



**Benedito Rodrigues da Silva Neto**  
**(Organizador)**

# **Inventário de Recursos Genéticos**



**Atena**  
Editora  
Ano 2019

Benedito Rodrigues da Silva Neto  
(Organizador)

# Inventário de Recursos Genéticos

Atena Editora  
2019

2019 by Atena Editora  
Copyright © Atena Editora  
Copyright do Texto © 2019 Os Autores  
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora  
Editora Executiva: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira  
Diagramação: Natália Sandrini  
Edição de Arte: Lorena Prestes  
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

#### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
162	<p>Inventário de recursos genéticos [recurso eletrônico] / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019.</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-486-3 DOI 10.22533/at.ed.863191807</p> <p>1. Melhoramento genético. 2. Germoplasma. 3. Diversidade Genética. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da. CDD 575.1</p>
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br

## APRESENTAÇÃO

O termo “genética” nos últimos anos ganhou uma conotação cada vez mais importante e acessível à população. Podemos dizer que a genética saiu da rotina laboratorial e da sala de aula para adentrar as casas da população, seja por informação ou na forma de produto. Isso porque a revolução tecnológica contribuiu grandemente com o avanço no campo da pesquisa básica e aplicada à genética, e as descobertas propiciadas por tecnologias mais apuradas possibilitaram um entendimento mais amplo desta importante área.

A genética como sabemos possui um campo vasto de aplicabilidades que podem colaborar e cooperar grandemente com os avanços científicos e tecnológicos. O acelerado mundo das descobertas científicas caminha a passos largos e rápidos no sentido de transformar a pesquisa básica em aplicada, portanto é relevante destacar que investimentos e esforços nessa área contribuem grandemente com o desenvolvimento de uma nação.

O livro “Inventários e Recursos Genéticos” aqui apresentado, aborda assuntos relativos aos avanços e dados científicos publicados de cunho voltado para a utilização dos recursos genéticos disponíveis na área ambiental, microbiológica dentre outras diversas que cientistas tem gastado esforços para compreender. Assim, são diversas as possibilidades de aplicações genéticas em diversos campos, neste livro tentaremos otimizar os conceitos dos recursos genéticos abordando plantas medicinais, segurança alimentar, sanidade animal, microrganismos patogênicos, identificação molecular, caracterização morfoagronômica, Banco de DNA, metabólitos secundários, melhoramento genético, análise multivariada, bioinformática, expressão de genes, viabilidade polínica, Germoplasma, recursos genéticos, cultivares, Qualidade de sementes; seleção de plantas; melhoramento genético da mamoneira, simulações em Easypop, fluxo gênico, fragmentação florestal, análise de diversidade genética de Nei, Coeficientes de endogamia, demonstrando ferramentas genéticas e moleculares usadas em diferentes estudos que estão diretamente relacionados ao dia-a-dia da população.

Desejamos que este material possa somar de maneira significativa aos novos conceitos aplicados à genética. Parabenizamos cada autor pela teoria bem fundamentada aliada à resultados promissores, e principalmente à Atena Editora por permitir que o conhecimento seja difundido e disponibilizado para que as novas gerações se interessem cada vez mais pelo ensino e pesquisa em genética.

Benedito Rodrigues da Silva Neto

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA EM GENÓTIPOS DE TRIGO: PRESENÇA DE MICRONÚCLEOS E VIABILIDADE POLÍNICA	
Sandra Patussi Brammer Patrícia Frizon Elizandra Andréia Urio	
<b>DOI 10.22533/at.ed.8631918071</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>13</b>
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA PARTE AÉREA DE ACESSOS DE <i>Psychotria ipecacuanha</i> (IPECA)	
Raphael Lobato Prado Neves Osmar Alves Lameira Ana Paula Ribeiro Medeiros Helaine Cristine Gonçalves Pires Mariana Gomes de Oliveira Carolina Mesquita Germano Fábio Miranda Leão	
<b>DOI 10.22533/at.ed.8631918072</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>25</b>
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>Staphylococcus aureus</i> E <i>Escherichia coli</i> ISOLADOS EM MEIOS CROMOGÊNICOS ORIUNDOS DE LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA	
Clarissa Varajão Cardoso Eunice Ventura Barbosa Alcir das Graças Paes Ribeiro Rossiane de Moura Souza Helena Magalhães Helena Carla Castro Maíra Halfen Teixeira Liberal	
<b>DOI 10.22533/at.ed.8631918073</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>38</b>
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	
Mariely Cristine dos Santos Juliana Vitória Messias Bittencourt Mariana Machado Fidelis Nascimento Luciano Medina-Macedo	
<b>DOI 10.22533/at.ed.8631918074</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>47</b>
CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE UMA POPULAÇÃO NATURAL DE <i>Physalis angulata</i> L. EM TERESINA-PI VISANDO A SELEÇÃO DE GENÓTIPOS SUPERIORES	
Hortência Kardec da Silva	
<b>DOI 10.22533/at.ed.8631918075</b>	

**CAPÍTULO 6 ..... 53**

COLEÇÕES DE PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS NA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Thiago Serravalle de Sá  
Carolina Santos Pinho  
Maíra Miele Oliveira Rodrigues de Souza  
Suzelir Souza Nascimento  
Adrielle Matos de Jesus  
Izabela Santos Dias de Jesus  
Jozimare dos Santos Pereira  
Maria Luiza Silveira de Carvalho  
Alessandra Selbach Schnadelbach  
José Geraldo de Aquino Assis

**DOI 10.22533/at.ed.8631918076**

**CAPÍTULO 7 ..... 66**

COMPARAÇÃO DE TEMPO E CUSTOS DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS DO CERRADO: SUBSÍDIO PARA CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DO BIOMA

Diego Cerveira de Souza  
Terezinha Aparecida Teixeira  
Carla Ferreira de Lima  
Vanessa Aparecida Caetano Alves

**DOI 10.22533/at.ed.8631918077**

**CAPÍTULO 8 ..... 76**

CORRELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE CARACTERES VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS DE PIMENTEIRAS (*Capsicum* spp.)

Joanderson Marques Silva  
Allana Tereza Mesquita de Lima  
Alaide Silva de castro  
Ivanayra da Silva Mendes  
Larissa Pinheiro Alves  
Mayara Cardoso Araújo Lima  
Ramile Vieira de Oliveira  
Raquel Sobral da Silva  
Jardel Oliveira Santos

**DOI 10.22533/at.ed.8631918078**

**CAPÍTULO 9 ..... 84**

DESEMPENHO AGRONÔMICO E SELEÇÃO DE HÍBRIDOS DE MAMONEIRA PARA ALTA PRODUTIVIDADE

Sebastião Soares de Oliveira Neto  
Odila Friss Ebertz  
Maria Márcia Pereira Sartori  
Maurício Dutra Zanotto

**DOI 10.22533/at.ed.8631918079**

**CAPÍTULO 10 ..... 93**

DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE SUBAMOSTRAS DE PIMENTEIRAS (*Capsicum* spp.)  
CONSERVADAS EX SITU NO MARANHÃO

Joanderson Marques Silva  
Ivanayra da Silva Mendes  
Gabriela Nunes da Piedade  
Raquel Sobral da Silva  
Alaide Silva de Castro  
Allana Tereza Mesquita de Lima  
Larissa Pinheiro Alves  
Mayara Cardoso Araújo Lima  
Ramile Vieira de Oliveira  
Jardel Oliveira Santos

**DOI 10.22533/at.ed.86319180710**

**CAPÍTULO 11 ..... 106**

DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DO BANCO DE GERMOPLASMA DE MACIEIRA DA  
EPAGRI

Filipe Schmidt Schuh  
Pedro Soares Vidigal Filho  
Marcus Vinicius Kvistchal  
Gentil Carneiro Gabardo  
Danielle Caroline Manenti  
Giseli Valentini

**DOI 10.22533/at.ed.86319180711**

**CAPÍTULO 12 ..... 118**

DOF: FATOR DE TRANSCRIÇÃO IMPORTANTE EM PLANTAS DE INTERESSE AGRONÔMICO

Tiago Benedito dos Santos  
Sílvia Graciele Hulse de Souza

**DOI 10.22533/at.ed.86319180712**

**CAPÍTULO 13 ..... 130**

FENOLOGIA REPRODUTIVA DE *Quassia amara* L. (SIMAROUBACEAE)

Ana Paula Ribeiro Medeiros  
Osmar Alves Lameira  
Raphael Lobato Prado Neves  
Carolina Mesquita Germano  
Helaine Cristine Gonçalves Pires  
Fábio Miranda Leão  
Mariana Gomes de Oliveira

**DOI 10.22533/at.ed.86319180713**

**CAPÍTULO 14 ..... 138**

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO RHINELLA (BUFONIDAE) DE  
OCORRÊNCIA NOS BIOMAS DO MEIO NORTE DO BRASIL

Sulamita Pereira Guimarães  
Aryel Moraes de Queiroz  
Elmary da Costa Fraga  
Maria Claudene Barros

**DOI 10.22533/at.ed.86319180714**

**CAPÍTULO 15 ..... 148**

INCIDÊNCIA DE ESPINHA BÍFIDA NO ESTADO DO MARANHÃO, PRÉ- E PÓS-FORTIFICAÇÃO DE FARINHAS COM ÁCIDO FÓLICO

Rômulo Cesar Rezzo Pires  
Vanalda Costa Silva  
Beatriz Fernanda Santos da Silva

**DOI 10.22533/at.ed.86319180715**

**CAPÍTULO 16 ..... 155**

MARCADORES MOLECULARES CONFIRMAM A OCORRÊNCIA DA OSTRÁ *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) NO LITORAL MARANHENSE

Rodolf Gabriel Prazeres Silva Lopes  
Ícaro Gomes Antônio  
Lígia Tchaika  
Maria Claudene Barros  
Elmary da Costa Fraga

**DOI 10.22533/at.ed.86319180716**

**CAPÍTULO 17 ..... 167**

PADRÕES PARA O CULTIVO DE HORTALIÇAS EM ESPAÇOS RESIDENCIAIS NO INTERIOR DO MARANHÃO

Alaide Silva de castro  
Larissa Pinheiro Alves  
Mayara Cardoso Araújo Lima  
Ramile Vieira de Oliveira  
Allana Tereza Mesquita de Lima  
Ivanayra da Silva Mendes  
Gabriela Nunes da Piedade  
Joanderson Marques Silva  
Raquel Sobral da Silva  
Jardel Oliveira Santos

**DOI 10.22533/at.ed.86319180717**

**CAPÍTULO 18 ..... 174**

RECEPTIVIDADE ESTIGMÁTICA, VIABILIDADE E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DO PÓLEN DA ESPÉCIE *Delonix regia* (Bojerex Hook.) Raf. NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA – UEFS

Hortência Kardec da Silva  
Jéssica Barros Andrade  
Joseane Inácio da Silva Moraes  
Katiane Oliveira Porto

**DOI 10.22533/at.ed.86319180718**

**CAPÍTULO 19 ..... 185**

RECURSOS GENÉTICOS DE VIDEIRA NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Patrícia Coelho de Souza Leão

**DOI 10.22533/at.ed.86319180719**

<b>CAPÍTULO 20</b> .....	<b>194</b>
SELEÇÃO DE HÍBRIDOS DE MAMONEIRA PARA ALTA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES	
Sebastião Soares de Oliveira Neto	
Odila Friss Ebertz	
Larissa Chamma	
Maria Márcia Pereira Sartori	
Maurício Dutra Zanotto	
<b>DOI 10.22533/at.ed.86319180720</b>	
<b>CAPÍTULO 21</b> .....	<b>204</b>
USO DE DADOS DE MARCADORES MOLECULARES EM SIMULAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DE FRAGMENTOS DE LUEHEA DIVARICATA MART. & ZUCC. NO BIOMA PAMPA	
Caetano Miguel Lemos Serrote	
Lia Rejane Silveira Reiniger	
Valdir Marcos Stefenon	
Aline Ritter Curti	
Leonardo Severo Da Costa	
Aline Ferreira Paim	
<b>DOI 10.22533/at.ed.86319180721</b>	
<b>CAPÍTULO 22</b> .....	<b>226</b>
USO DE DADOS GENÔMICOS COMO INDICADORES DE IDENTIDADE E QUALIDADE NA GESTÃO DE COLEÇÕES MICROBIOLÓGICAS	
Luciana de Almeida	
Mariely Cristine dos Santos	
Mariana Machado Fidelis Nascimento	
Luciano Medina-Macedo	
Juliana Vitória Messias Bittencourt	
<b>DOI 10.22533/at.ed.86319180722</b>	
<b>CAPÍTULO 23</b> .....	<b>233</b>
VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS ESPONTÂNEOS DE MAMONEIRA COLETADOS EM DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS	
Sebastião Soares de Oliveira Neto	
Odila Friss Ebertz	
Maria Márcia Pereira Sartori	
Maurício Dutra Zanotto	
<b>DOI 10.22533/at.ed.86319180723</b>	
<b>SOBRE O ORGANIZADOR</b> .....	<b>244</b>
<b>ÍNDICE REMISSIVO</b> .....	<b>245</b>

## CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA EM GENÓTIPOS DE TRIGO: PRESENÇA DE MICRONÚCLEOS E VIABILIDADE POLÍNICA

### **Sandra Patussi Brammer**

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –  
Embrapa Trigo, Passo Fundo – RS.

### **Patrícia Frizon**

Universidade de Passo Fundo, Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia, Passo Fundo – RS.

### **Elizandra Andréia Urio**

Faculdades Ideau, Agronomia, Getúlio Vargas –  
RS.

**RESUMO:** O presente estudo teve por finalidade caracterizar citogeneticamente genótipos de trigo quanto à presença de micronúcleos e viabilidade polínica. O material biológico, pertence ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo, e consistiu de dois grupos distintos. No grupo I foram avaliadas 17 cultivares comerciais de trigo e no grupo II, 20 acessos de trigos sintéticos e seis cultivares comerciais de trigo. Em ambos os grupos, foram coletadas espigas nos estágios de pré-antese e de pólen maduro, seguida da fixação em Carnoy. As lâminas citológicas foram preparadas pela técnica de esmagamento, com corante carmim acético 1 % e observadas em microscópio ótico. Foram analisadas as variáveis tétrades normais, presença de micronúcleos, grãos de pólen viáveis e vazios, presença de mais de um poro e variação no tamanho do grão de pólen. Os resultados do grupo I mostraram que

apenas as cultivares de trigo BRS 208 e BRS 220 apresentaram tétrades com micronúcleos, embora a viabilidade polínica foi de 96% e 99%, respectivamente. No grupo II, as caracterizações quanto à presença de micronúcleos variaram entre os dois anos consecutivos de análises. O Índice Meiótico foi maior para as cultivares, comparadas aos trigos sintéticos, que, por sua vez, apresentaram variações entre 44% a 99%. Esses resultados representam a caracterização de importante germoplasma e permitem inferir sobre a estabilidade genética para posterior seleção e uso em programas de melhoramento do trigo.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Triticum aestivum*, trigo sintético, germoplasma, estabilidade genética.

### CITOGENETIC CHARACTERIZATION IN WHEAT GENOTYPES: PRESENCE OF MICRONUCLEI AND POLLEN VIABILITY

**ABSTRACT:** The present study aimed to characterize cytogenetically wheat genotypes considering the presence of micronuclei and pollen viability. The biological material belongs to the Germplasm Active Bank of Embrapa Wheat, and consisted of two distinct groups. In group I were evaluated 17 commercial wheat cultivars and in group II, 20 synthetic wheats accesses and six commercial wheat cultivars. In both

groups, spikes were collected in the pre-anthesis and mature pollen stages, followed by fixation in Carnoy. The cytological slides were prepared by smash technique with 1% acetic carmine dye and observed under optical microscopy. The variables normal tetrads, presence of micronuclei, viable and empty pollen grains, presence of more than one pore and variation in the size of the pollen grain were analyzed. The results of group I showed that only wheat cultivars BRS 208 and BRS 220 presented tetrads with micronuclei, although the pollen viability was 96% and 99%, respectively. In group II, the characterization of the presence of micronuclei varied between the two consecutive years of analysis. The Meiotic Index was higher for the cultivars, compared to the synthetic wheats, which presented variations between 44% and 99%. These results represent the characterization of important germplasm and allow to infer about genetic stability for later selection and use in wheat breeding programs.

**KEYWORDS:** *Triticum aestivum*, synthetic wheat, germplasm, genetic stability.

## 1 | INTRODUÇÃO

O trigo é uma das culturas mais antigas do mundo e foi essencial para o desenvolvimento da agricultura e da civilização atual. A espécie *Triticum aestivum* L. em Thell, pertence à família Poaceae, tribo Triticeae e subtribo Triticinae, sendo originado de cruzamentos de gramíneas silvestres que existiam próximas ao rio Tigre e Eufrates há milhares de anos. A subtribo compreende quinze espécies, reunidas em três grupos, denominados em função do seu número de cromossomos: diploide ( $2n=14$ ), tetraploide ( $2n=28$ ) e hexaploide ( $2n=42$ ) (FEDERIZZI et al. 2005). Vestígios fósseis dos primeiros trigos selvagens, datados de 17 mil anos, foram encontrados no Sudoeste da Ásia, em uma região conhecida como Crescente Fértil, atualmente chamado de Oriente Próximo e compreendendo o centro de origem dessas espécies (PIANA & CARVALHO, 2008).

Instituições de pesquisa têm desenvolvido genótipos de trigo adaptados a diferentes regiões e que apresentem elevadas produtividades, fazendo com que espécies de interesse possam ser melhoradas (GUTKOSKI et al. 2007). Na busca de variabilidade genética, as espécies silvestres, afins às plantas cultivadas, são germoplasma valiosos para a obtenção de novos genes agronomicamente úteis. A hibridação interespecífica é importante na utilização do reservatório de genes de algumas espécies silvestres que possuem resistência a fatores bióticos e abióticos, transferindo-se a resistência para outras espécies cultivadas suscetíveis (BRAMMER et al., 2000; OGBONNAYA et al., 2013). Entretanto, essa transferência depende de quanto e de como são introgrididos tais genes, tornando-se facilitada quando ambas as espécies apresentam maior homologia entre seus cromossomos, permitindo maior recombinação genética (MORAES-FERNANDES et al., 2000). Cabe ressaltar que o potencial prático da hibridação ampla em Triticeae é provavelmente muito maior do que em outros grupos, em função da facilidade de cruzamento, aliada ao amplo

conhecimento dos genomas, mas também como consequência da importância desta cultura para o mundo (MUJJEB-KAZI & KIMBER, 1985).

Os trigos sintéticos resultam do cruzamento entre espécies tetraploides (genomas AABB) e diploides (genoma DD), originando um híbrido estéril ABD, seguido de cultivo *in vitro* do embrião imaturo. Para restaurar a fertilidade, é feita a síntese artificial do trigo hexaploide duplicando os cromossomos (TRETOWAN & VAN GINKEL, 2009). O uso desse germoplasma visa à transferência de genes agronomicamente importantes para o trigo cultivado a partir de retrocruzamentos (MORAES-FERNANDES et al., 2000).

Para que um germoplasma seja disponibilizado, é imprescindível haver a caracterização quanto à estabilidade genética, que pode ser estimada pela presença de micronúcleos e viabilidade polínica (OLIVEIRA & PIERRE, 2018). Plantas em estado silvestre, ou em fase de pré-melhoramento, podem apresentar comportamento meiótico variável. Essas irregularidades são comumente relatadas na família Poaceae e, entre as mais comuns, verifica-se a migração precoce dos cromossomos para os polos e cromossomos retardatários em metáfases, micronúcleos em tétrades e citocinese anormal (BONATO et al., 2006; REZAI et al., 2010). Tais alterações podem interferir no desenvolvimento reprodutivo das plantas, uma vez que a meiose representa o estágio mais sensível do ciclo de vida das plantas cultivadas, a qual é influenciada diretamente por fatores genéticos e ambientais, além de refletir na viabilidade econômica da produção de sementes comerciais de uma nova cultivar gerada (ERICKSON & MARKHART, 2002; POZZOBON et al., 2015).

Andrade Junior et al. (2008) definem micronúcleos como estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que se perdem na divisão celular e por isso não são incluídas nos núcleos das células-filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas. Na telófase, essas estruturas são incluídas nas células-filhas e podem fundir-se com o núcleo principal ou formar um ou mais “núcleos” secundários menores no citoplasma, os micronúcleos. A determinação do Índice Meiótico (IM) é um procedimento simples para avaliar a regularidade do processo meiótico e é também uma técnica rápida citológico que prontamente demonstra o grau de estabilidade meiótica (LOVE 1951).

O objetivo do estudo foi de caracterizar genótipos de trigo quanto à presença de micronúcleos e viabilidade polínica, inferindo sobre a estabilidade genética para posterior seleção e utilização pelos programas de melhoramento genético desta cultura.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O material biológico foi consistido de dois grupos distintos: Grupo I) 17 cultivares brasileiras de trigo, lançadas após o ano de 2000 e mantidas no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo (BAG-Trigo). Nesse grupo, foram analisados a presença de micronúcleos em tétrades, o índice meiótico e a viabilidade polínica no

ano de 2012; Grupo II) 20 acessos de trigos sintético, oriundos do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT – México) e seis cultivares comerciais de trigo, servindo como controles, e mantidos no BAG-Trigo. As análises desse segundo grupo foram realizadas nos anos de 2014 e 2015, quanto aos micronúcleos e índice meiótico.

## **2.1 Semeadura e tratos culturais**

As cultivares do grupo I foram semeadas em vasos de plástico com solo corrigido e cultivadas em telado da Embrapa Trigo, sendo desenvolvidas cinco plantas/vaso e com duas repetições, totalizando dez plantas/cultivares. Para o grupo II, os genótipos foram semeados em campo na área experimental da Embrapa Trigo. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 26 tratamentos e com três repetições. Cada genótipo foi semeado em parcela constituída de uma linha de 5,00 m com 60 sementes aptas por metro linear. O espaçamento entre duas parcelas consecutivas foi de 0,40 m, e, a cada conjunto de duas parcelas, de 0,80 m. Para ambos os grupos, cuidados fitossanitários foram realizados para o pleno desenvolvimento das plantas, até o momento da obtenção e coleta das espigas.

## **2.2 Coleta e fixação das espigas**

Para avaliar as tétrades, a fim de identificar a presença de micronúcleos, foram coletadas cinco espigas por genótipo, no estágio anterior à antese, fixadas em Carnoy 3:1 (álcool etílico absoluto:ácido acético glacial) por 24 h em temperatura ambiente e armazenadas em álcool 70% a temperatura de -20 °C, até o momento de uso. Para avaliar a viabilidade polínica, outras cinco espigas de cada genótipo foram coletadas no estágio de pólen maduro, fixadas e armazenadas nas mesmas condições citadas anteriormente.

## **2.3 Preparação das lâminas e análises citogenéticas**

As análises quanto à presença de micronúcleos e viabilidade polínica foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia – área de citogenética da Embrapa Trigo. As lâminas citológicas de ambas as análises, foram preparadas através da mesma técnica. Foram usadas três anteras da mesma flor, coletadas da região mediana da espiga. A técnica utilizada foi da maceração e coloração das anteras com corante carmim acético 1%. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, sendo que cada genótipo representou um tratamento. De cada tratamento, foram feitas cinco repetições, onde cada repetição foi representada por uma espiga e para cada espiga foi confeccionada uma lâmina. Para verificar as anormalidades meióticas, em cada lâmina, as primeiras 200 tétrades foram contadas e analisadas quanto a tétrades normais e presença de micronúcleos. O Índice Meiótico (IM) foi calculado conforme Love (1949), onde  $IM = \frac{\text{número de tétrades normais}}{\text{número total}}$

de tétrades analisadas x 100. As cultivares com IM superior a 90% foram consideradas meioticamente estáveis. Para verificar a viabilidade polínica em cada lâmina, 100 grãos de pólen foram contados e analisados como grãos de pólen viáveis (bi/trinucleados e presença de amido), grãos de pólen inviáveis (vazios), grãos de pólen com mais de um poro e grãos de pólen com tamanhos diferentes. As lâminas foram observadas em microscópio óptico e a captura das melhores imagens foi realizada pelo programa Honestech TVR 2.5. A análise estatística utilizou o programa Genes (Cruz, 2013) onde foi feito primeiramente a análise da variância e posteriormente teste de Scott e Knott a 5 % de probabilidade.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Grupo I

##### *3.1.1 Análise das tétrades, presença de micronúcleos e Índice meiótico*

As cultivares estudadas diferiram bastante entre si com relação ao ciclo de emergência ao espigamento. Mediante este fato, para não haver discrepância entre os resultados, selecionou-se para o teste estatístico somente as cultivares onde foi possível realizar a coleta de espigas com tétrades, pois algumas já se encontravam no estágio de pólen maduro. Desta forma, as cultivares BRS Angico, BRS Guabijú, BRS Guamirim, BRS Umbú e CNT 10 foram retiradas desta análise. Em relação à análise de variância, os resultados evidenciaram que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas para a variável tétrades com micronúcleos. Em razão da natureza dos dados, fez-se necessário o uso do teste estatístico Scott e Knott para a normalização dos mesmos, principalmente pelo fato de que nem sempre foi possível analisar 200 tétrades por lâmina. A Tabela 1 apresenta o agrupamento de médias para as variáveis analisadas.

Cultivares	Índice meiótico	Tétrades normais	Micronúcleos (médias)	Micronúcleos %
BRS 208	92,1	96,20	5,0 a	2,5
BRS 220	89,3	107,2	4,0 a	2,0
Safira	92,4	115,5	2,0 b	1,0
BR 25	88,4	59,80	2,0 b	1,0
BRS Timbaúva	98,6	192,8	1,2 b	0,6
BR 33	97,0	193,6	1,0 b	0,5
BR 32	97,7	130,2	1,0 b	0,5
BR 24	98,2	128,2	0,0 b	0,0
Onix	91,4	183,3	0,4 b	0,2
BRS Louro	93,7	126,0	0,0 b	0,0
BRS Camboatá	98,2	139,4	0,0 b	0,0

Tabela 1 - Índice meiótico e médias obtidas na análise de tétrades normais e presença de micronúcleos em cultivares de trigo. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012

\*Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna no nível de 5% de probabilidade.

De acordo com Love (1949), plantas com índice meiótico inferior a 90% trazem problemas quando usadas em cruzamentos. As cultivares analisadas neste estudo exibiram elevado índice meiótico, podendo então, ser indicadas para cruzamentos em programas de melhoramento genético, por mostrarem meiose regular, com exceção das cultivares BRS 220 e BR 25 que mostraram valores abaixo de 90%. Ainda, as cultivares BRS 220 e BRS 208 apresentaram micronúcleos em suas tétrades, diferindo estatisticamente das demais.

Para Ramulu et al. (1991), micronúcleos grandes, observados em baixas concentrações de antimitóticos, são atribuídos a “má” separação dos cromossomos metafásicos. Do mesmo modo, Toniazzi et al. (2018) destacam que os micronúcleos podem ser formados por cromossomos bivalentes não orientados, assim como por cromossomos com ascensão precoce ou retardatária que ocorrem nas metáfases e anáfases da primeira e/ou da segunda divisão da meiose. A consequência biológica disso é que, como esses cromossomos não são distribuídos por igual nas células-filhas, haverá um desequilíbrio na distribuição do material genético, resultando na variação no número e no tamanho de grãos de pólen obtidos a partir da célula-mãe do pólen, bem como na formação de grãos de pólen geneticamente desbalanceados e/ou estéreis e com material genético diferente da célula-mãe.

No presente estudo, verificando os resultados obtidos pela análise de tétrades, inferiu-se que a maioria das cultivares apresentaram meiose regular, o que certamente resultaria em grãos de pólen viáveis e com material genético idêntico à célula original, contribuindo para a fertilidade destes grãos e para a fiel transmissão das características hereditárias. Estas cultivares que apresentaram normalidade na meiose, podem ser utilizadas em blocos de cruzamento de programas de melhoramento, por consequência de sua estabilidade genética.

### 3.1.2 Viabilidade polínica

A análise de variância apontou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente para a variável diferença de tamanho e as demais variáveis apresentaram normalidade (Tabela 2). As medidas dos grãos de pólen em diâmetro variaram entre 48,3  $\mu\text{m}$  e 61,8  $\mu\text{m}$ .

Cultivares	Normal	Vazio	Mais de um poro	Tamanhos diferente	Medida do diâmetro ( $\mu\text{m}$ )
BR 24	97,6	0,2	0,0	2,2 a	48,3
BR 25	99,2	0,4	0,0	0,4 b	58,5
BRS 208	96,2	3,8	0,0	0,0 b	59,0
BR33 Guar	99,0	1,0	0,0	0,0 b	54,0
BR 32	96,4	3,6	0,0	0,0 b	58,9
Safira	98,2	1,8	0,0	0,0 b	58,6
Onix	99,6	0,4	0,0	0,0 b	57,6
CNT 10	99,0	1,0	0,0	0,0 b	57,8
BRS Umbu	99,2	0,8	0,0	0,0 b	56,5
BRS Timbaúva	99,6	0,2	0,0	0,2 b	55,5
BRS Louro	99,2	0,6	0,2	0,0 b	60,0
BRS Guamirim	99,0	1,0	0,0	0,0 b	54,7
BRS Guabij	97,2	2,0	1,0	0,0 b	56,9
BRS Camboatá	98,6	1,4	0,0	0,0 b	59,5
BRS Angico	98,4	1,6	0,0	0,0 b	55,9
BRS 220	99,0	0,8	0,0	0,2 b	61,8
BRS 194	98,4	1,6	0,0	0,0 b	59,7

Tabela 2 – Categorias de gros de polens (indicados por suas médias) observados para as cultivares de trigo e analisados pelo teste Scott e Knott a 5%. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2012

\*Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna no nível de 5% de probabilidade.

Poças (2004) descreve os gros de pólen da família Poaceae de forma esférica, com opérculo rodeado por engrossamento da exina nas proximidades do poro formando um anel e dimensões variando entre 20 e 70  $\mu\text{m}$ . No presente estudo, analisando as medidas obtidas, pode-se verificar então, que as cultivares analisadas possuem grãos de pólen dentro do padrão descrito.

Quanto  caracterização da viabilidade polínica, foi observada uma variação entre 97,2% e 99,6%, confirmando também a estabilidade genética das cultivares estudadas por esse tipo de análise citogenética. Esses resultados também condizem com outros estudos para diferentes espécies, em que, normalmente, a viabilidade polínica fica acima de 90 %, quando analisada em materiais homocigotos como  o caso de cultivares (KELLY et al., 2002). Entretanto, quando se analisa linhas segregantes ou espécies com diferentes combinações genômicas como  o caso do triticale, a variação pode ser muito maior devido (ZANOTTO et al., 2009; BRAMBATTI et al.; 2016).

## 3.2 Grupo II

### 3.2.1 Análise das tétrades, presença de micronúcleos e ndice meiótico

Embora os mecanismos de reparo celular das plantas sejam eficientes, fatores bióticos e/ou abióticos, também podem levar a fragmentação do material genético

gerando células com micronúcleos (Omidi et al., 2014; Spósito et al., 2015. Nessa premissa, o presente estudo realizou análise de caracterização citogenética em dois anos consecutivos.

No ano de 2014, do total de genótipos caracterizados, 84% apresentaram micronúcleos (MCN) abaixo de 20%. Dois trigos sintéticos exibiram % MCN maiores de 50% e dois maiores de 30% (Tabela 3 I). Para o Índice Meiótico (IM), 21 genótipos incluindo cultivares tradicionais e acessos de trigos sintéticos apresentaram IM superior a 80% (Tabela 3 II).

(I) Genótipo	%		(II) Genótipo	IM	
CIGM92.1706	55,46	a	BRS 179	98,98	a
CIGM93.268	53,68	a	BRS Guamirim	97,96	a
CIGM93.20	38,10	b	Sumai 3	97,58	a
CIGM92.1680	30,20	b	CIGM93.403	96,86	a
CIGM90.896	19,20	c	CIGM92.1666	96,68	a
CIGM93.294	18,96	c	Trigo BR 18	96,56	a
CIGM93.302	13,44	c	CIGM93.298	96,34	a
CIGM90.909	12,96	c	CASW94Y00054S	96,12	a
CIGM93.200	11,56	c	BRS 194	94,70	a
CIGM93.225	10,50	c	CIGM92.1696	94,08	a
Frontana	10,28	c	CIGM88.1351-OB	92,82	a
CIGM92.1849	9,36	c	CIGM92.1698	91,80	a
CIGM92.1713	9,28	c	CIGM92.1713	90,72	a
CIGM92.1698	8,20	c	CIGM92.1849	90,64	a
CIGM88.1351-OB	7,18	c	Frontana	89,72	a
CIGM92.1696	5,92	c	CIGM93.225	89,50	a
BRS 194	5,30	c	CIGM93.200	88,44	a
CASW94Y00054S	3,88	c	CIGM90.909	87,04	a
CIGM93.298	3,66	c	CIGM93.302	86,56	a
Trigo BR 18	3,44	c	CIGM93.294	81,04	a
CIGM92.1666	3,32	c	CIGM90.896	80,80	a
CIGM93.403	3,14	c	CIGM92.1680	69,82	b
Sumai 3	2,42	c	CIGM93.20	61,90	b
BRS Guamirim	2,04	c	CIGM93.268	46,32	c
BRS 179	1,02	c	CIGM92.1706	44,54	c

Tabela 3 – (I) Percentual de tetrades com micronúcleo (MCN) e (II) Índice Meiótico (IM), avaliadas em acessos de trigos sintéticos e cultivares de trigo. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2014

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott e Knott a 5 %

No ano de 2015, a variabilidade quanto ao percentual de tetrades com micronúcleo e o índice meiótico foi maior. Nesse ano, 15 acessos apresentaram IM superior a 90%, incluindo as seis cultivares testemunhas, sete apresentaram IM de 89 a 75%, e quatro apresentaram abaixo de 74% (Tabela 4).

(I) Genótipo	%		(II) Genótipo	IM	
CIGM90.896	52,04	a	BRS 179	99,54	a
CIGM92.1629	43,62	a	Trigo BR 18	97,06	a
CIGM93.268	30,38	b	CIGM93.294	96,60	a
CIGM93.205	26,94	b	Frontana	96,20	a
CIGM92.169	22,50	c	BRS Guamirim	96,08	a
CIGM92.1680	16,66	c	CIGM93.302	95,84	a
CIGM88.1351-OB	15,42	c	CIGM92.1713	95,30	a
CIGM92.1698	14,58	c	CIGM92.1849	92,50	a
CIGM90.909	14,08	c	CASW94Y00054S	92,50	a
CIGM92.1706	12,74	c	BRS 194	92,04	a
CIGM93.298	11,58	c	CIGM92.1666	91,56	a
Sumai 3	9,36	d	CIGM93.200	91,14	a
CIGM93.225	9,02	d	CIGM93.403	91,12	a
CIGM93.403	8,88	d	CIGM93.225	90,98	a
CIGM93.200	8,86	d	Sumai 3	90,64	a
CIGM92.1666	8,44	d	CIGM93.298	88,42	b
BRS 194	7,98	d	CIGM92.1706	87,26	b
CIGM92.1849	7,50	d	CIGM92.1680	86,34	b
CASW94Y00054S	7,50	d	CIGM90.909	85,92	b
CIGM92.1713	4,70	d	CIGM92.1698	85,42	b
CIGM93.302	4,16	d	CIGM88.1351-OB	84,58	b
BRS Guamirim	3,92	d	CIGM92.1696	75,50	b
Frontana	3,80	d	CIGM93.205	73,06	c
CIGM93.294	3,40	d	CIGM93.268	69,62	c
Trigo BR 18	2,94	d	CIGM92.1629	56,38	d
BRS 179	0,46	d	CIGM90.896	47,96	d

Tabela 4 - (I) Percentual de tétrades com micronúcleo (MCN) e (II) Índice Meiótico (IM), avaliadas em acessos de trigos sintéticos e cultivares de trigo. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2015

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott e Knott a 5 %

Comparando-se os dois anos de análise, as seis cultivares utilizadas como testemunhas permaneceram no grupo de melhor Índice meiótico. No entanto, os acessos de trigos sintéticos, com melhores índices meióticos diferiram entre os anos, sendo que em 2014 o acesso CIGM93.403 (IM 96,86) teve o melhor resultado e em 2015 o acesso CIGM93.302 (IM 95,84).

