

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
CURSO DE AGRONOMIA
AGR99006 - DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Emanuel De Costa
00207376**

*“Experiências em Experimentação Científica em casa de vegetação e em Biologia
Molecular: foco em resistência de Plantas Daninhas”*

PORTO ALEGRE, Setembro de 2016.

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

*Experiências em Experimentação Científica em casa de vegetação e em Biologia
Molecular: foco em resistência de Plantas Daninhas*

Emanuel De Costa

00207376

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: Maurizio Sattin, Dr. Pesquisador Senior - CNR

Orientador Acadêmico do Estágio: Aldo Merotto Junior, Dr. Professor Adjunto - UFRGS

COMISSÃO DE AVALIAÇÃO

Prof. Alberto Vasconcellos Inda Junior (Departamento de Solos)

Prof^a. Beatriz Maria Fedrizzi (Departamento de Horticultura e Silvicultura)

Prof^a. Carine Simioni (Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia)

Prof. Fábio Kessler Dal Soglio (Departamento de Fitossanidade)

Prof^a. Mari Lourdes Bernardi (Departamento de Zootecnia)

Prof. Samuel Cordeiro Vitor Martins (Departamento de Plantas de Lavoura)

PORTO ALEGRE, Setembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Pesquisa da Itália (CNR), ligado ao Instituto de Biologia Agroambiental e Florestal e Faculdade dos Estudantes de Padova – Unipd – Itália, pelo acolhimento, oportunidade e estrutura para que este meu estágio fosse realizado.

Ao programa Ciência Sem Fronteiras, pela oportunidade de realizar o intercâmbio/estágio e apoio financeiro.

Ao professor Aldo Merotto Jr., pela indicação, orientação, ensinamentos, oportunidades e amizade. O levarei como exemplo de um ótimo profissional e acima de tudo uma pessoa de caráter para a minha vida e carreira.

Aos pesquisadores Maurizio Sattin, Silvia Panozzo, e servidores do Instituto CNR – Legnaro - PD – IT.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram, mesmo que a distância, compreendendo a minha ausência em momentos especiais de nossas vidas.

À minha família, em especial ao meu pai Ari, minha mãe Terezinha e minha irmã Michele, pela motivação e pelo apoio incondicional de poder cursar uma faculdade pública e de qualidade mesmo sendo distante da terra natal. A gratidão que tenho por vocês não cabe nestas poucas palavras.

A Deus, pela vida, e por ter me guiado até então nas minhas escolhas profissionais.

RESUMO

O estágio curricular foi realizado no Instituto de Biologia Agroambiental e Florestal da Universidade dos Estudantes de Padova ligado ao Conselho Nacional de Pesquisa (Consiglio Nazionale delle Ricerche – CNR), no município de Legnaro – PD, Veneto, Itália. Os principais objetivos foram obter uma percepção prática sobre o estudo da resistência de plantas daninhas das principais culturas de interesse econômico desenvolvidas no país, além de entender como um pesquisador trata suas experiências para solucionar e discernir os mecanismos de insensibilidade dos herbicidas nessas plantas invasoras. Os objetivos também foram relacionados ao conhecimento de atividades científicas voltadas ao campo e análises laboratoriais de forma a aprimorar os conhecimentos obtidos junto à universidade nas diversas disciplinas do curso de Agronomia e nas atividades de iniciação científica.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes para preparação do Mix para PCR <i>in vitro</i>.	17
Tabela 2. Classificação das populações de <i>Echinochloa</i> spp. através da chave taxonômica de Costea & Tardif (2002).....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Identificação das amostras em <i>ependorfs</i> com substrato da extração de DNA.	16
Figura 2. Gel de agarose montado em cuba de eletroforese e sendo preenchido com o material extraído.....	18
Figura 3. Gel corado com brometo de etílio.....	18
Figura 4. Falcon com sementes de <i>Echinochloa</i> sp. e HSO₄.....	19
Figura 5. Gerbox preenchido com substrato.	20
Figura 6. Transplante de plântulas de <i>Echinochloa</i> sp. em bandejas.....	20
Figura 7. Avaliação visual dos tratamentos em bandejas.....	21
Figura 8. Equipamento de leitura das etiquetas de identificação dos tratamentos.....	22
Figura 9. Sementes de <i>Echinochloa</i> spp. com medidas lineares da cariopse.	23
Figura 10. Binocular Wild M3B para auxílio das medidas das cariopses das sementes..	23

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	8
2.	CARACTERIZAÇÃO DO <i>CENTRO NAZIONALE DI RICERCA</i> (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA - CNR)	10
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1.	Cultivo de arroz na Itália e principais problemas relacionados com plantas daninhas.....	12
3.2.	Procedimentos de experimentação relacionados à área de plantas daninhas.....	13
4.	ATIVIDADES REALIZADAS	15
4.1.	Acompanhamento das atividades laboratoriais	15
4.1.1.	Extração de DNA.....	15
4.1.2.	Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR	16
4.1.3.	Quantificação de DNA por Eletroforese em gel de Agarose (2%).....	17
4.1.4.	Métodos de quebra de dormência de sementes de <i>Echinochloa</i> spp.	18
4.2.	Acompanhamento das atividades a campo	20
4.2.1.	Transplante de plântulas de <i>Echinochloa</i> spp.....	20
4.2.2.	Avaliações em Casa de Vegetação de toxicidade em <i>Echinochloa</i> spp.....	21
4.2.3.	Classificação de espécies capim-arroz (<i>Echinochloa</i> spp.) de diferentes regiões produtoras de arroz da Itália através de medidas lineares da cariopse em comparação com chaves de descrição taxonômica.....	22
5.	DISCUSSÃO	24
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
	ANEXOS	30

1. INTRODUÇÃO

Os estudos da resistência de plantas daninhas a herbicidas tem apresentado grande crescimento nos últimos anos na Itália, em especial sobre os problemas relacionados à cultura do arroz. As práticas de manejo errôneas, onde, o uso de ingredientes ativos para controle de plantas invasoras acaba não sendo efetivo, portanto sem grande eficiência de controle destas plantas.

A produção da cultura do arroz obtida na Itália é muito importante para a comunidade Europeia. A Itália foi o país pioneiro na rizicultura na Europa, e esta cultura ocupa mais de 200 mil hectares e corresponde aproximadamente a mais da metade da produção total do arroz dentre todos os países da União Europeia. A produção de arroz se estabilizou nestes últimos anos, após vários problemas, dentre eles a ocorrência de plantas daninhas, prejudicarem o desenvolvimento da cultura por possuírem mecanismos de resistência à diversos herbicidas.

