

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
CURSO DE AGRONOMIA
AGR 99003 - ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO SUPERVISIONADO**

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

**PATRÍCIA BOLZAN DE OLIVEIRA
00209339**

Melhoramento de Tabaco (*Nicotiana tabacum L.*)



**Alliance One Brasil Exportadora de Tabacos Ltda
Pesquisa & Desenvolvimento**

PORTO ALEGRE, Setembro de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
CURSO DE AGRONOMIA

Melhoramento de Tabaco (*Nicotiana tabacum L.*)

PATRÍCIA BOLZAN DE OLIVEIRA
00209339

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do Grau de Engenheiro Agrônomo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Supervisor de campo do Estágio: Eng. Agr. Ms. Laize Fraga Espíndula, Supervisora de Pesquisa e Desenvolvimento, Alliance One Brasil Exportadora de Tabacos Ltda.

Orientador Acadêmico do Estágio: Prof. Dr. Christian Bredemeier, Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS.

COMISSÃO DE AVALIAÇÃO

Profa. Beatriz Maria Fedrizzi (Departamento de Horticultura e Silvicultura)
Prof. Alberto Vasconcellos Inda Junior (Departamento de Solos)
Prof. Fábio Kessler Dal Soglio (Departamento de Fitossanidade)
Profa. Carine Simioni (Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia)
Profa. Mari Lourdes Bernardi (Departamento de Zootecnia)
Prof. Samuel Cordeiro Vitor Martins (Departamento de Plantas de Lavoura)

PORTO ALEGRE, Setembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Mãe Maria pela saúde, vida, proteção e força em todos os momentos destes seis anos.

À minha família, principalmente aos meus pais João Jorge Rosa de Oliveira e Janir Bolzan de Oliveira, pela educação, incentivo, apoio, o agradecimento por todas as vezes que meu pai me buscou ou levou para pegar o ônibus nas saídas de campo, pois saíam muito cedo e chegavam muito tarde, enfim, por estarem comigo em todas as etapas de minha vida. Amo vocês!

Ao meu companheiro, amigo, namorado, futuro noivo, futuro marido Fernando Pontes de Borba pelo amor, paciência e inúmeras impressões de trabalhos.

À família do meu namorado, tio Lauro, tia Naninha, Paty, Alex, Cíntia, Arthur, pela acolhida, estadia, caronas e carinho durante meu estágio.

À UFRGS, pelo conhecimento transmitido de excelentes professores e pela estrutura disponibilizada principalmente para a Agronomia com a EEA (Estação Experimental Agronômica).

Ao meu orientador acadêmico, Prof. Christian Bredemeier, que com seu entusiasmo pela cultura do tabaco me influenciou a escolher o estágio, pela transmissão de conhecimentos, incentivo, apoio e confiança.

À empresa Alliance One Brasil, pela oportunidade da realização do estágio, principalmente para a orientadora Eng. Agr. Laize Fraga Espíndula, ao Sr. Claudir Paniz, aos Técnicos de Pesquisa Eduardo Somavilla e Edio Spindler, aos Coordenadores Alceliro Berle e Airton Leonhardt. Aos funcionários que tão bem me acolheram José de Almeida, Maurício Schneiders, Esônia Benazzi, Ivone dos Santos e a todos os demais colaboradores do centro de pesquisas em Vera Cruz, pelos conhecimentos transmitidos e apoio durante o período de estágio.

Aos colegas e amigos que fiz ao longo da graduação por contribuírem com a minha formação, Andrêss Sopelsa, Silvia Regina Pomatti, Guilherme Heisler, Mariana Martins Valli, Fernando Berlitz, Daiane de Almeida e tantos outros que marcaram minha passagem pela UFRGS.

RESUMO

O estágio foi realizado no município de Vera Cruz/RS, na empresa Alliance One Brasil Exportadora de Tabacos Ltda., na área de Melhoramento de Tabaco, no setor de Pesquisa & Desenvolvimento, nos meses de janeiro e fevereiro de 2016.

A empresa e a cultura foram escolhidas de modo a ampliar os conhecimentos sobre a cultura do tabaco e assim possibilitar abrir o “leque” de conhecimentos e possibilidades futuras, melhorando a formação técnica e profissional.

As atividades foram supervisionadas pela orientadora, técnicos e funcionários capacitados. Foram acompanhadas as atividades do programa do melhoramento do tabaco a campo e em laboratório, inoculação de *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) em folhas, atividades em laboratório para seleção de plantas, extração de DNA e colheita de capulhos.

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Localização do município de Vera Cruz no estado do Rio Grande do Sul	9
2. Solos da região de Vera Cruz/RS	10
3. Planta (A) e Inflorescência (B) de <i>Nicotiana tabacum</i>	12
4. Destino do Tabaco Brasileiro	13
5. Dados da Fumicultura do Brasil, Safra de 2014/15	14
6. Distribuição em percentual da produção de tabaco regiões do sul do Brasil	14
7. Representação do percentual utilizado para cada atividade na propriedade	15
8. Inflorescência recebendo pólen de <i>N. africana</i> (A) e plantas protegidas por TNT para evitar contaminação de outros pólenes (B)	17
9. Colheita de capulhos (A), Debulha de sementes (B), Limpeza das sementes (C) e Armazenamento de sementes (D)	18
10. Aparelho de Citometria de Fluxo (Citômetro)	19
11. Retirada de lâmina foliar das nervuras (A) e Identificação das nervuras (B)	21
12. Assepsia de nervuras (A) e Nervuras em meio de regeneração (B)	22
13. Brotações em nervura no meio de regeneração (A) e Brotações repicadas para meio de enraizamento (B)	22
14. Transferência das plantas enraizadas para vasos pequenos	22
15. Solução de Coloração e Reagente	23
16. Gráfico de uma planta haploide (A); Gráfico de uma planta tetraploide (B); Gráfico de uma planta duplo- haploide (C)	23
17. Transferência das plantas 2n para vasos maiores (A) e Cultivo em casa de vegetação (B)	24
18. Carborundum (A), Inoculação de TMV em folhas de tabaco (B) e Inóculo utilizados na inoculação de TMV (C)	24
19. Inoculação de TMV (A), Infecção em cultivares resistentes (B) e	

	Infecção em cultivares suscetíveis (C)	25
20.	PCR executado por Veriti® Thermal Cycler (A), Amostras acondicionadas em poços de gel (B) e Visualização do gel sob ultravioleta no transiluminador (C)	26
21.	Fotografia digital com resultados de resistência e suscetibilidade de plantas	26

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	8
2. Caracterização do meio físico e socioeconômico da região de realização do trabalho	9
2.1. Clima	9
2.2. Solo	9
2.3. Aspectos econômicos	10
3. Alliance One Brasil Exportadora de Tabacos Ltda.	10
4. Referencial teórico	11
4.1. Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	11
4.2. Programa de Melhoramento de Tabaco	15
4.2.1. Método de Retrocruzamento	16
4.2.2. Método Duplo-Haploide	16
4.2.3. Cruzamento Interespecífico	17
4.2.4 Cultura de Tecidos	19
4.3. TMV (Tobacco Mosaic Virus)	20
5. Atividades Realizadas	20
5.1 Atividade de Cultura de Tecidos e Citometria de Fluxo	20
5.2 Seleção de Resistência ao TMV (Tobacco Mosaic Virus)	24
6. Outras Atividades	25
6.1. Extração de DNA	25
6.2. Técnica Molecular de PCR (Polymerase Chain Reaction).....	26
7. Discussão	27
8. Considerações Finais	28
Referências Bibliográficas	29

1. INTRODUÇÃO

A área de interesse para realização do estágio surgiu para que houvesse a ampliação do leque de possibilidades em diferentes áreas, já que a área de formação diversificada complementar (FDC) escolhida foi a animal.

A cultura do tabaco (*Nicotiana tabacum L.*) possui grande importância socioeconômica para o Brasil, principalmente na região sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), com produção de aproximadamente 695.850 toneladas de folhas secas de tabaco na safra 2014/2015 (AFUBRA/IBGE, 2015).

O estágio foi realizado na empresa Alliance One Brasil Exportadora de Tabaco Ltda., na unidade de Pesquisa e Desenvolvimento, no município de Vera Cruz / RS. A empresa está localizada em uma das maiores regiões produtoras de tabaco do mundo, o Vale do Rio Pardo. A região foi inicialmente colonizada por alemães, que encontraram na cultura uma fonte de renda, assim como condições climáticas propícias para o crescimento do tabaco.

As atividades de campo tiveram a orientação da Engenheira Agrônoma Mestre Laize Fraga Espindula, supervisora de Pesquisa e Desenvolvimento da Alliance One Brasil, e do Professor Doutor Christian Bredemeier, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O estágio teve início em 5 de janeiro e término em 26 de fevereiro de 2016, totalizando 300 horas efetivas de estágio.

O estágio possibilitou a experiência de trabalhar e analisar a realidade de uma empresa privada, mais especificamente na área de melhoramento de plantas, compreendendo melhor as atividades, as tomadas de decisões e o trabalho em equipe.