Em programas de pré-melhoramento genético, é importante avaliar o comportamento cromossômico dos híbridos, bem como inferir sobre a estabilidade genética acessada a partir de análise do Índice meiótico. Combinações gênicas advindas de introgressões entre espécies relacionadas, faz com que a duração do ciclo meiótico varie nos diferentes genomas, ocasionando, em muitos casos, instabilidades meióticas. Nesse contexto, o grau de fertilidade das plantas é demonstrado pelo comportamento meiótico, sendo a formação de gametas funcionais controlada por genes que garantem um processo meiótico normal (PAGLIARINI, 2000).

Portanto, o uso adequado dos recursos genéticos fornece aos produtores a variabilidade que eles necessitam para melhoramento futuro, dedicando esforços no aumento do rendimento, por incorporação de novos genes ou combinações de genes visando resistência a doenças e pragas (SKOVMAND et al., 2002). Pelo presente estudo foi possível caracterizar genótipos de trigo que poderão servir de base para outros estudos biológicos e/ou para a seleção de futuros parentais em programas de melhoramento genético.

## 4 | CONCLUSÕES

A caracterização citogenética do grupo I demonstrou que apenas as cultivares de trigo BRS 208 e BRS 220 apresentaram tétrades com micronúcleos, embora a viabilidade polínica foi de 96% e 99%, respectivamente, não influenciando na viabilidade dos grãos de pólen. No grupo II, as caracterizações quanto à presença de micronúcleos variaram entre os dois anos consecutivos de análises, onde o Índice Meiótico foi maior para as cultivares, comparadas aos trigos sintéticos, que, por sua vez, apresentaram variações entre 44% a 99%.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE JUNIOR, S.J. de; SANTOS JUNIOR, J.C.S.; OLIVEIRA, J.L.; CERQUEIRA, E.M.M.; MEIRELES, J.R.C. Micronúcleos em tétrades de *Tradescantia pallid* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* Boom: alterações genéticas decorrentes de poluição de aérea urbana. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 30, p. 295-301, 2008.

BONATO, A.; RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S; VALLE, C.B. Chromosome number and meiotic behaviour in *Brachiaria jubata* (Gramineae). **Journal of Genetic**, v. 85, p. 83–87, 2006.

BRAMBATTI, A.; BRAMMER, S.P.; WIETHÖLTER, P.; NASCIMENTO JUNIOR, A. Estabilidade genética em triticale estimada pela viabilidade polínica. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-7, 2016.

BRAMMER, S.P.; BARCELLOS, A.L.; MORAES-FERNANDES, M.I.B.; MILACH, S.K. Bases genéticas da resistência durável à ferrugem da folha do trigo e estratégias biotecnológicas para o melhoramento no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 5-20, 2000.

CRUZ, C.D. **Programa genes: diversidade genética**. Editora UFV. Viçosa, 2008. 278 p.

DIEGUES, P.I.; DAMASCENO JUNIOR, P.C.; RIBEIRO, N.V.S.; REIS, M.V.M.; ABOUD, A.C.S. Comportamento meiótico e viabilidade polínica na espécie *Jatropha curcas* L. **Ciências Agrárias**, v. 36, p. 141-150, 2015.

ERICKSON, A.N.; MARKHART, A.H. Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 123-130, 2002.

FEDERIZZI, L.C.; SCHEEREN, P.L.; NETO, J.F.B.; MILACH, S.C.K.; PACHECO, M.T. Melhoramento do Trigo. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2ª ed. Viçosa: UFV, 2005. p. 659-715.

- GUTKOSKI, L.C.; KLEIN, B; PAGNUSSAT, F.A.; PEDÓ, I. Características tecnológicas de genótipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) cultivados no Cerrado. Lavras, **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 786-792, 2007.
- KELLY, J.K.; RASCH, A.; KALISZ, S. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. **American Journal of Botany**, v. 89, p.1021-1023, 2002.
- LOVE, R.M. Estudos Citológicos Preliminares de Trigos Rio-Grandenses. Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio, Porto Alegre. **Circular**, **74**, p. 23, 1949.
- LOVE, R.M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. **Agronomy Journal**, v. 43, p. 72-76, 1951.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B.; ZANATTA, A.C.A.; PRESTES, A.M.; CAETANO, V.R.; BARCELLOS, A.L.; ANGRA, D.C.; PANDOLFI, V. Cytogenetics and immature culture embryo at Embrapa Trigo breeding program: transfer of disease from related species by artificial resynthesis of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p.1051-1062, 2000.
- MUJEEB-KAZI, A.; KIMBER, G. The production, cytology and practicality of wide hybrids in *Triticeae*. **Cereal Research Communications**, v. 13, p.111-124, 1985.
- OGBONNAYA, F.C.; ABDALLA, O.; MUJEEB-KAZI, A.; KAZI, A.G.; XU, S.S.; GOSMAN, N. Synthetic hexaploids: harnessing species of the primary gene pool for wheat improvement. **Plant Breeding**, v. 37, p.35-122, 2013.
- OLIVEIRA, L.B.P.; PIERRE, P.M.O. Índice meiótico e palinologia de cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC-Myrtaceae). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 17, p. 481-490, 2018.
- OMIDI, M.; SIAHPOOSH, M.R.; MAMGHANI, R.; MODARRESI, M. The influence of terminal heat stress on meiosis abnormalities in pollen mother cells of wheat. **Cytologia**, v.79, n. 1, p. 49-58, 2014.
- PAGLIARINI, M.Q.S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 997-1002, 2000.
- PIANA, C.F.B.; CARVALHO, F.I.F. Trigo. In: BARBIERI, R.L.; STUMPI, E.R.T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. 1ª Ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 821-851.
- POÇAS, M.E.P. **Palinologia**, 2004. Disponível: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/577/16/Cap%20I%20V.pdf>.
- POZZOBON, M.T.; BIANCHETTI, L.B.; SANTOS, S.; CARVALHO, S.I.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; RIBEIRO, C.S.C. Comportamento meiótico em acessos de *Capsicum chinense* Jacq. do Banco de Germoplasma da Embrapa, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 2, 2015.
- RAMULU K.S.; VERHOEVEN, H.A.; DIJKHUIS, P. Mitotic blocking, micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, amiprofos-methyl and colchicine in potato. **Protoplasma**, v. 160, p. 65-71, 1991.
- REZAEI, M.; ARZANI, A.; SAYED-TABATABAEI, B.E. Meiotic behaviour of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*) and their synthetic hexaploid wheat derivatives influenced by meiotic restitution and heat stress. **Journal of Genetics**, v.89, n.4, p.401-407, 2010.
- SKOVMAND, B.; RAJARAM, S.; RIBAUT, J. M.; HEDE, A.R. Wheat genetic resources. In: CURTIS, B.C.; RAJARAM, S.; MACPHERSON, H.G. **Bread wheat: improvement and production**. 1ª Ed. Rome: FAO, 2002. p. 89-101.

TONIAZZO, C.; BRAMMER, S. P.; CARGNIN, A.; WIETHÖLTER, P. Ocorrência de micronúcleos e inferência da instabilidade genética em acessos de trigos sintéticos. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento online** n° 88 / **Embrapa Trigo**, 18p, 2018. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1091920/1/ID443292017BPDO88.pdf>.

TRETHOWAN R.M.; VAN GINKEL M., 2009. Synthetic wheat – an emerging genetic resource. In: CARVER, B. **Wheat - Science and Trade**, USA: Ames, 2009, p. 369-386.

ZANOTTO, M.; BRAMMER, S.P.; NASCIMENTO JUNIOR, A.; SCAGLIUSI, S. Viabilidade polínica como seleção assistida no programa de melhoramento genético de triticales. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 2078-2082, 2009.

## CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA PARTE AÉREA DE ACESSOS DE *PSYCHOTRIA IPECACUANHA* (IPECA)

### **Raphael Lobato Prado Neves**

Universidade Federal Rural da Amazônia  
Belém-Pará

### **Osmar Alves Lameira**

Embrapa Amazônia Oriental  
Belém-Pará

### **Ana Paula Ribeiro Medeiros**

Universidade Federal de Lavras, Departamento  
de agricultura  
Lavras-Minas Gerais

### **Helaine Cristine Gonçalves Pires**

Universidade Federal Rural da Amazônia  
Capitão-poço-Pará

### **Mariana Gomes de Oliveira**

Instituto Federal do Pará  
Marabá-Pará

### **Carolina Mesquita Germano**

Universidade Federal de Lavras  
Lavras-Minas Gerais

### **Fábio Miranda Leão**

Universidade Federal do Pará  
Altamira-Pará

de Germoplasma de *Psychotria ipecacuanha* por caracteres morfológicos, e identificar descritores. Foram estudados 17 acessos de *Psychotria ipecacuanha*, conservados *in vivo* na Embrapa Amazônia Oriental para 19 caracteres morfológicos da parte aérea da planta, sendo treze qualitativos e seis quantitativos. Desse total doze foram submetidos às análises multivariadas. A seleção dos descritores foi realizada pela análise de componentes principais. Os acessos de *Psychotria ipecacuanha* apresentaram variações para boa parte dos caracteres, sendo sete qualitativos não variáveis. Dois caracteres foram considerados redundantes e dez selecionados como descritores. As dissimilaridades genéticas variaram de 0,19 a 0,77 com média de 0,55 e permitiram separar os acessos em dois com vários subgrupos e seis grupos divergentes pelos métodos UPGMA e de Tocher, respectivamente. Os caracteres “Altura da planta” e “Altura da primeira ramificação” foram os que mais contribuíram para a divergência entre os acessos. Os acessos de *Psychotria ipecacuanha* possuem ampla variação morfológica para a parte aérea da planta com dez caracteres sendo considerados descritores para essa espécie. Estas informações servirão de base para o manejo do banco de germoplasma, na seleção de indivíduos de interesse dos programas de

**RESUMO:** A espécie *Psychotria ipecacuanha* (Brotero) Stokes, Rubiaceae, conhecida popularmente como ipeca, ipecacuanha ou poaia, encontra-se ameaçada de erosão genética e em vias de extinção. Caracterizar e avaliar acessos do Banco Ativo

melhoramento e para fornecer informações fundamentais que facilitarão a identificação de espécimes em ecossistemas nativos ou plantados.

**PALAVRAS-CHAVE:** componentes principais; variação morfológica; agrupamentos; plantas medicinais; Rubiaceae.

## CHARACTERIZATION AND MORPHOLOGICAL EVALUATION OF AERIAL PARTS OF ACCESSIONS OF *PSYCHOTRIA IPECACUANHA* (BROT.) STOKES (IPECA)

**ABSTRACT:** The species *Psychotria ipecacuanha* (Brotero) Stokes, Rubiaceae, popularly known as ipeca, ipecacuanha or poaia, is threatened by genetic erosion and endangered. Identify and evaluate access of Germoplasm Active Bank of *Psychotria ipecacuanha* by morphological characters, and identify descriptors. Were studied 17 access of *Psychotria ipecacuanha*, preserved in vivo at Embrapa Amazônia Oriental by 19 morphological characters of the aerial part of the plant, being thirteen qualitative and six quantitative. Of this total twelve were subjected to multivariate analysis. The selection of descriptors was conducted by principal component analysis. *Psychotria ipecacuanha* access fluctuated for the most of the characters, seven qualitative and not variables. Two characters were considered redundant and ten selected as descriptors. The genetic dissimilarity ranged from 0.19 to 0.77 with a mean of 0.55 and allowed to separate into two accesses with various subgroups and six different groups by UPGMA methods and Tocher, respectively. The characters “Plant height” and “Height of the first branch” were the main contributors to the discrepancy between the accesses. *Psychotria ipecacuanha* access have extensive morphological variation to the aerial part of the plant with ten characters being considered descriptors for this species. These information form the basis for the management of germplasm bank, in the selection of subjects of interest to breeding programs and to provide key information that will facilitate the identification of specimens in native or planted ecosystems.

**KEYWORDS:** principal components; morphological variation; groups; medicinal plants; Rubiaceae.

## 1 | INTRODUÇÃO

A espécie *Psychotria ipecacuanha* (Brotero) Stokes, Rubiaceae, conhecida popularmente como ipeca, ipecacuanha ou poaia, encontra-se ameaçada de erosão genética e em vias de extinção (OLIVEIRA; MARTINS, 1998). Os fatores que têm contribuído para essa ameaça envolvem a exploração intensa a partir do século XVI, devido elevado valor comercial de suas raízes; desmatamento da Mata Atlântica e a abertura de novas fronteiras agrícolas diminuindo suas áreas de ocorrência natural; a forma extrativista com plantios de *P. ipecacuanha* inexpressivos e sem o manejo adequado; e a dificuldade do cultivo convencional da espécie, frente à grande demanda de mercado (LAMEIRA, 2002; ROCHA; LAMEIRA, 2011). Além disso, a espécie apresenta escassez de estudos que possam orientar plantios racionais, principalmente

aqueles que envolvam a geração de conhecimentos sobre o germoplasma conservado.

Há registros de que nas raízes de *P. ipecacuanha* são encontrados valiosos alcaloides como, a psicotrina, emetina e cefalina, que conferem à espécie poderes eméticos, amebicida, expectorante e anti-inflamatório (LAMEIRA, 2002). Essas propriedades medicinais são conhecidas e utilizadas pelas populações nativas, desde antes do descobrimento do Brasil, os quais foram repassados aos colonizadores europeus, contribuindo para a espécie integrar a pauta de produtos tropicais exportados pelo Brasil no período colonial, sendo considerada como a espécie de maior valor medicinal da época (MIRANDA, 1983; AKERELE et al., 1991; ASSIS, 1992; CORRÊA, 2010).

No Brasil, esforços contínuos de pesquisadores tentam mostrar a viabilidade do uso, da manipulação e da disponibilização de plantas com potencial mercadológico (OLIVEIRA, 2005). Com vista a avançar nestes estudos e na conservação da espécie, em 1989, foi estabelecido o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *P. ipecacuanha*, na Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, sendo este o único banco ativo de *P. ipecacuanha* existente. Porém, nesse banco os acessos ainda não foram caracterizados e avaliados morfológicamente.

A caracterização e a avaliação morfológica se mostram vantajosas por manter as informações dos BAG's atualizadas e disponíveis para os mais diversos usos, além de apresentar baixo custo em comparação com as demais técnicas, pelo fato de ser elaborada *in vivo* e em curto tempo, não precisando de equipamentos complexos ou análises laboratoriais e que elevam o dispêndio financeiro. Essas atividades auxiliam na seleção prévia de indivíduos de interesse, onde descritores bem definidos podem garantir características hereditárias próprias e fornecer os elementos para manutenção da pureza vegetal, além de haver facilidade em ser replicada periodicamente (SILVA, 2014).

Visando contribuir com informações que servirão de base para a seleção de indivíduos de interesse dos programas de melhoramento genético; além de fornecer informações fundamentais que facilitarão a identificação de indivíduos em ecossistemas nativos ou plantados; este estudo inédito para a espécie em foco, teve o objetivo de caracterizar e avaliar acessos pertencentes ao banco ativo de germoplasma de *P. ipecacuanha*, e identificar descritores morfológicos para a espécie.

## 2 | MÉTODOS

### Área do estudo

O estudo foi realizado no Banco Ativo de Germoplasma de *P. ipecacuanha*, situado no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Oriental, com altitude de 10m e temperatura média anual de 30°C. O clima em Belém, segundo a classificação

de Köppen (1900-1936) é do tipo Afi, ou seja, clima tropical chuvoso de monção. A pluviosidade média anual é de  $2.858,7 \pm 76,6$  mm/ano com maior volume no período chuvoso (dezembro a maio), correspondendo a 71,2 % do total anual, enquanto que os 28,8 % restantes são distribuídos nos meses de junho a novembro (SILVA JÚNIOR et al., 2012).

### **Germoplasma avaliado**

Foram avaliados 17 acessos, conservados *in vivo* no banco ativo de germoplasma de *Psychotria ipecacuanha* (Brotero) Stokes, Rubiaceae; em cada acesso foram selecionados cinco indivíduos para a caracterização morfológica. Os acessos se encontram em ambiente onde há o controle de pragas e doenças, adubação orgânica e intensidade luminosa com sombrite 50%.

Os acessos foram coletados em diferentes localidades de três Estados do Brasil, sendo seis em Mato Grosso (590, 595, 596, 602, 607 e 707); um acesso em Minas Gerais (753); e dez acessos em Rondônia (610, 612, 819, 826, 828, 829, 833, 834, 836 e 837).

### **Caracterização morfológica**

Os caracteres morfológicos qualitativos utilizados foram: Forma foliar (FF); Base foliar (BF); Ápice foliar (AF); Cor da folha apical (CDFA); Cor do pecíolo (CDP); Cor da nervura foliar (CDN); Tipo de caule (TC); Tipo de folha (TF); Filotaxia (F); Consistência da folha (CDF); Tipo de venação foliar (TDVF); Tipo de estípula (TDE); Posição do pecíolo (PDP). Os caracteres forma foliar, base foliar e ápice foliar foram aplicados com base em Carlton (1961); enquanto as cores da folha apical, do pecíolo e da nervura foliar foram observadas com o auxílio da carta de cores *Standard Leaf Color Charts* (KIUCHI; YAZAWA, 1972).

### **Seleção de descritores e divergência genética entre os acessos**

Os caracteres morfológicos quantitativos avaliados foram: Altura da planta (AP), em centímetros; Altura da primeira ramificação (APR), em centímetros; Número de nós na haste principal (NNHP), pela contagem dos nós existentes na planta; Largura da folha (LF); Comprimento da folha (CF); e Comprimento do pecíolo (CP), em centímetros. Com exceção do número de nós na haste principal, os demais foram aferidos com auxílio de régua e paquímetro.

Após tabulação dos dados, foram eliminados os caracteres qualitativos redundantes ou invariáveis e os demais foram utilizados juntos com os quantitativos para a seleção dos descritores com base em dois procedimentos com o auxílio do *software Genes* (CRUZ, 2006): o primeiro procedimento foi o de seleção direta, proposto por Jolliffe (1972; 1973), neste caso foram eliminados todos os caracteres que apresentaram maior coeficiente de ponderação em valor absoluto (autovetor) no

componente principal de menor autovalor, partindo do último componente até aquele cujo autovalor não excedesse a 0,70. O segundo foi o a seleção com reanálise, sugerida por Cury (1993), em que a cada caráter descartado, foi realizada nova análise com os caracteres remanescentes, examinando os coeficientes de correlação do caráter sugerido para descarte com os demais caracteres, sendo finalizada quando o caráter a ser descartado se mostrou altamente correlacionado com pelo menos um caráter já descartado. O descarte final foi realizado com base na informação obtida simultaneamente nos dois procedimentos.

Os dez descritores selecionados foram utilizados, no mesmo software, para a obtenção das dissimilaridades entre cada par de acesso com base na distância euclidiana média padronizada, uma vez que os acessos encontram-se estabelecidos sem obedecer a nenhum delineamento experimental, assim como os caracteres em diferentes medidas e escalas. Esta análise foi executada com base na média de cada caráter.

A matriz de distâncias obtidas foi utilizada na formação dos agrupamentos pelos métodos *Unweighted Paired Group Method Using Arithmetic Averages* (UPGMA) (CRUZ, 2004), de otimização de Tocher e pela análise de componentes principais.

### 3 | RESULTADOS

#### Caracterização morfológica

Dos treze caracteres qualitativos foram eliminados sete caracteres por não terem apresentado variação entre os acessos: Tipo de caule (Ereto); Tipo de folha (Simples); Filotaxia (Opostas decussadas); Consistência da folha (Membranosa); Tipo de venação foliar (Peninérvea); Tipo de estípula (Interpeciolada); Posição do pecíolo (Oposto), enquanto os demais mostraram duas variações (tabela. 1).

Acessos	Forma da folha	Base foliar	Ápice foliar	Cor da folha apical	Cor do pecíolo	Cor da nervura
590	Obovada	Revoluta	Agudo	Verde claro	Verde escuro	Verde escuro
595	Elíptica	Cuneada	Agudo	Verde claro	Verde escuro	Verde escuro
596	Obovada	Revoluta	Agudo	Verde claro	Verde claro	Verde escuro
602	Elíptica	Cuneada	Acuminado	Verde claro	Verde escuro	Verde escuro
607	Elíptica	Cuneada	Agudo	Verde escuro	Verde escuro	Verde claro
610	Elíptica	Cuneada	Agudo	Verde claro	Verde claro	Verde claro

612	Obovada	Cuneada	Agudo	Verde escuro	Verde escuro	Verde claro
707	Obovada	Revoluta	Agudo	Verde claro	Verde claro	Verde claro
753	Obovada	Revoluta	Agudo	Verde escuro	Verde claro	Verde claro
819	Obovada	Cuneada	Agudo	Verde escuro	Verde claro	Verde claro
826	Elíptica	Cuneada	Agudo	Verde escuro	Verde escuro	Verde claro
828	Obovada	Cuneada	Agudo	Verde claro	Verde escuro	Verde claro
829	Elíptica	Cuneada	Agudo	Verde escuro	Verde escuro	Verde claro
833	Elíptica	Cuneada	Agudo	Verde escuro	Verde claro	Verde claro
834	Obovada	Cuneada	Acuminado	Verde escuro	Verde claro	Verde escuro
836	Obovada	Cuneada	Acuminado	Verde escuro	Verde claro	Verde claro
837	Obovada	Cuneada	Acuminado	Verde escuro	Verde claro	Verde claro

Tabela 1. Variação de seis caracteres morfológicos qualitativos em 17 acessos de *P. ipecacuanha* conservados no BAG da Embrapa.

Nos acessos, o caráter Forma foliar (FF) variou de “Obovada” e “Elíptica”, sendo 10 acessos (590, 596, 612, 707, 753, 819, 828, 834, 836 e 837) de forma foliar obovada e sete (595, 602, 607, 610, 826, 829 e 833) elíptica. O caráter Base foliar (BF) obteve duas variações “Revoluta” e “Cuneada”, onde 13 acessos (595, 602, 607, 610, 612, 819, 826, 828, 829, 833, 834, 836 e 837) foram classificados como “Cuneada” e quatro (590, 596, 707 e 753) como “Revoluta”. Para o caráter Ápice foliar (AF), a variação foi de “Acuminado” e “Agudo”, sendo que 13 acessos (590, 595, 596, 607, 610, 612, 707, 753, 819, 826, 828, 829 e 833) foram classificados como “Agudo” e quatro (602, 834, 836 e 837) como “Acuminado”.

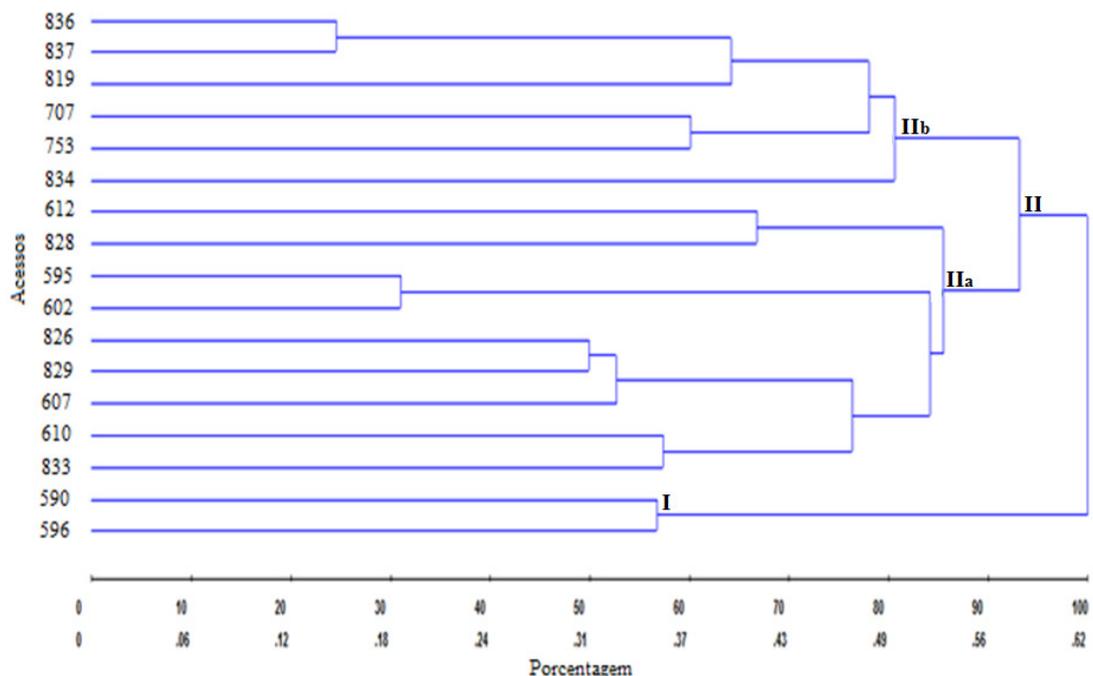
Os caracteres Cor da folha apical (CDFA), Cor do pecíolo (CDP) e Cor da nervura foliar (CDN) apresentaram duas tonalidades “Verde escuro” e “Verde claro”, mas de intensidades distintas (Tabela 1). Para a Cor da folha apical (CDFA) 10 acessos (607, 612, 753, 819, 826, 829, 833, 834, 836 e 837) apresentaram folha apical verde escuro (7.5 GY 4 / 4) e sete acessos (590, 595, 596, 602, 610, 707 e 828) verde claro (7.5GY 4.5 / 5). No caráter Cor do pecíolo (CDP), oito acessos (590, 595, 602, 607, 612, 826, 828 e 829) foram classificados como “verde escuro” (7.5GY 3.5 / 4) e nove acessos (596, 610, 707, 753, 819, 833, 834, 836 e 837) como “verde claro” (7.5GY 4.5 / 4). No caso da Cor da nervura foliar (CDN) cinco acessos (590, 595, 596, 602 e 834) foram classificados como “verde escuro” (7.5GY 5 / 7) e 12 acessos (607, 610, 612, 707, 753, 819, 826, 828, 829, 833, 836 e 837) como “verde claro” (7.5GY 6 / 7).

## Seleção dos descritores e divergência entre os acessos

Dos doze caracteres avaliados foram sugeridos para descarte dois deles: um qualitativo, o Ápice foliar (AF), e um quantitativo, o Comprimento da folha (CF), os quais se mostraram redundantes nos dois procedimentos utilizados. Os demais caracteres foram sugeridos como descritores para a espécie.

As dissimilaridades obtidas entre os 136 pares de acessos variaram de 0,15 a 0,77 (tabela. 2) com média de 0,55. Os acessos mais semelhantes, ou seja, de maior similaridade foram os acessos 836 x 837, que apresentaram a menor distância (0,15), seguido pelos acessos 595 x 602, com 0,19 de dissimilaridade. Os pares de acessos mais divergentes, ou seja, de maior dissimilaridade foram 602x819, 596x826 e 596x829, todos com a maior distância (0,77).

Com base no método UPGMA os 17 acessos formaram dois grupos divergentes: o I contendo os acessos 590 e 596, coletados em diferentes Municípios do Estado de Mato Grosso e o II pelos demais acessos (Figura 1). No grupo II os acessos foram organizados em vários subgrupos, com dois subgrupos apresentando consistência acima de 90% (IIa e IIb). No subgrupo IIa ficaram nove acessos (612, 828, 595, 602, 826, 829, 607, 610 e 833) a maioria coletado no Município de Costa Marques, Ro. Enquanto no subgrupo IIb foram agrupados seis acessos de diferentes localidades (836, 837, 819, 707, 753 e 834).



**Figura 1.** Dendrograma gerado pelo método UPGMA, a partir das dissimilaridades obtidas entre os 17 acessos de *P. ipecacuanha* conservados no BAG da Embrapa com base em dez caracteres morfológicos selecionados.

Pelo método de Tocher houve a formação de seis grupos divergentes entre os 17 acessos (tabela 3). No grupo I foram agrupados sete acessos (836, 837, 610, 833, 829, 826 e 707) de diferentes localidades; o grupo II contendo dois acessos (590 e 596), ambos coletados em Mato Grosso, sendo esse coincidente ao grupo I formado pelo método UPGMA; o grupo III formado também por dois acessos (753 e 834) coletados em diferentes Estados; o grupo IV formado por quatro acessos (607, 828, 595 e 602), três deles coletados em Mato Grosso; e os grupo V e VI constituído por um acesso, 612, de Costa Marques e 819 de Cacoal, respectivamente.

Grupos	Acessos						
	I	836	837	610	833	829	826
II	590	596					
III	753	834					
IV	607	828	595	602			
V	612						
VI	819						

**Tabela 3.** Grupos formados pelo método de Tocher, a partir das dissimilaridades obtidas entre os 17 acessos de *Psychotria ipecacuanha* conservados no BAG da Embrapa com base em dez caracteres morfológicos selecionados.

A Altura da planta (AP) e Altura da primeira ramificação (APR) foram os caracteres que mais contribuíram para a divergência entre os 17 acessos com mais de 44% e 35%, respectivamente (tabela 4). Por outro lado, a menor contribuição ocorreu no caráter comprimento do pecíolo (CP) com 0,08 %.

Caracteres	S,j	Contribuição (%)
Número de nós na haste principal (NNHP)	77,2	2,76
Largura da folha (LF)	174,12	6,23
Altura da planta (AP)	1235,98	44,23
Altura da primeira ramificação (APR)	980,9	35,10
Comprimento do pecíolo (CP)	2,34	0,08
Forma foliar (FF)	70	2,50
Base foliar (BF)	52	1,86
Cor da folha apical (CDFA)	70	2,50
Cor do pecíolo (CDP)	72	2,58
Cor da nervura foliar (CDN)	60	2,15

**Tabela 4.** Contribuição relativa de dez caracteres morfológicos para a divergência entre 17 acessos de *Psychotria ipecacuanha* do BAG da Embrapa.

## 4 | DISCUSSÃO

### Caracterização morfológica

Assis & Giuliatti (1999) em um estudo comparativo de populações de ipeca, afirmaram que as variações associadas ao comprimento e largura das folhas, estão expressas na variação das folhas, na qual variaram desde elípticas até ovais, oblongo-lanceoladas ou obovais. Observaram também que não houve correlação entre os padrões de morfologia foliar encontrados e a distribuição geográfica.

No presente estudo as variações morfológicas da forma da folha estão entre Obovada e Elíptica, sendo que a maioria (dez acessos) foi representada por Obovada e os demais, como elíptica. Este resultado está de acordo com a caracterização morfológica feita por Assis & Giuliatti (1999).

### Seleção de descritores e divergência entre os acessos

Para a seleção de descritores, todo caráter deve apresentar uma parcela de contribuição na variação do germoplasma analisado. Mas há uma tendência de que o aumento do número de descritores avaliados ocasione a presença de caracteres redundantes, posto que esses caracteres quase sempre estão associados a outros (CRUZ, 2004). A eliminação dos redundantes é uma decisão vantajosa, pois reduz o trabalho sem ocasionar perda na precisão da caracterização, especialmente se esses caracteres forem de difícil mensuração e apresentarem baixa variabilidade (DAHER, 1993), por isso, neste trabalho foram eliminados todos os caracteres redundantes.

A análise de componentes principais vem se destacando como a metodologia mais empregada em bancos e ou coleções de germoplasma, pois além de identificar os caracteres mais importantes na contribuição de variação total disponível entre os indivíduos analisados, fornece indicação para eliminar os que pouco contribuem (PEREIRA, 1989).

Assis & Giuliatti (1999) realizando avaliação de 97 populações de *P. ipecacuanha* de diversas procedências, baseadas no exame de exsicatas provenientes de diversos herbários nacionais e estrangeiros, afirma que o primeiro componente principal foi a simetria da folha, que incluiu o comprimento e a largura das folhas e que representou 72,4% do total. O segundo componente principal foi a distância entre os entrenós e que representou 13,1% da variabilidade total.

A diversidade genética pode estar associada à distância geográfica. Neste estudo, os acessos com maior dissimilaridade (602x819, 596x826 e 596x829) apresentam procedência de diferentes estados, sendo 602 e 596 procedentes do estado do Mato Grosso e os acessos 819, 826 e 829 do estado de Rondônia. O mesmo ocorreu para os acessos que apresentaram a menor dissimilaridade, ou seja, os mais semelhantes, sendo os acessos 836x837 procedentes de Rondônia e 595x602 do Mato Grosso. Fatores, como a seleção, deriva genética, fluxo gênico, entre outros, podem atuar de

forma conjunta ou isolada, em diferentes intensidades e determinar a existência ou não de algum paralelismo entre essas medidas (ALVES, 2002; DIAS, 1994).

No subgrupo IIb onde foram agrupados seis acessos, constata-se que quatro deles (836, 837, 819 e 834) são provenientes do estado de Rondônia, o 707 proveniente do Mato Grosso e o 753 proveniente de Minas Gerais. Já no subgrupo IIa formado por nove acessos, verifica-se que seis acessos (612, 828, 826, 829, 610 e 833) são procedentes de Rondônia e três acessos (595, 602 e 607) do Mato Grosso. Pode-se perceber que apesar de diferentes procedências, houve o agrupamento destes acessos. O aumento da distância geográfica nem sempre implica em maior divergência genética, pois a deriva genética e a seleção em diferentes ambientes podem contribuir muito mais para a divergência do que a separação geográfica (UPADHYAY; MURTY, 1970).

Pelo método de Tocher observou-se alguma semelhança na formação dos grupos com as demais análises, ressalta-se a formação de seis grupos, sendo o grupo I com cinco acessos (836, 837, 610, 833 e 826) provenientes de Rondônia e apenas o 707 proveniente do Mato Grosso. O grupo II com os acessos 590 e 596, ambos do estado do Mato Grosso, semelhante ao encontrado no grupo 2 da Distância Euclidiana Média. O grupo III ficou agrupado por dois acessos, 753 (estado de Minas Gerais) e 834 (estado de Rondônia). O grupo IV pelos acessos 607, 595 e 802 do Mato Grosso e 828 de Rondônia. E aqueles com maior dissimilaridade formando grupos distintos, o grupo V formado pelo acesso 612 (proveniente do Mato Grosso) e o grupo VI pelo acesso 819 (proveniente de Rondônia).

Neste trabalho, os descritores que mais contribuíram para a divergência entre os acessos foram Altura da planta (AP) e Altura da primeira ramificação (APR), ressalta-se que as procedências deste presente estudo abordaram três estados brasileiros e com espécimes *in vivo*, e no trabalho de Assis & Giulietti (1999) foram avaliadas procedências de outros países através de exsicatas.

## 5 | CONCLUSÃO

Os acessos de *Psychotria ipecacuanha* possuem ampla variação morfológica para a parte aérea da planta com dez caracteres sendo considerados descritores para essa espécie. Estas informações servirão de base para o manejo do banco de germoplasma, na seleção de indivíduos de interesse dos programas de melhoramento e para fornecer informações fundamentais que facilitarão a identificação de espécimes em ecossistemas nativos ou plantados.