O estágio curricular obrigatório foi realizado no Instituto de Biologia Agroambiental e Florestal da Universidade dos Estudantes de Padova ligado ao Conselho Nacional de Pesquisa (Consiglio Nazionale delle Ricerche – CNR), no município de Legnaro – PD, Veneto, Itália, sob a supervisão do Dr. Pesquisador Senior Maurizio Sattin e a orientação acadêmica do Prof. Dr. Aldo Merotto Junior. As atividades foram realizadas no período de 18 de março de 2015 a 30 de junho de 2015, totalizando 420 horas de estágio.

O CNR é um instituto de pesquisa voltado a diversas áreas de atuação, e pode ser comparado com a instituição Embrapa no Brasil. O segmento onde foram desenvolvidas as atividades é voltado diretamente para a pesquisa de plantas daninhas resistentes a produtos comerciais usados na cultura do arroz. Esta instituição é referência no país e no mundo por pesquisas no ramo da herbologia, sendo este o principal motivo para a realização do estágio no local. O estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz do Brasil, o qual também possui diversos problemas relacionados ao controle não efetivo de invasoras resistentes.

Os principais objetivos deste estágio foram: realizar estudos relacionados ao entendimento dos mecanismos de resistência a herbicidas e sobre a necessidade de mudanças de manejo da cultura para o melhor controle de plantas infestantes na lavoura; obter percepção prática a respeito do funcionamento de um instituto de pesquisa que atua no setor agrícola; e avaliar a importância do Eng. Agrônomo nos sistemas de produção.

A experiência possibilitou associar o conhecimento adquirido na universidade com as práticas adotadas na experimentação científica a campo e em laboratório, bem como

possibilitou aprender a conviver com pessoas de diferentes heranças culturais, idades, grau de escolaridade e comportamentos sociais.

O estágio foi associado principalmente com as atividades da pesquisadora Silvia Panozzo em relação a realização de tarefas conforme a necessidade do grupo de pesquisa, dentre elas, a execução de práticas de manejo em diversos experimentos e também em atividades de visitas a campo. Entretanto, como foco principal do trabalho, buscou-se acompanhar e desenvolver atividades em casa de vegetação e procedimentos laboratoriais de quantificação e expressão de genes de resistência das plantas.

2. CARACTERIZAÇÃO DO *CENTRO NAZIONALE DI RICERCA* (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA - CNR)

O Conselho Nacional de Pesquisa (CNR) é a maior estrutura pública de pesquisa na Itália. O CNR foi fundado em 1923, e operou no passado como conselheiro do Governo em assuntos de pesquisa e como fundo de financiamento para as grandes pesquisas universitárias.

Desde 1989 o CNR é um órgão de pesquisa, com a missão de promover e realizar atividades de investigação, em busca da excelência e relevância estratégica no âmbito nacional e internacional, em cooperação com a investigação acadêmica e com outras organizações públicas e privadas, assegurando a difusão dos resultados no interior do país.

O CNR é composto por sete departamentos: Ciências da Terra e tecnologias para o ambiente, Ciências Bio-agroalimentares, Ciências Químicas e tecnologias de matérias, Ciências Físicas, Ciências Biomédicas, Engenharia e tecnologias para energia e transportes e o de Ciências Humanas e Sociais. Dentre todos os departamentos aproximadamente 4000 pesquisadores fazem parte do CNR.

O CNR do departamento de Ciências da terra localizado em Legnaoro é composto por um pesquisador Sênior, dois pesquisadores adjuntos, um pós-doc, um doutorando e três servidores de atividades gerais. As pesquisas avançam em diversas áreas de interesse econômico do país, mas principalmente na área de fruticultura e culturas estivais, tratando especificamente com o estudo de resistência de plantas daninhas.

No âmbito do seu plano anual no quadro da colaboração com universidades e outras organizações públicas e privadas, o CNR define, gere e coordena programas de pesquisas nacionais e internacionais. Através do seu próprio programa de bolsas de estudo para alunos de pós-graduação, alunos de educação contínua ou recorrente e de formação em programas de doutorado. Ainda, o CNR pode disponibilizar-se de interesse do grupo de pesquisa, vagas para estagiários atuarem diretamente nas atividades de pesquisa a campo e em laboratório.

Para a execução dessas atividades e quaisquer outras atividades relacionadas à pesquisa, o CNR estipula acordos e contratos, e participa em consórcios, fundações ou sociedades com partes privadas ou públicas, italianos ou estrangeiros. No caso específico deste estágio, houve o intercâmbio de um pós-doc que esteve desenvolvendo estudos em parceria com o orientador da UFRGS junto ao laboratório de biologia molecular do Departamento de Plantas de Lavoura.

As atividades de extensão ou de caráter aplicado são desenvolvidas pelo CNR através de programas, diretrizes e regulamentos dos governos regionais ou outras administrações públicas, voltadas para a divulgação dos resultados de pesquisas no sistema econômico e

também pode contribuir para a realização das condições necessárias para o estabelecimento de empresas altamente inovadoras.

Finalmente, o CNR pode participar de centros internacionais de pesquisa, em colaboração com instituições científicas análogas de outros países.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Cultivo de arroz na Itália e principais problemas relacionados com plantas daninhas

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos principais cereais produzidos em grande escala na Itália. O país se destaca na produção pelas condições climáticas e relevo propício. A Itália é o primeiro país produtor de arroz irrigado da Europa, que abrange em torno de 216.019 hectares, que corresponde 51% de toda produção da União Europeia (ENTERISI, 2013).

Nos últimos anos, o aumento de produção da cultura do arroz irrigado na Itália se correlaciona com desenvolvimento de tecnologias e estratégias de manejo. Um dos principais fatores de redução da produtividade se deve pelo efeito de plantas daninhas que competem pelos mesmos fatores da lavoura, assim diminuindo a expressão do potencial genético da cultura (Bortoly, 2013). O capim-arroz (*Echinochloa* ssp.) é um dos principais fatores responsáveis pela redução da produtividade das lavouras de arroz na Itália (ENTERISI, 2013).