2. CARACTERIZAÇÃO DO MEIO FÍSICO E SOCIOECONÔMICO DA REGIÃO DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

O município de Vera Cruz pertence à microrregião do Vale do Rio Pardo, centro-leste do Estado do Rio Grande do Sul (Figura 1) e está localizado a 167 km da capital Porto Alegre.

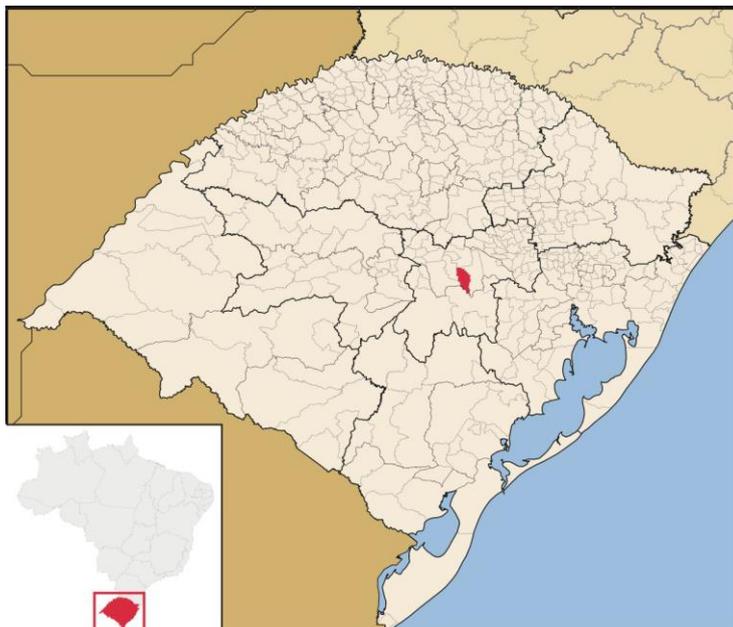


Figura 1: Localização do município de Vera Cruz no estado do Rio Grande do Sul. Fonte: Google, 2016.

2.1. CLIMA

O clima da região é subtropical úmido (Cfa), segundo a classificação climatológica de Köppen (1948).

O município possui temperatura média anual de 19°C, com máximas de 42°C e mínimas de 5°C, apresentando verões quentes e invernos frios, com pequenas ocorrências de geada. As chuvas ocorrem de 100 a 126 dias ao ano, com precipitação média anual de 1500 mm. (PREFEITURA MUNICIPAL DE SANTA CRUZ DO SUL, 2014).

As temperaturas são importantes para a cultura do tabaco, pois as geadas podem provocar grandes perdas na produção. Na região de realização do estágio, o transplante ocorre em agosto, quando as temperaturas começam a se elevar evitando, assim, riscos de geada.

2.2 SOLOS

Os solos da região são bastante variados, possibilitando o cultivo de diversas culturas como milho, arroz irrigado, tabaco, mandioca, feijão, batata, soja, cana-de-açúcar, amendoim

e arroz de sequeiro. Essa variação possibilita desde o cultivo do arroz irrigado em solo inundado, até o cultivo do tabaco, que exige solos com boa drenagem.

Os solos típicos da região de Vera Cruz (Figura 2) são: Nitossolo Vermelho e Argissolo Vermelho.

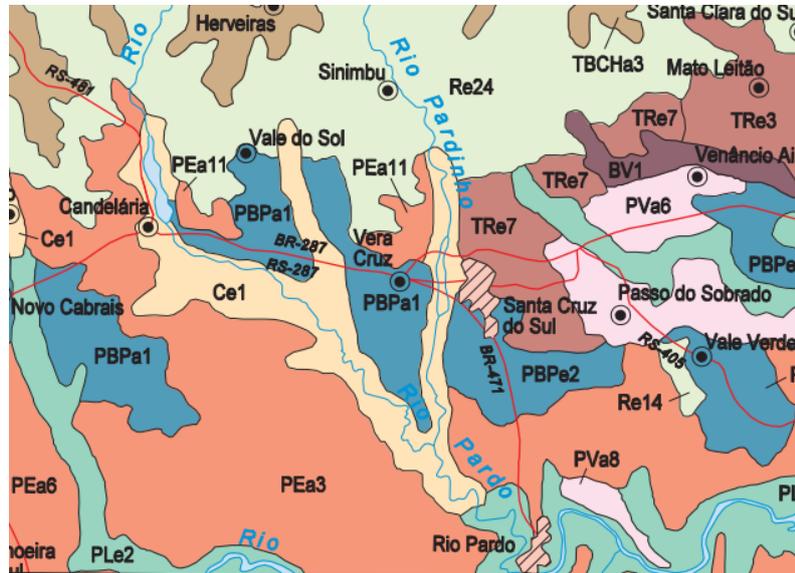


Figura 2: Solos da região de Vera Cruz/RS. Legenda: Nitossolo Vermelho (TRe), Argissolo Vermelho (PEa). Fonte: IBGE, 2002.

2.3 ASPECTOS ECONÔMICOS

O município de Vera Cruz possui aproximadamente 25 mil habitantes, com sua maioria fixada na zona urbana (55,5%) (Censo IBGE, 2010).

O tabaco predomina na economia do município, o qual possui oito grandes empresas fumageiras, entre elas a Alliance One Brasil. O município de Vera Cruz ocupa o 9º lugar na produção de tabaco no Rio Grande do Sul, sendo o 15º município maior produtor de tabaco no sul do Brasil. Na safra de 2012/2013, estima-se que o município concentrou 2.282 famílias produtoras. O valor bruto gerado pela safra de tabaco foi projetado em R\$ 66,650 milhões. O município possui em torno de 2,4 mil propriedades rurais, sendo que 95% destas cultivam o tabaco. (PREFEITURA MUNICIPAL DE VERA CRUZ, 2013).

3. ALLIANCE ONE BRASIL EXPORTADORA DE TABACOS LTDA.

A Alliance One Brasil Exportadora de Tabacos Ltda. surgiu de um acordo de fusão de duas grandes organizações do setor fumageiro, a DIMON Incorporated e a Standard Commercial Corporation, em novembro de 2004. Estas empresas eram representadas no país pela DIMON do Brasil e pela Meridional de Tabacos. Em 13 de maio de 2005, foi

concretizada essa união, surgindo assim uma das maiores companhias do mercado de tabaco em folha do mundo, com mais de 200 anos de experiência e conhecimento.

A empresa tornou-se a principal empresa na produção e beneficiamento de tabaco em folha do país, tendo sua produção distribuída em 45 países e suprindo fabricantes de cigarros de outros 90 países. No Brasil, possui unidades em Venâncio Aires/RS (Matriz, Polo logístico e Centro Administrativo - Compra/ Processamento), Vera Cruz/RS (Centro de Pesquisa, Produção de Sementes e Campo Experimental do Melhoramento), Passo do Sobrado/RS (Centro de Treinamento, Pesquisa e Desenvolvimento), Palmitos/SC, Canoinhas/SC, Rio do Sul/SC (Compra) e Rio Azul (PR) (Compra).

A Alliance One Brasil conta com 21 mil produtores contratados, em mais de 370 municípios, gerando 3,5 mil empregos diretos, entre efetivos e temporários. A empresa, processa anualmente mais de 200.000 toneladas de tabaco e, em 2010, ficou na 59ª posição das maiores companhias do Brasil, o que representa 20% de todo mercado de exportação de tabaco do país (ALLIANCE ONE, 2015).

A empresa cumpre todas as etapas do sistema de produção, desde o fornecimento de variedades próprias melhoradas, financiamento de insumos, custeio de safra e assistência técnica, garantindo também a compra do produto, participando, assim, de todo o ciclo da cultura.

O programa de melhoramento de tabaco da Alliance One tem como objetivos principais o melhoramento e seleção de cultivares tolerantes/resistentes a doenças como murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), amarelão (*Phytophthora glovera*), vírus do mosaico do tabaco (TMV), vírus Y da batata (PVY), *Pythium* e nematoides, assim como redução do teor da nicotina e melhoria de qualidade de folhas e produtividade do tabaco.

A empresa já lançou várias cultivares de fumos dos grupos Virgínia e Burley, algumas delas apresentando baixos teores de nicotina (PATENTGENIUS, 2010).

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. TABACO (*Nicotiana tabacum* L.)

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Figura 3) é uma planta nativa de regiões tropicais e subtropicais da América e pertence à família Solanaceae, sendo atualmente cultivada em todo mundo. Em 1561, Jean Nicot, de onde se originou o nome Nicotina, enviou sementes de tabaco para a França, para que fossem plantadas e a Rainha experimentasse os efeitos da planta no controle de suas enxaquecas. Com o sucesso do tratamento, o cultivo do tabaco se

popularizou. O hábito de fumar o tabaco originou-se na Espanha, através do charuto, e, somente por volta de 1840, começaram os relatos do uso de cigarro.

No Brasil, a cultura já era utilizada pelos povos indígenas, sendo as regiões de maior produção Salvador e Recife. A partir do século XIX, as mais importantes regiões produtoras passaram a ser Bahia, Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

No Rio Grande do Sul, na região de Santa Cruz do Sul, o tabaco é cultivado desde o século XIX, mais precisamente tabaco do grupo Virgínia, o qual teve maior produtividade na região.