## REFERÊNCIAS

AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. **The conservation of medicinal plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

ALVES, R.M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Will ex Spreng) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2002.

ASSIS, M.C. **Aspectos taxonômicos, anatômicos e econômicos da “ipeca” *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes. (Rubiaceae).** São Paulo: Universidade de São Paulo, 1992.

ASSIS, M.C.; GIULIETTI, A.N. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de “ipeca” - *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica.** v.22, n. 2, 1999.

CARLTON, W.M. **Laboratory Studies in General Botany.** New York: Ronald Press Company, 1961.

CORRÊA, M.X. Ensaio bibliográfico sobre a Economia da Poaia na Zona da Mata Mineira. In: **Anais do XX ciclo de estudos históricos.** Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz, 2010.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético.** Viçosa: editora UFV, 2004.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Biometria.** Viçosa: Editora UFV, 2006.

CURY, R. **Dinâmica evolutiva e caracterização de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na agricultura autóctone do Sul do Estado de São Paulo.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1993.

DAHER, R.F. **Diversidade morfológica e isoenzimática em capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.).** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1993.

DIAS, L.A.S. **Divergência genética e fenética multivariada na predição de híbridos e preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao* L.).** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1994.

JOLLIFFE, I.T. Discarding variables in a principal component analysis. I: artificial data. **Journal of the Royal Statistical Society Series C.** v. 21, n. 2, p. 160-173, 1972.

JOLLIFFE, I.T. Discarding variables in a principal component analysis. II: real data. **Journal of the Royal Statistical Society Series C.** v. 22, n. 1, p. 21-31, 1973.

KIUCHI, T.; YAZAWA, H. **Standard Leaf Color Charts.** Tokyo: National Institute of Agricultural Sciences, 1972.

LAMEIRA, O.A. **Cultivo da Ipecacuanha *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002.

MIRANDA, G.O. **A poaia: um estudo em Barra do Bugres.** Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso, 1983.

OLIVEIRA, L. O.; MARTINS, E.R. O desafio das plantas medicinais brasileiras: I - **O caso da poaia (*Cephaelis ipecacuanha*).** Campos dos Goytacazes: UENF, 1998.

OLIVEIRA, M.S.P. **Caracterização molecular e morfoagronômica de germoplasma de Açaizeiro.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005.

PEREIRA, V.A. **Utilização de análise multivariada na caracterização de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.).** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,

Universidade de São Paulo, 1989.

ROCHA, T.T.; LAMEIRA, O.L. Avaliação do período de floração e frutificação do BAG ipecacuanha. In: **Anais do 15º Seminário de Iniciação Científica da Embrapa**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2011.

SILVA, M.L. **Cultivo agroflorestal de *Psychotria Ipecacuanha* (Brot.) Stokes no território do baixo sul da Bahia**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2014.

SILVA JÚNIOR, J.A.; COSTA, A.C.L.; PEZZUTI, J.C.B.; COSTA, R.F.; GALBRAITH, D. Análise da Distribuição Espacial do Conforto Térmico na Cidade de Belém, PA no Período Menos Chuvoso. **Revista Brasileira de Geografia Física**, n. 2, p. 218-232, 2012.

UPADHYAY, M.K.; MURTY, B.R. Genetic divergence in relation to geographical distribution in pearl millet. **Indian Journal Genetics & plant Breeding**. v. 30, n. 3, p. 704-715, 1970.

## CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli* ISOLADOS EM MEIOS CROMOGÊNICOS ORIUNDOS DE LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA

### **Clarissa Varajão Cardoso**

Universidade Federal Fluminense  
Niterói – Rio de Janeiro

### **Eunice Ventura Barbosa**

Universidade Federal Fluminense  
Niterói - Rio de Janeiro

### **Alcir das Graças Paes Ribeiro**

Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do  
Rio de Janeiro  
Niterói - Rio de Janeiro

### **Rossiane de Moura Souza**

Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do  
Rio de Janeiro  
Niterói - Rio de Janeiro

### **Helena Magalhães**

Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do  
Rio de Janeiro  
Niterói - Rio de Janeiro

### **Helena Carla Castro**

Universidade Federal Fluminense  
Niterói - Rio de Janeiro

### **Máira Halfen Teixeira Liberal**

Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do  
Rio de Janeiro  
Niterói – Rio de Janeiro

evitando-se a evolução e disseminação da doença, e o consumo de leite contaminado. Foi realizada uma pesquisa com 211 amostras de leite cru, coletadas de vacas com mastite subclínica, pertencentes à 11 propriedades rurais de base familiar no RJ, utilizando-se os Meios Cromogênicos Compact Dry® X-SA, Compact Dry® EC, e CHROMagar ORIENTATION, com o objetivo de analisar a sua viabilidade na rotina laboratorial. Esses meios além de facilitarem o crescimento bacteriano, revelam características fenotípicas de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli*, patógenos prevalentes em casos de mastite. Cepas ATCC foram utilizadas como controle. Compact Dry® X-SA é específico na identificação de *S. aureus* e Compact Dry® EC para coliformes totais e *E. coli*. CHROMagar ORIENTATION é utilizado para isolamento e diferenciação de uma variedade de microrganismos. Como resultado foram isolados *S. aureus* (30,3%) e *E. coli* (15,2%), sendo confirmados pela Bacteriologia Clássica. A praticidade na manipulação desses meios e a rapidez na caracterização fenotípica das bactérias isoladas, indicam esses meios como alternativas viáveis para as análises microbiológicas em amostras de leite cru, sem comprometer a confiabilidade dos resultados.

**PALAVRA-CHAVE:** Segurança Alimentar, Sanidade Animal, Microrganismos Patogênicos.

**RESUMO:** A identificação rápida de microrganismos causadores de mastite subclínica é fundamental para o início do tratamento, e/ou controle da enfermidade,

**ABSTRACT:** The rapid identification of microorganisms that cause subclinical mastitis is essential for the initiation of treatment and/or control of the disease, avoiding the evolution and spread of the disease, and the consumption of contaminated milk. A study was carried out with 211 samples of raw milk, collected from cows with subclinical mastitis, belonging to the 11 rural properties of the family base in RJ, using the Chromogenic Media Compact Dry® X-SA, Compact Dry® EC, and CHROMagar ORIENTATION, with the objective of analyzing their viability in the laboratory routine. These media, in addition to facilitating bacterial growth, reveal phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, pathogens prevalent in cases of mastitis. ATCC strains were used as controls. Compact Dry® X-SA is specific in the identification of *S. aureus* and Compact Dry® EC for total coliforms and *E. coli*. CHROMagar ORIENTATION is used for the isolation and differentiation of a variety of microorganisms. As a result, *S. aureus* (30.3%) and *E. coli* (15.2%) were isolated and confirmed by Classical Bacteriology. The practicality in the manipulation of these media and the speed in the phenotypic characterization of the isolated bacteria, indicate these media as viable alternatives for the microbiological analyzes in samples of raw milk; without compromising the reliability of the results.

**KEYWORDS:** Food Safety, Animal Health, Pathogenic Microorganisms.

## 1 | INTRODUÇÃO

A mastite é definida como processo inflamatório da glândula mamária. Trata-se de uma resposta do tecido glandular do úbere por agressões físicas ou pela presença de agentes infecciosos. Mesmo apresentando diferentes etiologias, a invasão por microrganismos patogênicos é a principal causa. O processo inflamatório tem por objetivo eliminar e/ou neutralizar os microrganismos agressores e auxiliar no reparo dos tecidos da glândula para que a mesma, retorne a função usual (BERLOTI *et al*, 2015).

A principal via de entrada dos microrganismos é pelo canal do teto, podendo atingir porções internas da glândula mamária, estabelecer-se, multiplicar-se e promover um processo inflamatório (HARMON, 1994). Os sintomas são variáveis e diretamente dependentes, não só do grau de resposta do úbere, como também da patogenicidade do agente envolvido (BERLOTI *et al*, 2015). Dependendo do grau de inflamação, a mastite pode ser classificada como: mastite clínica (subaguda, aguda, hiperaguda e crônica) e subclínica (HARMON, 1994).

A mastite bovina é hoje um problema mundial. Embora a taxa de letalidade das vacas com mastite seja baixa, elas apresentam maior risco de abate prematuro (SEEGERS *et al*, 2003). Também gera mudanças negativas na composição do leite, reduzindo o rendimento na fabricação de derivados e o prazo de validade de produtos lácteos (AULDIST *et al*, 1995; KLEI *et al*, 1998).

## Mastite Clínica

A forma clínica apresenta sintomas inflamatórios evidentes, como: edema mamário, presença de coágulos, sangue e exsudato no leite, além de dor e hipertermia local (MARTINS *et al*, 2010). O diagnóstico deve ser realizado pelos sinais clínicos, como: inflamação do úbere, secreção láctea com grumos, pus e/ou sangue (BOUCHOT *et al.*, 1985).

A mastite clínica possui um impacto econômico relativamente alto, pois o leite produzido deve ser descartado (PHILPOT E NICKERSON, 2002).

## Mastite Clínica Subaguda

Na mastite clínica subaguda, o úbere ou os quartos mamários afetados não apresentam alterações clínicas evidentes. Existem alterações no leite produzido, como formação de coágulos e flocos de caseína, coloração alterada, presença de pus e/ou sangue, caracterizando uma mastite clínica leve (HARMON, 1994).

## Mastite clínica aguda

A mastite clínica aguda apresenta alterações visíveis no leite, como também no úbere ou nos quartos mamários afetados, tendo sinais clássicos da inflamação. O inchaço ocorre pelo acúmulo de secreção no interior do quarto afetado, devido a formação de coágulos que bloqueiam os ductos glandulares e impedem a drenagem do leite nos alvéolos. Ocorrendo inchaço dos alvéolos, pressão contra o tecido glandular e interrupção ou diminuição da produção de leite (BELOTI *et al*, 2015).

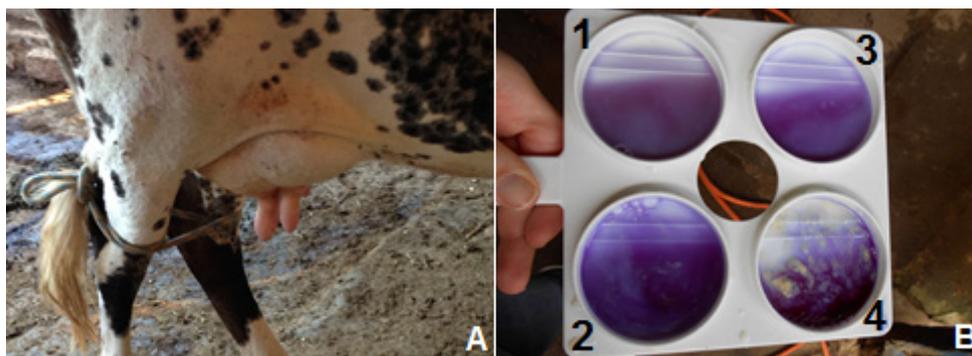
## Mastite Clínica Hiperaguda

A mastite clínica hiperaguda apresenta todos os sintomas descritos anteriormente, como também, alterações sistêmicas. Esta forma de mastite é pouco comum de ocorrer por ser restrita a agentes patogênicos extremamente agressivos, como por exemplo, a *Escherichia coli*. Também pode ser chamada de mastite tóxica, pois usualmente ocorre choque endotóxico causado por eliminação de toxinas dos agentes causadores, que atingem a circulação sanguínea, determinando um quadro sistêmico (STEENEVELD *et al*, 2008).

Os animais afetados apresentam sinais de depressão, alterações nas taxas respiratórias e cardíacas, perda de calor nas extremidades, redução no reflexo pupilar, desidratação e diarreia. Podem ocorrer, ainda, febre e redução das contrações ruminais. Além das alterações visíveis no leite, como: coloração sanguinolenta, aspecto aquoso ou seroso e redução significativa no volume (STEENEVELD *et al*, 2008).

## Mastite Subclínica

Na forma subclínica não há alteração visível na glândula mamária, ocorrendo reduzida ou nenhuma variação na qualidade do leite, porém com queda na produção. (VIGUIER *et al*, 2009). Apesar da ausência dos sinais típicos da inflamação, ocorre aumento significativo do número de células de defesa no úbere, por aumento do fluxo sanguíneo e tentativa de eliminação do agente infeccioso (Figura 1).



**Figura 1.** Realização da contagem de células somáticas em cada quarto mamário utilizando o *California Mastitis Test* (CMT). A: Úbere com aparência normal na análise clínica. B: Resultado do CMT. 1: Mistura homogênea e inalterada indicando resultado negativo. 2: Amostra apresentando distinta viscosidade com nítida formação de gel indicando positividade na contagem de células somáticas. 3: Mistura homogênea e inalterada indicando resultado negativo. 4: Amostra apresentando densa massa gelatinosa indicando resultado forte positivo (Próprio autor).

## Agentes Infecciosos Causadores De Mastite

Os microrganismos são naturalmente encontrados nas vacas, no úbere e no ambiente da ordenha, como por exemplo: nos equipamentos, utensílios e na água. Os microrganismos causadores de mastite (tabela 1) são classificados de acordo com as suas características, como: contagiosos, ambientais, oportunistas e outros (BELOTI *et al*, 2015).

Classificação	Espécies, gêneros e grupos
Contagiosos	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Micoplasma bovis</i> , <i>Corynebacterium bovis</i> .
Ambientais	<i>Streptococcus uberis</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , Coliformes ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> ).
Oportunistas	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Staphylococcus coagulase negativo</i> .
Outros	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosas</i> , <i>Actinomyces pyogenes</i> , <i>Nocardia</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Pasteurella</i> spp., <i>Prototheca</i> spp.

**Tabela 1.** Classificação dos principais microrganismos causadores de mastite bovina (Fonte: PHILPOT E NICKERSON, 2002).

A mastite contagiosa é aquela causada por microrganismos bacterianos que são parasitas obrigatórios da glândula mamária. A contaminação ocorre de vaca para vaca, e/ou de um quarto mamário doente para um quarto mamário sadio. Os patógenos se multiplicam sobre o revestimento externo do teto, no canal do teto e no interior da glândula mamária do animal infectado (MARQUES, 2006).

A mastite ambiental é causada por microrganismos que vivem na sala de ordenha ou no curral, principalmente no esterco, e até mesmo na água de bebida ou de limpeza. A transmissão pode ocorrer no período entre as ordenhas, principalmente quando as vacas se deitam nos ambientes contaminados (CASSOL, 2010).

Os microrganismos oportunistas são aqueles que estão naturalmente presentes no leite, entretanto sem causar alteração no úbere, e que em situações específicas conseguem promover reação inflamatória nos animais. Esses microrganismos causam mastite mais usualmente no período seco (fase de não produção de leite), quando os tetos não estão expostos à germicidas, aumentando suas populações na pele dos tetos (FOX, 2009).

## Métodos de identificação de microrganismos no leite

### *Compact Dry*<sup>®</sup>

O sistema de identificação bacteriano (*Nissui Pharmaceutical CO*) *Compact Dry*<sup>®</sup> permite quantificar microrganismos e identificar suas características fenotípicas.

O *Compact Dry*<sup>®</sup> EC é específico para identificação de coliformes totais e *E. coli*. O meio contém dois tipos de substratos enzimáticos cromogênicos: X-Gluc que é hidrolisável pela enzima beta-glucuronidase, utilizado para a identificação de *E. coli*, através da cor azul e Magenta-Gal, que é um substrato hidrolisável pela enzima beta-galactosidase, que identifica as bactérias do grupo Coliformes, através da cor magenta (Tabela 2).

Crescimento de Cepas Padrão - <i>Compact Dry</i> <sup>®</sup> EC	
Microrganismo	Coloração da Colônia
<i>Aeromonas hydrophila</i> JCM 3976	magenta
<i>Citrobacter amalonaticus</i> ATCC 25405	magenta
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	magenta
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	magenta
<i>Enterobacter amnigenus</i> ATCC 33072	magenta
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	magenta
<i>Enterobacter intermedius</i> ATCC 33110	magenta
<i>Enterobacter salazakii</i> ATCC 29544	magenta
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	azul
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	azul

<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	azul
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	azul
<i>Escherichia coli</i> sorotipo 0157 ATCC 35150	magenta
<i>Escherichia coli</i> sorotipo 0157 ATCC 43888	magenta
<i>Escherichia hermanii</i> JCM 1473	magenta
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182	magenta
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>azaenae</i> ATCC 11296	magenta
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumonia</i> ATCC 13883	magenta
<i>Kluyvera ascorbata</i> ATCC 33433	magenta
<i>Kluyvera cryocrescens</i> ATCC 33435	magenta
<i>Rahnella aquatilis</i> ATCC 33071	magenta
<i>Rahnella aquatilis</i> JCM 1683	magenta
<i>Serratia fonticola</i> ATCC 29844	magenta
<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC 81002	magenta
<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC 13880	magenta

**Tabela 2.** Padrão de reconhecimento do Compact Dry® EC para a identificação bacteriana e coloração das colônias utilizando cepas padrão ATCC e JCM. Fonte: Apostila Compact Dry®.

O Compact Dry® X-SA é específico para a identificação de *S. aureus*. O meio contém peptona, sais minerais, manitol, EDTA, antibióticos e substratos cromogênicos, que coram em azul as colônias de *S. aureus*. EDTA e os antibióticos presentes no meio inibem o crescimento de bolores, leveduras e outras bactérias que não o *S. aureus*.

O manitol e os dois substratos cromogênicos específicos para a fosfatase ácida e beta glucosidase, diferenciam *S. aureus* de outras bactérias que possam crescer na placa X-SA, enquanto outros *Staphylococcus* sp. podem formar pequenas colônias, brancas, atípicas. Pode haver crescimento de outras colônias brancas ou magenta, que não *S. aureus* e alguns *Bacillus* sp. que apresentam crescimento parcialmente suprimido, porém pode haver crescimento de colônias azul claras foscas vitrificadas, todas atípicas (Tabela 3).

<b>Crescimento de Cepas Padrão - Compact Dry® X-SA</b>	
<b>Microrganismo</b>	<b>Coloração da Colônia</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	azul
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	azul
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	branco
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	vermelho

**Tabela 3.** Padrão de reconhecimento do Compact Dry® X-SA para a identificação bacteriana e coloração das colônias utilizando cepas padrão ATCC. Fonte: Apostila Compact Dry®.

### CHROMagar ORIENTATION

CHROMagar Orientation é um meio cromogênico de ágar nutritivo com alto desempenho para o isolamento de uma variedade de microrganismos. Apresenta uma paleta de cores instantâneas (Tabela 4) com a finalidade de obter um amplo espectro

de diferenciação dos agentes patogênicos (MERLINO *et al.*, 1996).

Microrganismo	Coloração da colônia
<i>E. coli</i>	rosa escuro
<i>Klebsiella spp.</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i>	azul metálico
<i>Proteus spp.</i>	auréola marrom
<i>Pseudomonas spp.</i>	creme
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	rosa opaco
<i>Staphylococcus aureus</i>	ouro opaco
<i>Candida spp.</i>	cremosa

**Tabela 4.** Aparência típica das colônias bacterianas no CHROMagar Orientation. (Fonte: MERLINO *et al.*, 1996)

A utilização de meios seletivos e/ou indicativos para determinado grupo de bactéria e/ou espécie bacteriana, facilita e agiliza a identificação do agente causador da mastite, permitindo a obtenção dos resultados rápidos, somado a menos gastos com materiais laboratoriais e possibilitando um retorno mais rápido ao produtor rural.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de meios cromogênicos específicos para identificação de *E. coli* e *S. aureus*, visando definir e disponibilizar protocolos para o isolamento e identificação dessas bactérias oriundas de amostras de leite cru.

## 2 | METODOLOGIA

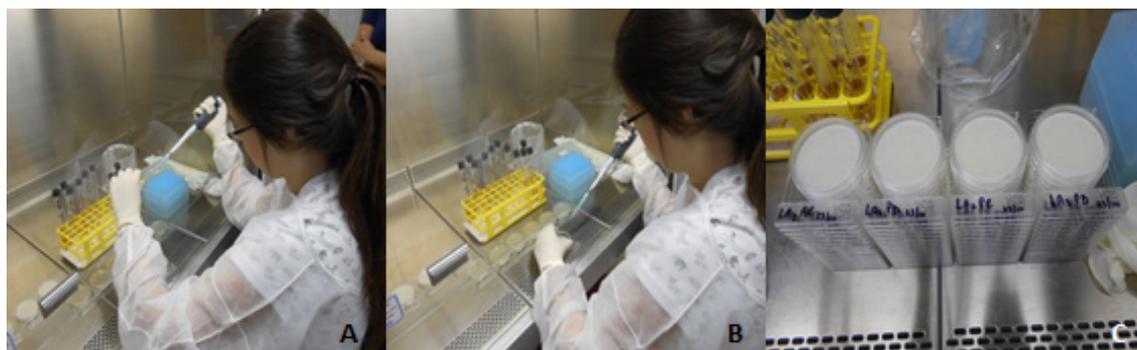
As amostras foram coletadas em 11 propriedades rurais de base familiar, situadas nas Regiões Metropolitana, Baixadas Litorâneas e Noroeste do RJ. Os diagnósticos de mastite subclínica foram realizados no campo, ou seja, “ao pé da vaca” (*on-farm testing*).

Para a detecção de *E. coli* e *S. aureus* foram usadas placas Compact Dry® específicas (Figura 2) e como controle foram utilizados testes padrões da Bacteriologia Clássica. As cepas *E. coli* (ATCC 8739) e *S. aureus* (ATCC 12228), também foram utilizadas como controle tanto das placas Compact Dry® como dos meios da Bacteriologia Clássica.



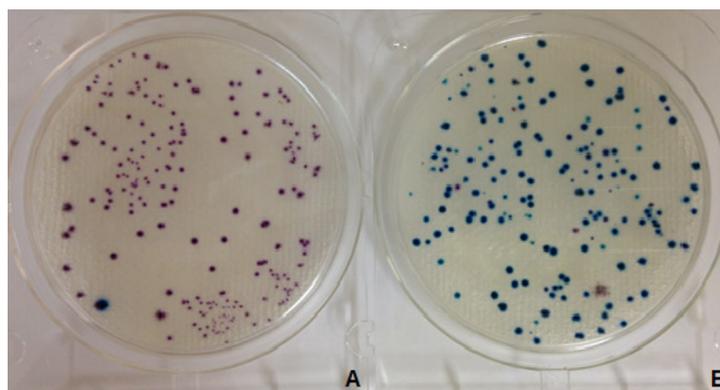
**Figura 2.** Embalagem e placas Compact Dry®. A: Embalagem Compact Dry EC® específico para *E. coli*. B: Embalagem Compact Dry X-SA® específico para *S. aureus* (Próprio autor).

No laboratório, após a homogeneização das amostras de leite, foi realizada uma diluição 1:9 em Água Peptonada, sendo retirado 1 mL desta diluição e adicionado nas placas Compact Dry X-SA® e EC®. As placas foram empilhadas invertidas na estufa a 35°C (±2°C). Após 24 horas de incubação, foi feita a primeira leitura e a segunda após 48 horas (Figura 3).



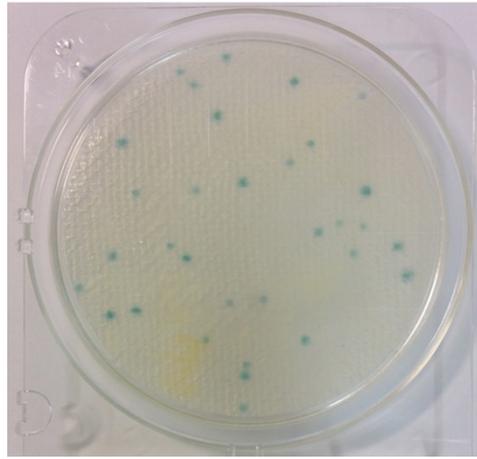
**Figura 3.** Fluxograma do preparo das amostras na placa Compact Dry®. A: Diluição 1:9 em Água Peptonada. B: Diluição pipetada na placa Compact Dry®. C: Placas Compact Dry® empilhadas e identificadas (Próprio autor).

Na placa Compact Dry EC®, a presença do substrato Magenta-Gal, possibilita a visualização das bactérias do grupo Coliformes, através da formação das colônias de coloração magenta (Figura 4A) e a presença do substrato enzimático cromogênico X-Gluc, permite a identificação de *E. coli*, através da cor azul as colônias (Figura 4B).



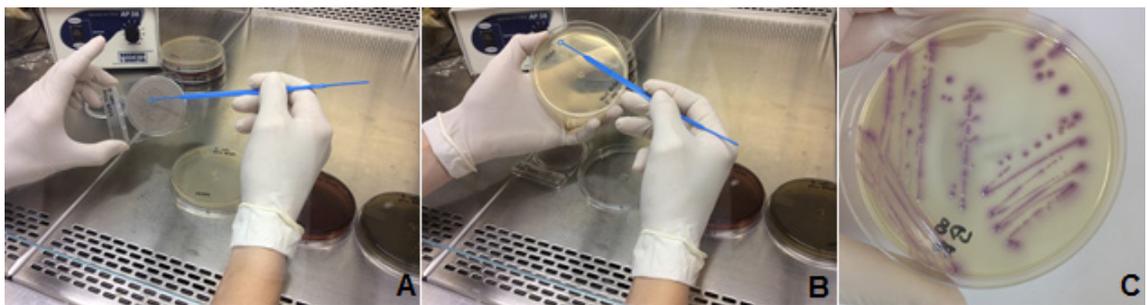
**Figura 4.** Crescimento bacteriano em placas Compact Dry EC®. A: Colônias de coloração magenta característica de Coliformes. B: Colônias de coloração azul características de *Escherichia coli* (Próprio autor).

Na placa Compact Dry X-SA® os substratos cromogênicos presentes, coram em azul as pequenas colônias de *S. aureus* (Figura 5).



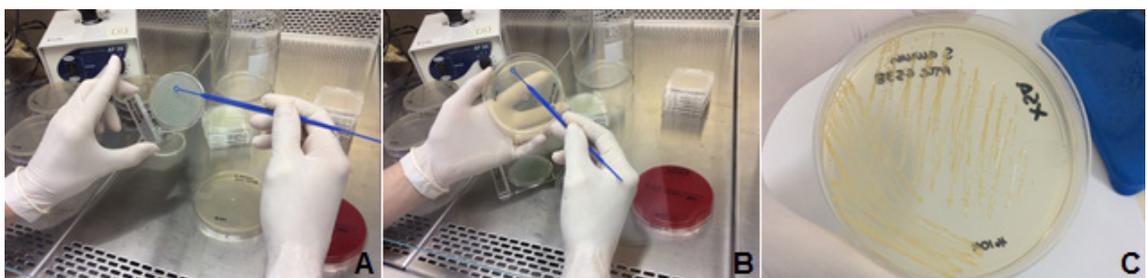
**Figura 5.** Crescimento de colônias pequenas e azuis características de *Staphylococcus aureus* na placa Compact Dry X-SA® (Próprio autor).

Como controle foram feitos cultivos pela Bacteriologia Clássica: para o Compact Dry EC® foram utilizados o Ágar EMB Teague, CHROMagar Orientation (Figura 6) e Enterokit B; e para o Compact Dry X-SA® foram utilizados o Ágar Sangue, Ágar Sal Manitol, CHROMagar Orientation, Teste da Catalase e Teste da Coagulase.



**Figura 6.** Utilização do meio CHROMagar Orientation como controle dos resultados encontrados na placa Compact Dry EC®. A: Alçada de colônia azul na placa Compact Dry EC®. B: Colônia sendo semeada em meio Ágar EMB Teague. C: Crescimento de colônias rosa escuro, característica de *Escherichia coli* (Próprio autor).

O meio cromogênico CHROMagar Orientation também foi utilizado como controle de *S. aureus* isolados nas placas Compact Dry X-SA®, sendo incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas, para posterior leitura dos resultados (Figura 7).



**Figura 7.** Utilização do meio CHROMagar Orientation como controle dos resultados

encontrados na placa Compact Dry X-SA®. A: Alçada de colônia azul na placa Compact Dry X-SA®. B: Colônia sendo semeada em meio CHROMagar Orientation. C: Crescimento de colônias pequenas ouro opacas, característica de *Staphylococcus aureus* (Próprio autor).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 211 amostras de leite, 33 (15,6%) apresentaram crescimento característico de *E. coli* e coliformes totais nas placas Compact Dry EC® (Quadro 1). Com a Bacteriologia Clássica como controle, foi possível confirmar os resultados e ainda, diferenciar os Coliformes, sendo isolados 12 (5,7%) *Klebsiella* spp. e uma (0,5%) *Serratia liquefaciens*.

Com relação ao Compact Dry X-SA®, das 211 amostras estudadas, 64 (30,3%) deram positivo para *S. aureus* (Tabela 5), sendo todos os resultados confirmados na Bacteriologia Clássica. Em 22 placas Compact Dry X-SA® ocorreu o crescimento de colônias brancas, características de *S. epidermidis*, tendo seus resultados confirmados nos controles.

Nas 11 propriedades rurais, foram isolados *S. aureus* (30,3%), seguido de *E. coli* (15,6%); *S. epidermidis* (10,4%); *Klebsiella* spp. (5,7%); e *Serratia liquefaciens* (0,5%).

Propriedade	Nº de amostras	Compact Dry®	
		Compact Dry EC®	Compact Dry X-SA®
P1	28	0	4
P2	24	7	3
P3	38	22	22
P4	13	1	1
P5	14	0	5
P6	20	1	8
P7	24	0	12
P8	11	0	4
P9	17	1	1
P10	6	0	0
P11	16	1	4
<b>TOTAL (n)</b>	<b>211</b>	<b>33</b>	<b>64</b>
<b>TOTAL (%)</b>	<b>100%</b>	<b>15,6%</b>	<b>30,3%</b>

**Tabela 5.** Resultado do isolamento de *Escherichia coli* e coliformes nas placas Compact Dry EC® e *Staphylococcus aureus* nas placas Compact Dry X-SA® em amostras de leite cru de vacas com mastite subclínica.

Em relação aos ensaios com o Compact Dry®, todos os resultados encontrados foram confirmados nos controles, determinando alta eficiência do produto com obtenção do resultado em 24 horas. Um ponto negativo em relação ao Compact Dry X-SA® foi o aparecimento de manchas brancas ocorridas pela impregnação de glóbulos de gordura no meio de cultura dificultando a leitura dos resultados.

Estes resultados assemelham-se aos apresentados por Fontana e colaboradores

(2012), que analisaram 208 cepas bacterianas em vacas leiteiras na região de Jataí-GO, e o microrganismo mais isolado também foi o *S. aureus* (40,9%), seguido de *Corynebacterium* spp. (35,6%), *Streptococcus* spp. (19,7%), e *E. coli* (3,8%).

A pluralidade etiológica da mastite também foi confirmada pelos dados relatados por Reis e colaboradores (2003), cujos resultados demonstraram maior positividade para *Staphylococcus* spp. Andrade e colaboradores (2001) em Goiás, também obtiveram isolamentos positivos para *Staphylococcus* spp. em maior frequência nos casos de mastite subclínica, enquanto que Brito e colaboradores (2003), em Minas Gerais, verificaram que a maior frequência de isolamentos foi de *Corynebacterium* spp. (55,2%).

- O Compact Dry® permitiu o rápido isolamento do *S. aureus* e *E. coli*, sem a necessidade de um período de pré-enriquecimento, apresentando os resultados após 24 horas de incubação à 35°C. Após 48 horas de incubação, apenas observou-se a formação de um maior número de colônias. O meio pronto e desidratado diminui os perigos de contaminação e aumenta a eficiência no laboratório.

Esta avaliação assemelha-se ao trabalho de validação em uma variedade de alimentos feito por Baylis (2010), onde o Compact Dry X-SA® foi capaz de fornecer resultado rápido (24h), destacando-se na capacidade de enumeração de *S. aureus* em alimentos.

Segundo Hosokawa e Kodaka (2010), o método da placa Compact Dry EC® foi útil para teste de triagem no local para *E. coli* e coliformes em frutos do mar. Em geral, este estudo demonstrou que o Compact Dry EC® e métodos de cultura convencionais produziram resultados da contagem de coliformes comparáveis e que este método proporciona muitas vantagens, já que é fácil inocular amostras sem necessidade de nenhuma técnica especial, e sem a necessidade de preparação de nenhum outro tipo de meio.

## 4 | CONCLUSÃO

O Compact Dry® apresentou-se como um meio prático, confiável e rápido para o isolamento de microrganismos, sem necessidade de pré-enriquecimento e com boa similaridade às práticas clássicas de isolamento da Bacteriologia.

## AGRADECIMENTO

FAPERJ, PESAGRO-RIO, UFF, CAPES.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. A. **Mastite bovina subclínica: prevalência, etiologia e testes de sensibilidade**

**antimicrobiana.** Hora Vet. 2001; 20: 19-26.

AULDIST, M. J.; COATS, S.; ROGERS, G. L.; MCDOWELL, G. H. **Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle.** Aust. J. Exp. Agric. 35: 427–436. 1995.

BAYLIS, C.L. **Methods Comparison Study final Report Hyserve Compac Dry X-SA Method.** Campden Technology Limited, UK, 2010.

BELOTI, V.; NERO, L. A.; MOREIRA, M. A. S.; DA SILVA, L. C. C.; FAGNANI, R.; REIS, K. T. M. G. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade.** Londrina: Editora Planta, 2015. 417p.

BOUCHOT, M. C.; CATEL, J.; CHIROL C.; GANIERE J. P.; LE MENEZ, M. **Diagnostic bacteriologique des infections mamaries des bovins.** Recueil Médecine Vétérinaire. 1985; v.61, p.567-577.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. **O padrão de infecção intramamária em rebanho leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação.** Arq Bras Med Vet Zootec. 2003; 55: 651-658.

CASSOL, D. M. S.; SANDOVAL, G. A. F.; PERICOLE, J. J.; GIL, P. C. N.; MARSON, F. A. **Introdução Agentes da Mastite Diagnóstico e Tratamento.** A Hora Veterinária – Ano29, n°175, maio/junho/2010. Disponível em: [http://www.ourofinovet.com.br/portal/files/espaco\\_veterinario/HV175MastitebovinaDaniela.pdf](http://www.ourofinovet.com.br/portal/files/espaco_veterinario/HV175MastitebovinaDaniela.pdf) . Acesso em: 04 de fevereiro de 2014.

FONTANA, V. L. D. S.; GIANNINI, M. J. S. M.; LEITE, C. Q. F.; MIRANDA, E. T.; ALMEIRA, A. M. F.; FONTANA, C. A. P.; DE SOUZA, C. M.; STELLA, A. E. **Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antibacterianas e detecção do gene da beta-lactamase em *Staphylococcus aureus*.** Vet. E Zootec. 2012; dez.; 17(4):552-559.

FOX, L. K. **Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis.** Veterinary Microbiology. 2009; 134(1-2):82-88.

HARMON, R. J. **Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts.** Journal of Dairy Science. 1994; 77(7):2103-2112.

HOSOKAWA, S. & KODAKA, H. **Efficacy of Compact Dry EC for Coliform Detection in Seafood.** Jpn. J. Food Microbial. 2010; 27(2):80-85.

KLEI, L.; YUN, J.; SAPRU, A.; LYNCH, J.; BARBANO, D.; SEARS, P.; GALTON, D. **Effects of milk somatic cell count on cottage cheese yield and quality.** J. Dairy Sci. 81, 1205–1213. 1998.

MARQUES, D. C. **Criação de Bovinos.** CVP Consultoria Veterinária e publicações, Belo Horizonte. 2006; 7: 435-450.

MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO, E. S. **Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na Microrregião de Cuiabá, MT.** Ciência Animal Brasileira, Goiânia. 2010; 11(1):181-187.

MERLINO; SIARAKAS, S.; ROBERTSON, G. J.; FUNNELL, G. R.; GOTTLIEB, T.; BRADBURY, R. **Avaliação de CHROMagar Orientation para diferenciação e presumível identificação de bacilos Gram-negativos e Enterococcus Espécies.** JCM. 1996;34: 1788-1793.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite.** Naperville, USA: Westfali. 2002.

REIS, S. R.; SILVA, N.; BRESCIA, M. V. **Antibioticoterapia para controle de mastite subclínica de vacas em lactação.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte. 2003; 55(6):651-658.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. **Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds.** Vet Res. 34:475–91. 2003.

STEENEVELD, W.; HOGVEEN, H.; BARKEMA, H. W.; VAN DEN BROEK, J.; HUIRNE, R. B. M. **The influence of cow factors on the incidence of Clinical Mastitis in Dairy Cows.** Journal of Dairy Science. 2008; 91(4):1391-1402.

VIGUEIER, C.; ARORA, S.; GILMARTIN, N.; WELBECK, K.; O`KENNEDY, R. **Mastitis detection: current trends and future perspectives.** Trends in Biotechnology. 2009; 27(8):486-493.

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

### **Mariely Cristine dos Santos**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Programa de Pós-graduação em  
Ponta Grossa – Paraná

### **Juliana Vitória Messias Bittencourt**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Programa de Pós-graduação em  
Ponta Grossa – Paraná

### **Mariana Machado Fidelis Nascimento**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Programa de Pós-graduação em  
Ponta Grossa – Paraná

### **Luciano Medina-Macedo**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Programa de Pós-graduação em  
Ponta Grossa – Paraná

**RESUMO:** Nos últimos anos, a indústria alimentícia vem aumentando a busca por novas fontes de produtos naturais. O metabolismo microbiano pode produzir uma ampla gama de compostos capazes de serem utilizados na indústria alimentícia, incentivando o desenvolvimento de vários processos biotecnológicos para a obtenção de novos aditivos alimentares. Nesse sentido, microrganismos isolados de frutos podem produzir compostos voláteis que possuem um aroma característico de frutas. Assim, este trabalho teve como objetivo a identificação

molecular de 22 leveduras responsáveis pela produção de compostos aromáticos constituintes do aroma marcante da maçã. As leveduras foram selecionadas dentre as linhagens depositadas na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico (CMIB) da UTFPR Ponta Grossa, as quais tiveram seu DNA extraído e amplificado na região ITS0 produto da amplificação foi sequenciado e as sequências foram tratadas e analisadas com software específico e posteriormente comparadas com as sequências depositadas no banco de dados de nucleotídeos do NCBI. Árvores filogenéticas foram construídas para confirmar a identidade molecular e a relação entre as espécies encontradas, utilizando-se do método de máxima verossimilhança com dois diferentes modelos evolutivos. Das 22 leveduras, onze linhagens foram identificadas como *Clavispora lusitaniae*, oito como *Rhodotorula muciluginosa* e três como *Lodderomyces elongisporus*. As três espécies encontradas neste estudo foram relatadas na literatura causando infecções em humanos. No entanto, as espécies também foram isoladas de outras fontes, incluindo alimentos, o que pode fornecer oportunidades para o estudo de aplicações biotecnológicas dessas leveduras, como a produção de bioaromas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioaromas. Identificação Molecular. Leveduras não-*Saccharomyces*.

## MOLECULAR IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH THE VOLATILE COMPOUNDS PRODUCTION

**ABSTRACT:** In recent years, the food industry has been increasing the search for new sources of natural products. The microbial metabolism can produce a wide range of compounds capable of being used in the food industry, encouraging the development of various biotechnological processes to obtain new food additives. Regarding this, isolated microorganisms from fruits can produce volatile compounds that have a characteristic fruit aroma. Thus, the objective of this work was the molecular identification of 22 yeasts responsible for the production of aromatic compounds constituting the remarkable aroma of the apple. The yeasts were selected among the strains deposited in the Microbiological Collection of Biotechnological Interest (CMIB) of UTFPR Ponta Grossa, which had their DNA extracted and the ITS region amplified. The amplification product was sequenced, and the sequences were treated and analyzed with specific software and then compared to the sequences deposited in the NCBI nucleotide database. Phylogenetic trees were constructed to confirm the molecular identity and the relationship between the species found, using the maximum likelihood method with two different evolutionary models. Among the 22 yeasts, eleven strains were identified as *Clavispora lusitaniae*, eight as *Rhodotorula mucilaginosa* and three as *Lodderomyces elongisporus*. The three species found in this study have been reported in the literature causing infections in humans. However, the species also have been isolated from other sources, including food, which may provide opportunities for the study of biotechnological applications of these yeasts, such as for bioaroma production

**KEYWORDS:** Bioaromas. Molecular identification. Non-*Saccharomyces* yeasts.

### 1 | INTRODUÇÃO

O progresso científico no ramo da biotecnologia incentivou o desenvolvimento de inúmeras técnicas para obtenção de produtos e processos que envolvem a esfera biológica e tecnológica (ZORZAL, 2017). Esses processos podem ser incorporados em diversas áreas, como, por exemplo, na indústria alimentícia.

Na indústria de alimentos, as características sensoriais são altamente valorizadas na compra de algum produto pelo consumidor. Uma das características mais observadas é o aroma dos produtos, sejam estes naturais ou artificiais. Os mais variados compostos químicos aromáticos são responsáveis pelo aroma e podem ser naturais ou adquiridos durante o processamento, para incrementar as características desejadas para determinado alimento ou bebida (TEIXEIRA, 2009). Contudo, esses aromas também podem ser originários do metabolismo microbiano.

Durante décadas, muitos estudos com microrganismos capazes de produzir aroma têm sido realizados, destacando principalmente fungos e leveduras com essa capacidade. Leveduras produtoras de bioaromas já são isoladas há mais de um século (OMELIANSKI, 1923).

Microrganismos produtores de determinados bioaromas podem ser isolados de frutos, sendo responsáveis por produzir o aroma característico do fruto em que foram encontrados. Os bioaromas são produzidos por meio da fermentação de nutrientes, como açúcares e aminoácidos, pelos microrganismos dando origem a compostos voláteis com características aromáticas específicas (LONGO & SANROMÁN, 2006).

A maçã é um fruto que recebe alto destaque em escala mundial. Estima-se que o seu consumo médio per capita anual seja de aproximadamente 10 quilogramas, sendo produzidas 77 milhões de toneladas do fruto (LAZZAROTTO, 2018), das quais 1,4% são do Brasil. Atualmente o Brasil se encontra entre os dez maiores produtores de maçã (USDA, 2018). Entretanto, a ampla produção de maçã acaba gerando muitos descartes na medida em que aumentam as exigências por características sensoriais melhores pelos consumidores. Como forma de reaproveitar os frutos que seriam rejeitados, características sensoriais da maçã são estudadas para idealizar a melhor forma de incorporação dessa matéria em novos produtos, principalmente bebidas. Desta forma, a maçã se tornou um fruto amplamente empregado para a produção de sidras, sendo bastante estudado quanto a sua composição aromática (XIABO; JIEWEN, 2008).

Portanto, este trabalho se propôs a identificar por meio de taxonomia molecular 22 leveduras produtoras de aromas extraídas da casca de maçã depositadas na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico – CMIB da UTFPR Ponta Grossa.

## **2 | MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Linhagens selecionadas para o estudo**

Para o desenvolvimento deste estudo, foram selecionadas 22 linhagens de leveduras produtoras de aromas que estão depositadas na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico (CMIB). Tais linhagens foram isoladas inicialmente de frutos de maçã por Pietrowski et al., 2018 e foram selecionadas para este estudo a partir da CMIB, devido às suas habilidades para produzir compostos voláteis com aroma.

### **2.2 Identificação Molecular**

Para a extração de DNA genômico das linhagens de leveduras produtoras de aromas foi utilizado o protocolo proposto por Vicente et al. 2008. As linhagens foram cultivadas em Ágar Sabouraud e incubadas a 28°C por 48h. Após esse período aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> das culturas foi transferido para um tubo de 1,5 mL contendo 300 µL de CTAB 2% e 80mg de uma mistura de sílica em pó (sílica gel/celite 2:1). As células foram trituradas manualmente utilizando pistilos de plásticos esterilizados por aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, 200 µl de tampão CTAB foram adicionados, a mistura foi incubada a 65°C por 10 min. Após incubação, adicionou-se 500µL de CIA (24:1). Os tubos foram centrifugados durante 7 min a 20.500 g, e o

sobrenadante foi coletado em novos tubos de 1,5 e acrescentado 800  $\mu\text{L}$  de etanol a 96% gelado para a precipitação do DNA. Após a etapa de precipitação do DNA, foi procedida a lavagem do DNA extraído com álcool 70% gelado e posteriormente os DNAs extraídos foram secos à temperatura ambiente e na sequência adicionado 100  $\mu\text{L}$  de água.

A amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA foi realizada de acordo com White et al.1990 utilizando oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 para as duas etapas. As reações de amplificação (PCR) foram preparadas num volume de 25  $\mu\text{L}$  contendo 1  $\mu\text{L}$  de DNA extraído (30 ng), 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10X de PCR, 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (2 mM), 2  $\mu\text{L}$  da mistura de dNTP (2,5 mM), 1  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (10 pmol), 0,2  $\mu\text{L}$  de polimerase Taq (Invitrogen, Brasil) (5 U.mL<sup>-1</sup>) e água ultrapura esterelizada para completar o volume final. A PCR foi realizada em um termociclador MaxyGene II (Axygene, Tewksbury, EUA). As amplificações foram realizadas de acordo com a seguinte programação: 95°C por 5 min, seguido por 30 ciclos consistindo de 94°C por 45 s, 52°C por 45 s, e 72°C por 2 min e pós-alongamento a 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese num gel de agarose a 1% (p/v) e enviados para sequenciamento (Myleus Biotechnology, [www.myleus.com](http://www.myleus.com)). O sequenciamento foi feito com um sequenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems).

### 2.3 Alinhamento e análises filogenéticas

As sequências foram ajustadas usando o pacote SEQMAN (DNASar, Madison, E.U.A.). As comparações da região ITS foram realizadas usando o banco de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia - NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando a ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Em seguida as sequências foram alinhadas usando o programa MAFFT (<http://www.ebiac.uk/Tools/mafft>) e inspecionadas visualmente pelo programa MEGA versão 6 (TAMURA et al, 2013).

As relações filogenéticas e a obtenção das árvores foram estimadas pelo método de máxima verossimilhança usando dois diferentes modelos evolutivos também através do programa MEGA versão 6 (TAMURA et al, 2013).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliado um total de 22 linhagens de leveduras produtoras de aromas. Entre as espécies identificadas, onze linhagens foram identificadas como *Clavispora lusitaniae*, oito linhagens como *Rhodotorula mucilaginosa* e três como *Lodderomyces elongisporus*, as quais são pertencentes aos filos Basidiomycota e Ascomycota.

	Código da linhagem	Espécies
1.	CMRP3203	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
2.	CMRP3170	<i>Clavispora lusitaniae</i>
3.	CMRP3197	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
4.	CMRP3192	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
5.	CMRP3171	<i>Clavispora lusitaniae</i>
6.	CMRP3205	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
7.	CMRP3204	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
8.	CMRP3169	<i>Clavispora lusitaniae</i>
9.	CMRP3175	<i>Clavispora lusitaniae</i>
10.	CMRP3172	<i>Clavispora lusitaniae</i>
11.	CMRP3189	<i>Clavispora lusitaniae</i>
12.	CMRP3160	<i>Clavispora lusitaniae</i>
13.	CMRP3163	<i>Clavispora lusitaniae</i>
14.	CMRP3202	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
15.	CMRP3180	<i>Clavispora lusitaniae</i>
16.	CMRP3165	<i>Clavispora lusitaniae</i>
17.	CMRP3177	<i>Clavispora lusitaniae</i>
18.	CMRP3167	<i>Clavispora lusitaniae</i>
19.	CMRP3195	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
20.	CMRP3184	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
21.	CMRP3198	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
22.	CMRP3181	<i>Lodderomyces elongisporus</i>

Tabela 1. Código e identificação das linhagens

Fonte: Autoria Própria (2019)

Todas as linhagens foram identificadas com 100% de compatibilidade com as sequências depositadas no banco de dados de nucleotídeos do NCBI.

A árvore filogenética apresentada a seguir (figura 1) confirma a identidade molecular da espécie *Rhodotorula mucilaginosa*.

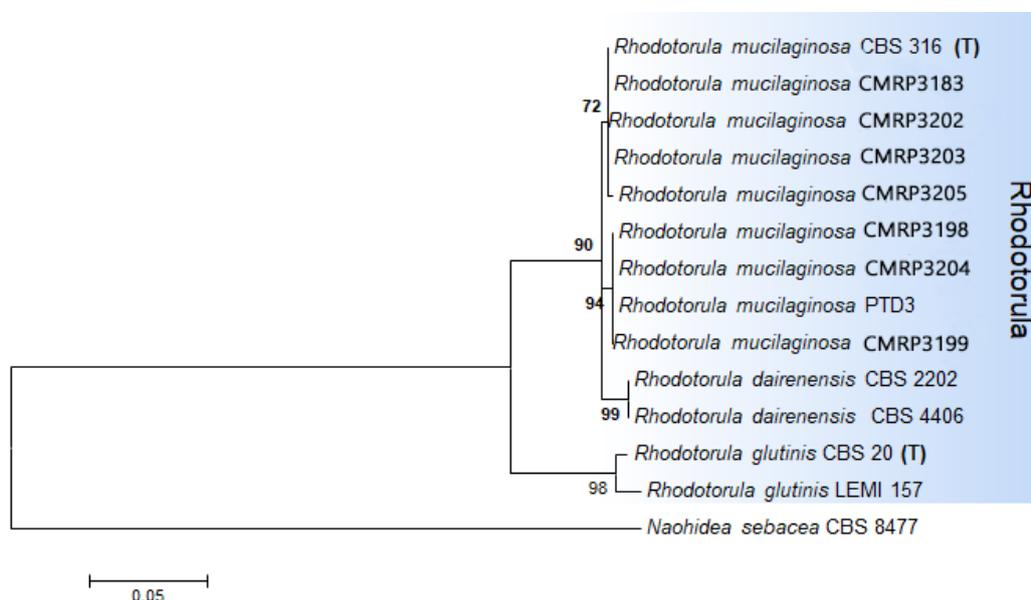


Figura 1. Árvore filogenética construída com máxima verossimilhança, com 500 bootstraps de repetições, o melhor modelo evolutivo foi Tamura-Nei com sítios invariantes e deleção parcial. A espécie *Naohidea sebacea* (CBS 8477) foi usada como um grupo externo.

As leveduras do gênero *Rhodotorula* são pigmentadas, pertencentes a família Sporidiobolaceae (FELL et al., 2000). A maior parte das espécies de *Rhodotorula* apresentam colônias de coloração rosa a coral, podendo também variar de laranja para vermelho, caso sejam cultivadas em Ágar Sabouraud com a presença de pigmentos carotenoides (LARONE, 2002). Das 37 espécies pertencentes ao gênero, 3 já foram relacionadas com infecções em humanos, sendo eles: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula glutinis* (BISWAS et al., 2001).

Mesmo relacionada com casos de infecções em humanos, a *R. mucilaginosa* é reconhecida por sua excelente capacidade de produção de aromas, sendo testada em fermentações de bebidas alcoólicas (MINGORANCE-CAZORLA et al., 2003). Assim como as linhagens utilizadas no presente trabalho, outros autores (GHOLAMNEJAD; ETEBARIAN; SAHEBANI, 2010) também realizaram o isolamento desta espécie de maçãs saudáveis.

Para as espécies, *Clavispora lusitanae* e *Lodderomyces elongisporus*, identificadas neste estudo também construiu-se uma árvore filogenética (figura 2), percebendo-se a proximidade entre as espécies.

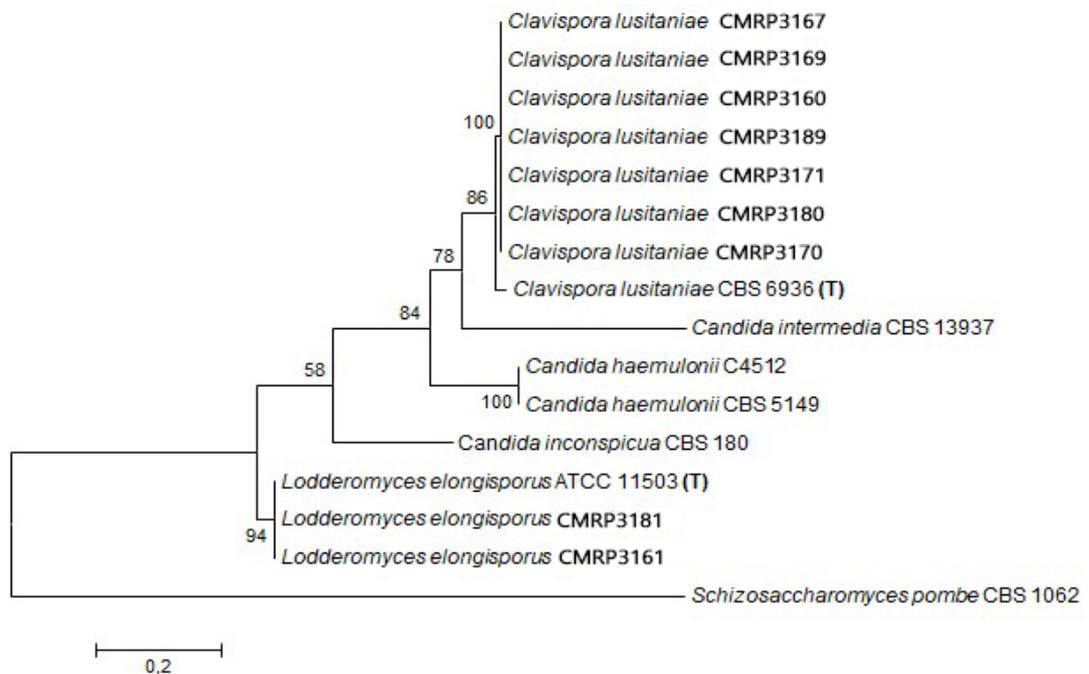


Figura 2 - Árvore filogenética construída com máxima verossimilhança, com 500 bootstraps de repetições, o melhor modelo evolutivo foi Tamura-Nei com variância gama e deleção parcial. A espécie *Schizosaccharomyces pombe* foi usada como um grupo externo.

A espécie *Clavispora lusitanae* foi isolada pela primeira vez do trato digestório de animais de sangue quente e desde então tem sido isolada de diversos outros lugares como farinha de milho, casca de frutas cítricas, sucos de frutas e leite de

vacas com mastite (ELLIS; KIDD, 2017]). *Clavispora lusitaniae* é a fase anamórfica de *Candida lusitaniae*, sendo responsável por colonizar e infectar humanos, podendo causar candidíase, incluindo septicemia e pielonefrite (HADFIELD, 1987). E sendo com frequência isolada em amostras clínicas, entretanto não é considerada como um verdadeiro patógeno humano (HURLEY et al., 1987). Tem sido estudada quanto a sua capacidade de produção de aromas em queijos (MONTET; RAY, 2016) e na produção de aromas cítricos, como as leveduras originárias de Israel utilizadas por Ravasio et al. (2018) em seu estudo.

A outra espécie identificada, *Lodderomyces elongisporus* já foi associada com infecções sanguíneas, onde, devido a sua grande semelhança morfológica, acreditava-se que se tratava na verdade de *Candida parapsilosis* (LOCKHART et al., 2007). Sendo assim, a identificação molecular se torna o caminho mais “simples” para a correta identificação deste organismo. Além de ter sido isoladas de maçãs, essa linhagem também já foi isolada de sucos concentrados de frutas, sendo um forte indício da sua capacidade de produção de aromas frutais, como o esperado para este trabalho (DEAK, BEUCHAT, 1993).

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo apresentamos como a identificação molecular de microrganismos pode ser uma ferramenta muito importante para a correta identificação de microrganismos, principalmente devido ao fato de que existem casos, como os citados neste capítulo, onde duas espécies só podem ser diferenciadas por meio de diagnóstico molecular, visto que são extremamente semelhantes fenotipicamente.

É evidente que muitas vezes para que a correta identificação dos microrganismos seja realizada é necessário combinar diferentes métodos como, por exemplo, identificação molecular com os aspectos micro e macromorfológicos das colônias dos microrganismos.

Neste estudo, todas as espécies identificadas envolvem algum tipo de infecção em humanos, mas também já foram isoladas de outras fontes ambientes, inclusive alimentos, e mesmo assim vem sendo estudadas quanto à sua capacidade de produção de bioaromas.

Uma das classes de compostos aromáticos constituintes do aroma de maçãs é a classe dos terpenos. Com grande aplicabilidade em diferentes indústrias, o terpeno vem sendo buscado em metabólitos de microrganismos como as leveduras não-*Saccharomyces*.

As leveduras não-*Saccharomyces* apresentam baixa tolerância ao álcool, não resistindo até o final da fermentação em bebidas, por exemplo. Todavia, o descobrimento de rotas terpênicas nessas leveduras pode caracterizar uma nova possibilidade de incorporação delas em processos industriais com diferentes finalidades. A continuação

da presente pesquisa segue esta linha de trabalho, onde estão sendo selecionadas entre estas leveduras identificadas quais delas são capazes de consumir e biotransformar compostos terpênicos.

## REFERÊNCIAS

- BISWAS et al. **Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene.** Int J Syst Evol Microbiol. V. 51, n.3, p. 1191-1199, 2001.
- DEAK, T. BEUCHAT, L. R. **Yeasts Associated with Fruit Juice Concentrates.** Journal of Food Protection, v. 56, n. 9, p. 777-782, 1993
- ELLIS, D; KIDD, S. ***Clavispora lusitaniae*.** Disponível em: <<https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/yeasts/clavispora/>> Acesso em: 12 dez. 2019.
- FELL, J. W. **Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis.** Int J Syst Evol Microbiol. v. 50 n.3, p. 1351-71, 2000.
- GHOLAMNEJAD, J.; ETEBARIAN, H. R.; SAHEBANI, N. **Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*.** Afr. J. Food. Sci. v. 4, p. 001- 007. 2010.
- HADFIELD, et al. **Mycoses caused by *Candida lusitaniae*.** Rev. Infect. Dis. v. 9, p. 1006-1012, 1987.
- HURLEY, R.J.; DE LOUVOIS, J; MULHALL, A. 1987. **Yeasts as human and animal pathogens.** In **The Yeasts**, 2nd edn, AH Rose, JS Harrison (eds). London: Academic Press; 212– 239.
- LARONE, D. H. **Medically important fungi.** 4<sup>a</sup> ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2002.
- LAZZAROTTO, J. J. **Indicadores econômicos e financeiros em sistemas típicos de produção de maçã no Brasil.** CIRCULAR TÉCNICA. Bento Gonçalves, RS, jul., 2018.
- LOCKHART, S. R. et al. ***Lodderomyces elongisporus* Masquerading as *Candida parapsilosis* as a Cause of Bloodstream Infections.** Journal Of Clinical Microbiology, [s.l.], v. 46, n. 1, p.374-376, out. 2007. American Society for Microbiology.
- LONGO M. A.; SANROMÁN, M. A. **Production of Food Aroma Compounds,** Food Technol. Biotechnol. v. 44 n.3, p. 335–353, 2006.
- MINGORANCE-CAZORLA et al. **Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 19, n. 3, p. 297, 2003.
- MONTET, D.; RAY, R. C. **Fermented Foods, Part I: Biochemistry and Biotechnology.** CRC Press, abr. 2016. 413 p.
- OMELIANSKI, V. L. **Aroma-Producing Microorganisms.** Journal of Bacteriology. 8(4), p. 393-419, 1923.
- PIETROWSKI, G. A. M.; BITTENCOURT, J. V. M.; BRANDAO, L. R.; ROSA, C. A.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A. **Identification and selection of non-*Saccharomyces* strains isolate from brazilian apple must.** Ciência Rural, [s.l.], v. 48, n. 5, p.1-4, 21 maio 2018.

RAVASIO, D. et al. **Adding Flavor to Beverages with Non-Conventional Yeasts. Fermentation.** v. 4, p. 1-16, 2018.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. **Molecular Biology and Evolution** v. 30 p. 2725-2729, 2013.

TEIXEIRA, L. V. **Análise Sensorial Na Indústria De Alimentos.** Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes” v.64, n. 366, p. 12-21, 2009.

USDA. United **States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service.** PS&D. Production, supply and distribution. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>>. Acesso em: 14 abr. 2019.

VICENTE, V. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M. R. et al. **Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection.** Stud Mycol. v. 61, p. 137–144, 2008.

XIABO, Z.; JIEWEN, Z. **Comparative analyses of apple aroma by a tin-oxide gas sensor array device and GC/MS.** Food Chemistry, v. 107, p. 120-128, 2008.

ZORZAL, P. B. **Invenções Biotecnológicas No Brasil: Proteção De Sequências Biológicas Por Reivindicações De Gênero Em Patentes.** 281 f. Tese (Doutorado). Programa De Pós-Graduação Em Biotecnologia. Rede Nordeste De Biotecnologia Renorbio. Vitória, 2017.

## CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE UMA POPULAÇÃO NATURAL DE *Physalis angulata* L. EM TERESINA-PI VISANDO A SELEÇÃO DE GENÓTIPOS SUPERIORES

**Hortência Kardec da Silva**

Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em Recursos  
Genéticos Vegetais, Feira de Santana- BA.

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização morfoagronômica preliminar de uma população natural de *Physalis angulata* L., visando a seleção de genótipos superiores. Foram avaliados 13 genótipos, escolhidos aleatoriamente, em uma população de fisalis encontrada na região de Teresina- PI, situada à latitude S05° 00' 25'', longitude W42° 49' 55'', e altitude de 59 m. As características avaliadas foram: altura da planta (ALT), diâmetro do caule (DC), número de ramificações por planta (NRP), número de frutos por planta (NFP) e peso do fruto (PF). Os dados foram tabulados em planilha eletrônica e as variáveis foram analisadas por meio de estatística descritiva. Foi possível observar variabilidade para todos os caracteres avaliados. O intervalo dos coeficientes de variação (CV) foi de 22,63% a 78,91% para as variáveis altura e número de frutos por planta, respectivamente. A variável número de frutos por planta (NFP) exibiu a maior variação, enquanto o peso do fruto (PF) apresentou as menores variações. A população de fisalis apresenta variabilidade em relação as características avaliadas, o que pode auxiliar na escolha de genótipos potenciais para o

programa de melhoramento genético da espécie. Entretanto, por se tratar de um estudo preliminar é essencial que outros aspectos possam ser analisados a fim de caracterizar a planta.

**PALAVRAS-CHAVE:** Camapu; Caracterização morfoagronômica; Variabilidade.

### PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF A NATURAL POPULATION OF *Physalis angulata* L. IN TERESINA-PI AIMING THE SELECTION OF SUPERIOR GENOTYPES

**ABSTRACT:** The objective of this work was to perform the preliminary morphoagronomic characterization of a natural population of *Physalis angulata* L., aiming the selection of superior genotypes. A total of 13 genotypes were randomly selected from a physalis population found in the region of Teresina-PI, located at latitude S05° 00 '25' ', longitude W42° 49' 55 ' ', and altitude of 59 m. The evaluated characteristics were: plant height (ALT), stem diameter (DC), number of branches per plant (NRP), number of fruits per plant (NFP) and fruit weight (PF). The data were tabulated in a spreadsheet and the variables were analyzed by means of descriptive statistics. It was possible to observe variability for all evaluated characters. The range of coefficients of variation (CV) was

22.63% to 78.91% for the variables height and number of fruits per plant, respectively. The number of fruits per plant (NFP) showed the highest variation, while fruit weight (PF) presented the smallest variations. The *Physalis* population presents variability in relation to the characteristics evaluated, which may help in the selection of potential genotypes for the breeding program of the species. However, because it is a preliminary study, it is essential that other aspects can be analyzed in order to characterize the plant.

**KEYWORDS:** Camapu; Morphoagronomic characterization; Variability.

## 1 | INTRODUÇÃO

*Physalis angulata* L. é comumente conhecida no Brasil como “camapú”, “bucho de rã”, “juá de capote” ou “mata-fome” (FREITAS et al., 2006). É uma planta herbácea, ereta, medindo 40-70 cm de altura (Lorenzi & Matos, 2008). Possui um ciclo relativamente curto, produzindo a maior quantidade de frutos em média aos 90 dias após a semeadura. Os frutos são pequenos e redondos, envolvidos por sépalas em forma de balão (Freitas & Osuña, 2006) e com bom conteúdo de vitamina A, C, ferro e fósforo (CHAVES, 2006).

Essa planta apresenta relevante interesse por ser amplamente utilizada pela população para o tratamento de uma série de doenças, pois apresenta bom potencial farmacológico, uma vez que a fisalina, composto por ela produzido, pode ser usado na prevenção e, ou, na cura de diversas doenças tais como a malária, asma, hepatite, dermatite e reumatismo (ADAMS et al., 2009). Ademais, possui ação anti-cancerígenas, anti-micobacterianos, antipirética, imuno-modulatória e diurética (SOARES et al., 2006; CASTRO et al., 2008).

Antes de se iniciar um programa de melhoramento genético de determinada cultura, é primordial conhecer a diversidade genética existente, para que se possa explorar de maneira mais eficiente a variabilidade genética. A caracterização morfológica é frequentemente a forma mais acessível de quantificar a diversidade genética (SINGH et al., 1991). Esta consiste em fornecer uma série de informações a respeito da variabilidade genética de cada amostra estudada, tornando possível o conhecimento do germoplasma (DAROS et al., 2002). Já a caracterização agrônômica tem como base avaliar características desejáveis pelo agricultor e que satisfaçam o mercado consumidor (FABRI, 2009). A caracterização morfoagronômica é realizada com base em caracteres que sejam de fácil detecção, mensuração e possuam alta herdabilidade (COSTA et al., 2009).

Dessa forma, devido à grande relevância da *P.angulata* L. como espécie produtora de frutos de alto valor nutricional e que apresenta propriedades farmacêuticas, é importante o estudo da sua variabilidade genética por meio da caracterização morfoagronômica, tanto para a conservação dos recursos genéticos existentes como para a criação de programas de melhoramento genético com a espécie. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização morfoagronômica preliminar em

uma população natural de *P.angulata*, localizada na cidade de Teresina-PI, visando à seleção de genótipos superiores.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no mês de março de 2017 na cidade de Teresina-PI, situada a latitude S05°00'25", longitude W42°49'55" e altitude de 59 m. Foram analisados 13 genótipos de *P.angulata* L. escolhidos aleatoriamente. Os frutos foram coletados, em cada genótipo, acondicionados em sacos plásticos, etiquetados e conduzidos ao Laboratório de Análise de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, em Teresina, para pesagem.

Foram utilizados cinco descritores quantitativos para a caracterização morfoagronômica (Tabela 1).

Descritor	Metodologia
Altura da planta (ALT)	Medida da base até o topo do ramo principal, com fita métrica (cm).
Diâmetro do caule (DC)	Medida da base até cinco cm do solo, com paquímetro digital (mm).
Número de ramificações por planta (NRP)	Número de ramificações por planta.
Número de frutos por planta (NFP)	Número de frutos por planta.
Peso do fruto (PF)	Média de cinco frutos escolhidos ao acaso, utilizando balança de precisão (g).

Tabela 1: Descritores quantitativos para a caracterização de 13 genótipos de uma população natural de *P.angulata* L. amostradas na cidade de Teresina- PI. Teresina, PI, 2017.

Nas determinações métricas, utilizou-se fita métrica, paquímetro digital e as massas foram obtidas com auxílio de balança analítica. Os dados foram tabulados em planilha eletrônica (aplicativo Excel) e as variáveis analisadas por meio de estatística descritiva, utilizando-se medidas de posição (média) e dispersão (coeficiente de variação, desvio padrão, valores máximos e mínimos). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GENES (CRUZ, 2013).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 refere-se aos dados descritivos dos 13 genótipos de *P.angulata*, para os cinco caracteres estudados. Foi possível observar variabilidade para todos os caracteres avaliados. Os indivíduos apresentaram altura variando entre 34 e 84 cm. Para o diâmetro do caule, o menor valor foi de 2,73 e o maior de 17,16 mm. O número médio de ramificações foi 12 (máximo=21, mínimo=7). O número de frutos por planta variou de 5 a 150, com média de 55 por planta. O peso médio dos frutos foi de 0,75g variando de 0,02 a 2,62g, evidenciando que os frutos não estavam em plena

maturação.

Descritores quantitativos	Média	Valor máximo	Valor mínimo	Desvio padrão	Coefficiente de Variação (%)
ALT (cm)	57,19	83	34	12,94	22,63
DC (mm)	11,52	17,16	2,73	3,79	32,88
NRP	12,07	21	7	4,14	34,28
NFP	55,84	150	5	44,07	78,91
PF(g)	0,75	2,62	0,02	0,58	77,33

Tabela 2. Estatísticas descritivas para os descritores quantitativos utilizados na caracterização de 13 genótipos de uma população natural de *P.angulata* L. na cidade de Teresina-PI. Teresina, PI, 2017.

O intervalo dos coeficientes de variação (CV) foi de 22,63% a 78,91% para as variáveis altura e número de frutos por planta, respectivamente. Os resultados encontrados para os valores de CV refletem uma ampla variação, demonstrando assim, uma variabilidade e heterogeneidade entre os genótipos, possível de exploração em programas de melhoramento genético.

De acordo com Pimentel (2009), o coeficiente de variação é a medida estatística utilizada na avaliação da precisão dos experimentos, valores de  $CV < 10\%$  são considerados baixos e o experimento tem alta precisão, de  $10\% < CV < 20\%$  médios e de boa precisão, de  $20\% < CV < 30\%$ , alto, com baixa precisão, e  $CV > 30\%$ , muito alto. Assim sendo, a variabilidade expressa pelos coeficientes de variação para as variáveis diâmetro do caule (DC), número de ramificações (NRP), número de frutos por planta (NFP) e peso do fruto (PF) foi considerada muito alta. Levando em consideração que os indivíduos foram caracterizados em seu habitat natural, as características mensuradas podem estar associadas à influência de fatores ambientais como tratos culturais desuniformes, ausência de adubações e controle de ervas daninhas, pragas e doenças.

Restrepejo e Vallejo (2003), ao estimar a variabilidade genética em acessos de tomate, obtiveram coeficiente de variação igual a 82,34%, 30,82% e 30,04% para a variável número de frutos por planta, peso médio do fruto e altura da planta, respectivamente. Segundo Ledo et al. (2003), a categorização do coeficiente de variação é inconveniente por não levar em consideração fatores como a cultura estudada, tamanho da parcela e heterogeneidade do solo.

A variável número de frutos por planta (NFP) exibiu a maior variação, cuja diferença entre o valor máximo e o mínimo foi de 145, enquanto o peso do fruto (PF) apresentou as menores variações (0,02g e 2,62g para mínimo e máximo, respectivamente). Moreno et al.(2012) obtiveram resultados que corroboram os encontrados, nesse estudo, obtendo maior variação para a variável número de frutos por planta (NFP), avaliando a variabilidade de 54 acessos de uma coleção de germoplasma de *Physalis peruviana* L. proveniente da região central e nordeste da Colômbia. A produção de

frutos é uma das principais características agrônômicas, tal caractere é influenciado pelas características individuais de cada genótipo como o ciclo da cultura e a interação genótipo x ambiente (PRECZENHAK et al., 2014).