O gênero *Echinochloa* ssp. inclui cerca de 50 espécies que são difundidas em ambas as regiões tropicais e temperadas, em solos secos ou inundados no território Italiano (Clayton e Renvoize, 1986). Algumas destas plantas são listadas entre as ervas daninhas mais problemáticas na cultura do arroz (Ferrero e Tabacchi, 2000). Todas as espécies de capim que apresentam mecanismo fotossintético do tipo C4 possuem grande vantagem competitiva quando crescem juntamente com culturas C3 (Bouhache e Bay-ER, 1993). Esta planta daninha pode provocar perdas de até 90% na produtividade do arroz, dependendo da densidade da infestante, cultivar e manejo da lavoura (Pinto *et al.*, 2008), o que demanda o emprego de métodos de controle.

No cultivo de arroz, quer seja nos países da Europa ou da América do Sul, existe grande pressão de seleção imposta pela alta utilização generalizada de grupos de herbicidas altamente ativos, tais como os inibidores da acetolactato sintase –ALS. Estes herbicidas inibem as reações de condensação responsáveis pela síntese dos aminoácidos alifáticos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina (Powles e Yu, 2010). No entanto, tratam-se de herbicidas propensos a selecionarem populações resistentes devido à alta taxa de mutação natural do gene ALS e pela elevada capacidade de serem detoxificados por plantas (Carvalho *et al.*, 2009).

Este problema é acentuado devido à redução da disponibilidade de herbicidas de outros mecanismos de ação, à diminuição da introdução de novos herbicidas com novos locais de ação, e devido à falta de rotação de cultura (Tabacchi *et al.*, 2004.; Merotto *et al.*, 2009).

3.2. Procedimentos de experimentação relacionadas a área de plantas daninhas

As técnicas de sequenciamento de DNA proporcionam resultados precisos para comprovar o mecanismo de resistência aos herbicidas ALS (Corbett e Tardil, 2006). O gene ALS de *E. crus-galli* apresenta um tamanho de 1870 pares de bases (Panozzo *et al.*, 2013). A realização do sequenciamento de DNA indica o local de ocorrência e o aminoácido alterado relacionado à resistência aos herbicidas. (Bortoly, 2013). Atualmente existe grande facilidade de realização do sequenciamento gênico, o que facilita a identificação da ocorrência do local de ação alterado como mecanismo de resistência de plantas daninhas.

A extração de DNA é o primeiro passo para utilizá-lo em técnicas moleculares a fim de estudar o mecanismo de resistência de herbicidas em plantas daninhas. Neste aspecto, a qualidade e integridade do DNA são fundamentais para o sucesso nas etapas posteriores (Costa e Moura, 2001). Existem diferentes protocolos de extração de DNA que variam em função da espécie e do tecido a ser utilizado. A maneira de coletar e acondicionar o tecido vegetal, assim como o estado do mesmo é fundamental para o sucesso da extração de DNA (Bortoly, 2013).

Um dos procedimentos importantes para o desenvolvimento da genética molecular foi a invenção de uma estratégia incrivelmente simples de amplificação de DNA chamada de reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica PCR é um processo rápido para a amplificação enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA e é capaz de aumentar a quantidade de uma sequência de DNA alvo numa amostra, por meio da síntese de várias cópias do segmento de DNA (Channara, 2007).

O princípio da técnica de PCR é a de um aumento exponencial na quantidade de DNA. Uma sequência de DNA alvo a ser amplificada é escolhida em primeiro lugar. O conhecimento prévio da sequência de nucleotídeos do DNA não se faz necessário, pois os primers se encarregaram de realizar uma série de reações com os nucleotídeos semelhantes. Os oligonucleotídeos (primers) são usados como iniciadores para uma série de reações que são catalisadas por uma DNA polimerase. Estes oligonucleotídeos têm tipicamente sequências diferentes e são complementares às sequências que se encontram em suportes opostos do DNA molde e flanqueiam o segmento de DNA que deve ser amplificado (Channara, 2007).

A ocorrência de dormência de sementes é um problema para as atividades de experimentação com plantas daninhas. Por várias razões, um número considerável de sementes duras ou dormentes pode permanecer sem germinar durante a instalação de um

experimento. As sementes de capim-arroz apresentam diferentes taxas de germinação, devido principalmente à ocorrência de dormência. A manutenção da dormência depende das condições pós-colheita às quais são submetidas (Delatorre, 1999). Na prática com KNO_3 , as sementes são colocadas a germinar numa solução de 0,2% de nitrato de potássio. As sementes ficam submersas nesta solução até o início do estágio de plântula. O procedimento com o H_2SO_4 consiste na escarificação química fazendo com que se retire toda camada da cariopse das sementes por um determinado tempo.

Outro procedimento importante em estudos com plantas daninhas é a avaliação em casa de vegetação sobre a verificação de fitotoxicidade dos herbicidas através do procedimento expedito de avaliação visual e inferição de nota de percentual de injúria em diferentes dias após a aplicação do tratamento (DAT). Em estudos de resistência a ALS em plantas daninhas, a avaliação do controle é feito aos 7, 14 e 21 DAT, por meio de uma escala percentual determinada através de avaliação visual, em que zero significa ausência de sintomas e 100 % significa a morte da planta (Dalazen, 2016). A matéria seca é outro parâmetro usual para determinar a eficiência dos herbicidas. Comumente estas mensurações são coletadas as 28 DAT, após secagem das plantas em estufa (60°C) até as mesmas atingirem massa constante (Panozzo, 2013).

Existe grande diversidade das mais de 50 espécies de *Echinochloa* (capim-arroz) e a diferenciação destas espécies é de difícil execução. Na Itália existe o agrupamento em relações as espécies chamadas “brancas” para (*E. colona*, *E. phyllopogon*, *E. erecta*) e “vermelho” para (*E. crus-galli*). Estas espécies são muito competitivas e de difícil distinção morfológica. O conhecimento das características morfológicas e o comportamento dessas espécies são fatores importantes para que se possa adotar estratégias adequadas para controlá-las. Além disso, diferentes espécies de *Echinochloa* spp. mostram sensibilidade diferencial a herbicidas (Ruiz-Santaella *et al.*, 2006).