O tabaco é bastante sensível à alta temperatura do ar e umidade do solo, sendo que solos bem drenados, temperaturas entre de 20-30°C e umidade do ar de 80-85% são os mais indicados para o crescimento. É uma planta alotetraplóide (48 cromossomos) e acredita-se que foi gerada a partir do cruzamento de *N. tomentosiformis* e *N. sylvestris*. É cultivada como planta anual, robusta e pouco ramificada, atingindo até 2,5 m de altura, com grandes folhas verdes e flores branco rosadas longas em forma de trompete.

Todas as folhas são cobertas por pelos. As folhas inferiores são as maiores, medindo em torno de 60 cm de comprimento. As flores têm cerca de 5 cm de comprimento, sendo que uma flor origina um fruto (capulho) com inúmeras sementes, muito pequenas, ovais ou em forma de rim, com coloração marrom (ALLIANCE ONE, 2016).



**Figura 3: Planta (A) e Inflorescência (B) de *Nicotiana tabacum*.
Fonte: Arquivo fotográfico da autora. Vera Cruz, 2016.**

O Brasil é o segundo maior país produtor de tabaco do mundo, ficando atrás somente da China, e é o maior exportador mundial (SINDITABACO, 2015). De acordo com a

AFUBRA (Associação dos Fumicultores do Brasil), a produção anual foi de aproximadamente 751 mil toneladas na safra de 2013/2014, e na safra de 2014/2015, de 697,6 mil toneladas (GAZETA DO SUL, 2015).

A safra brasileira em 2014/15 teve 85% da sua produção exportada. Os principais compradores são União Européia (43%), Extremo Oriente (25%), América do Norte (11%), Leste Europeu (8%), África/Oriente Médio (7%) e América Latina (6%) (Figura 4).

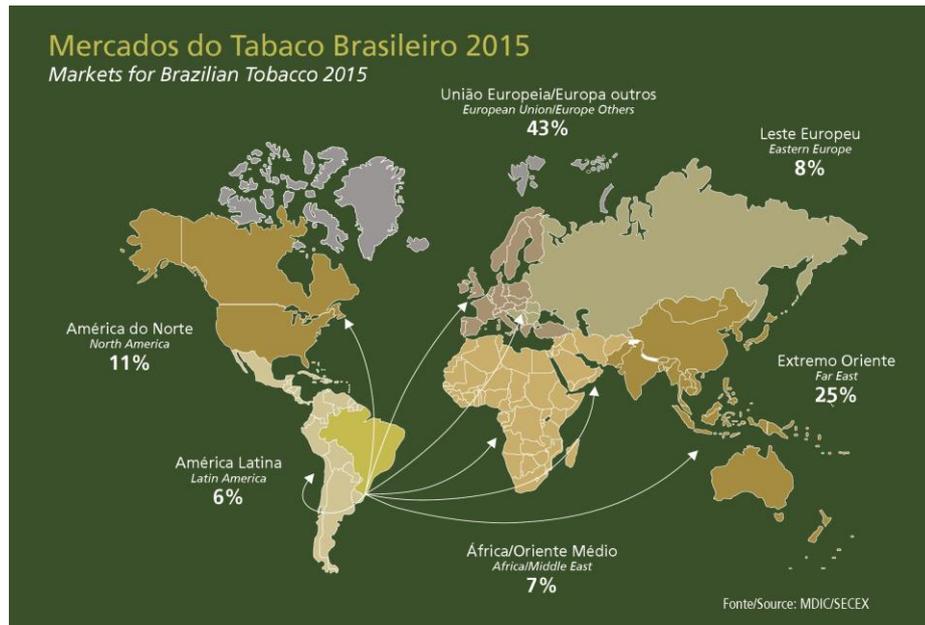


Figura 4: Destino do Tabaco Brasileiro.
Fonte: MDIC/SECEX- SINDITABACO, 2015

As lavouras de tabaco do Brasil obtiveram redução no uso de defensivos agrícolas de aproximadamente 83,3% nas últimas duas décadas. O tabaco está entre as culturas que utilizam menos ingredientes ativos por hectare, em torno de 1,1 kg de IA/ha. O investimento das empresas em pesquisas para o melhoramento de plantas tem garantido ao tabaco a condição de produto agrícola comercial que menos usa agrotóxicos no país, incrementando a responsabilidade ambiental e sustentabilidade do negócio (AGROLINK, 2013).

No Brasil, o tabaco tem um relevante papel socioeconômico. A indústria movimenta em torno de cinco bilhões de reais por ano (Figura 5), gerando dois milhões de empregos, sendo cerca de 700.000 diretos e aproximadamente 1.400.000 indiretos (AFUBRA, 2015).

FUMICULTURA BRASILEIRA								
Safrá: 2014/15*								
REGIÃO	Nº de	FAMÍLIAS	HECTARES	PRODUÇÃO	Partic.	kg/ha	VALOR	
	Estados	produtoras	plantados	Ton	%		R\$/kg	Total
Sul	3	153.730	308.260	695.850	97,9	2.257	7,23	5.029.085.000,00
Nordeste	7	14.420	12.975	14.715	2,1	1.134	2,42	35.563.000,00
Outras	4	380	285	245	0,0	860	5,42	1.328.000,00
TOTAL	14	168.530	321.520	710.810	100	2.211	7,13	5.065.976.000,00

Figura 5: Dados da Fumicultura do Brasil, Safrá de 2014/15.

Fonte: AFUBRA/IBGE, 2015.

A maior produção de tabaco no Brasil se dá nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, com cerca de 96% do total produzido, sendo os outros 4% produzidos na Bahia e Alagoas, na região do Nordeste (ABIFUMO, 2012). Dos 1.191 municípios que formam a região sul, 55% são produtores de tabaco (655 municípios). O Rio Grande do Sul tem a maior parcela, em torno de 52% da produção de tabaco (Figura 6). Na maioria das propriedades, o cultivo do tabaco é a principal atividade econômica.

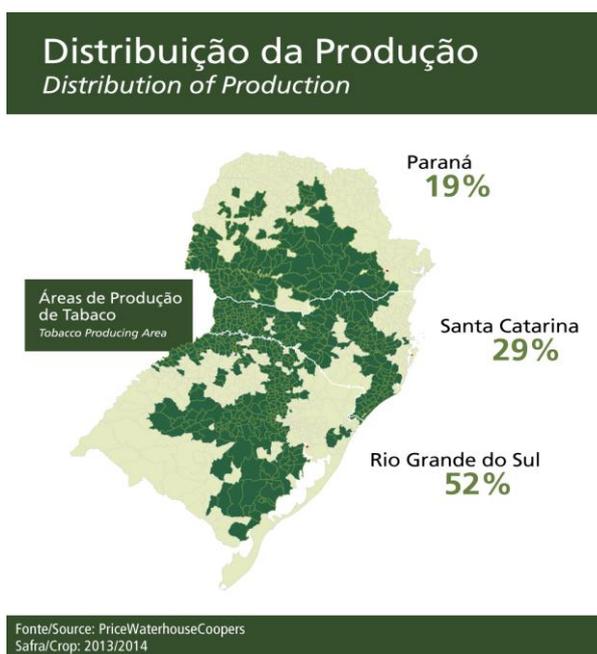


Figura 6: Distribuição em percentual da produção de tabaco regiões do sul do Brasil.

Fonte: PriceWaterhouseCoopers- AFUBRA, 2015.

Venância Aires ocupa a primeira colocação no ranking de municípios produtores, com 21,5 toneladas produzidas de acordo com os dados da Associação do Fumicultores do Brasil (AFUBRA, 2015).

As propriedades que cultivam tabaco possuem, em média, 15,7 hectares, sendo que apenas 15,4% da propriedade são destinadas à produção do tabaco (2,5 ha), o que corresponde a 53% da renda do produtor (Figura 7).

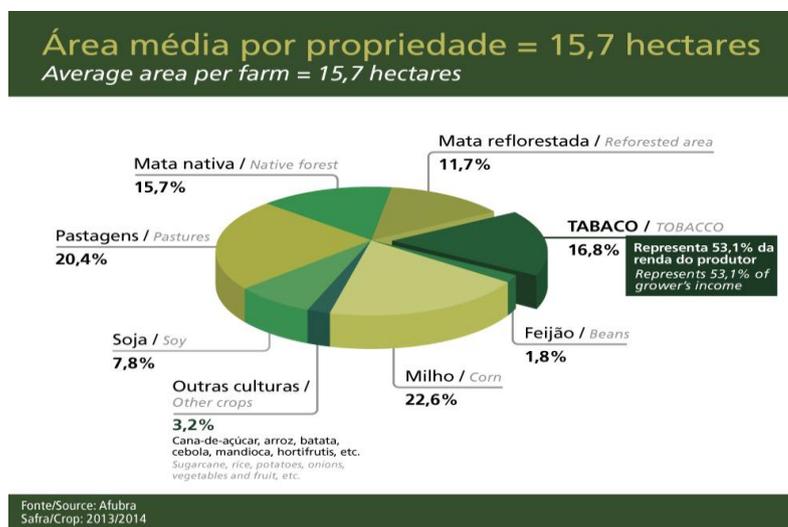


Figura 7: Representação do percentual utilizado para cada atividade na propriedade. Fonte: AFUBRA, 2013/14.