#### 4 | CONCLUSÃO

A população de *Physalis* apresenta variabilidade em relação aos caracteres avaliados, o que pode auxiliar na escolha de genótipos potenciais para o programa de melhoramento genético e na domesticação da espécie. No entanto, por se tratar de um estudo preliminar é fundamental que outros aspectos possam ser observados a fim de caracterizar a planta.

#### REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. et al. **Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders - A survey of European herbals from the 16th and 17th century**. Journal of Ethnopharmacology, v.121, n.2, p.343–359, 2009.
- CASTRO, D.P. et al. **Immune depression in *Rhodnius prolixus* by seco-steroids, physalins**. Journal of Insect Physiology, v.54, n.3, p.555–562, 2008.
- CHAVES, A.C. **Propagação e avaliação fenológica de *Physalis* sp., na região de Pelotas, RS**. 2006. 65 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – , Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.
- COSTA, F.R. et al. **Marcadores RAPD e caracteres morfoagronômicos na determinação da diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões**. Ciência Rural, v.39, n.3, p.696-704, 2009.
- CRUZ, C.D. **GENES - A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics**. Acta Scientiarum, v.35, n.3, p.271-276, 2013.
- DAROS, M. et al. **Caracterização morfológica de acessos de batata-doce**. Horticultura Brasileira, v. 20, n.1, p.43-47, 2002.
- FABRI, E.G. **Diversidade genética entre acessos de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.Lam.) avaliada através de marcadores microssatélites e descritores morfoagronômicos**. 2009. 173f. Tese (Doutorado em Agronomia)- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- FREITAS, T.A. et al. **Cultivation of *Physalis angulata* L. and *Anadenanthera colubrina* [(Vell.) Brenan] species of the Brazilian semi-arid**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v.8, n.esp., p.201-204, 2006.
- FREITAS, T.A.; OSUÑA, J.T.A. 2006. **Efeito do substrato e da luminosidade na germinação de sementes de *Physalis angulata* L.** (Solanaceae). Sitientibus, v.6, n.2, p.101-104, 2006.
- LEDO, C. A. S. et al. **Avaliação do coeficiente de variação na experimentação com bananeira**. In: V Simpósio brasileiro sobre bananicultura. I Workshop do genoma musa, 2003, Paracatu. Anais... Paracatu: Nova Civilização, 2003, p. 238-240.
- LORENZI, H. E; MATOS, M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 512 p.

MORENO, A.M.H. et al. **Agronomical evaluation of cape gooseberries (*Physalis peruviana* L.) from central and north-eastern Colombia.** *Agronomía Colombiana*, v.30, n.1, p.15-24, 2012.

PIMENTEL, G.F. **Curso de estatística experimental.** 15. ed. Piracicaba: FEALQ, 2009. 451p.

PRECZENHAK, A. P. et al. **Caracterização agrônômica de genótipos de minitomate.** *Horticultura Brasileira*. v. 33, n. 2, p. 348-356, 2014.

RESTREPO, E.F.; VALLEJO, F.A. **Diversidad genética del tomate cultivado tipo “chonto”, *Lycopersicon esculentum* Mill, en las zonas productoras de Colombia.** *Acta Agronómica*, v. 52, n.1, p.11–17, 2003.

SINGH, S. P. et al. **Genetic diversity in cultivated common bean: II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits.** *Crop Science*, v. 31, p. 23-29, 1991.

SOARES, M.B. et al. **Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection.** *International Immunopharmacology*, v.6, n.3, p.408–414, 2006.

## COLEÇÕES DE PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS NA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

### **Thiago Serravalle de Sá**

Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Biologia  
Salvador - Bahia

### **Carolina Santos Pinho**

Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Biologia  
Salvador - Bahia

### **Maíra Miele Oliveira Rodrigues de Souza**

Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Biologia  
Salvador – Bahia

### **Suzelir Souza Nascimento**

Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Biologia  
Salvador – Bahia

### **Adrielle Matos de Jesus**

Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Biologia  
Salvador – Bahia

### **Izabela Santos Dias de Jesus**

Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Biologia  
Salvador – Bahia

### **Jozimare dos Santos Pereira**

Universidade Federal da Bahia, Escola de  
Nutrição  
Salvador – Bahia

### **Maria Luiza Silveira de Carvalho**

Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Biologia

Salvador – Bahia

### **Alessandra Selbach Schnadelbach**

Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Biologia  
Salvador – Bahia

### **José Geraldo de Aquino Assis**

Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Biologia  
Salvador – Bahia

**RESUMO:** Há um interesse cada vez maior pelo aumento da biodiversidade alimentar através da popularização das PANC (Plantas Alimentícias Não Convencionais). Estas plantas são essenciais para a soberania e segurança alimentar, mas o seu uso e sua produção tem sido cada vez mais diminuído, refletindo numa queda de diversidade e risco de extinção de espécies e variedades tradicionalmente cultivadas. Procuramos levantar as espécies de PANC mais comuns no estado através de expedições pelo estado e visitas a feiras e mercados populares em diversos municípios. Posteriormente verificamos a ocorrência dessas espécies no acervo do Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB) e posteriormente iniciamos uma coleção de plantas herborizadas, germoplasma(sementes) e banco de DNA para espécies de PANC. Foram levantados o uso de 61 PANC correspondendo a pelo

menos 65 espécies, mas apenas 53 estão representadas no acervo do ALCB, em sua maioria espécies nativas ou naturalizadas que podem aparecer mais facilmente em levantamentos florísticos. A coleção de PANC da Universidade Federal da Bahia conta hoje com 33 exemplares compreendendo 30 espécies descritas com 29 nomes populares e englobam não apenas o material herborizado, mas também germoplasma (sementes) e DNA. A criação dessas coleções voltadas para as PANC visa subsidiar o uso e a manutenção da diversidade genética das dessas espécies, permitindo seu estudo, preservação e uso.

**PALAVRAS-CHAVE:** PANC, Espécies Negligenciadas e Subutilizadas, Herbário, Banco de DNA, Bahia.

## COLLECTIONS OF NEGLECTED AND UNDERUTILIZED SPECIES IN THE FEDERAL UNIVERSITY OF BAHIA, BRAZIL

**ABSTRACT:** There is a growing interest in increasing food biodiversity through the popularization of the Neglected and Underutilized Species (NUS). These plants are essential for food sovereignty and security, but their use and production has been increasingly diminished, reflecting a decline in diversity and risk of extinction of traditionally cultivated species and varieties. We sought to raise the most common NUS species in the state of Bahia, Brazil through expeditions and visits to fairs and popular markets in several cities and towns throughout the State. After, we verified the occurrence of these species in the collection of the *Alexandre Leal Costa Herbarium* (ALCB) and subsequently started a collection of herborized plants, germplasm (seeds) and DNA Bank for species of NUS. We raised 61 species of NUS corresponding to at least 65 species, but only 53 are represented in the ALCB collection, and most of them comprise native or naturalized species that may often appear in floristic surveys. The collection of PANC of the Federal University of Bahia comprises 33 specimens corresponding to 30 species within 29 popular names and encompasses not only the herborized specimens, but also germplasm (seeds) and DNA. The creation of these collections focused on NUS aims to subsidize the use and maintenance of the genetic diversity of these species, allowing their study and preservation.

**KEYWORDS:** NUS, Neglected and Underutilized Species, DNA bank, Herbarium, Bahia.

### 1 | INTRODUÇÃO

A alimentação constitui um tópico central para a humanidade e recentemente temos visto um crescente interesse na diversificação das bases alimentares, com grande foco na soberania e na segurança alimentar. Nos últimos 12.000 anos o homem selecionou espécies e variedades de interesse para o cultivo com finalidade alimentar; entretanto, esta seleção estreitou o número de espécies que utilizamos a tal ponto, que hoje apenas 30 espécies representam 95% do aporte calórico de origem

vegetal e somente o trigo, arroz, batata e milho são responsáveis por 60% das calorias consumidas de acordo com Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO).

O número reduzido de espécies cultivadas constitui uma vulnerabilidade para a segurança alimentar, uma vez que qualquer declínio na produção de quaisquer dessas espécies pode acarretar grandes problemas no suprimento de alimentos. De acordo com Lachat et al. (2017) uma alta biodiversidade alimentar está associada a uma dieta mais adequada, tanto em calorias como em nutrientes. A preocupação com a segurança alimentar e a valorização de ingredientes tradicionais de movimentos como o *slowfood* procuram divulgar espécies pouco utilizadas e fomentar a sua produção e consumo.

Um fenômeno ainda mais recente é a popularização de espécies pouco usuais sob o acrônimo PANC (Plantas Alimentícias Não Convencionais). O termo é popularizado na obra de Kinupp e Lorenzi (2014) e abarca diversas espécies vegetais cujos usos são pouco conhecidos ou pouco difundidos. Segundo (KINUPP e LORENZI, 2014) as PANC são plantas cujos usos alimentares de uma ou mais das suas partes podem ser feitos pelo homem *in natura* ou após algum tipo de preparo culinário. Cabe ressaltar que o que é não convencional e o que não é variam de acordo com o tempo, localidade e cultura dominante, podendo uma espécie ser não convencional em determinada localidade, mas ser usual em outra. De um modo geral, podemos pensar as PANC como plantas que não possuem uma cadeia produtiva estabelecida, ou, caso existente, atendem a mercados restritos nos quais seu consumo é usual.

Muitas destas hortaliças são exóticas, provenientes do intenso processo de intercâmbio de plantas durante o período colonial. Estas plantas passaram a ter grande importância na formação da base alimentar e cultural brasileira, a exemplo de quiabo, maxixe e inhame (ou cará a depender da região), originários da África (MADEIRA et al., 2008; BRASIL, 2010). Outras como taioba, mangarito, ora-pro-nobis, por exemplo, são nativas do Brasil ou outros pontos das Américas. De acordo com Kinupp et al (2006), nos países tropicais e subtropicais, detentores da maior biodiversidade, a falta de pesquisa a longo prazo, divulgação e valorização das espécies nativas é um contrassenso à tão citada e defendida riqueza biológica.

De acordo com Brasil (2010), o cultivo das hortaliças não convencionais no Brasil é feito predominantemente por agricultores familiares, muitos deles caracterizados como populações tradicionais, cujo conhecimento do cultivo e consumo destas plantas foi passado de geração a geração. A maioria dos cultivos está estabelecida nos quintais para o consumo da própria família, sem nenhum apelo comercial (BRASIL, 2010).

Melo (2007) e Batista et al. (2013) destacam que a maior parte dessas hortaliças possui grande variabilidade genética devido ao processo de manutenção local das variedades. Ao mesmo tempo, estão vulneráveis ao processo de erosão genética por causa do êxodo rural ou substituição do cultivo por outras espécies, já que são mantidas, tradicionalmente, por pequenos agricultores e cultivadas para consumo familiar, e não

sendo mais cultivadas, o germoplasma acaba se perdendo. Além disso, a restrição do conhecimento do sistema de produção associado à falta de conhecimento e incentivo em relação a essas hortaliças são fatores que contribuem para o agravamento desse quadro (BRASIL, 2010; CAVALCANTI, et al., 2012).

O trabalho de resgate das hortaliças tradicionais é fundamental para que se evite o processo de extinção hoje verificado em algumas destas plantas (BRASIL, 2010). Além de difundir o conhecimento sobre os usos e o sistema de produção das hortaliças não convencionais, é importante que sejam realizadas ações para a conservação do germoplasma das mesmas a fim de evitar a perda da diversidade genética das variedades locais tradicionalmente cultivadas no Brasil (NUNES et al., 2012). Uma alternativa é a manutenção das cultivares em bancos de germoplasma (NUNES et al., 2012).

Segundo Melo (2007), mais de seis milhões de acessos de plantas alimentícias são conservados atualmente em cerca de 1.300 coleções pelo mundo, deste total a maior parte (80 %) pertencem a grandes culturas e espécies relacionadas, restando 20 % a outras culturas, incluindo as hortaliças não convencionais, as quais são pobremente representadas (menos de oito acessos por espécie).

A partir do exposto, a conservação de material genético revela-se uma poderosa estratégia à conservação e estudo dessas espécies vegetais tão vulneráveis à perda de diversidade, bem como pode vir a subsidiar estudos em melhoramento genético de plantas, entre outras pesquisas biotecnológicas (CARVALHO, ARAÚJO e SILVA, 2008). Desta forma, os bancos de conservação de DNA representam uma ferramenta mitigadora de riscos de redução da biodiversidade de PANC, bem como se apresentam como uma abordagem didática muito necessária e potencializadora do processo de ensino-aprendizagem em botânica e para a formação do biólogo.

Espécies cultivadas não costumam estar representadas em coleções de herbário porque, em geral, ambientes agricultáveis não costumam ser alvo de expedições de coleta. A pouca atenção dada a ambientes agricultáveis reside no fato de que plantas cultivadas costumam ser bem conhecidas na botânica, fato que não é exatamente verdadeiro para muitas Plantas Alimentícias não Convencionais (PANC), em especial as cultivadas de pouca expressão.

É primordial para a conservação destas espécies conhecer os seus usos e fazer divulgação deles para que haja interesse geral sobre estas plantas e para que estudos como o das características nutricionais e dos usos gastronômicos tenham alto valor agregado. Há muitos casos de dúvidas sobre a identificação correta destas plantas além da difusão de identificações incorretas pelo uso de mesmos nomes comuns para diferentes espécies, equívocos que muitas vezes se propagam nas bibliografias. Esses problemas podem vir de um desconhecimento taxonômico, visto que, o trabalho de classificação de espécies botânicas é feito por profissionais que trabalham em herbários, onde espécimes de PANC cultivados raramente são coletados.

Para que haja, no entanto, o uso consciente das PANC é necessário que seja

realizado seu reconhecimento preciso enquanto espécies, bem como a catalogação de suas características morfológicas, genéticas e fisiológicas, o que não é processo simples. A partir disso, a criação de coleções dessas espécies constitui uma tentativa de resguardar o conhecimento botânico básico inerente a essas plantas ainda tão pouco exploradas.

Assim, o presente trabalho se propôs levantar as PANC mais comuns no Estado da Bahia, levantar a representatividade dessas espécies no acervo do Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB) e a construir três tipos de coleções biológicas para a preservação de dados das PANC, sendo elas: 1) Coleção de herbário, 2) Banco de germoplasma (sementes) e 3) Banco de DNA.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

O levantamento das espécies de PANC mais comuns no estado da Bahia foi feito através de expedições de campo, visitas a feiras populares e comunidades tradicionais em diversos municípios no estado da Bahia. Procedemos então com a busca de exemplares das espécies no acervo do ALCB, hoje o terceiro maior da Bahia com mais de 160.000 exemplares entre plantas vasculares, algas, briófitas e fungos, através da plataforma *Species Link* <<http://www.splink.org.br>>. Esta busca teve como propósito conhecer como estas espécies de plantas, utilizadas como recurso alimentar no estado, estavam representadas no acervo do ALCB. Posteriormente, passou-se a introduzir espécimes de PANC em coletas realizadas no município de Salvador e adjacências. Os materiais coletados foram primeiramente identificados em nível específico e processados de três maneiras distintas: herborização (segundo parâmetros usuais de prensagem, secagem e montagem de ramos vegetais).

Além da coleção de herbário foram iniciados um banco de DNA e uma coleção de germoplasma semente. Para a extração de DNA foi usado o protocolo CTAB 2% para folhas. A coleção de sementes foi feita em recipientes em sílica gel para redução da umidade das sementes. A germinabilidade das sementes foi testada para registro antes do armazenamento de sementes.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O levantamento inicial de espécies de PANC no estado da Bahia revelou o uso de 61 PANC correspondendo a pelo menos 65 espécies, das quais apenas 53 estão representadas no acervo do ALCB perfazendo um total de 1108 espécimes (**Tabela 1**). Apesar de serem espécies conhecidas da botânica e utilizadas pela população do estado da Bahia, estas espécies não são bem representadas nas coleções botânicas, mostrando a negligência em relação a espécies alimentícias de pouca expressividade.

Em geral, plantas alimentícias encontradas em herbário são espécies nativas

ou naturalizadas e por isso podem ser coletadas em levantamentos florísticos. Estas espécies são a maioria dentre as apresentadas na **Tabela 1**.

Outra categoria de plantas facilmente encontradas em herbário são espécies de hábito invasor (nativas ou não) como as espécies de *Amaranthus*, *Talinum* e *Portulaca*, além das espécies como *Sonchus oleraceus* L., *Piper umbellatum* L e *Cucumis anguria* L., esta última muito cultivada na região nordeste, mas que também é reconhecida como planta daninha (Costa, 1985)

Das espécies listadas, poucas que são as que são mais comumente encontradas em sistema de cultivo como *Cyclanthera pedata* Schrad, *Maranta arundinacea* L e *Moringa oleifera* Lam.

NOME POPULAR	ESPÉCIE	FAMÍLIA	ALCB
Bredo	<i>Amaranthus</i> spp.	Amarantaceae	51
Aroeira	<i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi.	Anacardiaceae	106
Cajá	<i>Spondias mombin</i> L.	Anacardiaceae	11
Caju	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Anacardiaceae	91
Umbu	<i>Spondias tuberosa</i> Arruda.	Anacardiaceae	57
Umbu-cajá	<i>Spondias bahiensis</i> P. Carvalho, Van den Berg & M. Machado.	Anacardiaceae	0
Pimenta-de-macaco	<i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart.	Annonaceae	49
Coentrão	<i>Eryngium foetidum</i> L.	Apiaceae	4
Mucugê	<i>Couma rigida</i> Müll. Arg.	Apocynaceae	32
Taioba	<i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott	Araceae	1
Taioba	<i>Xanthosoma taioba</i> E.G. Gonç.	Araceae	0
Buriti	<i>Mauritia flexuosa</i> L.f.	Arecaceae	0
Dendê	<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	Arecaceae	3
Licuri	<i>Syagrus coronata</i> (Mart.) Becc.	Arecaceae	26
Almeirão	<i>Lactuca canadensis</i> L.	Asteraceae	0
Serralha	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Asteraceae	18
Bertalha	<i>Basella alba</i> L.	Basellaceae	1
Quiabento	<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis.	Basellaceae	3
Imburana	<i>Commiphora leptophloeos</i> (Mart.) J. B. Gillett.	Burseraceae	48
Cabeça-de-nêgo	<i>Stephanocereus luetzelburgii</i> (Vaupel) N.P. Taylor & Egli).	Cactaceae	7
Mandacaru	<i>Cereus jamacaru</i> DC.	Cactaceae	9
Ora-pro-nobis	<i>Pereskia aculeata</i> Mill.	Cactaceae	10
Ora-pro-nobis	<i>Pereskia bahiensis</i> Gürke	Cactaceae	26
Ora-pro-nobis	<i>Pereskia grandifolia</i> Haw	Cactaceae	11
Palma forrageira	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	Cactaceae	2
Batata-da-Serra	<i>Ipomoea pintoii</i> O'Donnell	Convolvulaceae	6
Batata-da-Serra	<i>Ipomoea serrana</i> Sim-Bianch. & L.V.Vasconcelos.	Convolvulaceae	3
Cana-de-macaco	<i>Costus</i> sp.	Costaceae	55
Caxixe	<i>Lagenaria siceraria</i> (Molina) Standl.	Cucurbitaceae	1
Chuchu-de-vento	<i>Cyclanthera pedata</i> Schrad.	Cucurbitaceae	1
Maxixe	<i>Cucumis anguria</i> L.	Cucurbitaceae	8

Maxixe Italiano	<i>Cucumis melo</i> L.	Cucurbitaceae	0
Melão Caboclo	<i>Sicana odorífera</i> (Vell.) Naudin.	Cucurbitaceae	0
Melão Coalhada	<i>Cucumis melo</i> L.	Cucurbitaceae	0
Cará Fígado	<i>Dioscorea bulbifera</i> L.	Dioscoreaceae	3
Inhambu	<i>Dioscorea trifida</i> L.f.	Dioscoreaceae	0
Inhame	<i>Dioscorea cayennensis</i> Lam.	Dioscoreaceae	1
Chaya	<i>Cnidoscolus aconitifolius</i> (Mill.) I.M. Johnst.	Euphorbiaceae	0
Mandioca	<i>Manihot esculenta</i> Crantz.	Euphorbiaceae	5
Andu	<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp	Fabaceae	16
Feijão-de-corda	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	Fabaceae	0
Hortelã-de-borda-branca	<i>Plectranthus coleoides</i> Benth.	Lamiaceae	1
Quioiô, Alfavaca	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Lamiaceae	38
Murici	<i>Byrsonima verbascifolia</i> (L.) DC.	Malpighiaceae	37
Graxa	<i>Hibiscus rosa sinensis</i> L.	Malvaceae	0
Manguba	<i>Pachira aquatica</i> Aubl.	Malvaceae	18
Vinagreira	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	Malvaceae	4
Araruta	<i>Maranta arundinacea</i> L.	Marantaceae	3
Fruta-pão	<i>Artocarpus altilis</i> (Park) Fosberg.	Moraceae	0
Jaca	<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.	Moraceae	3
Moringa	<i>Moringa oleifera</i> Lam.	Moringaceae	8
Banana	<i>Musa paradisiaca</i> L.	Musaceae	3
Cambuí	<i>Myrcia multiflora</i> (Lam.) DC.	Myrtaceae	3
Jambo	<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & L.M. Perry.	Myrtaceae	5
Biribiri	<i>Averrhoa bilimbi</i> L.	Oxalidaceae	7
Maracujá-do-mato	<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	Passifloraceae	83
Capeba	<i>Piper umbellatum</i> L.	Piperaceae	19
Capim Santo	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.	Poaceae	8
Beldroega	<i>Portulaca oleracea</i> L.	Portulacaceae	13
Língua-de-vaca	<i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd.	Talinaceae	18
Juá	<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	Rhamnaceae	45
Jenipapo	<i>Genipa americana</i> L.	Rubiaceae	27
Camapu	<i>Physalis angulata</i> L.	Solanaceae	8
Jurubeba	<i>Solanum paniculatum</i> L.	Solanaceae	91
Rami	<i>Boehmeria nivea</i> (L.) Gaudich.	Urticaceae	3

**Tabela 1.** PANC levantadas no estudo, seu nome popular mais comum, espécie, família botânica e número de exemplares encontrados no ALCB.

Muitas plantas citadas em estudos etnobotânicos acabam mal identificados por basear-se sobretudo nos nomes populares informados nas entrevistas. Um caso documentado de possível má identificação em estudos etnobotânicos é apontado por Andrade et al. (2006), que citam que Costa-Neto e Moraes (2000), registraram no município de Tanquinho (sertão baiano), o uso do mandacaru-de-três-quinas (segundo eles, *Cereus hildmannianus* K.Schum.) como planta medicinal. Estes autores dizem que se trata de um mandacaru que “enrama”, muito cultivado (sic.) naquele município. A identificação por eles apresentada é duvidosa, pois o mandacaru-de-três-quinas é

uma trepadeira, possivelmente do gênero *Hylocereus* ou *Selenicereus* e não *Cereus hildmannianus* K.Schum., pois esta espécie tem hábito arbóreo, possui mais de três “quinas” (geralmente de quatro a oito), não ocorrendo e nem sendo comumente cultivada na Bahia e, sim, no Sul e Sudeste do Brasil.

Esse tipo de situação é especialmente comum quando envolve espécies do mesmo gênero sendo, por isso, importante a existências de coleções de herbário que sirvam de referência.

A coleção de PANC do ALCB conta hoje com 33 exemplares compreendendo 30 espécies descritos com 29 nomes populares como podemos observar na **Tabela 2**. Observam-se diferentes espécies de *Amaranthus*, que são todas popularmente reconhecida como breo ou caruru, sem distinção taxonômica para o consumidor tradicional e da mesma maneira as espécies de *Talinum* dificilmente são diferenciadas pelo consumidor leigo e são popularmente nomeadas como língua-de-vaca (principalmente na Bahia). Na **Figura 1 A** podemos observar o material herborizado para depósito no acervo do ALCB.

As diferentes espécies de *Pereskia* podem ser facilmente distintas pelos tipos florais, mas são todas popularmente reconhecidas como ora-pro-nobis. Também o gênero *Ocimum*, apresenta várias espécies com nomes populares que não necessariamente identificam espécie botânica específicos. Dentre as PANC nativas, as do gênero *Spondias* são bem diversas e muitas vezes com nomes populares não específicos.

NOME POPULAR	ESPÉCIE	FAMÍLIA
Breo, Caruru	<i>Amaranthus viridis</i> L.	Amaranthaceae
Caruru-rasteiro	<i>Amaranthus deflexus</i> L.	Amaranthaceae
Aroeira, pimenta-rosa	<i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi	Anacardiaceae
Umbuzeiro	<i>Spondias tuberosa</i> Arruda	Anacardiaceae
Coentrão	<i>Eryngium foetidum</i> L.	Apiaceae
Almeirão-roxo	<i>Lactuca canadensis</i> L.	Asteraceae
Picão-preto	<i>Bidens pilosa</i> L.	Asteraceae
Cana de macaco	<i>Costus amazonicus</i> (Loes.) J.F.Macbr.	Costaceae
Melão Vermelho	<i>Sicana odorifera</i> (Vell.) Naudin	Cucurbitaceae
Cabaça	<i>Lagenaria siceraria</i> (Molina) Standl.	Curcubitaceae
Andú	<i>Cajanus cajan</i> (L.) Huth	Fabaceae
Fedegoso	<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link	Fabaceae
Flamboianzinho	<i>Caesalpinia pulcherrima</i> (L.) Sw.	Fabaceae
Ingá de mato	<i>Inga edulis</i> Mart.	Fabaceae
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae
Alfavaca	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Lamiaceae
Manjericão	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae
Quioiô	<i>Ocimum campechianum</i> Mill.	Lamiaceae
Romã	<i>Punica granatum</i> L.	Lythraceae
Araruta	<i>Maranta arundinacea</i> L.	Maranthaceae
Araçá-mirim	<i>Psidium guineense</i> Sw.	Myrtaceae

Jambo	<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & L.M. Perry.	Myrtaceae
Biri biri	<i>Averrhoa bilimbi</i> L.	Oxalidaceae
Chanana	<i>Turnera subulata</i> Sm.	Passifloraceae
Maracujá-do-mato	<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	Passifloraceae
Noni	<i>Morinda citrifolia</i> L.	Rubiaceae
Língua-de-vaca -roxa	<i>Talinum paniculatum</i> (Jacq.) Gaertn.	Talinaceae
Língua-de-vaca	<i>Talinum fruticosum</i> (L.) Juss.	Talinaceae
Língua-de-vaca	<i>Talinum patens</i> Juss.	Talinaceae
Urtiga-vermelha	<i>Laportea aestuans</i> (L.) Chew	Urticaceae

**Tabela 2.** Espécies já depositadas na coleção de Plantas Alimentícias não Convencionais do Herbário Alexandre Leal Costa, tanto como material herborizado, em banco de germoplasma e no banco de DNA.

A coleção de germoplasma semente (**Figura 1 B**) criada é ainda incipiente, mas de relevância pelo fato que existem poucas ações de conservação de germoplasma de PANC no Brasil Destacam-se como instituições que desenvolvem ações para o resgate e a conservação do germoplasma de variedades de hortaliças não convencionais a Embrapa Hortaliças, a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER-MG), o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e algumas Universidades do estado de Minas Gerais, como a Universidade Federal de Viçosa (UFV), a Universidade Federal de Lavras além do Instituto Federal de Minas Gerais (UFMG) – campus Bambuí.

O projeto pioneiro de resgate e pesquisas com hortaliças não convencionais foi desenvolvido no INPA pelo pesquisador Hiroshi Noda, principalmente com o cubiu (Melo, 2007). Com os resultados obtidos dos trabalhos desenvolvidos foi produzido o livro “Agricultura Familiar no Amazonas: conservação dos recursos ambientais”. Ainda sobre germoplasma nativo da Amazônia, existe BAG de jambu na Embrapa Trópico Úmido (BRASIL, 1998).

A Embrapa através da Rede Nacional de Recursos Genéticos Vegetais propôs como plano de ação a criação do Banco Ativo de Germoplasma de Hortaliças não convencionais que foi implantado no ano de 2006 pela Embrapa Hortaliças em Brasília-DF (G1, 2013). São cultivadas no banco cerca de 40 espécies de plantas não convencionais, dentre elas o jacatupé, vinagreira, azedinha, araruta, capuchinha e cará moela (G1, 2013). Além de cultivar as variedades a Embrapa Hortaliças faz a produção de sementes e mudas que abastecem outros bancos regionais pelo Brasil (G1, 2013). Isso é observado principalmente em parceria com a EMATER-MG, em que várias hortas tem sido desenvolvidas em diversas cidades de Minas Gerais, como por exemplo, Juiz de Fora e Bom Jardim de Minas (G1, 2013).

O estado de Minas Gerais abriga 23 bancos de germoplasma de hortaliças não convencionais segundo Avelar (2011). A UFV foi a primeira Universidade do estado a

implantar um banco de germoplasma de hortaliças não convencionais (AVELAR, 2011). No ano de 2008 teve início a implantação do Banco de Germoplasma de Hortaliças não convencionais da UFV. A iniciativa foi decorrente da parceria entre a EMATER-MG, vinculada à Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Seapa), UFV, Prefeitura de Viçosa, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), Embrapa Hortaliças e Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Atualmente são cultivadas cerca de 30 espécies de hortaliças dentre elas a vinagreira, jacatupé, mangarito e almeirão de árvore (AVELAR, 2011).

Em 2009, foi iniciado o estabelecimento do Banco de Germoplasma de Hortaliças não convencionais e Plantas Medicinais no Instituto Federal de Minas Gerais – campus Bambuí (OLIVEIRA et al., 2010). O banco foi montado em parceria com a EMATER-MG, IAC, EMBRAPA, UFLA e UFV (OLIVEIRA et al., 2010). Beldroega, jacatupé, ora-pro-nobis e vinagreira são algumas das espécies de hortaliças não convencionais introduzidas no banco de germoplasma do IFMG – campus Bambuí.

Outra universidade de Minas Gerais que estabeleceu um banco de germoplasma foi a Universidade Federal de Lavras (UFLA). O Banco de Hortaliças não convencionais da UFLA foi implantado em 2013 no setor de olericultura da UFLA e já reúne mais de 35 espécies (ALVIM, 2014). O banco foi formado a partir de coleta das espécies em propriedades rurais, e também por meio de doações de mudas e sementes de outros bancos, como a Epamig e a Embrapa Hortaliças (ALVIM, 2014).

A Embrapa Cerrados possui coleção de germoplasma de *Amaranthus* hoje com 2328 acessos das espécies *Amaranthus caudatus* L., *Amaranthus cruentus* L., *Amaranthus viridis* L., *Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthus tricolor* L. e *Amaranthus* sp.

Em relação a hortaliças de frutos destacam-se as cucurbitáceas que tem recebido atenção de alguns bancos de germoplasma. Em levantamento feito por Assis et al. (2012) foi mostrado que os bancos do BAG Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS e do Instituto Agrônômico de Campinas possuem acessos de espécies não convencionais. As coleções de germoplasma de cucurbitáceas da Embrapa Semiárido e Embrapa Hortaliças também incluem espécies não convencionais, embora não tenhamos encontrado os números de acessos de cada espécie especificados na bibliografia consultada (MARIANTE et al., 2009).

Os bancos de DNA têm sido criados com o propósito de armazenar material que possa vir a ser utilizado para utilização futura para estudos de diversidade genética. Tem sido voltados, sobretudo, para espécies coletadas em herbários ou jardins botânicos mas tem sido utilizados também estratégias complementares de conservação em bancos de germoplasma como os de tamareira, *Phoenix dactylifera* L., no Egito (BEKHEET e TAHA, 2013), goiaba, *Psidium guajava*, no México e espécies de Sapindaceae, na Nigéria (ADEYEMI et al., 2012). Coleções de DNA como no caso das PANC (**Figura 1 C**), podem envolver muitas espécies, então, há a possibilidade de armazenamento paulatino de amostras de diferentes espécies para estudos futuros

quando houver no banco boa representatividade do germoplasma de determinada espécie.



**Figura 1.** Acervos de PANC da Universidade Federal da Bahia. A) Exsicatas para acervo do ALCB, B) Banco de semente, C) Banco de DNA.

#### 4 | CONCLUSÃO

A falta de conhecimento sobre a diversidade vegetal e seus potenciais usos alimentícios restringem seu uso, gerando erosão cultural e genética. A construção do acervo de PANC na Universidade Federal da Bahia, através do depósito de espécimes herborizados devidamente identificados e com registro de nomes populares e usos no ALCB, o banco de germoplasma semente e de DNA visam subsidiar o uso e a manutenção da diversidade genética dessas espécies. Ainda que incipiente, há grande perspectiva de ampliação e uso destas coleções, uma vez que a instituição tem conduzido, de forma crescente, trabalhos em articulação com parceiros de diferentes áreas desta e outras instituições do estado da Bahia.

#### REFERÊNCIAS

ADEYEMI, T. O.; OGUNDIPE, O. T. Biodiversity of Sapindaceae in West Africa: a checklist. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, v. 4, n. 8, p. 326-331, 2012.

ALVIM, A. E. **Banco de Germoplasma de Hortaliças Não Convencionais da UFLA já reúne mais de 35 espécies**. Disponível em: <https://ufla.br/arquivo-de-noticias/6287-banco-de-germoplasma-de-hortalicas-nao-convencionais-da-ufla-ja-reune-mais-de-35-especies> Acesso em 02 de agosto de 2014

ANDRADE, C. T. S.; MARQUES, J. G. W.; ZAPPI, D. C. Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 36-42, 2006.

ASSIS, J. G. de A. et al. Recursos Genéticos de cucurbitáceas convencionais e subutilizadas no estado da Bahia, Brasil. **Magistra**, v. 24, p. 323-331, 2012.

AVELAR, Sebastião. 2011. **Banco de hortaliças não convencionais é implantado na Universidade Federal de Viçosa**. Disponível em: [https://www2.dti.ufv.br/ccs\\_noticias/scripts/exibeNoticia.php?codNot=13589](https://www2.dti.ufv.br/ccs_noticias/scripts/exibeNoticia.php?codNot=13589). Acesso em 02 de agosto de 2014.

BATISTA, M. R. A. et al. Seleção de populações de espécies alternativas para uso na olericultura da Amazônia. **Agricultura familiar no Amazonas: conservação dos recursos ambientais. Manaus: Weg**, p. 41-56, 2013.

BEKHEET, S. A.; TAHA, H. S. Complementary strategy for conservation of date palm germplasm. **Global Journal of Environmental Science and Management**, v. 3, n. 1, p. 96-107, 2013.

BRASIL. MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE DOS RECURSOS HIDRICOS E DA AMAZONIA. **Primeiro relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica**. 1998. 283p., 1998.

BRASIL. **Manual de Hortaliças não convencionais. Brasília: Ministério da agricultura pecuária e abastecimento**. 92p. 2010.

CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. de S.; DA SILVA, M. A. Preservação e intercâmbio de germoplasma. **Embrapa Algodão-Documents (INFOTECA-E)**, 2008.

CAVALCANTI, T. F. M. et al. Composição mineral de cinco acessos de mangarito. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2.

COSTA, C. D. da. Use of Cucumis anguria as a vegetable in Brazil. **Cucurbit Genetics Cooperative**, p. 31, 1985.

COSTA-NETO, E. M. et al. The use of medicinal plants in the county of Tanquinho, State of Bahia, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2000.

FAO. **Biodiversity for a world without hunger**. Plants. Disponível em: <http://www.fao.org/biodiversity/components/plants/en/>. Acesso em 15 de abril de 2018.