Para melhor classificação e identificação destes capins no sul da Europa, criaram-se chaves taxonômicas oriundas de diversas pesquisas nas regiões mais produtoras de arroz da União Europeia. Careterro (1981) é o pioneiro na execução desta chave taxonômica específica para o gênero *Echinochloa*. Posteriormente, Pignatti (1982) lança a chave de classificação contribuindo com algumas modificações pontuais e atualiza a chave proposta por Pignatti. Mais recentemente, Costea e Tardif (2002) desenvolvem uma nova chave taxonômica para o gênero com novas observações morfológicas que anteriormente não eram levadas em conta (Tabacchi, 2006).

4. ATIVIDADES REALIZADAS

4.1. Acompanhamento das atividades laboratoriais

4.1.1. Extração de DNA

A coleta do tecido vegetal *in vivo* foi realizada após 24 horas da aspersão do herbicida, em plantas submetidas e não submetidas ao agroquímico do grupo químico ALS. Para cada tratamento realizado foram coletadas três amostras. Cada amostra foi composta de uma parte vegetal da lâmina da folha (dois terços), considerado a partir da base da folha. Após a retirada da lâmina foliar, todas as partes foram submetidas à desinfecção em uma solução de hipoclorito de sódio a 50% durante 1 minuto. Após, o material foi lavado com água destilada e deionizada.

Os materiais a serem utilizados para a extração de DNA, pinças, cadinhos de porcelanas e pestilo foram previamente congelados. O material vegetal desinfestado foi então cortado com tesoura estéril sempre observando e evitando as nervuras principais. O material vegetal foi transferido para o cadinho e adicionado nitrogênio líquido, sempre cuidando para que esta etapa de maceração fosse o mais rápido possível. O conteúdo macerado foi transferido para tubos de *ependorf* de 1,5 ml e identificado (Figura 1), sendo que logo após foi realizada a adição do reagente tampão na quantidade de 650 µl. Em seguida, foi realizada agitação para uma homogeneização da solução com o material vegetal macerado.

Em seguida, as amostras foram submetidas a banho-maria a 60°C, durante uma hora, com agitação manual a cada 10 minutos. Após este período, foi adicionado 650 µl de clorofórmio: álcool isoamil (24:1), sempre agitando muito bem para que formasse uma emulsão. Logo em seguida, foi realizada centrifugação durante 10 minutos (4°C a 12 000 rpm). Após, o sobrenadante foi retirado, transferindo-o para outro *ependorf* e acrescentando novamente 650 µl de clorofórmio e 200 µl de tampão de extração sem proteinase K, seguido por nova centrifugação. Na sequência, retirou-se 500 µl do sobrenadante e acrescentou-se um volume igual de isopropanol gelado, o qual fazia com que o DNA precipitasse.

Figura 1. Identificação das amostras em eppendorfs com substrato da extração de DNA.



Autor: Emanuel De Costa

Os *eppendorfs* foram acondicionados em freezer por cerca de 20 minutos e em seguida centrifugava-se novamente para possibilitar a retirada de todo líquido com adição de 1000 μ l de etanol 70 % para remoção de todos os sais. Novamente a centrifugação foi necessária por um tempo de 10 minutos. Finalmente, foi realizada a retirada de todo o líquido e os *eppendorfs* foram depositados em estufa com temperatura de 35°C por aproximadamente 3 horas.

A ressuspensão do DNA foi feita com 40 μ l de RNase, e em seguida os tubos foram colocados em estufa a 37°C novamente durante uma hora. Após este período os tubos foram acomodados em geladeira a 4°C até a quantificação do DNA para poder comparar e inferir nos resultados posteriores. A estocagem final do material foi realizada em ultrafreezer (-70°C).

4.1.2. Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Esta prática foi realizada após todos os procedimentos de preparação e extração do DNA. Ela consiste na amplificação (criação de múltiplas cópias) de DNA para possibilitar detectar algumas mutações específicas de resistência aos herbicidas.

A prática do PCR consiste na multiplicação de trechos específicos alternando-se a temperatura de ensaio entre: 1) desnaturação das cadeias de DNA genômico, 2) anelamento dos *primers*, usados para delimitar a sequência a ser amplificada (escolhido para uma melhor amplificação), 3) delimitando uma temperatura ideal para as enzimas e 4) fazendo que se reinicie o ciclo.

O primeiro passo foi um prévio estudo para delimitar a “sequência alvo” que melhor expressa o gene de resistência. A partir disso desenharam-se dois iniciadores (*primers*), para dar partida ao processo de síntese em um local específico.

As atividades do procedimento do PCR ocorrem em duas etapas principais, a de preparação *in vitro* (Tabela 1) e o processo de multiplicação no Termociclador. O protocolo da reação do PCR foi composto por 1 minuto de desnaturação das cadeias de DNA a 98°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 58°C para que ocorra o anelamento, 40 ciclos de 1 minuto a 72°C para ocorrer a extensão da fita do DNA e, por fim, 10 ciclos de 1 minuto a 72°C para finalização. Após todas estas etapas, entra na parte de análise dos resultados através do passo seguinte que foi a Eletroforese.

Tabela 1. Reagentes para preparação do Mix para PCR *in vitro*.

	[] inicial	[] final	Q por reação (15uL)
Agua	-	-	7,45 uL
PCR buffer	10 x	1 x	1,5 uL
dTNP	10 mM	0,6 mM	0,9 uL
MgCl₂	50 mM	2,5 mM	0,75 uL
Taq	5 units/uL	1 units	0,2 uL
Primer F	10 uM	0,4 uM	0,6 uL
Primer R	10 uM	0,4 uM	0,6 uL
DNA	20 ng/uL	60 ng	3 uL
		TOTAL	15 uL

Fonte: CNR: Laboratório Microbiologia (2014).

4.1.3. Quantificação de DNA por Eletroforese em gel de Agarose (2%)

O gel de agarose foi preparado (ANEXO A) e transferido para a cuba de eletroforese (Figura 2). Foi utilizado um volume de 5 µl da solução de DNA para cada poço do gel de agarose. Os produtos do PCR foram analisados no gel corado com brometo de etílio na porção de 0,02 µl mL⁻¹, por 90 minutos a 110 V, em tampão TBE 0,5X (40 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0).