4.2. PROGRAMA DE MELHORAMENTO DE TABACO

Os principais objetivos do melhoramento de plantas é desenvolver cultivares superiores, de melhor qualidade, mais produtivas, tolerantes e que se adaptam facilmente em novos ambientes de cultivo. Para que estes objetivos sejam alcançados se faz necessário o ajuste das melhorias genéticas, eficiência na seleção dos genótipos mais promissores, e presença de variabilidade genética (MAIA, 2007).

Na cultura do tabaco, os principais objetivos do melhoramento genético são: a melhoria da qualidade, produtividade e obtenção de resistência às principais doenças que atacam a cultura, como a murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), as viroses (TMV, PVY e TSWV), nematoide de galha (*Meloidogyne incognita*), a tolerância ao amarelão (*Phytophthora glovera*), e a obtenção de cultivares com baixos teores de alcaloides (FARIAS, 2007).

A empresa possui um programa de melhoramento de plantas bem estruturado, com objetivos que buscam desde a tolerância ou resistência de plantas a doenças (doenças viróticas, bacterianas e nematoides; produtividade da cultura e diminuição dos teores de nicotina).

4.2.1. MÉTODO DE RETROCRUZAMENTO

O tabaco foi importante nas pesquisas genéticas envolvendo a tecnologia do DNA recombinante, cultura de tecidos, mutação induzida e outras, por ser considerada uma planta modelo.

No programa de melhoramento da Alliance One, utiliza-se o método de retrocruzamento ou *backcross*, o qual proporciona a transferência ou modificação de algumas características, principalmente de genes de resistência.

O retrocruzamento consiste basicamente em selecionar uma planta com alguma característica que se deseja transferir e em realizar uma hibridização entre uma planta F1, descendente de um cruzamento, com um de seus parentais. O parental geralmente já possui um ótimo material comercial, mas possui alguma falha em determinada característica, enquanto o doador é uma espécie selvagem que possui um gene para reparar essa falha.

O híbrido obtido será retrocruzado várias vezes com o parental, para ter as mesmas características de produtividade e qualidade, acrescidas da nova característica. Em média, seis gerações de retrocruzamentos são suficientes para recuperar em torno de 99% da genética original da população parental (BESPALHOK, GUERRA E OLIVEIRA, 2011).

4.2.2. MÉTODO DUPLO-HAPLOIDE

Outro método muito utilizado pela empresa é o duplo-haploide. O melhoramento de plantas é um processo longo e o método duplo-haploide é utilizado para reduzir esse tempo.

Os gametas (pólen e óvulo) são células haploides e, através da duplicação do número de cromossomos de um haploide, obtém-se uma linhagem homozigota em apenas uma geração. A planta obtida pela duplicação de cromossomos de um haploide é chamada de Duplo-Haploide. Essas plantas são menos vigorosas que as diploides e possuem alto grau de esterilidade (BESPALHOK, 2009).

A principal maneira que a empresa utiliza na obtenção de haploides é por cruzamento interespecífico, mas também obtém pela cultura de anteras ou androgênese.

O método duplo-haploide é uma técnica de melhoramento que consiste na obtenção de genótipos haploides a partir de uma planta-segregante $2n$, que pode ser usada para selecionar diversas características de interesse. Este método consiste no cruzamento de *N. tabacum* (com características de interesse), que será fecundada com a espécie *N. africana*, resultando na geração F1 gerada de um cruzamento interespecífico que gera progênes com número diferentes de cromossomos.

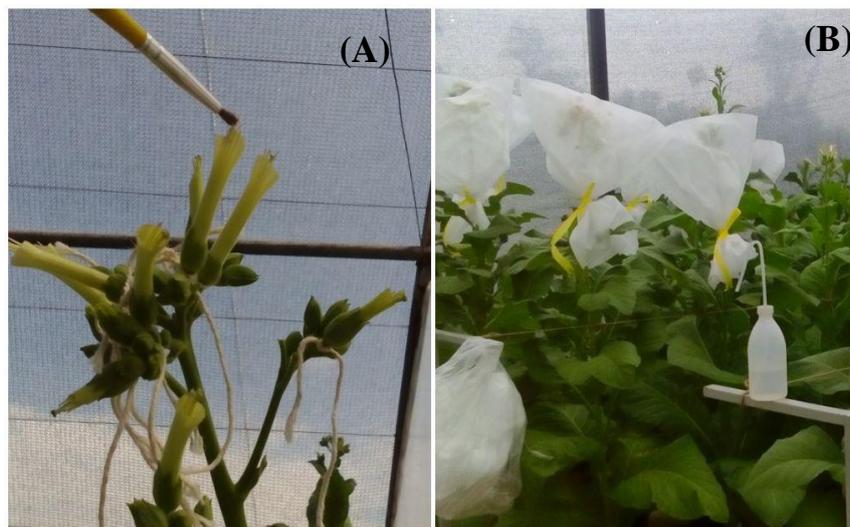
N. africana é uma espécie selvagem, sendo explorada em programas de melhoramento. É utilizada com o objetivo de simular a parte masculina na reprodução sexuada (meiose), fazendo com que as sementes produzidas por esta pseudofecundação tenham na sua constituição genética, número haploide de cromossomos. Esses cromossomos são provenientes de somente um dos genitores.

4.2.3. CRUZAMENTO INTERESPECÍFICO

A *N. tabacum* possui 48 cromossomos e a *N. africana* 46. No cruzamento, surgem plantas haploides com 24 cromossomos, com características da *N. tabacum*, e com 23 cromossomos, com características de *N. africana*, que não são de interesse do melhoramento.

As plantas são cultivadas em laboratório e em casa de vegetação, com os cuidados necessários para produzirem flores, com qualidade desejada. Com auxílio de uma pinça, evitando a autofecundação, as flores de *N. tabacum* que receberam o pólen sofrem uma toaleta, ou seja, o rompimento de parte das pétalas, retirando todas as anteras antes da flor abrir e o pólen ser liberado (~5 anteras) (Figura 8.A). O estigma exposto recebe o pólen de *N. africana* e, posteriormente, são protegidos individualmente com canutilhos e a inflorescência por capas de TNT para evitar contaminação com outro pólen (Figura 8.B).

A flor polinizada artificialmente é identificada com etiqueta. Após passadas algumas semanas da polinização, os capulhos são colhidos e colocados para secagem em estufa, com temperaturas de aproximadamente 25°C, sendo que, após a secagem, é feita a debulha e limpeza das sementes. As sementes limpas são depositadas em frascos, identificadas e colocadas em câmara fria, para melhor conservação (Figura 9) (ALLIANCE ONE, 2016).



**Figura 8: Inflorescência recebendo pólen de *N. africana* (A) e Plantas protegidas por TNT para evitar contaminação de outros pólenes (B).
Fonte: Arquivo fotográfico da autora. Vera Cruz, 2016.**

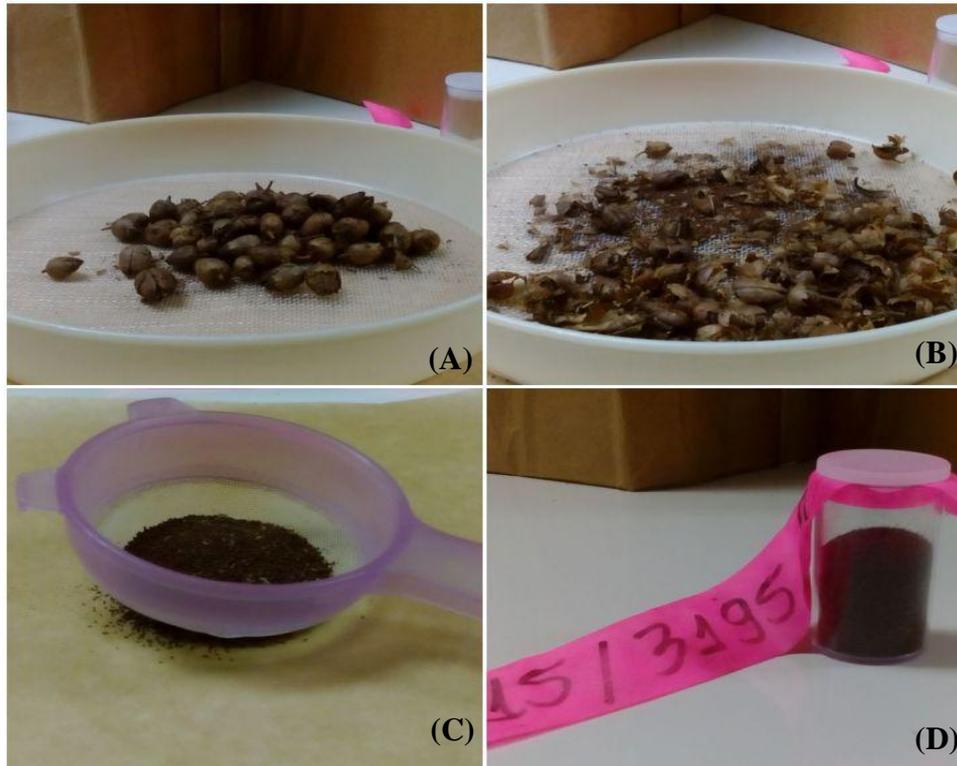


Figura 9: Colheita de capulhos (A), Debulha de sementes (B), Limpeza das sementes (C) e Armazenamento de sementes (D).