G1. 2013. **Projeto pretende resgatar o plantio e uso de hortaliças não convencionais**. Disponível em: <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2013/06/projeto-pretende-resgatar-o-plantio-e-uso-de-hortalicas-nao-convencionais.html> . Acesso em 02 de agosto de 2014

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. de. Hortaliças não convencionais. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 3, jul.-set. 2006.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2014. 768 p.

LACHAT, C. et al. Dietary species richness as a measure of food biodiversity and nutritional quality of diets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201709194, 2017.

MADEIRA, N. R.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; GIORDANO, L. de B. Contribuição portuguesa à produção e ao consumo de hortaliças no Brasil: uma revisão histórica. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 428-432, 2008.

MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. **The state of Brazils plant genetic resources**. Embrapa Technological Information, Brasília, 163p, 2009.

MELO, A. M. T. Hortaliças subutilizadas e sua importância no contexto da agricultura familiar. **Palestra ministrada no 47º Congresso Brasileiro de Olericultura**, Porto Seguro-BA. 2007.

NUNES, R. S. C. et al. Polymorphic microsatellites of analysis in cultivars of taro. **Horticultura Brasileira**, v.30, p.106-111. 2012.

OLIVEIRA, Pedro Cretton et al. 14934-Resgate de hortaliças tradicionais na Zona da Mata de Minas Gerais. **Cadernos de Agroecologia**, v. 8, n. 2, 2013.

## COMPARAÇÃO DE TEMPO E CUSTOS DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS DO CERRADO: SUBSÍDIO PARA CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DO BIOMA

### **Diego Cerveira de Souza**

Laboratório de Genética Molecular, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas/MG.

### **Terezinha Aparecida Teixeira**

Laboratório de Genética Molecular, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas/MG.

### **Carla Ferreira de Lima**

Laboratório de Microbiologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas/MG.

### **Vanessa Aparecida Caetano Alves**

Laboratório de Genética Molecular, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas/MG.

**RESUMO:** As plantas do Cerrado são geralmente ricas em metabólitos secundários, que dificultam a extração de DNA em quantidade e qualidade suficiente para estudos genéticos em nível molecular, de grande valia para programas de conservação da biodiversidade do bioma. Somente três protocolos já foram descritos como eficientes para extração de DNA de um maior número de plantas do Cerrado. Como, para caracterização de populações vegetais, o número de indivíduos que precisa ser avaliado geralmente é elevado, identificar protocolos que extraiam DNA com menor custo e em menor tempo é de fundamental importância.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou a comparação do tempo de execução e dos custos de reagentes e mão de obra dos três protocolos já descritos para extração de DNA de plantas do Cerrado. Os resultados mostraram que, por meio do protocolo baseado no uso conjunto de SDS e Triton X-100, a extração de DNA ocorre em cerca de 29 minutos, com gastos de R\$ 0,895 e R\$ 7,39 por amostra com reagentes e mão de obra, respectivamente. Com os demais protocolos são gastos de 80 a 242 minutos para extração e de R\$ 1,135 a R\$ 1,178 e R\$ 20,28 a R\$ 61,15 por amostra com reagentes e mão de obra, respectivamente. Portanto, o protocolo baseado no uso conjunto de SDS e Triton X-100 mostrou-se mais rápido e barato que os demais, sendo uma importante ferramenta para estudos genético-moleculares de espécies vegetais do Cerrado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estudos genéticos. Metabólitos secundários. SDS. Triton X-100

### COMPARISON OF TIME AND COSTS OF DNA EXTRACTION PROTOCOLS FOR CERRADO PLANTS: SUBSIDY FOR BIOME BIODIVERSITY CONSERVATION

**ABSTRACT:** Cerrado plants are generally rich in secondary metabolites, which make it difficult to extract DNA in sufficient quantity and quality

for genetic studies at the molecular level, which are of great value for biome biodiversity conservation programs. Only three protocols have been described as efficient for extracting DNA from a larger number of Cerrado plants. As for the characterization of plant populations, the number of individuals that need to be evaluated is generally high, identifying protocols that extract DNA with less cost and time is of fundamental importance. In this context, the present work aimed at comparing the execution time and the costs of reagents and labor of three protocols already described for the extraction of DNA from Cerrado plants. The results showed that, through the protocol based on the joint use of SDS and Triton X-100, DNA extraction occurs in about 29 minutes, with expenditures of R\$ 0.895 and R\$ 7.39 per sample with reagents and labor respectively. The other protocols spent from 80 to 242 minutes for extraction and from R\$ 1.135 to R\$ 1.178 and R\$ 20.28 to R\$ 61.15 per sample with reagents and labor, respectively. Therefore, the protocol based on the joint use of SDS and Triton X-100 proved to be faster and cheaper than the others, being an important tool for genetic-molecular studies of Cerrado plant species.

**KEYWORDS:** Genetic diversity. Secondary compounds. SDS. Triton X-100.

## 1 | INTRODUÇÃO

O Cerrado é composto por um mosaico de formações vegetais, que formam um gradiente de áreas florestais a campestres, ocupando cerca de 25 % do território brasileiro (DURIGAN; RATTER, 2016). Mais da metade dessa área já foi desmatada para implantação de pastagens e campos agrícolas (KLINK, 2013). Estima-se que, considerando a taxa atual de degradação, o restante do bioma estará destruído até 2050 (STRASSBURG et al., 2017). O Cerrado abriga mais de 11.000 espécies vegetais, das quais mais de 4.400 são endêmicas, além de uma grande variedade de vertebrados terrestres e aquáticos e elevado número de invertebrados (MEDEIROS, 2011). Perante a sua riqueza de espécies, o seu alto grau de endemismo e a sua crescente taxa de degradação, o Cerrado é considerado como um dos 35 *hotspots* mundiais, sendo a única savana entre eles (MITTERMEIER et al., 2011).

A adoção de estratégias de conservação do Cerrado é essencial para manutenção da sua biodiversidade. Para isso, é crucial a avaliação da variabilidade genética entre e dentro das populações, o que já passou a ter um papel de destaque na definição das estratégias de conservação e manejo de populações naturais (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006). Quanto maior a variabilidade genética existente nas populações, maiores são as chances de perpetuação da espécie (RODRIGUES, 2015). Uma maior diversidade genética assegura às populações altos potenciais adaptativo e evolutivo para contrapor os efeitos gerados pelas estocasticidades ambientais, bem como permite que populações se adaptem a ambientes em transformação e indivíduos sobrevivam e se reproduzam em situações novas (MIRANDA, 2014).

Até meados da década de 60, a avaliação da diversidade genética era realizada tendo como base caracteres morfológicos, em geral, fenótipos de fácil identificação

visual (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Todavia, com o desenvolvimento de novas tecnologias no campo da biologia molecular, especialmente a reação em cadeia da polimerase, foram criados diversos métodos moleculares para detecção da variabilidade existente diretamente em nível de DNA (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011). Para o sucesso destas análises, o primeiro passo é a obtenção de DNA em quantidade suficiente e com boa qualidade, ou seja, íntegro e livre de contaminantes (DEHESTANI; TABAR, 2007). Entretanto, as espécies vegetais do Cerrado em sua grande maioria são ricas em metabólitos secundários, especialmente compostos fenólicos, como flavonoides, polifenóis, fenóis e taninos, que dificultam a extração de DNA em quantidade e qualidade para análises moleculares (SILVA, 2010; MOREIRA; OLIVEIRA, 2011).

O uso de kits comerciais é uma alternativa para extração de DNA de plantas, entretanto, estes kits são caros, o que dificulta a sua utilização em laboratórios de pesquisa com poucos recursos financeiros ou mesmo para aqueles cujo número de amostras a ser analisado é elevado (AHMADI et al., 2018). Até hoje, apenas três estudos descreveram protocolos de extração adaptados para uma maior variedade de espécies vegetais do Cerrado: Faleiro et al. (2003), Silva (2010) e Souza e Teixeira (2019).

Faleiro et al. (2003) e Silva (2010) apresentaram métodos derivados do protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), com o uso de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), que consiste em uma metodologia que envolve diversas etapas de purificação e precipitação e usa compostos tóxicos, como clorofórmio e  $\beta$ -mercaptoetanol (TAMARI et al., 2013). Já Souza e Teixeira (2019) descreveram um método de extração baseado no uso conjunto de dodecilsulfato de sódio (SDS) e Triton X-100 para lise celular, eliminando a necessidade de realização de etapas de purificação pós-extração e o uso dos reagentes tóxicos usados na metodologia CTAB.

Em estudos moleculares com espécies vegetais, geralmente é necessária a avaliação de um grande número de indivíduos, muitas vezes em laboratórios que não possuem mão de obra e recursos financeiros abundantes, nem mesmo estrutura básica que garanta a segurança dos trabalhadores. Portanto, um bom protocolo de extração de DNA, além de ser capaz de extrair DNA puro, íntegro e em boa quantidade, deve ser seguro, rápido e barato (ANTANAVICIUTE et al., 2015).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo a análise do tempo de execução e dos custos gastos com reagentes e mão de obra nos protocolos cuja eficiência de extração de DNA em qualidade e quantidade para um maior número de espécies vegetais do Cerrado já foi descrita, a fim de auxiliar na escolha da metodologia de extração mais rápida e barata para estudos genético-moleculares com plantas do bioma.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Protocolos testados

As principais etapas dos três protocolos de extração de DNA testados estão descritas a seguir:

- I. Faleiro et al. (2003) – Colocar material foliar macerado em um microtubo de 2,0 mL, ocupando 1/5 do seu volume. Adicionar 800  $\mu$ L de tampão de extração (100 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA; 1,3 M NaCl; CTAB 2,8 %; PVP 1 %;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2 %). Incubar os microtubos em banho-maria a 70 °C por 60 minutos, agitando-os a cada 10 minutos. Adicionar 700  $\mu$ L de CIA – clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v). Agitar com suaves inversões por 10 minutos e centrifugar a 4 °C a 18.845 g por 10 minutos. Transferir o sobrenadante para novos microtubos de 2,0 mL. Adicionar 55  $\mu$ L de CTAB 7 % e repetir a etapa de limpeza com CIA. Adicionar ao sobrenadante 700  $\mu$ L de isopropanol gelado. Manter os tubos a – 20 °C por duas horas e centrifugar como na etapa de limpeza. Descartar o sobrenadante, lavar o *pellet* com etanol 70 % (v/v) e secar a temperatura ambiente. Ressuspender o *pellet* em 150  $\mu$ L de água contendo RNase na concentração de 40  $\mu$ g/mL. Colocar em banho-maria a 37 °C até a completa ressuspensão. Precipitar, centrifugar e ressuspender o *pellet* em 150  $\mu$ L de água, como já descrito.
- II. Silva (2010) – Colocar material foliar macerado em um microtubo de 2,0 mL. Adicionar 700  $\mu$ L do tampão de extração pré-aquecido (100 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; CTAB 2 %; PVP 1 %;  $\beta$ -mercaptoetanol 1 %). Incubar em banho-maria a 60-65 °C por 30 minutos. Retirar os microtubos do banho-maria e resfriar em temperatura ambiente. Adicionar 600  $\mu$ L de CIA – clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v). Agitar com suaves inversões por 10 minutos e centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo de 2,0 mL, adicionar 1/10 do volume de CTAB 10 % e homogeneizar por inversão. Repetir a limpeza com 600  $\mu$ L de CIA por mais duas vezes. Adicionar 2/3 do volume do sobrenadante de isopropanol gelado e centrifugar a 7.000 rpm por 5 minutos. Descartar o sobrenadante, lavar o *pellet* duas vezes em 1,0 mL de etanol 70 % e uma vez em 1,0 mL de etanol absoluto por 5 minutos. Secar o *pellet* em temperatura ambiente. Ressuspender em 100  $\mu$ L de tampão TE e armazenar a – 20 °C.
- III. Souza e Teixeira (2019) – Colocar cerca de 100 mg de material triturado em um tubo de 15 mL. Adicionar o tampão de extração pré-aquecido (100 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; SDS 5 %; Triton X-100 5 %) até aproximadamente 5 mL e incubar em banho-maria a 65 °C por 15 minutos. Transferir o sobrenadante para um microtubo de 2 mL e centrifugar a 13.000

rpm por 7 minutos. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo de 2 mL, adicionar o mesmo volume de etanol absoluto gelado e centrifugar a 13.000 rpm por 7 minutos. Descartar o sobrenadante, secar o pellet em temperatura ambiente e ressuspender em 100  $\mu$ L de tampão Tris-HCl e armazenar.

## 2.2 Análise dos dados

O tempo gasto para extração de DNA por meio de cada método foi determinado considerando o tempo para execução das principais etapas de cada um, desde a incubação em banho-maria com o tampão de extração, desconsiderando etapas anteriores para preparação do material vegetal, até a obtenção do *pellet*, desconsiderando etapas posteriores para limpeza deste. Ações rápidas, como a simples adição e mistura de reagentes e o uso do vórtex e/ou spin, por não exercerem grande influência no tempo total, não foram consideradas.

Para determinação do custo total de extração de cada método foram estimados os custos dos reagentes e da mão de obra gasta nas principais etapas descritas nos protocolos, nos termos apresentados para determinação do tempo. Os custos referentes aos equipamentos (aquisição e desgaste) e outros materiais do laboratório foram excluídos. Os custos de todos os reagentes foram calculados com base no valor dos reagentes da empresa Sigma-Aldrich®. Para cálculo do valor da mão de obra foi considerado o salário mensal de R\$ 2.446,97, correspondente ao salário inicial de um técnico de laboratório do governo federal (nível D-I), sendo 20 dias trabalhados/mês e 8 horas/dia.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria das plantas do Cerrado possui elevados teores de metabólitos secundários, especialmente terpenos e compostos fenólicos, como taninos, flavonoides, alcaloides, cumarinas, saponinas, fenóis e ligninas (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010), que dificultam o processo de extração e purificação de DNA e, conseqüentemente, a realização de estudos moleculares para conservação e aproveitamento econômico destas espécies.

As condições de baixa disponibilidade de recursos dos ambientes de Cerrado explicam o fato de as plantas do bioma possuírem estes elevados teores de metabólitos secundários. Estudos mostram que existe uma relação estreita entre a disponibilidade de nutrientes minerais e a concentração de metabólitos secundários, sendo que plantas que vivem em solos com baixa fertilidade, como os do Cerrado, acumulam grandes quantidades de compostos fenólicos e terpenos, devido à abundância de compostos orgânicos, produzidos pelo metabolismo primário e à menor disponibilidade de nutrientes minerais (NOLETO, 2010). Plantas que crescem em locais com limitações

de nutrientes também têm maior dificuldade em repor material vegetal perdido por herbivoria, o que as obriga a apresentarem maior investimento em compostos de defesa (COLEY; BRYANT; CHAPIN, 1985), sendo os metabólitos secundários algumas destas ferramentas de proteção das plantas (SANTOS, 2015).

Na maioria dos protocolos de extração de DNA de plantas, os tampões de extração possuem  $\beta$ -mercaptoetanol para eliminação de compostos fenólicos, polissacarídeos e outros contaminantes, sendo ainda necessária uma ou mais etapas de purificação para remoção de proteínas com clorofórmio e álcool isoamílico (RODRIGUES; VENÂNCIO; LIMA, 2017). Embora estes reagentes realmente promovam a melhora da qualidade do DNA extraído, são altamente tóxicos, reduzindo a segurança dos processos de extração. Os kits comerciais são uma alternativa para eliminar o uso destes reagentes e obter DNA de plantas com boa qualidade e em boa quantidade, mas são caros (SHI; PANTHEE, 2017), podendo chegar a cerca de R\$ 16,00 por amostra (US\$ 4,37), valor inviável de ser gasto para boa parte dos laboratórios de análises moleculares de plantas (ANTANAVICIUTE et al., 2015). Já o protocolo descrito por Souza e Teixeira (2019) não utiliza os principais reagentes tóxicos usados nos demais protocolos já testados para espécies vegetais do Cerrado ( $\beta$ -mercaptoetanol e clorofórmio), o que o torna mais seguro.

O tempo de extração de DNA dos protocolos testados variou de 29 a 242 minutos, sendo o protocolo descrito por Souza e Teixeira (2019) o mais rápido e o descrito por Faleiros et al. (2003) o mais demorado (Tabela 1). Enquanto os outros protocolos usam de 30 a 60 minutos de incubação em banho-maria, no protocolo de Souza e Teixeira (2019) são apenas 15 minutos. Além disso, ambos os protocolos baseados em CTAB exigem mais de uma etapa de limpeza com CIA e CTAB, o que aumenta consideravelmente o seu tempo de execução. O tempo total de extração do protocolo de Faleiros et al. (2003) foi ainda superior ao descrito por Silva (2010) devido à etapa de precipitação, uma vez que no primeiro as amostras são mantidas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por duas horas para precipitação do DNA, o que não é necessário no segundo.

Procedimento	Protocolo		
	Souza e Teixeira (2019) <sup>1</sup>	Faleiro et al. (2003) <sup>2</sup>	Silva (2010) <sup>3</sup>
Extração	15	60	30
Purificação	7	50	45
Precipitação	7	130	5
<b>Tempo total</b>	<b>29</b>	<b>242</b>	<b>80</b>

Tabela 1 – Tempo gasto, em minutos, nas principais etapas dos protocolos de extração de DNA estudados.

<sup>1</sup> Extração: incubação em banho-maria; Purificação: centrifugação para separação do sobrenadante com o DNA; Precipitação: centrifugação para precipitação do pellet.

<sup>2</sup> Extração: incubação em banho-maria; Purificação: duas limpezas com CIA (homogeneização e centrifugação) e uma limpeza com RNase (centrifugação); Precipitação: manutenção em baixa temperatura e centrifugação para precipitação do pellet.

<sup>3</sup> Extração: incubação em banho-maria; Purificação: limpeza com CIA por três vezes (homogeneização e centrifugação); Precipitação: centrifugação para precipitação do pellet.

Os custos dos reagentes variaram de R\$ 0,895 a R\$ 1,178 por amostra (Tabela 2). Embora o processo de obtenção de DNA pelo método de Souza e Teixeira (2019) tenha apresentado maior custo na etapa de extração, o seu custo total foi inferior 21 e 24 %, respectivamente, quando comparado aos protocolos descritos por Faleiros et al. (2003) e Silva (2010), pelo fato de não usar reagentes no processo de purificação, que é composto apenas por centrifugação. Estudos futuros devem testar o uso de microtubos de 2 mL na etapa de extração do protocolo de Souza e Teixeira (2019), a fim de buscar a redução de custos, com adaptações eventualmente necessárias para não redução de sua eficiência.

Procedimento	Protocolo		
	Souza e Teixeira (2019)	Faleiro et al. (2003)	Silva (2010)
Extração	0,762	0,113	0,093
Purificação	-	0,704	0,861
Precipitação	0,133	0,361	0,181
<b>Custo total</b>	<b>0,895</b>	<b>1,178</b>	<b>1,135</b>

Tabela 2 – Custos dos reagentes utilizados nas principais etapas dos protocolos de extração de DNA estudados (R\$)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Valor de cada reagente por quilograma ou litro: SDS (R\$ 2.039,00/kg), Triton X-100 (R\$ 403,00/L), NaCl (R\$ 496,00/kg), EDTA (R\$ 641,00/kg), NaOH (R\$ 779,00/kg), Tris-base (R\$ 1.102,00/kg); Precipitação: etanol absoluto (R\$ 133,00/L), CTAB (R\$ 2.068,00/kg), PVP (R\$ 1.569,00/kg), β-mercaptoetanol (R\$ 774,00/L), clorofórmio (R\$ 476,00/L), álcool isoamílico (R\$ 380,00/L), RNase (R\$ 5.846,00/kg), isopropanol (R\$ 258,00/L).

A etapa de purificação foi responsável por 60 e 76 % dos custos totais dos protocolos de Faleiro et al. (2003) e Silva (2010), respectivamente, sendo que no primeiro são realizadas duas limpezas com CIA, uma com CTAB e uma com RNase, enquanto que no segundo, além da limpeza por CTAB, a limpeza com CIA é repetida por três vezes, o que aumenta o gasto com estes reagentes.

Como o tempo total gasto no protocolo de Souza e Teixeira (2019) foi inferior aos demais, conseqüentemente, os custos com mão de obra também foram inferiores (Tabela 3). Enquanto no protocolo de Souza e Teixeira (2019) são gastos apenas R\$ 7,39 para execução de suas principais etapas, no protocolo descrito por Faleiro et al. (2003) esse custo chegou a R\$ 61,15.

Procedimento	Protocolo		
	Souza e Teixeira (2019)	Faleiro et al. (2003)	Silva (2010)
Extração	3,82	15,29	7,64
Purificação	1,78	12,74	11,47
Precipitação	1,78	33,12	1,27
<b>Custo total</b>	<b>7,39</b>	<b>61,15</b>	<b>20,38</b>

Tabela 3 – Custos com mão de obra para realização das principais etapas dos protocolos de extração estudados (R\$)<sup>1</sup>.

Considerando o tempo de execução das três principais etapas dos métodos de extração testados e o uso de uma micro centrífuga com capacidade para 24 amostras, como à usada em boa parte dos laboratórios, por meio do protocolo de Souza e Teixeira (2019), 384 amostras de DNA podem ser extraídas por uma pessoa durante um dia de trabalho. Já para os protocolos de Faleiros et al. (2003) e Silva (2010), a capacidade de extração diária por uma pessoa, nas mesmas condições, é reduzida para cerca de 48 e 144 amostras, respectivamente, o que dificulta a aplicação destes métodos quando a análise de um elevado número de indivíduos é requerida.

## 4 | CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que o protocolo apresentado por Souza e Teixeira (2019), além de eficiente na extração de DNA em qualidade e quantidade suficiente para análises moleculares, é mais seguro, rápido e barato, quando comparados aos demais protocolos já descritos para extração de DNA de um maior número de espécies vegetais do Cerrado. Assim, em estudos genéticos de plantas do bioma, onde geralmente o número de indivíduos a ser avaliado é elevado, o uso do protocolo de Souza e Teixeira (2019) mostra-se uma importante ferramenta para redução de custos e tempo para obtenção de DNA vegetal.

## REFERÊNCIAS

- AHMADI, E.; KOWSARI, M.; AZADFAR, D.; JOUZANI, G. S. Rapid and economical protocols for genomic and metagenomic DNA extraction from oak (*Quercus brantii* Lindl.). **Annals of Forest Science**, v.75, n.43, p.1-14, 2018.
- AMBAWAT, S.; KUMAR, R.; SINGH, S.; YADAV, R. An easy, quick and cost effective method of high quality DNA extraction from Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] without liquid nitrogen. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.6, n.9, p.2695-2703, 2017.
- ANTANAVICIUTE, L.; HARRISON, N.; BATTEY, N. H.; HARRISON, R. J. An inexpensive and rapid genomic DNA extraction protocol for rosaceous species. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.90, n.4, p.427-432, 2015.
- COLEY, P. D.; BRYANT, J. P.; CHAPIN, F. S. Resource availability and plant antiherbivore defenses. **Science**, v.230, n.4728, p.895-899, 1985.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011.
- DEHESTANI, A.; TABAR, S. K. K. A rapid and efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.6, n.6, p.977-981, 2007.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.

**Phytochem Bull**, v.19, p.11-15, 1987.

DURIGAN, G.; RATTER, J. A. The need for a consistent fire policy for Cerrado conservation. **Journal of Applied Ecology**, v.53, p.11-15, 2016.

FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do Cerrado visando a análises moleculares**. Comunicado Técnico nº 92. Planaltina: Embrapa, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

KLINK, C. A. Policy intervention in the Cerrado savannas of Brazil: changes in land-use and effects on conservation. In: CONSORTE-MCCREA, A. G.; SANTOS, E. F. (Eds.). **Ecology and conservation of the maned wolf: multidisciplinary perspectives**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2013.

MEDEIROS, J. D. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies**. Brasília: MMA/SBF, 2011.

MIRANDA, E. A. G. C. **Transferibilidade e validação de marcadores microssatélites derivados de EST para duas espécies de *Campomanesia* (Myrtaceae) do Cerrado**. 2014. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2014.

MITTERMEIER, C. G.; TURNER, W. R.; LARSEN, F. W.; BROOKS, T. M.; GASCON, C. Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In: ZACHOS, F. E.; HABEL, J. C. (Eds.). **Biodiversity hotspots: distribution and protection of priority conservation areas**. Berlin: Springer-Verlag, 2011. p.3-22.

MOREIRA, P. A.; OLIVEIRA, D. A. Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.10, n.1, p.353-358, 2011.

NOLETO, M. G. **Longevidade foliar, compostos fenólicos e nitrogenados em árvores e lianas d um fragmento de Cerrado na Estação Experimental de Itirapina, São Paulo**. 2010. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.5, n.3, p.253-260, 2006.

RODRIGUES, E. B. **Variabilidade genética populacional em variedades botânicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae): estratégias para conservação no cerrado**. 2015. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

RODRIGUES, P.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Toxic reagents and expensive equipment: are they really necessary for the extraction of good quality fungal DNA? **Letters in Applied Microbiology**, v.66, p.32-37, 2017.

SANTOS, D. Y. A. C. **Botânica aplicada: metabólitos secundários na interação planta-ambiente**. 2015. Tese (Livre Docência em Recursos Econômicos Vegetais) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SHI, R.; PANTHEE, D. R. A novel plant DNA extraction method using filter paper-based 96-well spin plate. **Planta**, v.246, p.579–584, 2017.

SILVA, M.N. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. **Revista Árvore**, v.34, n.6, p.973-978, 2010.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v.6, n.2, p.1-17, 2010.

SOUZA, D. C.; TEIXEIRA, T. A. A simple and effective method to obtain high DNA quality and quantity from Cerrado plant species. **Molecular Biology Reports**, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04845-0>.

STRASSBURG, B. B. N.; BROOKS, T.; FELTRAN-BARBIERI, R.; IRIBARREM, A.; CROUZEILLES, R.; LOYOLA, R.; LATAWIEC, A. E.; OLIVEIRA-FILHO, F. J. B.; SCARAMUZZA, C. A. M.; SCARANO, F. R.; SOARES-FILHO, B. S.; BALMFORD, A. Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology & Evolution**, v.1, p.1-3, 2017.

TAMARI, F.; HINKLEY, C. S.; RAMPRASHAD, N. A comparison of DNA extraction methods using *Petunia hybrida* tissues. **Journal of Biomolecular Techniques**, v.24, p.113-118, 2013.

## CORRELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE CARACTERES VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS DE PIMENTEIRAS (*Capsicum* spp.)

**Joanderson Marques Silva**  
**Allana Tereza Mesquita de Lima**  
**Alaide Silva de castro**  
**Ivanayra da Silva Mendes**  
**Larissa Pinheiro Alves**  
**Mayara Cardoso Araújo Lima**  
**Ramile Vieira de Oliveira**  
**Raquel Sobral da Silva**

Universidade Federal do Maranhão – UFMA,  
Discentes do Centro de Ciências Agrárias e  
Ambientais – CCAA.

**Jardel Oliveira Santos**

Universidade Federal do Maranhão, Centro de  
Ciências Agrárias e Ambientais, Docente da  
Coordenação de Biologia.  
Chapadinha – MA

**RESUMO:** Objetivou-se com este trabalho, estimar os coeficientes de correlação genotípica ( $r_g$ ), fenotípica ( $r_f$ ) e ambiental ( $r_a$ ) entre 13 caracteres de pimentas (*Capsicum* spp.), visando a seleção direta em futuros programas de melhoramento genético com as espécies. Vinte e uma sub-amostras de pimenteiras pertencentes a Coleção de *Capsicum* spp. do CCAA/UFMA, foram avaliados quanto aos caracteres: altura da planta - AP, comprimento do caule da planta - CCP, diâmetro do caule da planta - DCP, comprimento da folha - COMF, largura da folha - LARF, dias para o

florescimento - DPF, comprimento da pétala da corola - CPCOL, dias para frutificação - DFRUT, comprimento do fruto - CFRUT, largura do fruto - LFRUT, largura do pedúnculo - LP, comprimento do pedúnculo - CP e massa do fruto - MF. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância sob o delineamento inteiramente ao acaso e posteriormente foram estimadas as correlações genéticas entre os pares de caracteres. Verificou-se que para maioria dos pares de caracteres avaliados, os coeficientes de correlação fenotípica, genotípica e ambiental obtiveram os mesmos sinais e com todas as correlações com elevada magnitude (acima de 0,90). A maior associação ocorreu entre LP e DCP (0,9952\*\*), as demais associações tiveram a mesma magnitude e probabilidade. As correlações estimadas propiciaram o conhecimento das associações entre os caracteres de pimentas, fornecendo informações de que os caracteres avaliados possuem associação positiva.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Capsicum* spp.; Seleção direta; Melhoramento genético.

GENETIC CORRELATIONS BETWEEN  
VEGETATIVE TRAIT AND REPRODUCTIVE IN  
PEPPERS (*Capsicum* spp.)

**ABSTRACT:** The aim of this work was to

evaluate the genetic (rg), phenotypic (rf) and environment (re) correlations between 13 traits of the peppers (*Capsicum* spp.), aiming at direct selection in future breeding programs with the species. Twenty - one samples of peppercorns from the “Coleção of *Capsicum* spp. Of the CCAA / UFMA” were evaluated under greenhouse conditions. The evaluated traits were plant height - PH, plant stem length - PSL, plant stem diameter - PSD, leaf length - LL, leaf width - LW, days for flowering - DF, length of corolla petal - LCP, days for fruiting - DF, fruit length - FL, fruit width - FW, peduncle width - PW, peduncle length – PL and fruit mass - FM. The data were submitted to variance analysis under the completely randomized design and later the genetic correlations between the pairs of trait were estimated. It was verified that for most of the pairs of trait evaluated, the phenotypic, genotypic and environmental correlation coefficients obtained the same signals and with all correlations with high magnitude (above 0.90). The largest association occurred between LP and PDD (0.9952 \*\*), the other associations had the same magnitude and probability. The estimated correlations allowed the knowledge of the associations between the peppers traits, providing information that the evaluated characters have a positive association.

**KEYWORDS:** *Capsicum* spp.; Selection direct; Breeding genetical.

## 1 | INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* pertencente à família Solanaceae, é caracterizado pela grande diversidade de pimentas e pimentões, originários das regiões tropicais do continente americano, que são consumidos por grande parte da população mundial, especialmente na forma de condimentos (MOREIRA et al., 2006). O gênero é constituído por cerca de 37 espécies, sendo que apenas cinco destas são domesticadas (BOSLAND; VOTAVA, 2012).

O Brasil é considerado um importante centro de diversidade genética do gênero *Capsicum*, com ampla variabilidade de espécies disseminadas em todas as regiões do país (SOUZA, 2008). Dessa forma, a diversidade observada em *Capsicum* permite grande potencial para o melhoramento de suas espécies (POZZOBON et al., 2011).

No âmbito do melhoramento genético, uma das formas de aumentar a eficiência da seleção de um caráter é por meio do uso de caracteres correlacionados, uma vez que o estudo de associações utilizando correlações, permite traçar estratégias de seleção alternativas tendo em vista a maximização de ganhos genéticos (TEIXEIRA et al., 2012).

As relações existentes entre os caracteres são geralmente avaliadas por meio das correlações genotípicas, fenotípicas e de ambiente. A correlação fenotípica é resultante de causas genéticas e ambientais, já a correlação genotípica é a única de natureza herdável, sendo, portanto, empregada para orientar programas de melhoramento (RODRIGUES et al., 2010).

Uma alta correlação entre dois caracteres, permite a seleção para uma

característica de interesse, por meio de outra característica correlacionada e de mais fácil mensuração. Dessa forma, o conhecimento da associação entre caracteres permite ao melhorista antever as consequências da mudança simultânea das características, resultando em maior eficiência na seleção das características a serem melhoradas (OLIVEIRA et al., 2011).

Nesse sentido, objetivou-se estimar os coeficientes de correlação fenotípica ( $r_f$ ), genotípica ( $r_g$ ) e ambiental ( $r_a$ ) entre 13 caracteres de pimenteiras (*Capsicum* spp.), visando a seleção direta em futuros programas de melhoramento genético com a espécie.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Unidade de Apoio à Pesquisa do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Federal do Maranhão – CCAA/UFMA, município de Chapadinha – MA, região do Baixo Parnaíba, no período de janeiro a junho do ano agrícola de 2016.

O material genético utilizado constou de 21 sub-amostras de pimenteiras pertencentes a “Coleção de pimentas (*Capsicum* spp.) do CCAA/UFMA” (Tabela 1).

Sub-amostras	Nome comum	Procedência
UFMA-16	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-17	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-18	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-21	Pimenta	Pov. Água Rica-MA
UFMA-25	Pimenta	Alegre-ES
UFMA-35	Pimenta	Alegre-ES
UFMA-54	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-55	Pimenta de Cheiro	Chapadinha-MA
UFMA-56	Morto Doméstico	Trizidela do Vale-MA
UFMA-57	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-58	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-59	Biquinho	Chapadinha-MA
UFMA-60	Pimenta de Cheiro	Chapadinha-MA
UFMA-62	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-63	Pimenta	Buriti-MA
UFMA-64	Pimenta	Buriti-MA
UFMA-65	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-66	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-67	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-68	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-70	Pimenta	Valparaíso-GO

**Tabela 1.** Dados de passaporte das 21 sub-amostras pertencentes a “Coleção de pimentas (*Capsicum* spp.) do CCAA/UFMA”.

A semeadura das sub-amostras foi feita em bandejas de poliestireno expandido de 128 células, preenchidas com o substrato comercial Tropstrato HT<sub>HORTALIÇAS</sub>. Aos 25 dias após a semeadura, quando as mudas apresentavam cinco folhas definitivas, foi realizado o transplante para vasos plásticos de 18 L de capacidade, contendo substrato composto por solo de camada subsuperficial e esterco caprino, na proporção de 4:1. O substrato foi mantido sob a capacidade de campo durante a condução do experimento. A adubação e os demais tratamentos culturais foram realizados conforme as recomendações para a cultura (FILGUEIRA, 2008).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 21 tratamentos e quatro repetições, cada repetição constituiu-se de uma planta, sendo cultivadas duas plantas por vaso.

Com base em descritores para *Capsicum* estabelecidos pelo (IPGRI, 1995), 13 caracteres quantitativos foram avaliados: altura da planta - AP, comprimento do caule da planta - CCP, diâmetro do caule da planta - DCP, comprimento da folha - COMF, largura da folha - LARF, dias para o florescimento - DPF, comprimento da pétala da corola - CPCOL, dias para frutificação - DFRUT, comprimento do fruto - CFRUT, largura do fruto - LFRUT, largura do pedúnculo - LP, comprimento do pedúnculo - CP e massa do fruto - MF.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância sob o delineamento inteiramente ao acaso e posteriormente foram estimadas as correlações genéticas entre os pares de caracteres, com o auxílio do programa GENES (CRUZ, 2007).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos coeficientes de correlação fenotípica, genotípica e ambiental efeitos significativos ( $P < 0,01$ ) foram observados para todas as características estudadas indicando a existência de variabilidade genética entre as sub-amostras. Esses resultados possibilitam a obtenção de ganhos genéticos para as características avaliadas em futuros trabalhos de melhoramento com as sub-amostras estudadas.

Verificou-se também similaridade entre os pares de caracteres, em relação aos sinais, a magnitude e o nível de significância (Tabela 2). De modo que apenas 8,97% dos coeficientes de correlações genotípica e fenotípica foram significativos em nível de 5% de probabilidade, pela tabela de Fisher e Yates. Corroborando com o trabalho desenvolvido por Moreira et al. (2013), que estudando a correlação entre pimentas (*Capsicum annum* L), encontraram porcentagem similar a observada neste estudo.