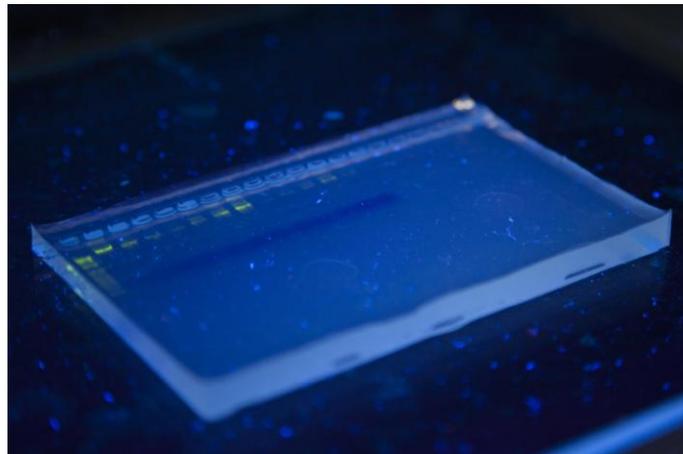
Figura 2. Gel de agarose montado em cuba de eletroforese e sendo preenchido com o material extraído.



Autor: Emanuel de Costa

Os tamanhos dos fragmentos foram determinados por comparação visual utilizando marcadores já conhecidos (*Ladder*). Em seguida, os géis foram fotografados com auxílio de um programa específico (Figura 3).

Figura 3. Gel corado com brometo de etílio.



Autor: Emanuel de Costa

4.1.4. Métodos de quebra de dormência de sementes de *Echinochloa* spp.

Para a realização de experimentos em casa de vegetação utilizam-se alguns métodos para realização da quebra de dormência das sementes, de forma a avançar algumas etapas e ter mais agilidade em relação ao fator tempo. A quebra de dormência consiste em eliminar o impedimento físico ou químico que o órgão de reserva possui, assim viabilizando a germinação a partir de sementes dormentes ou quiescentes.

Foi utilizado dois métodos, um por escarificação química com HSO_4 e outro por submersão das sementes com uma solução de KNO_3 a 2% em água deionizada. Pelo primeiro método utilizado com HSO_4 , identificaram-se os tubos Falcon para cada amostra. Foram adicionados 10g de sementes para cada tudo. Posteriormente adicionou-se HSO_4 até cobrir totalmente as sementes (Figura 4), respeitando um tempo de 15 minutos para a retirada completa deste ácido. Aos 10 minutos, iniciou-se a retirada do líquido em suspensão para facilitar o enxágue das sementes. Após isso as sementes foram submetidas ao enxágue com água corrente e por fim com água destilada deionizada. Em seguida foram colocadas em gerbox (Figura 5) com substrato adequado (vermiculita, areia média, casca de acácia triturada) e transferidos a uma BOD programada a uma temperatura constante de 25°C e um fotoperíodo de 14h luz/10h escuro por um período de 6 a 7 dias.

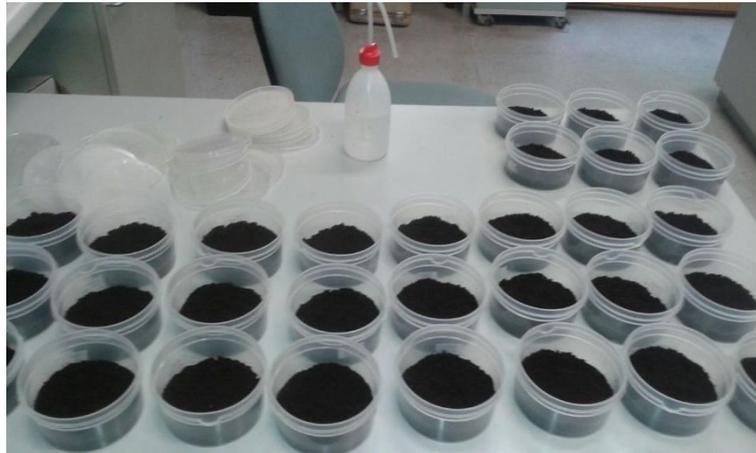
Figura 4. Falcon com sementes de *Echinochloa* sp. e HSO_4 .



Autor: Emanuel de Costa

Outro método utilizado foi o da submersão das sementes com KNO_3 a 2% a uma solução final com H_2O destilada deionizada. A solução foi preparada e homogeneizada antes da submersão das sementes. As sementes permaneceram 8 dias em uma BOD nas mesmas condições descritas anteriormente até o transplante.

Figura 5. Gerbox preenchido com substrato.



Autor: Emanuel de Costa

4.2. Acompanhamento das atividades a campo

4.2.1. Transplante de plântulas de *Echinochloa* spp.

Ao atingirem o estágio adequado de desenvolvimento, os capins foram transplantados em bandejas identificadas para cada tratamento, nas quais permaneceram até as últimas avaliações (Figura 6).

As bandejas utilizadas possuíam dimensões de 30 cm x 20 cm, onde se transplantou 20 plantas cada a fim de ter uma amostra representativa de cada tratamento. Estas bandejas foram regadas diariamente e alocadas a uma casa de vegetação não climatizada e sem fotoperíodo controlado, pois a época de condução dos experimentos coincidiu com o período de verão (dias longos).

Figura 6. Transplante de plântulas de *Echinochloa* sp. em bandejas.

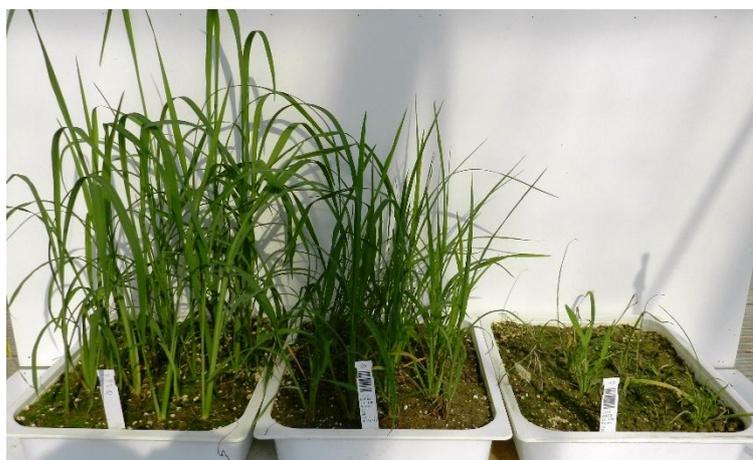


Autor: Emanuel de Costa.