Fonte: Arquivo fotográfico da autora. Vera Cruz, 2016.

As sementes oriundas da fecundação interespecífica são semeadas, sendo então obtidas plantas com características da espécie *N. africana*, *N. tabacum* e de ambas. No entanto, somente as plantas com características de *N. tabacum* tem interesse para o melhoramento. As plantas de *N. africana* podem ser diferenciadas das de *N. tabacum* por características fenotípicas, como formato redondo-ovalado, folhas mais grossas, coloração verde escura e presença de anomalias nas folhas. Uma vez identificadas nas sementeiras as plântulas candidatas a serem duplo-haploides, faz-se a aferição do nível de ploidia. Para tal, usa-se o aparelho de citometria de fluxo (Figura 10), que permite a identificação rápida e precisa destas plantas. Este aparelho faz a contagem de células e núcleos, escaneando cada núcleo e aferindo o nível de ploidia destes (OLIVEIRA, 2010).



**Figura 10: Aparelho de citometria de fluxo (Citômetro);
Fonte: Arquivo fotográfico da autora, Vera Cruz, 2016.**

4.2.4. CULTURA DE TECIDOS

As plantas duplo-haploides são cultivadas em casa de vegetação a fim de fornecerem material vegetal para cultura de tecidos. As nervuras das plantas haploides são coletas e inseridas em meio de cultura de regeneração (meio R), para dar origem a plantas duplo-haploides. A duplicação do número de cromossomos ocorre naturalmente no meio de cultura, a partir de *callus*, as plântulas são retiradas do meio de regeneração e transferidas para meio de enraizamento, após é realizado a aferição do nível de ploidia. As plantas duplicadas, os duplo-haploides, são transferidas para substrato e em casa de vegetação onde é realizada a autofecundação destes materiais. Esta duplicação é possível através da reprodução mitótica, por meio de cultura de tecidos em um meio de regeneração, denominado meio de cultura “R”, que é composto por macro e micronutrientes, vitaminas, glicina, hormônios (auxina e citocinina), sacarose, inseticida, fungicida e agar.

A duplicação do número de cromossomos faz com que as sementes oriundas da autofecundação destes materiais sejam férteis. (ALLIANCE ONE, 2016).

A cultura de tecidos vegetais é um método com alto potencial no melhoramento vegetal. Ela pode ser empregada na multiplicação de material genético, na troca e na avaliação de germoplasma e também, na produção de mudas livres de vírus. Nessa técnica, pequenos pedaços de tecido vivo, são isolados de uma estrutura vegetal, descontaminados e cultivados assepticamente em um meio de cultura apropriado (Alves et. al., 2008).

4.3. TMV (Tobacco Mosaic Virus- Vírus do Mosaico do Tabaco)

Os sintomas desse vírus são uma coloração verde-clara entre as nervuras das folhas, seguida pelo desenvolvimento do mosaico típico (coloração verde-clara e coloração verde-escura), principalmente em folhas jovens. O mosaico não resulta na morte da planta, mas se a infecção ocorre no início do desenvolvimento, as plantas ficam atrofiadas. As folhas baixas estão sujeitas a queimadura de mosaico, principalmente em épocas de clima quente e seco. A transmissão do vírus se dá por contato mecânico de planta para planta ou através do homem, o principal transmissor (PROFIGEN BRASIL, 2016).

5. ATIVIDADES REALIZADAS

Durante o estágio, foram realizadas atividades na área de melhoramento de tabaco.

A Alliance One possui um programa de melhoramento de plantas bem estruturado e com objetivos que buscam tolerância/resistência de plantas para doenças viróticas e bacterianas, as quais diminuem consideravelmente a produtividade da cultura.

A empresa possui um laboratório onde são realizadas atividades de citometria de fluxo, extração de DNA de plantas e cultura de tecidos, entre outras atividades. Conta com casas de vegetação que possibilitam condições ótimas para o crescimento da cultura, acelerando, assim, a obtenção de resultados.

A atividade mais observada e executada foi o uso da citometria de fluxo e cultura de tecidos no desenvolvimento de plantas duplo-haploides. Também foram observados, a extração de DNA e a realização da técnica molecular de PCR.

5.1. ATIVIDADE DE CULTURA DE TECIDOS E CITOMETRIA DE FLUXO

Os tecidos vegetais utilizados no método de cultura de tecidos para obtenção de plantas duplo-haploides são oriundos da coleta de folhas de plantas haploides próximas ao caule, com nervuras de diâmetro médio de 1 cm. É recomendada a realização de coleta de folhas antes do florescimento, sendo que folhas de plantas mais jovens possuem maior percentual de regeneração. As folhas são coletadas e levadas para o laboratório, onde se realiza a retirada da lâmina foliar (Figura 11.A), deixando as nervuras com aproximadamente 5 cm de comprimento, sendo posteriormente identificadas com etiqueta (Figura 11.B).

Após, realiza-se a assepsia das nervuras (Figura 12.A), realizada em câmara de fluxo. Utilizou-se 4 frascos tipo Becker de 250 mL. Cada nervura foi imersa em solução de etanol 70% durante 1 minuto, passando posteriormente por 3 imersões em solução de hipoclorito de

sódio 1%, durante aproximadamente 10 minutos cada. Após a descontaminação das nervuras, estas foram lavadas com aproximadamente 500 mL de água destilada, autoclavadas, e depositadas em meio de cultura “R”, em frascos Erlenmeyer (Figura 12-B).

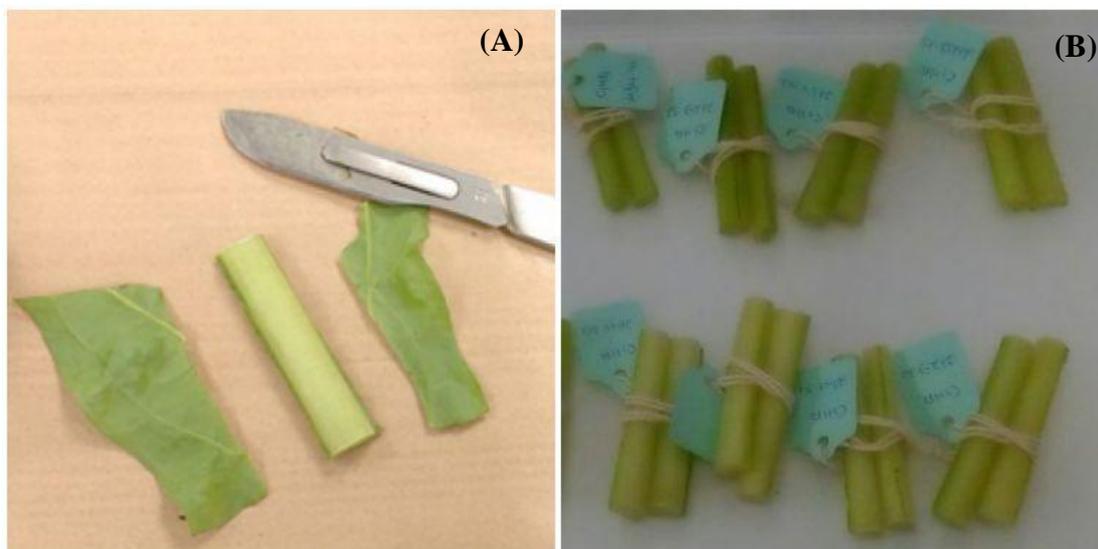


Figura 11: Retirada de lâmina foliar das nervuras (A) e Identificação das nervuras (B). Fonte: Konzen, L.H., Vera Cruz, 2015 (A); Arquivo Fotográfico da Autora, Vera Cruz, 2016 (B).

Os frascos foram fechados com papel celofane estéril, devidamente identificados e colocados na câmara de germinação (BOD), com temperatura constante de 25°C e fornecimento de luz 24 horas por dia, durante aproximadamente 30 dias, a fim de promover o desenvolvimento de calos/brotos vegetativos para formação de novas plantas (Figura 13.A). Os brotos que apresentam características morfológicas da planta diploide de interesse são repicados para outros frascos Erlenmeyer, contendo meio de enraizamento (Figura 13.B), em seguida são fechados com celofane e identificados, voltando então para BOD, com luz constante e temperatura de 25°C por mais 20 dias, até a formação de raízes. Após o enraizamento, as plantas são transferidas para vasos (Figura 14) contendo substrato misto, os quais são mantidos em bandejas com lâmina d'água de aproximadamente 3 cm, ficando em sala de crescimento por 7 dias. Por fim, realiza-se nova verificação de ploidia (Citometria), verificando e confirmando a duplicação dos cromossomos.