As maiores correlações fenotípicas, foram estimadas para as combinações entre as variáveis COMP x LARF (0,9878), CP X LP (0,9715), DFRUT x LP (0,9116) e CPCOL x DFRUT (0,9054). Esses dados concordam com Tavares et al. (2009), que obtiveram para o pimentão, uma correlação genotípica de 0,939 para a associação entre o comprimento da folha e largura da folha. Para DFRUT x LP esses autores

obtiveram uma estimativa de 0,928, mostrando uma associação de natureza herdável entre essas características, sendo de grande interesse para o melhoramento, podendo ser utilizadas para a realização de seleção indireta.

A maioria dos coeficientes de correlação fenotípica, genotípica e ambiental obtiveram correlações com elevada magnitude (acima de 0,90), a maior associação ocorreu entre LP e DCP (0,9952\*\*), resultados semelhantes foram encontrados por Farhad et al. (2008), estudando a associação e efeitos diretos e indiretos entre si de quatorze caracteres quantitativos de *Capsicum*.

Observou-se também que entre as 78 combinações, obtidas a partir dos treze caracteres avaliados em sub-amostras de pimenteiras, em apenas nove combinações a correlação ambiental foi superior a genotípica. Desta forma, contata-se pouco efeito ambiental sobre a expressão dos caracteres avaliados, o que pode implicar em uma maior herdabilidade dos caracteres e conseqüentemente maiores ganhos com a seleção em futuros programas de melhoramento de pimenteiras no estado do Maranhão.

A seleção direta dos caracteres pode ser uma estratégia efetiva entre as sub-amostras de pimentas avaliadas, uma vez que das correlações genotípicas somente para 10 caracteres não houve significância. No entanto, para o restante das correlações, essas expressaram valores superiores a 0,5 o que mostra claramente que os fatores genéticos contribuem mais do que os fatores ambientais para as correlações estudadas e que o fenótipo da expressão adequada do genótipo.

No que diz respeito a correlação entre fenótipo e genótipo, os dados apresentaram alta associação, demonstrando que o genótipo é refletido no fenótipo, e que o ambiente pouco contribuiu para essas correlações (CRUZ; MIRANDA; COSTA, 1988) Tais dados, permitem ao melhorista ter uma percepção da grandeza relativa das mudanças que podem ser obtidas por meio de seleção, ao longo de um programa de melhoramento, já que se trata de um parâmetro, cuja estimativa é diretamente proporcional à variância genética (SILVA FILHO et al., 2012).

	AP	CCP	DCP	COMF	LARF	DPF	CPCOL	DFRUT	CFRUT	LFRUT	CP	LP	MF
		0,6359**	0,6692**	0,6312**	0,6728**	0,7255**	0,7633**	0,7643**	0,4245 <sup>ns</sup>	0,5128*	0,6629**	0,6276**	0,2442 <sup>ns</sup>
AP	-	0,7003 <sup>ns</sup>	0,5782 <sup>ns</sup>	0,5500 <sup>ns</sup>	0,6049 <sup>ns</sup>	0,7785 <sup>ns</sup>	0,7681 <sup>ns</sup>	0,8022 <sup>ns</sup>	0,3318 <sup>ns</sup>	0,3761 <sup>ns</sup>	0,5830 <sup>ns</sup>	0,5332 <sup>ns</sup>	0,1646 <sup>ns</sup>
		0,4980++	0,8244++	0,7917++	0,7968++	0,6137++	0,7573++	0,6870++	0,7649++	0,7926++	0,8114++	0,7977++	0,7649++
			0,4641*	0,4905*	0,5327*	0,4711*	0,5735**	0,4894*	0,4262 <sup>ns</sup>	0,3963 <sup>ns</sup>	0,5569**	0,4570*	0,2533 <sup>ns</sup>
CCP	-	0,4228 <sup>ns</sup>	0,4309 <sup>ns</sup>	0,5037 <sup>ns</sup>	0,4756 <sup>ns</sup>	0,6179 <sup>ns</sup>	0,4804 <sup>ns</sup>	0,3882 <sup>ns</sup>	0,3177 <sup>ns</sup>	0,5412 <sup>ns</sup>	0,4036 <sup>ns</sup>	0,2063 <sup>ns</sup>	
			0,5572++	0,6302++	0,6018++	0,4597++	0,4958++	0,5145++	0,5906++	0,5849++	0,5971++	0,5760++	0,6190++
			0,9541**	0,9685**	0,8056**	0,8533**	0,9252**	0,6897**	0,9127**	0,9721**	0,9952**	0,5108*	
DCP	-	0,9544+	0,9600 <sup>ns</sup>	0,7995 <sup>ns</sup>	0,8440 <sup>ns</sup>	0,9624 <sup>ns</sup>	0,6301 <sup>ns</sup>	0,8764 <sup>ns</sup>	0,9658 <sup>ns</sup>	0,9975++	0,4760 <sup>ns</sup>		
			0,9626++	0,9845++	0,8392++	0,8678++	0,8866++	0,9669++	0,9899++	0,9862++	0,9934++	0,9559++	
				0,9878**	0,7705**	0,8643**	0,8957**	0,7391**	0,9273**	0,9469**	0,9619**	0,6631**	
COMF	-		0,9879++	0,7337 <sup>ns</sup>	0,8896 <sup>ns</sup>	0,9055 <sup>ns</sup>	0,6964 <sup>ns</sup>	0,9095 <sup>ns</sup>	0,9352 <sup>ns</sup>	0,9597 <sup>ns</sup>	0,6642 <sup>ns</sup>		
			0,9898++	0,8583++	0,8236++	0,8815++	0,9477++	0,9653++	0,9706++	0,9688++	0,9306++		
				0,8159**	0,8840**	0,9272**	0,7364**	0,9227**	0,9652**	0,9703**	0,6136**		
LARF	-		0,7979 <sup>ns</sup>	0,9088 <sup>ns</sup>	0,9486 <sup>ns</sup>	0,6893 <sup>ns</sup>	0,8920 <sup>ns</sup>	0,9536+	0,9591 <sup>ns</sup>	0,6051 <sup>ns</sup>			
			0,8646++	0,8436++	0,9004++	0,9699++	0,9866++	0,9860++	0,9896++	0,9519++			
				0,7957**	0,9366**	0,4607*	0,6645**	0,8012**	0,7780**	0,2513 <sup>ns</sup>			
DPF	-		0,8359 <sup>ns</sup>	0,9492 <sup>ns</sup>	0,3608 <sup>ns</sup>	0,5851 <sup>ns</sup>	0,7747 <sup>ns</sup>	0,7450 <sup>ns</sup>	0,1666 <sup>ns</sup>				
			0,7308++	0,9034++	0,8569++	0,8540++	0,8669++	0,8582++	0,8430++				
				0,9054**	0,6253**	0,8314**	0,8589**	0,8413**	0,5498**				
CPCOL	-		0,9746+	0,5865 <sup>ns</sup>	0,8224 <sup>ns</sup>	0,8627 <sup>ns</sup>	0,8310 <sup>ns</sup>	0,5528 <sup>ns</sup>					
			0,7864++	0,8272++	0,8553++	0,8537++	0,8585++	0,8238++					
				0,6215**	0,8085**	0,9101**	0,9116**	0,4298**					
DFRUT	-		0,5564 <sup>ns</sup>	0,7763 <sup>ns</sup>	0,9185 <sup>ns</sup>	0,9258 <sup>ns</sup>	0,3814 <sup>ns</sup>						
			0,9022++	0,8949++	0,9086++	0,9028++	0,8598++						
				0,6988**	0,7654**	0,7200**	0,8456**						
CFRUT	-		0,6332 <sup>ns</sup>	0,7249 <sup>ns</sup>	0,6651 <sup>ns</sup>	0,8416 <sup>ns</sup>							
			0,9789++	0,9783++	0,9772++	0,9705++							
				0,9172**	0,9195**	0,6968**							
LFRUT	-		0,8812 <sup>ns</sup>	0,8824 <sup>ns</sup>	0,6958 <sup>ns</sup>								
			0,9916++	0,9960++	0,9705++								
				0,9715**	0,5910**								
CP	-		0,9599 <sup>ns</sup>	0,5703 <sup>ns</sup>									
			0,9920++	0,9694++									
				0,5508**									
LP	-			0,5213 <sup>ns</sup>									
				0,9661++									
MF	-												

Tabela 2. Estimativas dos coeficientes de correlações fenotípicas ( $r_f$ ), genotípicas ( $r_g$ ) e ambientais ( $r_a$ ), respectivamente, entre treze caracteres agrônômicos em 21 acessos de pimenteiros (*Capsicum* spp.).

AP - Altura da planta; CCP - Comprimento do caule da planta; DCP - Diâmetro do caule da planta; COMF - Comprimento da folha; LARF - Largura da folha; DPF - Dias para o florescimento; CPCOL - Comprimento da pétala da corola; DFRUT - Dias para frutificação; CFRUT - Comprimento do fruto; LFRUT - Largura do fruto; LP - Largura do pedúnculo; CP - Comprimento do pedúnculo e MF - Massa do fruto.

## 4 | CONCLUSÕES

As correlações estimadas propiciam conhecimentos das associações entre os caracteres de pimentas, fornecendo informações de que os caracteres avaliados

possuem associação positiva.

Em um futuro programa de melhoramento com pimenteiros (*Capsicum* spp.) com as sub-amostras da “Coleção de pimentas (*Capsicum* spp.) do CCAA/UFMA”, pode-se preconizar a seleção direta dos caracteres e de maneira precoce, obter genótipos superiores, pois os dados obtidos apresentaram altos valores de coeficiente de variação genética.

## 5 | AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Maranhão pelo suporte e concessão da bolsa de iniciação científica e a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA, pelo auxílio financeiro ao projeto.

## REFERÊNCIAS

- BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. **Peppers**. Vegetable and Spice Capsicums, 2ed.; CABI: Cambridge, UK, 2012.
- CRUZ, C. D. **Programa genes**: versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2007.
- CRUZ, C. D.; MIRANDA, J. E. C.; COSTA, C. P. Correlações, efeitos diretos e indiretos de caracteres agrônômicos sobre a produção de pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Revista Brasileira de Genética**, v.11, n.4, p.921-928, 1988.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: Editora UFV, 2003. 585p.
- FARHAD, M. et al. Reliability of yield contributing characters for improving yield potential in chilli (*Capsicum annuum*). **International Journal of Sustainable Crop Production**, v.3, n.3, p.30-38, 2008.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3 ed. Viçosa: UFV, 2008. 421p.
- IPGRI. **Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum* spp.)**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1995. 49 p.
- MOREIRA, G. R. M. et al. Espécies e variedades de pimenta. In: EPAMIG (Belo Horizonte, MG). **Cultivo da pimenta**. v. 27, n. 235, p. 16-29, 2006.
- MOREIRA, L. S. A. et al. Correlações e análise de trilha sob multicolinearidade em linhas recombinadas de pimenta (*Capsicum annuum* L.). **Rev. Bras. Ciênc. Agrár.**, Recife, v.8, n.1, p.15-20, 2013.
- OLIVEIRA, E. J. et al. Estimativas de correlações genotípicas e fenotípicas em germoplasma de maracujazeiro. **Bragantia**, vol.70, n.2, pp.255-261, 2011.
- POZZOBON, M. T. et al. Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 212-216, 2011.

RODRIGUES, H. C. A. et al. Correlações genotípicas, fenotípicas e ambientais entre caracteres de mamoneira. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 6, p. 1390–1395, 2010.

SOUZA, S. A. M. **Caracterização citogenética, química e molecular em *Capsicum chinense* Jacq.** 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2008.

SILVA FILHO, D. F.; et al. Seleção de etnovarietades de pimenta murupi (*Capsicum chinense* Jacq.) originárias da região do alto rio Negro no estado do Amazonas. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 4379-4385, 2012.

TEIXEIRA, D. H. L. et al. Correlações genéticas e análise de trilha para componentes da produção de frutos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, n.4, p.1135-1142, 2012.

TAVARES, M. et al **Efeitos diretos e indiretos e correlações canônicas para caracteres relacionados com a produção de pimentão.** *Bragantia*, n.58, n.1, p.41-47, 2009.

## DESEMPENHO AGRONÔMICO E SELEÇÃO DE HÍBRIDOS DE MAMONEIRA PARA ALTA PRODUTIVIDADE

### **Sebastião Soares de Oliveira Neto**

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP  
Botucatu – SP

### **Odila Friss Ebertz**

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP  
Botucatu – SP

### **Maria Márcia Pereira Sartori**

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP  
Botucatu – SP

### **Maurício Dutra Zanotto**

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP  
Botucatu – SP

**RESUMO:** A mamoneira é uma oleaginosa encontrada em todo o mundo devido a sua fácil propagação e adaptação. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de óleo de rícino, aumentando a importância dessa cultura no país. O melhoramento vegetal visando à obtenção de híbridos é primordial para o sucesso econômico da cultura, pois materiais mais produtivos trazem um maior retorno econômico

para os produtores. O trabalho objetivou avaliar o desempenho agrônomo de 12 híbridos de mamoneira desenvolvidos pela Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, a fim de selecionar os melhores para registro e uso pelos produtores da cultura. O ensaio foi conduzido na Fazenda Experimental da UNESP em São Manuel –SP na safra de 2015, onde foram avaliados os híbridos HIB1, HIB2, HIB3, HIB4, HIB5, HIB6, HIB7, HIB8, HIB9, HIB10, HIB11 e HIB12 quanto às características: altura de plantas, altura de inserção do rácemo primário e secundário, número de rácemos, diâmetro de caule, porcentagem de flores, produtividade e teor de óleo. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Scott-Knott através do software estatístico SISVAR® e análises multivariada pelo software Minitab 17®. Os híbridos de mamoneira HIB4, HIB5, HIB11 e HIB12 apresentaram desempenho agrônomo superior e foram selecionados para registro e futura utilização pelos produtores de mamoneira na região central do Brasil.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Ricinus communis* L.; desempenho superior; melhoramento da mamoneira;

### AGRONOMIC PERFORMANCE AND SELECTION OF CASTOR BEAN HYBRIDS

**ABSTRACT:** The castor bean is an oilseed found throughout the world due to its easy propagation and adaptation. Brazil is the second largest producer of castor oil in the world, increasing the importance of this culture in the country. Plant breeding aimed at obtaining hybrids is primordial for the crop economic success, since more productive materials bring a greater economic return to the producers. The objective of this study was to evaluate the agronomic performance of 12 castor bean hybrids developed by UNESP's Faculty of Agronomic Sciences in order to select the best ones for registration and use by crop producers. HIB1, HIB3, HIB3, HIB4, HIB5, HIB6, HIB7, HIB8, HIB9, HIB10, HIB11 and HIB12 were evaluated in the Experimental Farm of São Manuel -SP in the harvest of 2015, to the characteristics: height of plants, height of insertion of the primary and secondary racemes, number of racemes, diameter of stem, percentage of flowers, productivity and oil content. Data were submitted to variance analysis and Scott-Knott's test using SISVAR® statistical software and multivariate analyzes using Minitab 17® software. HIB4, HIB5, HIB11 and HIB12 hybrids presented superior agronomic performance and were selected for registration and future use by castor bean producers in central Brazil.

**KEYWORDS:** *Ricinus communis* L.; superior performance; castor bean breeding;

## 1 | INTRODUÇÃO

O Brasil já foi o maior produtor mundial e exportador de óleo de mamona, mas seu cultivo entrou em decadência na década de 1990 e atualmente ocupa o 4º lugar no ranking dos maiores produtores de mamona (FAOSTAT, 2017). Essa redução do cultivo pode ser explicada pela falta do desenvolvimento de tecnologias que facilitem o manejo e aumentem a produtividade da cultura (SANTOS et al., 2007).

De outro lado, tem ocorrido um aumento crescente na demanda por óleos vegetais no Brasil, principalmente para inclusão na indústria do biodiesel, como forma de combustível renovável, o que torna necessário o desenvolvimento de novas tecnologias e materiais genéticos capazes de satisfazer as necessidades econômicas dos produtores e promover o aumento na produção da matéria prima (SAVY FILHO et al., 2007).

Existem duas formas de maximizar a produção de mamona, sendo uma de caráter ambiental, melhorando o manejo da cultura através de tratamentos culturais como controle de plantas infestantes, adubação adequada, suprimento de necessidade hídrica por irrigação e outra com viés genético, pelo uso de variedades e híbridos com potencial genético superior (SEVERINO & AULD, 2013).

Os programas de melhoramento genético da mamoneira têm feito uso da hibridação como fator de geração de variabilidade em uma população, propiciando o início da seleção por outros métodos e também explorando a heterose, promovida pelo cruzamento entre dois indivíduos com boas características (SAVY FILHO, 2005;

FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ & VELASCO, 2012).

Entre os principais desafios enfrentados para a elevação da produção na cultura está o desenvolvimento de materiais genéticos aptos para o cultivo mecanizado, minimizando custo de produção pela redução do emprego de mão de obra, principalmente no momento da colheita, tornando a cultura mais rentável aos produtores. Para tanto, outras características são importantes para a manutenção da produtividade desses materiais genéticos, como por exemplo o sistema reprodutivo macho-estéril, onde o racemo é formado apenas por flores pistiladas que irão formar frutos e sementes, aumentando consequentemente a produção por racemo (LU et al., 2019).

A estabilidade da produção e a adaptação a ambientes específicos, incluindo resistência a fatores bióticos e abióticos, também são fatores que determinam o sucesso dos genótipos para cultivo em grande escala (OLIVEIRA & ZANOTTO, 2008; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ & VELASCO, 2012; FIOREZE et al., 2016).

Para os programas de melhoramento, o conhecimento dos caracteres morfológicos que estão relacionados com a facilitação do manejo, elevação da produtividade e a duração do ciclo de cultivo é de suma importância e darão base para a seleção dos melhores genótipos (PIVETTA et al., 2015; SAVY FILHO, 2005; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ & VELASCO, 2012).

Este estudo baseia-se na avaliação de características morfológicas e agronômicas em híbridos de mamoneira desenvolvidos pelo programa de Melhoramento Genético Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista, visando a possível indicação dos híbridos mais produtivos ao Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, bem como, uso futuro pelos produtores da cultura na região central do Brasil.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Foi avaliado o desempenho agronômico de 12 híbridos de mamoneira (HIB1, HIB2, HIB3, HIB4, HIB5, HIB6, HIB7, HIB8, HIB9, HIB10, HIB11 e HIB12) desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA) da UNESP-Botucatu.

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental da FCA-UNESP em São Manuel – SP, Brasil (latitude 22°44'50" S, longitude 48° 34' 00" O e altitude de 709 m). O clima do município de São Manuel, segundo classificação de Köppen é do tipo Cfa.

O solo da área experimental é classificado como Latossolo Vermelho Amarelo Fase Arenosa de baixa fertilidade natural (EMBRAPA, 2006). Com os atributos químicos do solo nas profundidades de 0 – 0,20 m conforme apresentados na Tabela 1.

Local	P (Resina) mg dm <sup>-3</sup>	MO g dm <sup>-3</sup>	pH (CaCl <sub>2</sub> )	K	Ca	Mg	H+Al	Al	V
						----- mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----			(%)
São Manoel	34,00	10,00	5,10	0,90	15,0	4,0	19	0,2	51

**Tabela 1.** Atributos químicos dos solos na profundidade de 0–0,20 m.

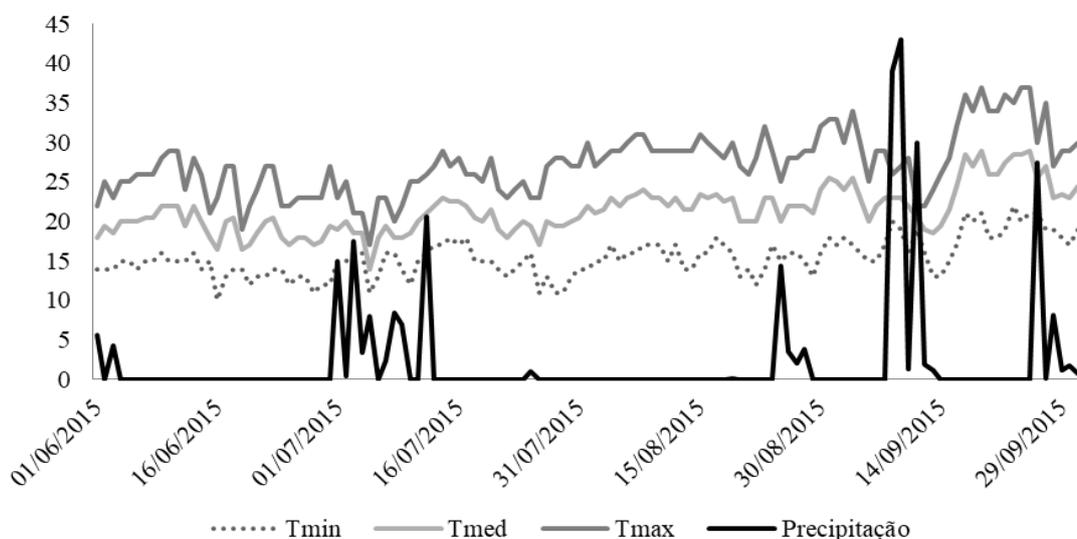
<sup>(1)</sup> P (Mehlich-1).

O solo foi corrigido e adubado em função da análise química e então realizada uma adubação de base com N-P-K (8-20-20), aplicando-se cerca de 200 kg.ha<sup>-1</sup>.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada parcela experimental foi constituída de quatro linhas de 5 m de comprimento com espaçamento entrelinhas de 1 m e espaçamento entre plantas de 0,5 m.

O cultivo ocorreu entre os meses de junho a setembro de 2015 e as informações climáticas no período do experimento são apresentadas na Figura 1.

O experimento foi irrigado por aspersão conforme as necessidades hídricas da cultura.



**Figura 1.** Temperatura mínima (Tmin), temperatura média (Tmed) e temperatura máxima (Tmax) em °C e precipitação, em milímetros, durante o ciclo de cultivo de 12 híbridos de mamoneira.

Foram avaliados as características: altura de plantas (AP): avaliadas 10 plantas por parcela, dada em centímetros; altura de inserção do rácemo primário (AI1): avaliadas 10 plantas por parcela, utilizando-se a média da superfície do solo até o ponto de inserção do rácemo primário da planta, dada em cm; altura de inserção do rácemo secundário (AI2): avaliadas 10 plantas por parcela, utilizando-se a média da superfície do solo até o ponto de inserção do rácemo secundário da planta, dada em cm; número de rácemos (NR): por meio da contagem do número de rácemos

por plantas, realizada em 10 plantas da parcela; diâmetro do caule ( $\emptyset$ ): realizada a medição do diâmetro do caule das plantas com o auxílio de um paquímetro, dada em cm; porcentagem de fecundação (%F): avaliada em 10 plantas de cada parcela a quantidade de flores fecundadas, estimada visualmente. Todas essas variáveis foram mensuradas na maturação fisiológica da cultura, exceto, %F, que ocorreu no período de florescimento.

A produtividade de grãos (PROD) foi obtida após a colheita de todas as plantas contidas nas linhas centrais da área útil da parcela, corrigida para 13% de umidade e posteriormente extrapolada para  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  e o teor de óleo (%O) foi dado através da leitura das amostras de sementes das parcelas pelo Espectrômetro de Ressonância Magnética SpinLock SLK 200, valor expresso em porcentagem.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os híbridos apresentaram médias discrepantes para alguns dos caracteres agronômicos avaliados (Tabela 2), não sendo constatada diferença estatística para AP, AI1, NR,  $\emptyset$ , %F, %O pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

As maiores médias foram observadas para AP e AI1 no híbrido HIB2 (113,25 cm e 40,68 cm, respectivamente), para NR em HIB4 (4,9), para  $\emptyset$  em HIB11 (2,33 cm), para %F em HIB9 (78,5 %) e para %O em HIB10 (44,80 %).

Já para PROD as maiores médias foram observadas para HIB4 (1.586,25  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), HIB11 (1.513,75  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) e HIB5 (1.403,75  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) que se diferiram dos demais híbridos pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Foi observado uma pequena variação na porcentagem de óleo das sementes, de 42,12% para HIB1 a 44,85% para HIB10, apesar de não apresentar diferença estatística, esse resultado por vir a influenciar na produtividade de óleo.

Híbrido	Caracteres Agronômicos							
	AP --cm--	AI1 --cm--	AI2 --cm--	NR --n--	$\emptyset$ --cm--	%F --%--	PROD --kg.ha <sup>-1</sup> --	%O --%--
H1	108,90a	35,52b	52,70b	4,65a	1,97a	60,25a	1015,00b	42,12a
H2	113,25a	40,67a	59,92a	4,20a	2,05a	68,75a	1225,00b	43,37a
H3	109,30a	35,25b	54,80a	4,52a	2,12a	68,50a	1266,25b	43,57a
H4	112,32a	34,15b	56,92a	4,90a	2,17a	70,25a	1586,25a	43,17a
H5	103,87a	32,72b	51,32b	4,30a	2,25a	65,75a	1403,75a	43,27a

<b>H6</b>	103,25a	32,36b	51,62b	4,42a	2,16a	66,75a	1191,25b	43,22a
<b>H7</b>	104,52a	32,77b	52,32b	4,32a	2,13a	72,75a	1238,75b	44,55a
<b>H8</b>	101,52a	32,80b	49,85b	4,15a	2,19a	73,00a	1241,25b	43,62a
<b>H9</b>	97,95a	31,87b	50,10b	3,87a	2,05a	78,50a	1185,00b	43,77a
<b>H10</b>	108,62a	35,97b	56,57a	4,13a	2,19a	74,75a	1202,50b	44,80a
<b>H11</b>	109,12a	33,32b	55,02a	4,40a	2,33a	73,00a	1513,75a	43,62a
<b>H12</b>	107,02a	32,35b	51,97b	4,60a	2,07a	75,00a	1307,50b	43,97a

AP: altura de plantas (cm); AI1: altura de inserção do racemo primário (cm); AI2: altura de inserção do racemo secundário (cm); NR: número de racemos; Ø: diâmetro de caule (cm); %F: porcentagem de fecundação de flores; PROD: produtividade de grãos (kg.ha<sup>-1</sup>); %O: teor de óleo dos grãos (%);

\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não são diferentes estatisticamente.

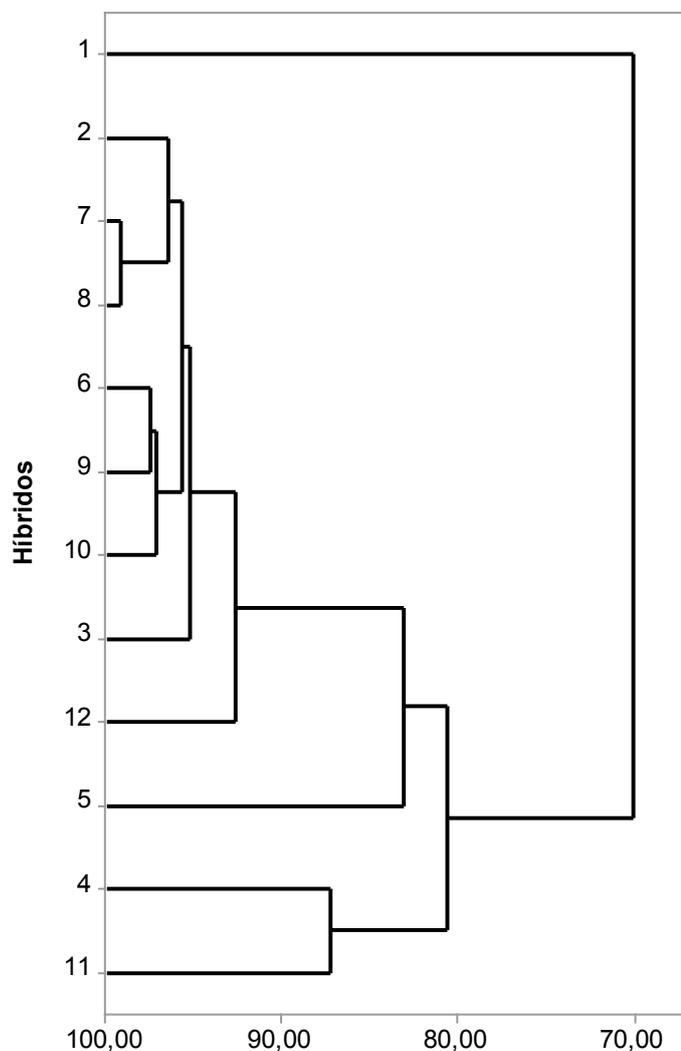
Tabela 2. Médias dos componentes avaliados em 12 híbridos de mamoneira

A análise de agrupamentos (Figura 2) identificou os híbridos com as respostas similares para as características de desempenho agrônômico.

Para HIB1, agrupado isoladamente, observa-se baixos valores de fecundação de flores (60,25 %), rendimento de grãos (1.015 kg.ha<sup>-1</sup>), teor de óleo (42,1%) e diâmetro (1,98 cm) (Figura 2).

Já o agrupamento formado pelos híbridos HIB4 e HIB11 (Figura 2), percebe-se que são materiais que obtiveram as maiores médias de produtividade (respectivamente, 1.586,25 e 1.513,75 kg.ha<sup>-1</sup>). Para a mamoneira, rendimentos acima de 1.500 kg.ha<sup>-1</sup> são considerados ótimos, pois a média nacional está em 638 kg.ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2019).

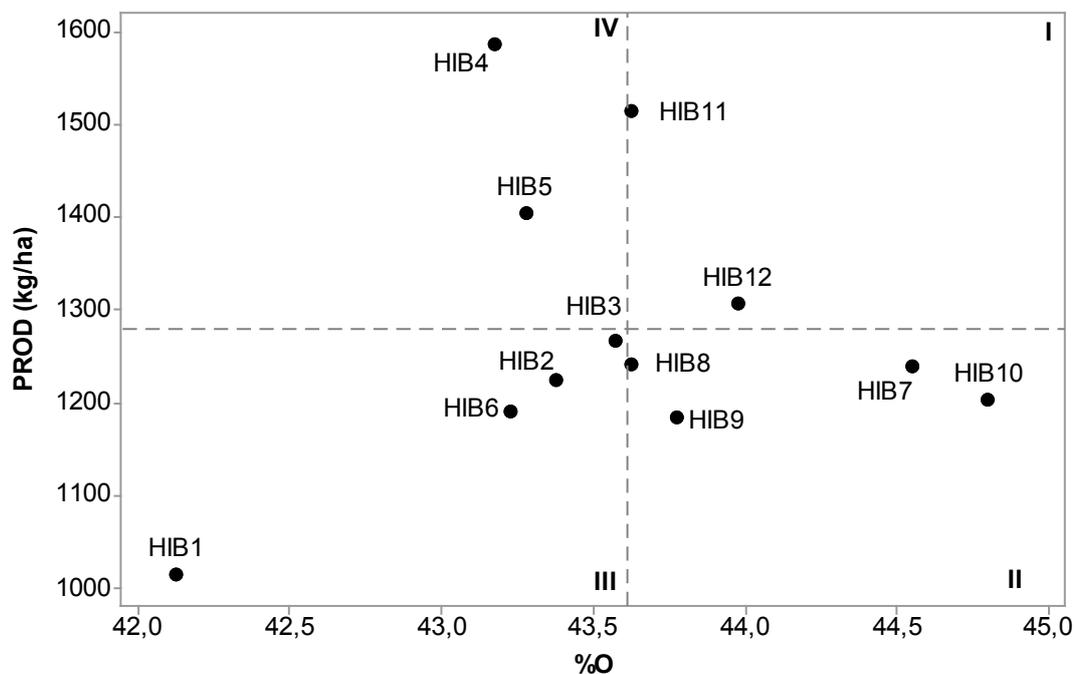
Nossos resultados de produtividade corroboram com Oswalt et al. (2014) que avaliaram altura de planta e produção de sementes de mamona pulverizadas com retardadores de crescimento e produtos químicos de auxílio à colheita, Pereira et al. (2015) que verificaram o desempenho agrônômico de cultivares de mamona em sistemas consorciados e monocultivos, Anastasi et al. (2015) que verificaram o rendimento de sementes e qualidade do óleo de mamona perene em ambiente mediterrâneo e Saadaoui et al. (2017) ao avaliarem a variação genética e produção de sementes de mamona.



**Figura 2.** Similaridade entre 12 híbridos de mamoneira, utilizando o método do vizinho mais próximo e a distância euclidiana para os caracteres: AP, AI1, AI2, NR, D, %F, PROD e %O.

Tendo em vista que o aumento de produção sem o eventual aumento de área é um dos grandes gargalos da agricultura moderna, a produtividade é uma característica muito importante, para as culturas em geral, materiais mais produtivos proporcionam menor uso de área e conseqüentemente maior lucro para o produtor. Trabalhar com os dados de teor de óleo mostra-se bastante importante para conhecer o potencial de óleo dos materiais melhorados.

A Figura 3 indica a relação entre a produtividade (PROD) e o teor de óleo (%O) dos híbridos, sendo que o Quadrante I – apresenta os materiais com alta produtividade e teor de óleo superior; Quadrante II – materiais com produtividade reduzida e teor de óleo superior; Quadrante III – materiais com produtividade reduzida e teor de óleo inferior; Quadrante IV – materiais com alta produtividade e teor de óleo inferior.



**Figura 3.** Relação entre a produtividade e o teor de óleo de 12 híbridos de mamoneira.

Os híbridos HIB4 e HIB5 foram classificados no Quadrante IV, apresentando um teor de óleo mediano (em torno de 43%), mas com produtividades elevadas, sendo respectivamente, 1.586,25 kg.ha<sup>-1</sup> e 1.403,75 kg.ha<sup>-1</sup>. O híbrido HIB4 obteve a maior média de produtividade entre todos os materiais.

Destacam-se os híbridos HIB11 e HIB12 (Figura 3, Quadrante I) que apresentaram elevadas produtividades e teor de óleo superior (respectivamente, 1.513,75 kg.ha<sup>-1</sup> e 43,62% de óleo para H11 e 1.307,50 kg.ha<sup>-1</sup> e 43,97% de óleo).

#### 4 | CONCLUSÃO

Os híbridos de mamoneira HIB4, HIB5, HIB11 e HIB12 apresentaram desempenho agrônomo superior e foram selecionados para registro e futura utilização pelos produtores de mamoneira na região central do Brasil.

#### REFERÊNCIAS

ANASTASI, U.; SORTINO, O.; COSENTINO, S. L.; PATANÈ, C. Seed yield and oil quality of perennial castor bean in a Mediterranean environment. *International Journal of Plant Production*. v. 9, p. 99-116, 2015. DOI: 10.22069/ijpp.2015.1871

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Safra 2018/2019, Sexto Levantamento. Brasília, v. 6, n. 6, p. 73 – 74. 2019.

FAO-Food and Agriculture Organization of United Nations. Food and agricultural commodities production. Disponível em: <<http://www.faostat.org>>. Acesso em: 04 de abril de 2019.

FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J. M.; VELASCO, L. Castor. In: **Technological Innovations in Major World Oil Crops, Volume 1**. Springer, New York, NY, 2012. p. 237-265.

FIOREZE, S. L.; LARA-FIOREZA, A. C. C.; PIVETTA, L. G.; RODRIGUES, J. D.; ZANOTTO, M. D. Características agronômicas da mamoneira afetadas pelo método de condução de plantas e densidade de semeadura. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 86-92, 2016.