4.2.2. Avaliações em Casa de Vegetação de toxicidade em *Echinochloa* spp.

Depois de instalado o experimento em casa de vegetação, foi realizado a aplicação do herbicida nos diversos tratamentos (Figura 7). As avaliações visuais dos tratamentos nos quais foram aspergidos o herbicida, foram realizadas por escala visual em porcentagem, onde 0 foi a não injúria da planta e 100 o seu controle efetivo da mesma. Estas avaliações foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA) do herbicida.

Figura 7. Avaliação visual dos tratamentos em bandejas.



Autor: Emanuel de Costa.

Em cada avaliação foram contadas as plantas sobreviventes e atribuído uma nota visual tomando como referência plantas testemunhas sem a aspersão do herbicida. Os valores coletados foram digitalizados no equipamento Chiper LAB (Figura 8) no momento da coleta, o qual tem o princípio de leitura de um código de barras previamente impresso e gerado por um programa específico que posteriormente disponibilizava as informações em formato de planilha de Excel. Aos 28 DAA mediu-se a altura das plantas sobreviventes e a coleta das mesmas para secagem e mensuração da matéria seca final a fins comparativos.

Figura 8. Equipamento de leitura das etiquetas de identificação dos tratamentos.



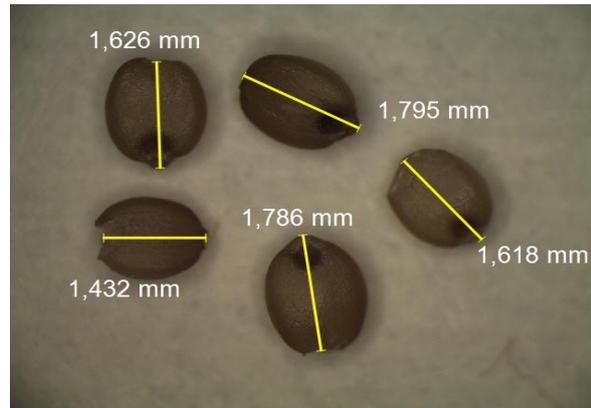
Autor: Emanuel de Costa

4.2.3. Classificação de espécies capim-arroz (*Echinochloa* spp.) de diferentes regiões produtoras de arroz da Itália através de medidas lineares da cariopse em comparação com chaves de descrição taxonômica

O manejo de plantas daninhas e as especificações relacionadas a estudos de resistência a herbicidas podem ser muito específicos a uma espécie. Existe possibilidade de obtermos o conhecimento prévio da espécie envolvida com uso mais detalhado das informações taxonômica, assim, podendo interpolar os dados e relacionar diretamente o comportamento da espécie. Existem grande variabilidade e complexidade de classificação entre as espécies do gênero *Echinochloa*.

A classificação realizada utilizou como base as médias lineares da cariopse (Figura 9). O material em estudo foi coletado por Tabacchi (2006) os quais classificou por chaves taxonômicas. Foram analisadas 12 populações escolhidas ao acaso a partir do trabalho de Tabacchi (2006) e 5 sementes cada.

Figura 9. Sementes de *Echinochloa* spp. com medidas lineares da cariopse.



Autor: Emanuel de Costa.

Inicialmente limpam-se as sementes deixando visível apenas a cariopse. As sementes foram visualizadas através do equipamento binocular Wild M3B (Figura 10) com aumento de 16x, conectado ao software Leica Application Suite (LAS). Os dados da medida linear e as fotos produzidas pelo software foram convertidos para uma planilha Excel e posterior classificadas segundo Costea e Tardif (2002).

Figura 10. Binocular Wild M3B para auxílio das medidas das cariopses das sementes.



Autor: Emanuel de Costa

5. DISCUSSÃO

Atualmente existe grande disponibilidade de diversos procedimentos moleculares baseados em segmentos de DNA como marcadores moleculares. A utilização destes procedimentos apresenta um requerimento importante que é a extração de DNA do material em estudo. Uma eficiente extração de DNA pode resultar em dados mais concretos e de mais fácil compreensão para geração de boas interpretações. Para isso a coleta do material vegetal deve respeitar rigorosamente alguns aspectos práticos.

A cautela para a realização de uma boa coleta de materiais para a extração de DNA e para obter ótimos resultados finais é influenciada diretamente pela higiene e esterilização dos materiais utilizados. O cuidado com estes fatores limitantes foi um dos principais aspectos de cobrança pelos pesquisadores do grupo. Na coleta das folhas após aplicação dos herbicidas se preconizava o uso de luvas de látex cirúrgicas para não haver o contato direto com o tecido vegetal apreendido e colhido com as mãos.

O estágio vegetativo que se encontram as plantas para aplicação dos tratamentos de herbicidas é um fator crucial para ser levado em consideração. Os pesquisadores adotavam o estágio de V3 (três folhas completamente expandidas), e a coleta do material 24 horas após a aplicação para realizar o ensaio de atividade enzimática, sendo que esta etapa foi feita diretamente pelos pesquisadores do grupo. Este estágio de desenvolvimento é descrito como fator decisivo para o controle e eficiência do produto (Panazzo, 2013). Desta forma, o estágio da cultura segue como um aspecto muito observado nestes experimentos, sejam eles, a campo ou em casa de vegetação. Isto se deve pela uniformidade universal dos mesmos, pois assim é possível comparar e avaliar outras atividades em conjunto de diversos grupos de pesquisa.

Após a extração do DNA, realizou-se o PCR de forma a amplificar o fragmento de DNA que apresenta possivelmente a mutação que gera insensibilidade aos herbicidas. As reações foram adaptadas de Panazzo *et al.* (2013) e o resultado foi eficiente, onde o ponto chave desta etapa está nos *primers (forward e reverse)* e também numa boa Taq DNA polimerase para que todas as reações nas etapas do termociclador sejam eficientes e amplifiquem somente a parte do DNA almejado.

A eletroforese, ferramenta amplamente utilizada no meio científico, é uma técnica baseada na separação de partículas em um determinado gel de acordo com sua massa e carga. A eletroforese pode ser utilizada para separação de diversas moléculas orgânicas, como lipoproteínas, proteínas, RNA e DNA. O princípio da eletroforese utilizada para separação de DNA se baseia na carga negativa global de uma fita de DNA. Portanto, íons livres, moléculas

de DNA ou fragmentos de DNA em uma solução podem ser separados aplicando-se uma certa voltagem. Ao final do processo, as cadeias de DNA estarão próximas ao cátodo (positivo), que atrai, devido à polaridade, moléculas de carga negativa.