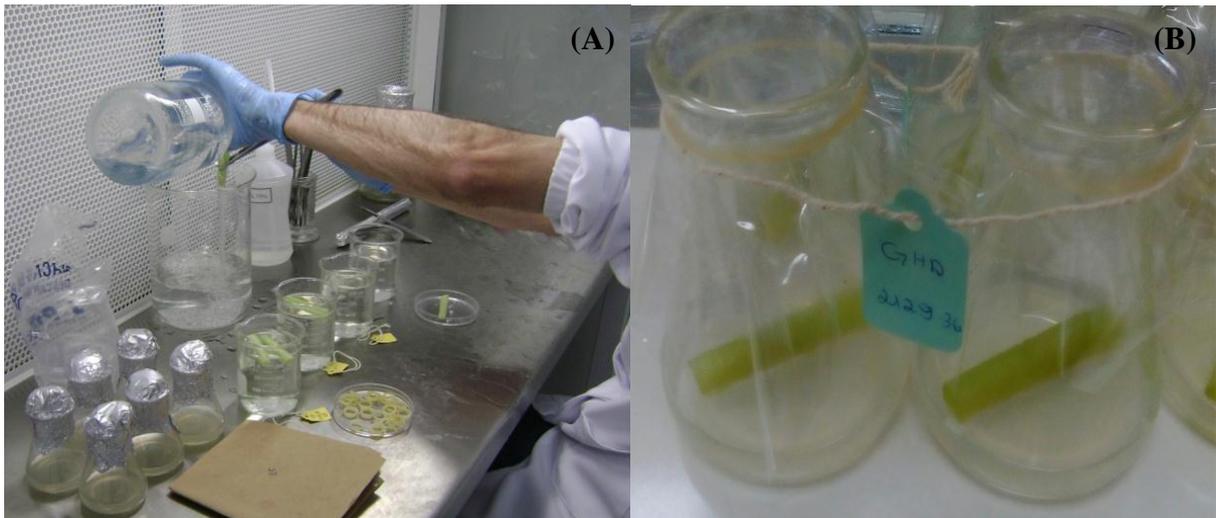


Figura 12: Assepsia de nervuras (A) e Nervuras em meio de regeneração (B).
Fonte: Oliveira, E., Vera Cruz, 2010 (A) e Arquivo fotográfico da autora, Vera Cruz, 2016 (B).

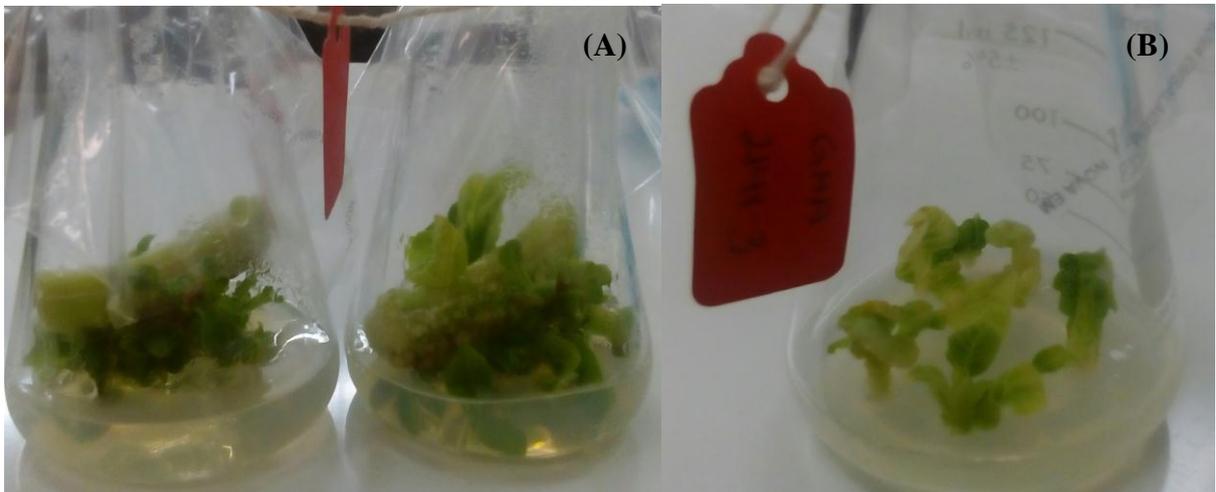


Figura 13: Brotações em nervura no meio de regeneração (A) e Brotações repicadas para meio de enraizamento (B). Fonte: Arquivo fotográfico da autora, Vera Cruz, 2016.



Figura 14: Transferência das plantas enraizadas para vasos pequenos.
Fonte: Arquivo fotográfico da autora, Vera Cruz, 2016.

A análise é feita com a coleta de uma folha por planta, preferivelmente as folhas mais jovens, sendo coletada cerca de 0,5 cm da lâmina de cada folha. Após, é adicionado reagente (Nuclei Extraction Buffer) 300 μ L e solução de coloração (Staining Buffer) 1200 μ L (Figura 15). A lâmina é macerada para extração, sendo o material posteriormente filtrado e depositado em um tubo. Todo o trabalho de leitura é realizado com o uso de testemunhas duplo-haploide, observando através de um gráfico se as plantas possuem ou não gráficos semelhantes.

Plantas haploides apresentavam seu gráfico com pico na metade do valor da testemunha diploide (Figura 16.A) e plantas tetraploides apresentam seu gráfico com pico no dobro do valor da testemunha diploide (Figura 16.B). Depois de realizado o trabalho de citometria, as plantas não duplo-haploides são eliminadas e as plantas duplo-haploides voltam para sala de crescimento e se desenvolvem durante mais 21 dias.



Figura 15: Solução de coloração e reagente.
Fonte: Arquivo fotográfico da autora, Vera Cruz, 2016.

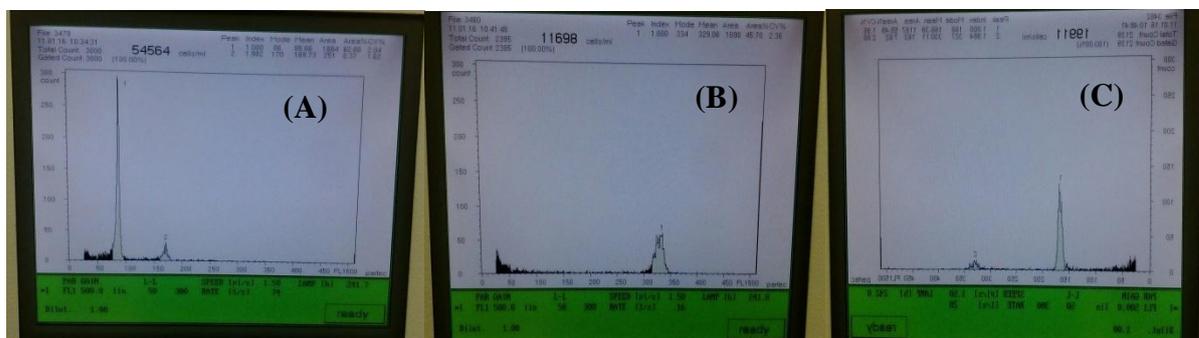


Figura 16: Gráfico de uma planta haploide (A); Gráfico de uma planta tetraploide (B); Gráfico de uma planta duplo-haploide- testemunha (C).
Fonte: Arquivo fotográfico da autora, Vera Cruz, 2016.

As plantas 2n são transferidas para vasos maiores, os quais serão depositados para cultivo em casa de vegetação para trabalhos de seleção, retrocruzamentos, entre outros (Figura 17).

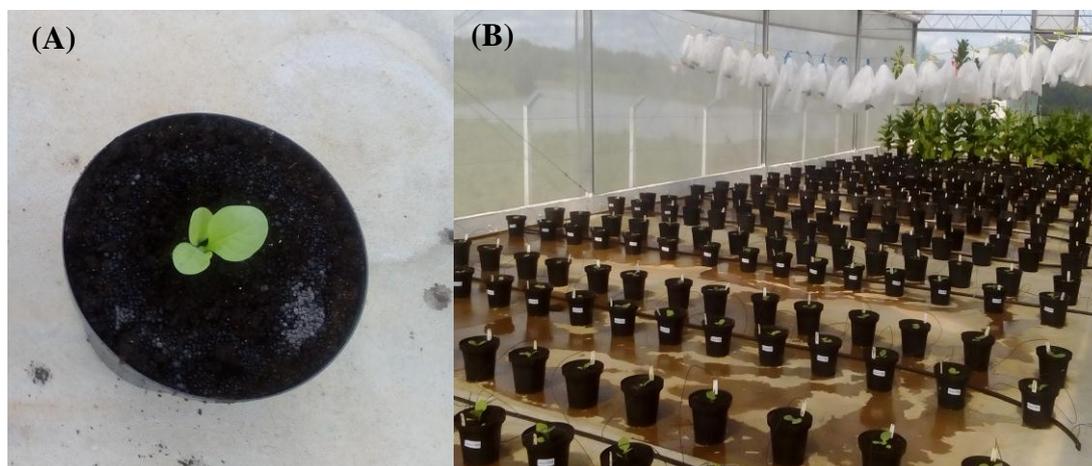


Figura 17: Transferência das plantas 2n para vasos maiores (A) e Cultivo em casa de vegetação (B). Fonte: Arquivo fotográfico da autora, Vera Cruz, 2016.

5.2. SELEÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOBACCO MOSAIC VIRUS (TMV)

Para a produção de inóculo de vírus do mosaico do tabaco (TMV), previamente realizou-se a inoculação do vírus nas plantas suscetíveis. Para a inoculação, foi feito preparo do inóculo, que foi depositado em um copo plástico, adicionou-se carborundum (produto abrasivo), o qual facilita a infecção na planta (Figura 18.A). O inóculo preparado foi friccionado nas folhas das plantas com auxílio de uma haste de madeira envolvida com algodão (Figura 18.B). Após o desenvolvimento das plantas, realizou-se coleta das folhas, que foram levadas para laboratório onde o inóculo foi extraído e armazenado (Figura 17.C).

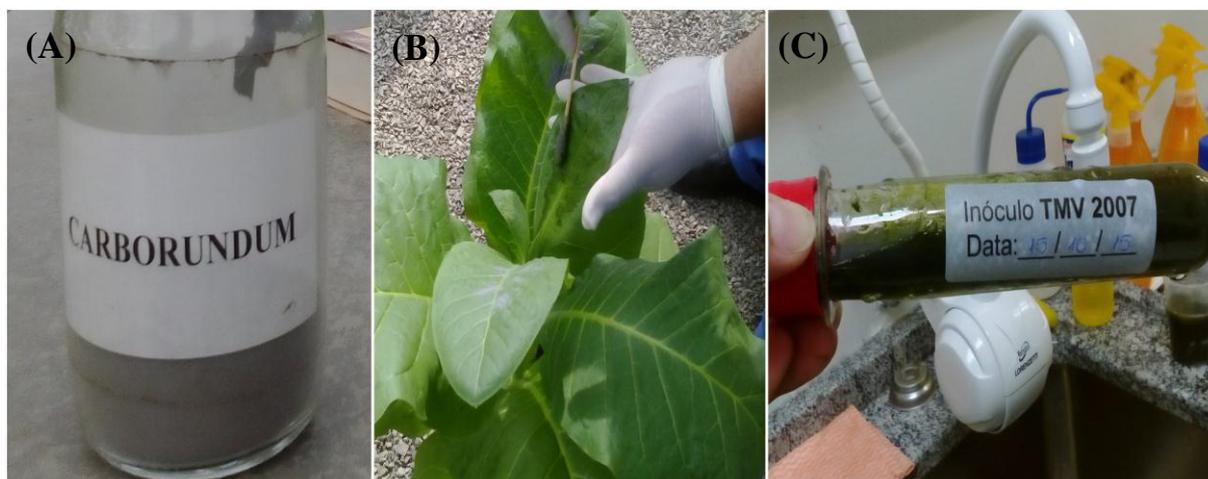


Figura 18: Carborundum (A), Inoculação de TMV em folhas de tabaco (B) e Inóculo utilizados na inoculação de TMV (C). Fonte: Arquivo fotográfico da autora, Vera Cruz, 2016.

Posteriormente, foram realizados testes de resistência ao TMV, onde foi coletada uma folha por planta ainda na fase de mudas. As folhas foram identificadas, inoculadas e acondicionadas em grades parcialmente imersas em bandejas com água, mantidas sob luz e temperatura controladas. Para a inoculação, o inóculo foi descongelado, depositado em um copo plástico e misturado com carborundum para facilitar a infecção na planta. O inóculo foi passado nas folhas com auxílio de uma haste de madeira envolvida com algodão (Figura 19.A). Os resultados da primeira leitura foram obtidos aproximadamente após 7 dias, enquanto os resultados da segunda leitura foram obtidos após 14 dias. As plantas resistentes apresentaram pontos típicos de necrose (hipersensibilidade ao vírus) distribuídos na lâmina foliar (Figura 19.B), e as suscetíveis não formaram pontos de hipersensibilidade, não demonstrando modificações (Figura 19.C).

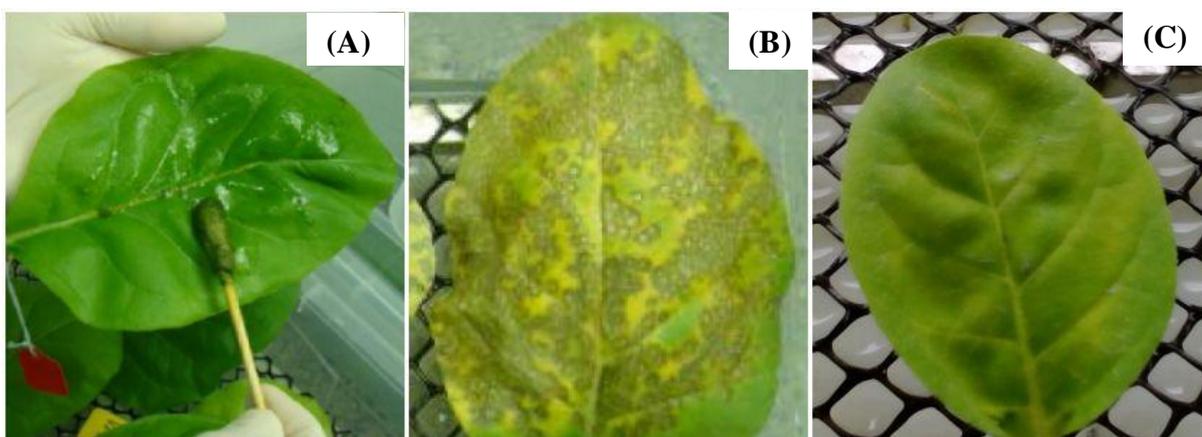


Figura 19: Inoculação de TMV (A), Infecção em cultivares resistentes (B) e Infecção em cultivares suscetíveis (C).

Fonte: Heintze. W., Vera Cruz, 2011 (A) e Arquivo fotográfico da autora, Vera Cruz, 2016 (A e B).

6. OUTRAS ATIVIDADES

6.1. EXTRAÇÃO DE DNA

A resistência de uma planta é feita pela presença ou ausência de genes, podendo ser identificada através de marcadores moleculares, pela análise da variabilidade do DNA que permite determinar pontos de referência nos cromossomos.

Na extração de DNA é realizada a maceração do material vegetal, segue-se o protocolo da empresa e obtêm-se DNA diluído.

6.2. TÉCNICA MOLECULAR DE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Na técnica molecular de PCR (*Polymerase chain reaction*), realizou-se primeiramente a preparação das amostras, onde é depositado o DNA extraído. Posterior à obtenção das amostras, seguiu-se um programa específico de PCR através do Veriti® Thermal Cycler (Figura 20.A).

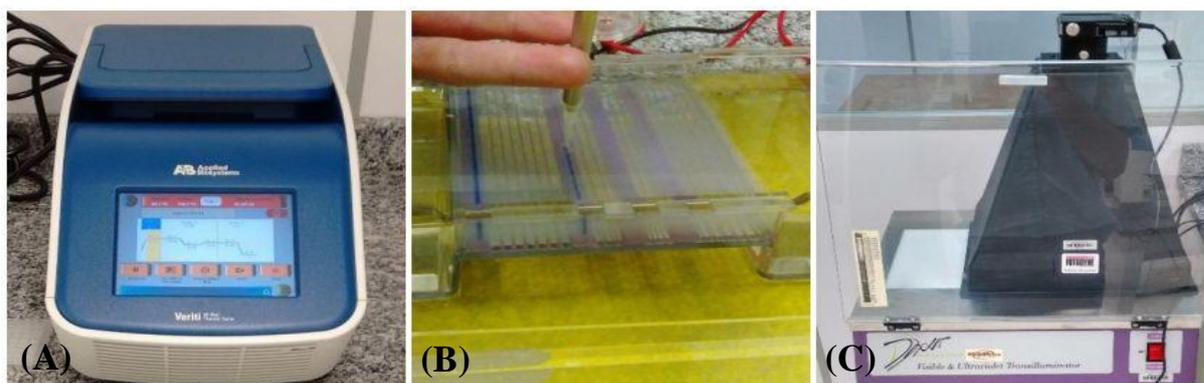


Figura 20: PCR executado por Veriti® Thermal Cycler (A), Amostras acondicionadas em poços de gel (B) e Visualização do gel sob ultravioleta no transiluminador (C). Fonte: Konzen, L.H., Vera Cruz, 2015 (A e C) e Arquivo fotográfico da autora, Vera Cruz, 2016 (B).

Ao final do programa, foi realizada a eletroforese em gel de agarose (Figura 20.B). Após passado o tempo de corrida, observou-se o gel sob luz ultravioleta no transiluminador (Figura 20.C) e registrou-se uma fotografia digital (Figura 21), na qual registra-se a expressão de genes de resistência de cada planta, em destaque, no caso para gene de TMV, onde “R” identifica a amostra com o gene de resistência, e “S” a amostra sem o gene ou suscetível.