O gel de agarose forma uma malha constituída por uma rede de polímeros que permite a migração de moléculas. Moléculas de menor peso molecular terão mais facilidade em atravessar a malha do gel, se posicionando assim mais próximas do cátodo, enquanto as moléculas com maior peso apresentam maior dificuldade e se posicionam mais próximas do anodo. A distância que o fragmento percorreu a partir do ponto de aplicação é comparada com a distância que outros fragmentos de tamanhos conhecidos percorreram no mesmo gel. São utilizados como comparação os marcadores de tamanho molecular (Ladders = Escadas), que são misturas de trechos de DNA com tamanhos variáveis.

A quantificação de DNA para analisar as quantidades de material extraído, possibilita visualmente julgar empiricamente as quantidades aproximadas de DNA e se existe a viabilidade ou não de encaminhamento do material para empresas que sequenciem estes DNAs.

As avaliações visuais dos tratamentos realizados com diversas doses de herbicidas para detectar o nível de resistência das plantas daninhas podem ser às vezes muito subjetivas. Esta mensuração de uma escala de 0 a 100 vai de acordo com a nota que o avaliador atribui. Este aspecto é relevante para um comparativo de análises laboratoriais confrontando e atribuindo mais consistência nos dados interpolados, por exemplo, nas análises de atividades das enzimas e expressão da resistência da planta.

A classificação das populações foi realizada através da chave taxonômica de Costea e Tardif (2002), que adota como parâmetro principal as medidas lineares da cariopse das sementes. As medidas de referência são: 0,7 – 1,2 mm *E. colona*, 1,4 – 1,9 mm *E. crus-galli*, 2 – 2,2 mm *E. hispidula* e 2,3 – 2,8 mm *E. oryzoides/ orydicola*. Os resultados obtidos nesta classificação prévia possibilitaram visualizar e separar populações para estudos mais precisos dentre as espécies. No entanto a análise morfológica destes capins será realizada em outro estudo para ter como contraprova da especificidade das populações. A classificação precisa das espécies de *Echinochloa* poderá possibilitar pesquisas de dose-resposta de diferentes herbicidas de forma a proporcionar a identificação das doses necessárias para o controle de cada uma dessas espécies em nível de campo.

Tabela 2. Classificação das populações de *Echinochloa* spp. através da chave taxonômica de Costea & Tardif (2002).

População	Média (mm)	Classificação
7	1,65	<i>E. crus-galli</i>
9	1,651	<i>E. crus-galli</i>
12	1,789	<i>E. crus-galli</i>
13	2,04	<i>E. hispidula</i>
32	2,443	<i>E. oryzoides/ oryicola</i>
41	2,34	<i>E. oryzoides/ oryicola</i>
45	2,56	<i>E. oryzoides/ oryicola</i>
46	1,951	<i>E. oryzoides/ oryicola</i>
49	2,858	<i>E. oryzoides/ oryicola</i>
54	2,395	<i>E. oryzoides/ oryicola</i>
71	2,243	<i>E. oryzoides/ oryicola</i>
72	1,815	<i>E. crus-galli</i>

Autor: Emanuel de Costa

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio obrigatório, além do cumprimento das normas estabelecidas pelo currículo do curso de Agronomia da UFRGS, ofereceu uma grande oportunidade de aprendizado. Durante o estágio, foi possível vivenciar a prática de um dos caminhos que um agrônomo pode seguir. O estágio foi uma possibilidade de ligar o ambiente acadêmico com o convívio da pesquisa e do campo, dando maturidade ao futuro Eng. Agrônomo. Apesar das limitações encontradas com as técnicas laboratoriais o conhecimento adquirido na iniciação científica dentro da universidade foi fundamental para evoluir no conhecimento da pesquisa.

O período de estágio ajudou a acumular conhecimento disponibilizado por meio do convívio com as pessoas do CNR, podendo perceber o potencial que um pesquisador possui para enfrentar os grandes desafios da agricultura moderna. O CNR é um órgão de grande credibilidade, e tenta buscar soluções dos desafios encontrados na agricultura para ter uma produção mais eficiente, nos moldes da sustentabilidade ambiental e econômica. O estágio foi concluído, deixando uma gama de boas e saudáveis recordações do local e das atividades realizadas, além da construção de amizades duradouras impostas por aquela cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAYER, D. E.; HILL, J. E. Weeds. In 'Integrated Pest Management For Rice. **University of California and Division of Agricultural and Natural Resources**, v. 3280, p. 32-55, 1993.
- BORTOLY, D. E. *Avaliação do mecanismo de resistência a Imazethapyr e relações filogenéticas de capim-arroz (Echinochloa spp.)*. 2013. 105 f, Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Departamento de Plantas de Lavoura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.
- BOUHACHE, M.; D. E. BAYER. Photosynthetic response of flooded rice (*Oryza sativa*) and three *Echinochloa* species to changes in environmental factors. **Weed Science**, v. 41, p. 611–614, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.
- CARRETERO, J. L. El genero Echinochloa en el Grande Suroeste de Europa. **Anales Jardin Botánico de Madrid**, v. 38, p. 91-108, 1981.
- CARVALHO, S. J. P. *et al.* Herbicide selectivity by differential metabolism: considerations for reducing crop damages. **Scientia Agricola**, v. 66, n.1, p.136-142, 2009.
- CHANNARA, Y. *Molecular Biotechnology: Principles and Practices*. Universities Press, CRC Press, v. 1, p. 288-298, 2007.
- CLAYTON, W. D.; S. A. RENOVOIZE. **Genera Graminum: grasses of the world**. Série. XIII p. 1–389, 1986.
- CORBETT, C. A. L.; TARDIF, F. J. Detection of resistance to acetolactate synthase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: a review. **Pest. Manag. Sci.**, Sussex, v. 62, n. 7, Jul., p.584 – 597, 2006.
- COSTA, M.R.; MOURA, E.F. Manual de extração de DNA. **Embrapa Amazônia Oriental**, v. 89, p. 1-27, 2001.
- COSTEA, M.; TARDIF, F.J. Taxonomy of the most common weedy European *Echinochloa* species (Poaceae: Panicoideae) with special emphasis on characters of the lemma and caryopsis. **SIDA** **20**, v. 2 p. 525-548, 2002.
- DALAZEN, G. *Avaliação de genes relacionados ao incremento de metabolização e efeito da temperatura e da concentração de CO₂ em capim-arroz resistente a Imazethapyr*. 2016. 130 f,

Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Departamento de Plantas de Lavoura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2016.

DELATORRE, C.; Dormência em sementes de Arroz Vermelho. **Ciência Rural**, vol. 29, n.3, p. 565-571, 1999.

DOYLE, J. J.; DOYLE, L. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Oklahoma, v.19, p. 11-15, 1987.

ENTE NAZIONALE RISI. La risicoltura in Italia. Disponível em:<http://enterisi.it/upload/enterisi/documentallegati/La%20risicoltura%20e%20la%20filiera%20oriscicola%20in%20Italia%202014_13660_369.pdf>. Acessado em: 10 ago. de 2016.

FERRERO, A.; TABACCHI, M. L'ottimizzazione del diserbo nel riso. **Proceedings 2000 Atti Convegno SIRFI**, p. 111-149, 2000.

MEROTTO JUNIOR. A. Resistência de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) aos herbicidas inibidores de ALS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., 2009, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: Palotti, 2009. p. 312-315.

PANOZZO, S. *et al.* Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, San Diego, v. 105, n. 2, Feb., p.93-103, 2013.

PIGNATTI, S. *Echinochloa* B. – Giavone. In **Flora d'Italia**, v. 2, p. 607 – 609, 1892.

PINTO, J. J. O. *et al.* Controle de capim-arroz (*Echinochloa* spp.) em função de métodos de manejo na cultura do arroz irrigado. **Planta Daninha**, v.26, n.4, p.767-777, 2008.

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, n. 1, p. 317-347, 2010.

RUIZ-SANTAELLA, J. P. Morphological and Molecular Characterization of Different *Echinochloa* spp. and *Oryza sativa* Populations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1166-1172, 2006.

SARTORATO, I. Modeling of Glyphosate Application Timing in Glyphosate-Resistant Soybean. **Weed Science**, v. 59, p. 390-397, 2011.

TABACCHI, M. Herbicide resistance in Italian rice crops: a late-developing but fast-evolving story. **Conference: Proceedings of the Conference “Challenges and opportunities for sustainable rice-based production systems”**, v. 1, p. 227– 238, 2004.

TABACCHI, M. *et al.* Morphological traits and molecular markers for classification of *Echinochloa* species from Italian rice fields. **Weed Science**, v. 54, p. 1086-1093, 2006.

ANEXOS

ANEXO A.

Protocolo para eletroforese em gel de agarose**Preparo do Gel**

- 1) Pesar a agarose em papel alumínio, conforme a tabela abaixo.

Volume	Porcentagens					
	0,9%	1%	1,5%	2%	2,5%	3%
60 ml	0,54g	0,6g	0,9g	1,2g	1,5g	1,8g
250 ml	2,25g	2,5g	3,75g	5g	6,25g	7,5g
350 ml	3,15g	3,5g	5,25g	7g	8,75g	10,5g

- 2) Transferir para um Erlenmeyer previamente marcado com o volume do gel (medir preferencialmente em proveta).
- Cuba grande – **350 ml** (pode-se trabalhar de 300 a 400 ml de gel)
 - Cuba média – **250 ml** (pode-se trabalhar de 200 a 300 ml de gel)
 - Cuba pequena - **60 ml** (pode-se trabalhar de 50 a 70 ml de gel)
- 3) Adicionar o tampão TBE 5X (10% do volume do gel) e completar o volume com água deionizada ou ultrapura (Milli-Q).
- 4) Dissolver a mistura no microondas (2 a 3 minutos), agitando o recipiente de vez em quando e tomando cuidado para evitar a fervura da solução.
- 5) Esfriar a solução, sempre agitando, até que a mesma fique morna. Pode ser utilizada nesta etapa água corrente.
- 6) Adicionar o brometo de etídeo na seguinte proporção:

	Cuba grande	Cuba média	Cuba pequena
1° uso	8 µL	6 µL	2 µL
2° uso	6 µL	4 µL	1,5 µL
3° uso	4 µL	3 µL	1 µL

- 7) Homogeneizar a solução e vertê-la sobre o *casting* (com as laterais previamente vedadas).
- 8) Retirar qualquer bolha que tenha ficado no gel e colocar cuidadosamente os pentes.
- 9) Esperar o gel solidificar (15 a 30 minutos, dependendo da concentração) e então retirar cuidadosamente os pentes.
- 10) Enquanto o gel está solidificando, verificar se a cuba está com tampão. Se for preciso, adicione TBE 0,5X que é preparado da seguinte forma: **200 ml TBE 5X + 1800 ml**

água ultrapura (para 2 litros de solução). Medir o TBE 5X em proveta e completar o volume em balão volumétrico.

- 11) Colocar o *casting* (sem as vedações laterais) na cuba e verificar se o gel está submerso no tampão. Os poços devem ficar próximos do polo negativo da cuba (pinos/encaixes pretos).

Aplicação das Amostras:

- 12) Aplicar entre 5 e 20 μL de amostra, dependendo do tamanho do poço. Nos primeiros poços colocar os marcadores necessários. Os mais usados no laboratório são:

- *Ladder* 100bp ou 50bp: Usado para determinar tamanho de fragmentos. Já está misturado com o *Loading* para gel de agarose, na concentração de 50 ng/ μL . Colocar entre 5 e 8 μL de amostra
- Lambda: Usado para quantificar o DNA. Não está misturado com o *loading* para gel de agarose. Os estoques estão a 500 e 50 ng/ μL

- 13) Segue abaixo um exemplo de preparação de lambda e amostras para aplicação em gel:

	Lambda	DNA	<i>Loading</i>	Água	Volume
λ -200	4 μL (λ -50)	xxx	3 μL	3 μL	10 μL
λ -1000	2 μL (λ -500)	xxx	3 μL	5 μL	10 μL
Amostras	xxx	2 μL	3 μL	5 μL	10 μL

Corrida do gel:

- 14) Tampar a cuba e conectar cuidadosamente os cabos elétricos na fonte.

- 15) Ligar a fonte, ajustada da seguinte forma:

- Cuba pequena – 70 a 90 V
- Cubas médias e grandes – 90 a 110 V

Esperar o tempo necessário, dependendo do tamanho dos fragmentos. Para quantificação de DNA o tempo de corrida fica entre 30 minutos e 1 hora.