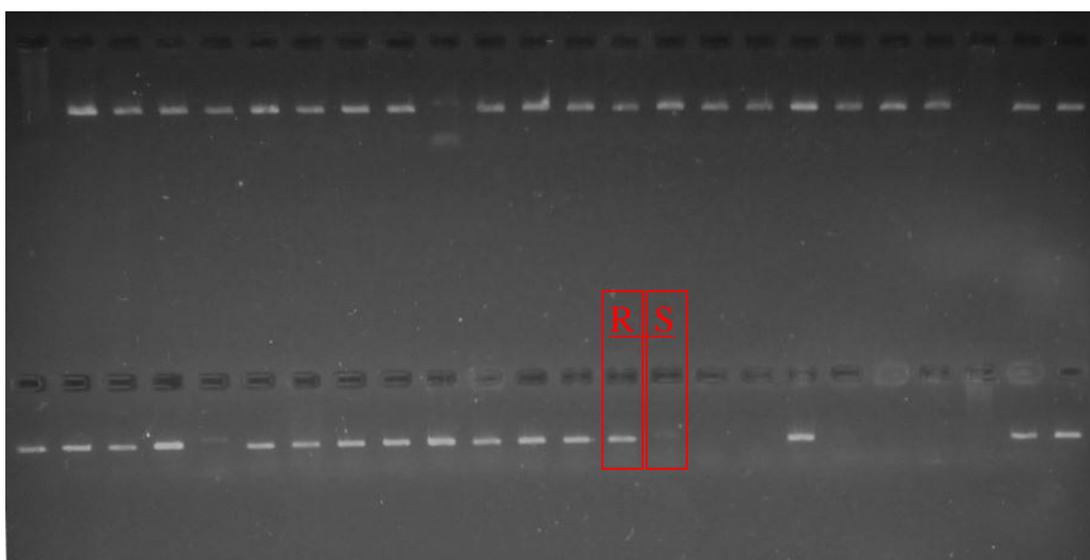


Figura 21: Fotografia digital com resultados de resistência e suscetibilidade de plantas. Fonte: ALLIANCE ONE, Vera Cruz, 2016.

7. DISCUSSÃO

Os métodos utilizados pela empresa são condizentes com os métodos utilizados em mais de 200 espécies para o melhoramento de plantas. Alguns estudos sobre o uso de duplo-haploide (DH) foram realizados por Gomez pando et al. (2009), demonstrando que linhagens DH de cevada possuíam potencial produtivo e qualidade nutricional para serem aproveitadas pela indústria. Essa tecnologia demonstrou-se viável financeiramente e efetiva na redução no tempo de obtenção das plantas resistentes.

O uso da técnica DH (duplo-haploide) compensa pelos termos financeiros e pela possibilidade de obtenção de linhagens em um tempo menor, além de estas linhagens estarem propícias ao uso como parentais na produção de híbridos comerciais. A tecnologia de DH é utilizada pelas empresas, devido ao fato que, segundo Morris et al. (2003), a liberação de cultivares pode ser feita em um tempo menor, acelerando a obtenção linhas geneticamente homogêneas.

O vírus do mosaico do tabaco (TMV) é um vírus que infecta plantas, principalmente o tabaco e outras plantas da família Solanaceae. O melhor método para evitar o TMV é o uso de cultivares resistentes, segundo Profigen Brasil (2015). A Alliance One busca essas plantas resistentes, com a obtenção de plantas duplo-haploide, principalmente através do método de cruzamento interespecífico.

A resistência a doenças é um dos principais objetivos do melhoramento, pois o controle de doenças através do uso de variedades resistentes é o mais viável economicamente e de fácil utilização, além de possibilitar uma menor agressão ao meio ambiente e ao produtor. No estágio foi observado que a obtenção dessas plantas resistentes além de diminuir o custo de produção também acabam aumentando a produtividade, por reduzir os danos causados pelas pragas e doenças.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O melhoramento genético busca cada vez mais ampliar o número de cultivares resistentes a determinadas doenças, diminuindo, assim, o número de aplicações de defensivos e reduzindo os custos de implantação das lavouras e os possíveis impactos causados pela aplicação de produtos químicos.

O estágio foi de grande importância para uma maior percepção de como são realizadas as atividades típicas e a organização de um programa de melhoramento genético.

O período de duração foi curto, sabendo que poderia ser vista uma gama muito maior de experimentos, caso fosse mais extenso, porém possibilitou acompanhamento de atividades práticas que não são abordadas em sala de aula, tornando-o muito satisfatório.

O estágio curricular supervisionado é uma grande oportunidade de unir o conhecimento teórico adquirido em sala e demonstrar sua aplicação prática.

As atividades desenvolvidas na Alliance One proporcionaram uma visão geral sobre a cultura do tabaco, ampliando os conhecimentos na área de melhoramento de plantas dessa cultura. Proporcionou também uma visão geral sobre o funcionamento e a organização de uma grande empresa do setor fumageiro. A empresa e os funcionários foram muito acolhedores, contribuindo para um ambiente de trabalho muito produtivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIFUMO, Associação Brasileira da Indústria do Fumo. **Produção de Fumo**. 2012. Disponível em: <http://www.abifumo.org.br/produ.htm>, acessado em 05 de jul. 2016.
- AFUBRA, **Associação dos Fumicultores do Brasil**, site da internet: <http://www.afubra.com.br>, acessado em 04 jul. 2016.
- AGROLINK, **Setor do tabaco tem programa na devolução de embalagens de agrotóxico**. 2013. Disponível em: http://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/noticia/setor-do-tabaco-tem-programa-na-devolucao-de-embalagens-de-agrotoxicos_179672.html, acessado em 05 de jul.2016.
- ALLIANCE ONE. Manual da Cultura do Tabaco. [S.I. : s. n.], 2015. 252p.
- BESPALHOK F. **Método de Duplicação de Haplóide**, In: BESPALHOK F., GUERRA E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. 2011. Disponível em: <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br.>, p.1-3.
- BESPALHOK F., GUERRA E. P.; OLIVEIRA, R. **Método de Retrocruzamento**. In: BESPALHOK F., GUERRA E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. 2011. Disponível em: <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br.>, p. 11-17.
- ALVES, C., OLIVEIRA, J., REIS, E., CORRÊA, R., SOUZA, J., SILVA, J.C., PAULA, J.C., RODRIGUES, L.H., SOUZA, M.A., MENDONÇA, M. **A Cultura de Tecidos na Agricultura**. I Jornada Científica e VI FIPA do CEFET BambuÍ. 2008. Disponível em: http://www.cefetbambui.edu.br/str/artigos_aprovados/Ci%C3%A4ncias%20Agrarias/14-PT-12.pdf, acessado em 10 ago. 2016.
- FARIAS, G. J. **Melhoramento Genético do Fumo (*Nicotiana tabacum* L.)**. Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Seminário em Genética e Melhoramento de Plantas. USP, Piracicaba-SP. 2007. Disponível em: <http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/GJFarias-200702-Resumo.pdf?PHPSESSID=80f9bec183038b57dc807a972240f17f>, acessado em 09 jul. 2016.
- GOMEZ, P. LR., JIMENEZ, D. J., EGUILUZ B. A., AGUILAR C. E., FALCONÍ-P. J., IBAÑEZ, T. M., ASPIOLEA M. L. JC. Estimated Economic Benefit of Double-Haploid Technique for Peruvian Barley Growers and Breeders, **Cereal Research Communications**. 2009. p287–293.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa Exploratório de Solos do Rio Grande do Sul**, 2002. Disponível em:

ftp://geoftp.ibge.gov.br/informacoes_ambientais/pedologia/mapas/unidades_da_federacao/rs_pedologia.pdf, acessado em 04 jul. 2016.

MAIA, L.C. Desenvolvimento de ferramenta e análise in silico da ocorrência de microssatélites (simple sequence repeat) no genoma do arroz. 2007. 120f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MORRIS M., DREHER K., RIBAUT J. K. M., Money matters (II): costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. **Molecular Breeding**. 2003. p235–247.

MULLER, I., PEDRY, B. Expedição 2016. Os Caminhos do Tabaco. **Gazeta do Sul**, Santa Cruz do Sul, 27 de fevereiro 2016. Caderno Safra 2015/2016, p2-16.

OLIVEIRA, F.; COSTA, M.C.F. **Dossiê Técnico: Cultivo de Fumo** (*Nicotiana tabacum* L.). Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT. São Paulo: Universidade de São Paulo – USP, 2010.

PATENTGENIUS, **Pesquisa de Patentes**. Disponível em:

<http://www.patentgenius.com/inventedby/LorencettiClaudirVeraCruzBR.html>, acessado em 10 jul. 2016.

PORTAL DO TABACO. **Destaque, agrotóxicos no tabaco**. 2016. Disponível em: <http://portaldotabaco.com.br/pesquisa-reduz-em-833-o-uso-de-agrotoxicos-no-tabaco/>, acessado em 14 jul. 2016.

PREFEITURA MUNICIPAL DE SANTA CRUZ DO SUL. **Dados do Município**. 2014. Disponível em: <http://www.santacruz.rs.gov.br/municipio/localizacao>, acessado em 04 jul. 2016.

PREFEITURA MUNICIPAL DE VERA CRUZ. **Dados do Município**. 2013. Disponível em: <http://www.veracruz-rs.gov.br/Pages/19439/Dados-do-Municipio>. Acessado em: 04 jul. 2016.

PROFIGEN. **Doenças e Pragas**. 2016. Disponível em: <http://profigen.com.br/>, acessado em 14 jul. 2016.

SINDITABACO, Sindicato da Indústria do Fumo. **A Cultura do tabaco no Sul do Brasil**, 2015. Disponível em: <http://www.sinditabaco.com.br>, acessado em 05 jul. 2016.

SOUZA CRUZ, site da internet: <http://www.souzacruz.com.br>, acessado em 04 jul. 2016.