LU, J.; SHI, Y.; YIN, X.; LIU, S.; WEN, D.; LI, W.; HE, X.; YANG, T. The genetic mechanism of sex type, a complex quantitative trait, in *Ricinus communis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 128, p. 590-598, 2019.

OLIVEIRA, I. J.; ZANOTTO, M. D. Eficiência da seleção recorrente para redução da estatura de plantas em mamoneira (*Ricinus communis* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, p. 1107-1112, 2008.

OSWALT, J. S.; RIEFF, J. M.; SEVERINO, L. S.; AULD, D. L.; BEDNARZ, C. W.; RITCHIE, G. L. Plant Height and Seed Yield of Castor (*Ricinus communis* L.) sprayed with growth retardants and harvest aid chemicals. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 272-277. 2014. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.07.006

PEREIRA, F. S.; TEIXEIRA, I. R.; PELÁ, A.; REIS, E. F.; SILVA, G. C.; TIMOSSO, P. C.; SILVA, A. G. Agronomic performance of kidney bean and castor bean cultivars in intercropping and monocropping systems under weed competition. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 7, p. 614-620, 2015.

PIVETTA, L. G.; ZANOTTO, M. D.; TOMAZ, C. A.; PIVETTA, L. A.; LARA-FIOREZE, A. C. C.; ZOZ, T. Avaliação de genótipos de mamona em diferentes níveis de adubação. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 2, n. 2, p. 9-18, 2015.

SAADAOU, E.; MARTÍN-GÓMEZ, J. J.; GHAZEL, N.; YAHIA, K. B.; TLILI, N.; CERVANTES, E. Genetic variation and seed yield in Tunisian castor bean (*Ricinus communis* L.). **Botanical Sciences**, v. 95, n. 2, p. 271-281, 2017.

SANTOS, R. F.; KOURI, J.; BARROS, M. A. L.; MARQUES, F. M.; FIRMINO, P. T.; REQUIÃO, L. E. G. Aspectos econômicos do agronegócio da mamona. In: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. **O agronegócio da mamona no Brasil**. 2. ed. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2007. p. 21-42.

SAVY FILHO, A. Melhoramento da mamona. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, 2005 p. 429-452.

SAVY FILHO, A.; AMORIM, E. P.; RAMOS, N. P.; MARTINS, A. L. M.; Cavichioli, J. C. IAC-2028: nova cultivar de mamona. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 3, p. 449-452, 2007.

SEVERINO, L. S.; AULD, D. L. A framework for the study of the growth and development of castor plant. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 25-38, 2013.

## DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE SUBAMOSTRAS DE PIMENTEIRAS (*Capsicum* spp.) CONSERVADAS EX SITU NO MARANHÃO

**Joanderson Marques Silva**

**Ivanayra da Silva Mendes**

**Gabriela Nunes da Piedade**

**Raquel Sobral da Silva**

**Alaide Silva de Castro**

**Allana Tereza Mesquita de Lima**

**Larissa Pinheiro Alves**

**Mayara Cardoso Araújo Lima**

**Ramile Vieira de Oliveira**

Universidade Federal do Maranhão – UFMA,  
Discentes do Centro de Ciências Agrárias e  
Ambientais – CCAA.

Chapadinha-MA

**Jardel Oliveira Santos**

Universidade Federal do Maranhão – UFMA,  
Centro de Ciências Agrárias e Ambientais –  
CCAA, Docente da Coordenação de Biologia.

Chapadinha-MA

**RESUMO:** A variabilidade genética das pimenteiras pode ser estimada a partir dos caracteres morfológicos ou botânicos; e no Brasil, esse caracter tem tido uso potencial em análises multivariadas e suas associações com dados de diferentes categorias do germoplasma de *Capsicum*. Desta forma, com a perspectiva de se obter informações sobre o germoplasma conservado *ex situ* no estado do Maranhão, objetivou-se estimar a variabilidade genética entre acessos de pimenteiras pertencentes a

“Coleção de *Capsicum* spp. do CCAA/UFMA”. Foram estudadas 21 subamostras cultivadas e ou comercializadas na microrregião de Chapadinha, MA, utilizando-se 24 descritores qualitativos. Dentre os descritores avaliados, apenas a cor e pubescência da folha e do caule, foram monomórficos, isto indica a existência de variabilidade genética entre os acessos, caracterizados e conservados *ex situ*, em relação aos demais 21 descritores avaliados. O método de Tocher reuniu os acessos em seis grupos de divergência genética. A caracterização possibilitou identificar acessos promissores para o desenvolvimento de cultivares, principalmente para pimenteiras ornamentais. A caracterização morfológica e a aplicação das técnicas multivariadas permitem estimar a variabilidade genética dos acessos de pimenteiras da Coleção de *Capsicum* spp. do CCAA/UFMA. A formação dos grupos de diversidade auxilia no direcionamento da conservação do germoplasma de *Capsicum* sp. do estado do Maranhão.

**PALAVRAS-CHAVE:** Análise Multivariada; *Capsicum* sp.; Germoplasma.

PHENOTYPICAL DIVERSITY OF PEPPER  
SAMPLES (*Capsicum* spp.) PRESERVED EX

**ABSTRACT:** Peppers diversity can be estimated with morphological or botanical traits. In order to subsidize the ex situ conservation of germoplasm in Maranhão State, the objective of this work was to study estimated genetic diversity between samples of the peppers belonging the “Coleção de *Capsicum* spp. do CCAA/UFMA”. Seeds from 21 samples of cultivated and comercialized peppers in the region the Chapadinha city were obtained from the germplasm bank. The samples were evaluated based on 24 qualitative descriptors. The only monomorphic descriptors were color and pubescent of leaves and pubescent of caule. The other 21 descriptors were useful for characterized the variability between ex situ samples. The Tocher’s method distinguished six groups based on the genetic diversity. The morphological characterization permitted the selection between samples for developing pepper cultivars, mainly ornamental. Morphological characterization and multivariate techniques enable the estimation of genetic diversity between the samples of pepper in the “Coleção de *Capsicum* spp. do CCAA/UFMA”. The composition of the diversity groups support the conservation of *Capsicum* germplasm in Maranhão estate.

**KEYWORDS:** *Capsicum*, sp.; Germplasm; Multivariate analysis.

## 1 | INTRODUÇÃO

As pimentas (*Capsicum* sp.) constituem parte valiosa do patrimônio da biodiversidade e são cultivadas, sobretudo pela variedade de tipos, tamanhos de frutos, cores, sabores e escalas de pungência (NEITZKE et al., 2008).

Segundo Moscone et al. (2007), o gênero *Capsicum*, que inclui pimentas e pimentões, possui 31 espécies já identificadas, sendo cinco delas cultivadas (*C. annum* e suas formas botânicas, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* e suas formas botânicas, e *C. pubescens*), e de grande importância econômica como alimento e especiaria. As demais espécies identificadas são classificadas como semidomesticadas e silvestres.

A manutenção da variabilidade genética pode ser desenvolvida por meio de informações obtidas a partir de acessos conservados em bancos de germoplasma, os quais devem ser caracterizados e avaliados a fim de se estimar a diversidade genética (NASCIMENTO, 2014). Os estudos colaboram para gerar informações úteis para preservação e uso do germoplasma, obter conhecimentos sobre a variabilidade existente, acrescer a eficiência dos trabalhos de melhoramento, além de possibilitar a identificação de possíveis duplicatas nos bancos (GELETA et al., 2005).

O uso potencial das análises multivariadas e suas associações, com dados de avaliações agronômicas e de caracterização botânica, têm sido bastante utilizado no germoplasma de *Capsicum* no Brasil (ULHOA, 2013). Büttow et al. (2010) realizaram a caracterização de 20 acessos de *C. annum* utilizando 36 descritores morfológicos envolvendo diferentes estádios. Medeiros (2012) e Mesquita (2015), com base em

descritores morfoagronômicos para o gênero *Capsicum* constataram que os caracteres de frutos são de maior variação para o estabelecimento dos grupos de divergência. Desta forma, podemos perceber a importância dessas análises em diferentes categorias de germoplasma dentro gênero *Capsicum*.

O Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Federal do Maranhão (CCAA/UFMA), localizado na cidade de Chapadinha, conta com uma coleção de pimentas *Capsicum* sp., composta por 100 acessos, conservando principalmente a biodiversidade das variedades e espécies de *Capsicum* regionais. Com a perspectiva de obter informações sobre o germoplasma conservado no estado do Maranhão, objetivou-se estimar a variabilidade genética entre acessos de pimenteiras pertencentes a “Coleção de *Capsicum* spp. do CCAA/UFMA”.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na área experimental do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais - CCAA, da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, município de Chapadinha – MA, situada a 03°44’30”S de latitude e 43°21’37”W de longitude e 105 m de altitude, no período de dezembro de 2015 a junho de 2016.

O material genético utilizado constou de 21 subamostras de pimentas cultivadas e ou comercializadas na microrregião de Chapadinha, MA pertencentes a “Coleção de *Capsicum* spp. do CCAA/UFMA” (Tabela 1).

A sementeira dos acessos foi feita em bandejas de poliestireno expandido de 128 células, preenchidas com o substrato comercial Tropstrato HT<sup>HORTALIÇAS</sup>. Aos 25 dias após a sementeira, quando as mudas apresentavam 5 folhas definitivas, foi realizado o transplante para vasos plásticos de 18 L de capacidade, contendo substrato constituído de terra vegetal (preta) e esterco caprino, na proporção de 4:1.

ACESSO	NOME COMUM	PROCEDÊNCIA
UFMA-16	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-17	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-18	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-21	Pimenta	Pov. Água Rica-MA
UFMA-25	Pimenta	Alegre-ES
UFMA-35	Pimenta	Alegre-ES
UFMA-54	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-55	Pimenta de Cheiro	Chapadinha-MA
UFMA-56	Morto Doméstico	Trizidela do Vale-MA
UFMA-57	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-58	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-59	Biquinho	Chapadinha-MA

UFMA-60	Pimenta de Cheiro	Chapadinha-MA
UFMA-62	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-63	Pimenta	Buriti-MA
UFMA-64	Pimenta	Buriti-MA
UFMA-65	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-66	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-67	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-68	Pimenta	Chapadinha-MA
UFMA-70	Pimenta	Valparaíso-GO

Tabela 1. Dados de passaporte das 21 subamostras pertencentes a “Coleção de *Capsicum* spp. do CCAA/UFMA”. Chapadinha, MA, 2016

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Cada repetição foi constituída por uma planta. A adubação e os demais tratamentos culturais foram feitos conforme as recomendações para a cultura (FILGUEIRA, 2008). Para a caracterização dos frutos foram realizadas quatro colheitas.

A caracterização morfológica baseou-se em descritores para *Capsicum* estabelecidos pelo *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI, 1995), atual *Bioversity*, utilizando-se 24 descritores qualitativos: Cor do caule - **CC** (1 = verde; 2 = verde com estrias roxas; 3 = roxo e 4 = outro); Presença de antocianina no caule - **PA** (1 = verde; 3 = roxo-claro; 5 = roxo; 7 = roxo-escuro e 8 = ausência de antocianina); Formato do caule - **FC** (1 = cilíndrico; 2 = angular e 3 = achatado); Pubescência do caule - **PC** (3 = escassa; 5 = intermediária e 7 = densa); Hábito de crescimento da planta - **HCP** (3 = prostrado; 5 = intermediário; 7 = ereto e 9 = outro); Densidade de folhas - **DF** (3 = escassa; 5 = intermediária e 7 = densa); Cor da folha - **CF** (1 = amarelo; 2 = verde-claro; 3 = verde; 4 = verde-escuro; 5 = roxo-claro; 6 = roxo; 7 = variegada e 8 = outro); Forma da folha - **FF** (1 = deltóide; 2 = oval e 3 = lanceolada); Margem da folha - **MF** (1 = inteira; 2 = ondular; 3 = ciliada); Pubescência da folha - **PF** (3 = escassa; 5 = intermediária e 7 = densa); Posição das flores - **POF** (3 = pendente; 5 = intermediária; 7 = ereta); Número de flores por axila - **NFA** (1 = uma; 2 = duas; 3 = três ou mais); Cor da corola - **CORC** (1 = branca; 2 = amarelo-clara; 3 = amarela; 4 = amarelo-esverdeada; 5 = roxa com base branca; 6 = branca com base roxa; 7 = branca com margem roxa; 8 = roxa e 9 = outra); Mancha na coloração da corola - **MCC** (1 = branca; 2 = amarelada; 3 = verde-amarelada; 4 = verde; 5 = roxa e 6 = sem mancha); Formato da corola - **FCOL** (1 = rotada; 2 = campanulada e 3 = outra); Cor da antera - **CA** (1 = branca; 2 = amarela; 3 = azul pálido; 4 = azul; 5 = roxa e 6 = outra); Pigmentação do cálice - **PIGC** (0 = ausente e 1 = presente); Coloração do fruto no estágio intermediário - **CFI** (1 = branco; 2 = amarelo; 3 = verde; 4 = laranja; 5 = roxo; 6 = roxo escuro e 7 = outra); Coloração do fruto no estágio maduro - **CFM** (1 = branco; 2 = amarelo-limão; 3 = amarelo-laranja pálido; 4 = amarelo-laranja; 5 = laranja-pálido; 6 = laranja; 7 = vermelho-claro; 8 = vermelho; 9 = vermelho-escuro; 10 = roxo; 11 =

marrom; 12 = preto e 13 = outro); Formato do fruto - **FORFRUT** (1 = alongado; 2= quase redondo, 3 = triangular; 4 = campanulado; 5 = retangular e 6 = outro); Formato do fruto no anexo do pedicelo - **FFAP** (1 = agudo; 2 = obtuso; 3 = truncado; 4 = cordado e 5 = lobato); Formato da ponta do fruto - **FPF** (1 = pontiagudo; 2 = truncado; 3 = afundado; 4 = afundado com ponta e 5 = outro); Corrugação transversal do fruto - **CTF** (3 = levemente corrugado; 5 = intermediário e 7 = corrugado); Número de lóculos - **NL** (Determinado com base em dez frutos cortados transversalmente).

A divergência genética entre os acessos foi estimada utilizando análise multivariada, a partir da aplicação do método de agrupamento de otimização de Tocher com base na matriz de dissimilaridades, utilizando a moda de cada variável por acesso. As análises foram realizadas com o auxílio do programa GENES (CRUZ, 2007).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização Morfológica

Dos 24 descritores avaliados, apenas cor e pubescência da folha e do caule, foram monomórficos. Assim, os 21 acessos de pimentas foram caracterizados por folhas e caules verdes e pubescência escassa com ausência de antocianina, exceto para UFMA-58. Isto indica a existência de variabilidade genética entre os acessos caracterizados, em relação aos demais descritores analisados.

Dos acessos avaliados, 57,14% apresentaram formato de caule cilíndrico e 42,86% angular. O hábito de crescimento das plantas variou entre ereto (80,95%) e intermediário (19,05%), a densidade de folhas entre dispersa (14,28%), intermediária (30,10%) e densa (47,62%). Segundo Neitzke et al. (2010), a densidade de folhas está diretamente ligada à estética da planta, sendo um dos descritores fenotípicos mais importantes, quando se visa a produção para o mercado ornamental. Em relação ao formato das folhas, 28,57% apresentaram-se deltóide, 47,62% oval e 23,81% lanceolada, com margem inteira (61,90%) e ondulada (38,10%) (Figura 1).

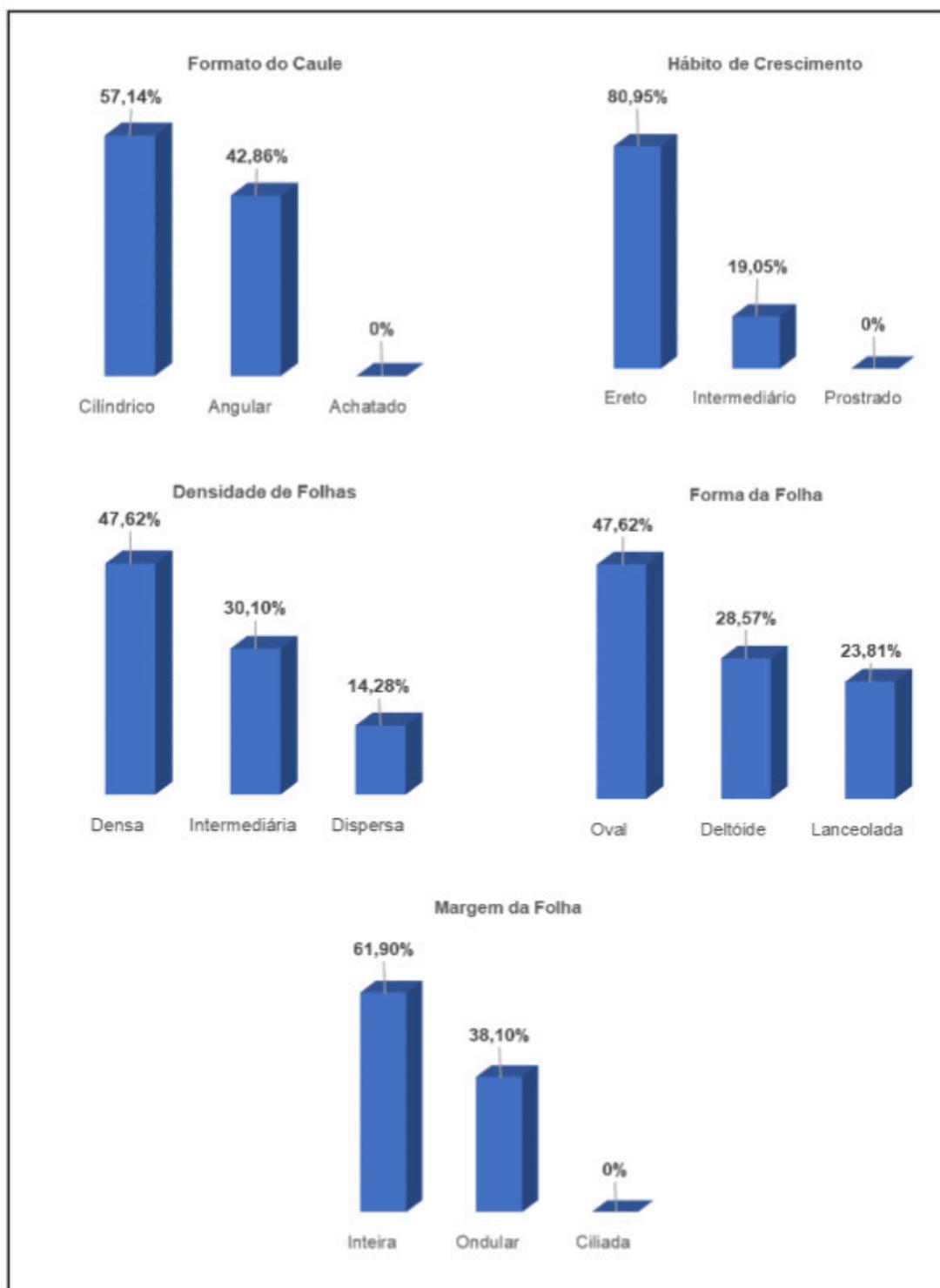


Figura 1. Histograma da frequência dos descritores: formato do caule, hábito de crescimento das plantas, densidade de folhas, forma da folha e margem da folha, avaliados em 21 acessos de pimentas da “Coleção de pimentas (*Capsicum* spp.) do CCAA/UFMA”. Chapadinha, MA, 2016.

A cor da corola variou entre branca (57,14%) e amarelo esverdeada (42,86%), com a presença de mancha apenas no acesso UFMA-64. A cor da antera foi predominantemente roxa (90,48%) sendo que apenas os acessos UFMA-70 e UFMA-64, apresentaram antera de coloração branca e amarela, respectivamente (Figuras 2 e 3).



Figura 2. Cor da corola (A e B), presença de mancha na corola no acesso UFMA-64 (C) e cor da antera (AB, C e D), observada entre os 21 acessos da “Coleção de pimentas (*Capsicum* spp.) do CCAA/UFMA”. Chapadinha, MA, 2016.

As flores foram encontradas em posição intermediária (38,10%) e ereta (61,90%). O mesmo percentual se aplicou à forma da corola em campanulada e rotada, respectivamente (Figura 3). A posição ereta das flores, de acordo com Nascimento (2013), produzirá frutos nesta mesma posição, característica que atende as exigências do mercado de pimentas ornamentais.

No estágio intermediário do fruto, a maioria dos acessos produziu frutos de coloração laranja (61,90%). Já no estágio maduro, 80,95% produziram frutos de cor vermelha. Pino et al. (2007) ao analisarem a relação da cor do fruto com a pungência, verificaram que os frutos de coloração laranja apresentaram maior teor de capsaicinoides.

Foram observados todos os formatos de frutos propostos pelo IPGRI, onde 23,81% dos acessos produziram frutos alongados, 14,29% quase redondo, 19,05% triangular, 4,76% campanulado e 38,09% retangular (Figura 4). Costa et al. (2015), avaliando 40 acessos de pimentas, também observaram todos os formatos de frutos existentes.

O formato do fruto no anexo do pedicelo variou entre truncado (52,38%), obtuso (33,33%) e cordado (14,29%), sendo o formato da ponta dos mesmos, pontiagudo (42,86%), truncado (19,05%), afundado (33,33%) e afundado com ponta (4,76%). O número de lóculos variou entre um (14,29%), dois (28,57%), três (47,62%) e quatro (9,52%). A maioria dos acessos (66,67%) apresentaram enrugamento da seção transversal do fruto levemente corrugado (Figura 4).

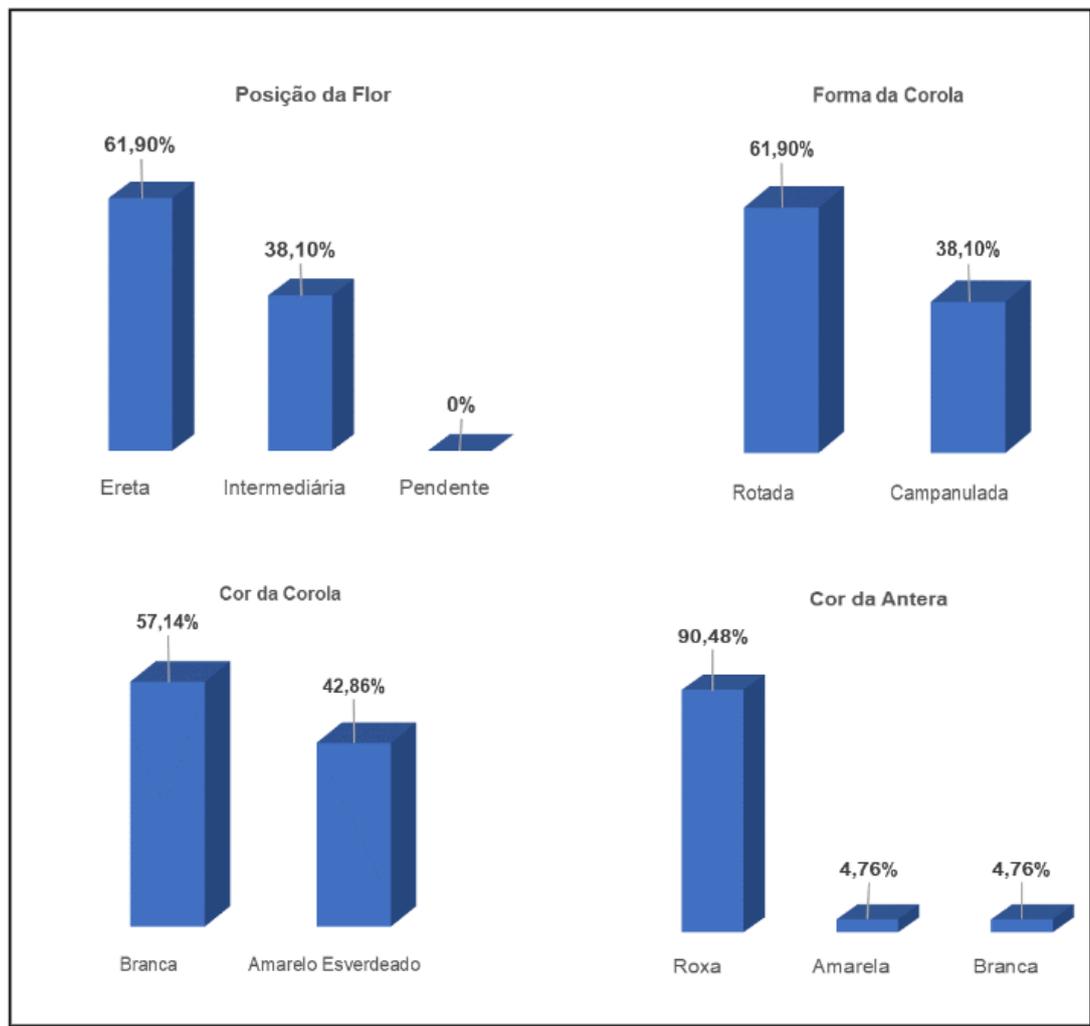


Figura 3. Histograma da frequência dos descritores: posição da flor, forma da corola, cor da corola e cor da antera, avaliados em 21 acessos de pimentas da “Coleção de pimentas (*Capsicum* spp.) do CCAA/UFMA”. Chapadinha, MA, 2016.

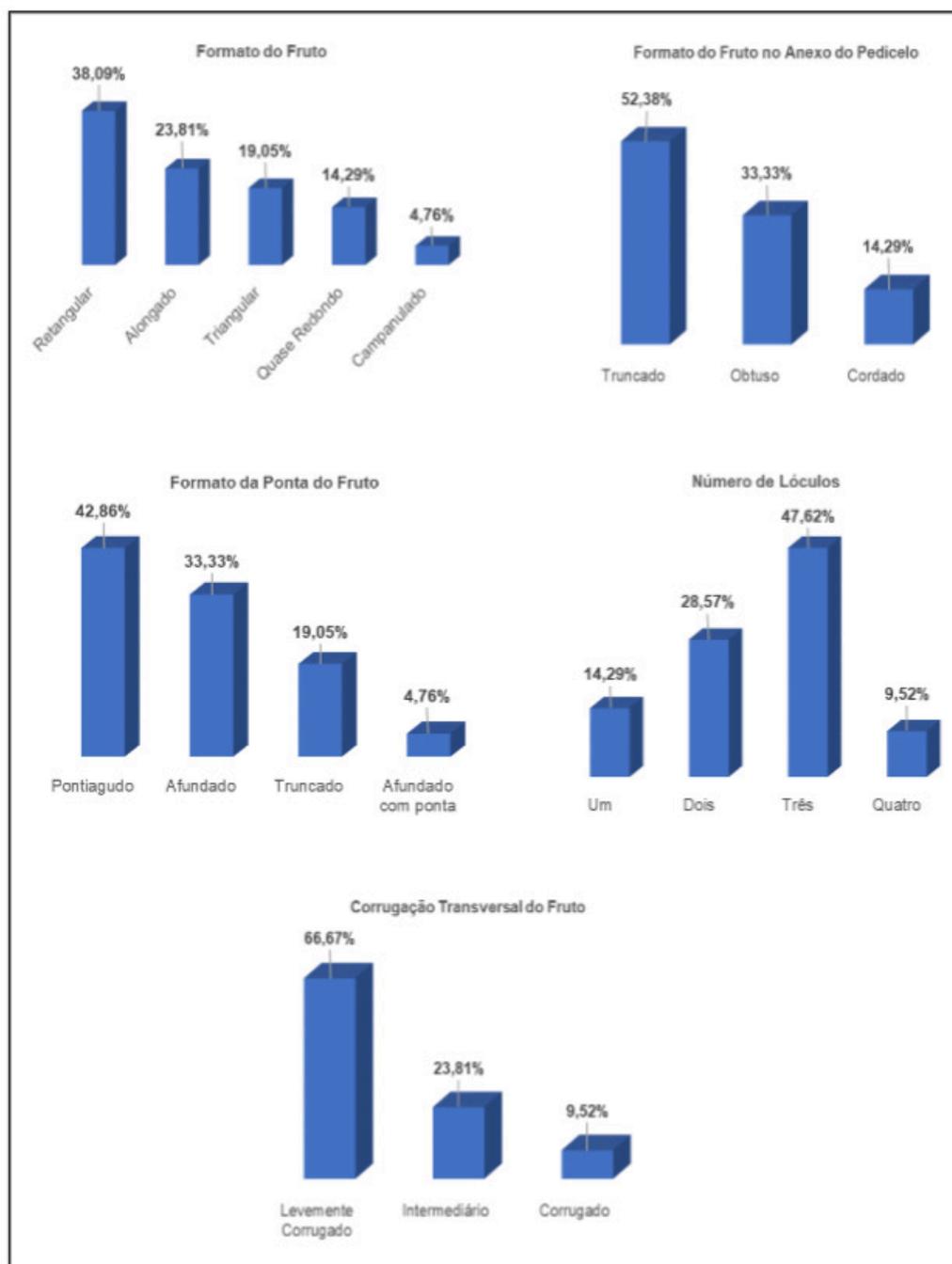


Figura 4. Histograma da frequência dos descritores: formato do fruto, formato do fruto no anexo do pedicelo, formato da ponta do fruto, número de lóculos e corrugação transversal do fruto, avaliados em 21 acessos de pimentas da “Coleção de pimentas (*Capsicum* spp.) do CCAA/UFMA”. Chapadinha, MA, 2016.

## 3.2 Análise de Agrupamento

### 3.2.1 Método de Tocher

Com base na matriz de dissimilaridade entre os 24 descritores qualitativos, o método de otimização de Tocher possibilitou a formação de seis grupos de divergência (Tabela 2). Segundo Vasconcelos *et al.* (2007), este método apresenta a distância média dentro de cada grupo sempre menor que a distância média entre os grupos, dessa forma, os acessos pertencentes a um mesmo grupo serão mais homogêneos do que os de outros grupos. Tal particularidade foi observada neste trabalho.

GRUPOS	ACESSOS
I	UFMA-25, UFMA-55, UFMA-63, UFMA-65, UFMA-35, UFMA-60, UFMA-66, UFMA-68
II	UFMA-17, UFMA-56, UFMA-16, UFMA-62, UFMA-18, UFMA-59, UFMA-67
III	UFMA-21, UFMA-57, UFMA-70
IV	UFMA-54
V	UFMA-58
VI	UFMA-64

Tabela 2. Agrupamento dos 21 acessos avaliados pertencentes a “Coleção de *Capsicum* spp. do CCAA/UFMA” com base em 24 descritores qualitativos, pelo método de otimização de Tocher. Chapadinha, MA, 2016.

O grupo I reuniu a maior quantidade de acessos: UFMA-25, UFMA-55, UFMA-63, UFMA-65, UFMA-35, UFMA-60, UFMA-66 e UFMA-68. Todos esses acessos apresentaram caule e folhas de cor verde sem a presença de antocianina, com a pubescência de folhas escassa. Sendo a maioria com caule de formato angular e densidade de folhas intermediária com formato oval e margem inteira. O hábito de crescimento de planta ereto prevaleceu entre a maioria dos acessos, assim também como a cor do fruto laranja no estágio intermediário e vermelha no maduro.

O grupo II abrangeu os acessos UFMA-17, UFMA-56, UFMA-16, UFMA-62, UFMA-18, UFMA-59 e UFMA-67. Estes caracterizaram-se por apresentar formato de folha variando entre deltóide e lanceolada, com flores em posição ereta, cor da antera roxa, e cor da corola predominante amarelo-esverdeada. Os frutos dos acessos apresentaram coloração variando entre marrom e laranja no estágio intermediário, sendo todos vermelhos quando maduros. O formato da ponta de todos os frutos foi pontiagudo, a maioria com formato alongado e corrugação transversal levemente corrugado, exceto UFMA-62, com corrugação transversal intermediária.

A forma e a coloração dos frutos maduros de pimentas são características qualitativas relevantes para seleção de variedades que irão compor programas de melhoramento destinados a produção de páprica, pois dando-se ênfase aos frutos com maior teor de pigmentos vermelhos, a coloração do pó será mais intensa (LEITE, 2014).

Os acessos UFMA-21, UFMA-57 e UFMA-70 que compõem o grupo III, apresentaram formato de folha oval com margem ondular e posição das flores ereta, cor da corola amarelo-esverdeado e antera roxa, com exceção do acesso UFMA-70 que apresentou antera de coloração branca. Apenas este acesso apresentou a coloração do fruto maduro vermelha e laranja no estágio intermediário, os demais apresentaram frutos de cor verde no estágio intermediário e quando maduros, laranja. Os acessos UFMA-21 e UFMA-57 apresentaram frutos com formato quase redondo, e UFMA-70 formato retangular.

No grupo IV, o acesso UFMA-54 apresentou três flores por axila em posição intermediária, corola de cor branca e antera roxa, frutos imaturos de cor laranja e

vermelhos quando maduros, com três lóculos. Diferentemente de todos os outros acessos, apresentou forma de fruto campanulado, com o formato da ponta do fruto afundado com ponta, o que justifica o isolamento.

Além disso este acesso foi caracterizado por hábito de crescimento ereto e folhas densas com formato deltoide. Ambas características permitem a seleção de genótipos visando a facilidade do manejo em campo, uma vez que folhas muito adensadas podem dificultar o arejamento das plantas, favorecendo o desenvolvimento de fungos, e plantas com hábito de crescimento ereto facilitam a colheita (HEIDEN *et al.*, 2007).

O grupo V é composto pelo acesso UFMA-58, o único acesso que apresentou antocianina no caule, com frutos no estágio intermediário de coloração verde com roxo e quando maduros, laranja com roxo. Este acesso apresentou plantas com hábito de crescimento ereto e folhas escassas, com duas flores por axila em posição intermediária e corola de cor branca e frutos com formato quase redondo e três lóculos.

O acesso UFMA-64, ficou alocado no grupo VI, para o qual foi observado corola de cor branca, com a presença de manchas e antera de cor amarela, o que justifica seu isolamento dos demais acessos. Este acesso apresentou hábito de crescimento ereto, com densidade de folhas intermediária, com apenas uma flor por axila e frutos com formato alongado e ponta pontiaguda.

A utilização de descritores que envolvem as fases reprodutivas, flores e frutos são importantes para separação botânica a nível de espécie entre as pimenteiras (*Capsicum*), conforme observa-se no trabalho de Sudré *et al.* (2006), que ao estudarem 59 acessos de *Capsicum* da Coleção de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, estabelecem a formação de oito grupos de diversidade pelo método de otimização de Tocher, os quais possibilitaram diferenciar as espécies *C. annum* var. *annuum*, *C. annum* var. *gabriusculum*, *C. chinense* e *C. pubescens*.

#### 4 | CONCLUSÃO

A caracterização morfológica e a aplicação das técnicas multivariadas permitem estimar a variabilidade genética dos acessos de pimenteiras da Coleção de *Capsicum* spp. do CCAA/UFMA.

A formação dos grupos de diversidade auxilia no direcionamento da conservação do germoplasma de *Capsicum* sp. do estado do Maranhão, bem como fornece suporte para futuros trabalhos de melhoramento com o gênero.

#### 5 | AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pelo auxílio financeiro ao projeto e concessão de bolsas.

## REFERÊNCIAS

- BÜTTOW, M. V.; BARBIERI, R. L.; NEITZKE, R. S.; HEIDEN, G.; CARVALHO, F. I. F. Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões da Embrapa Clima Temperado. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 40, n. 6, p. 1264-1269, 2010.
- COSTA, L. V. et al. Caracterização de acessos de pimentas do Amazonas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 290-298, 2015.
- CRUZ, C. D. **Programa genes**: versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2007.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3 ed. Viçosa: UFV, 2008, 421p.
- GELETA, L. F.; LABUSCHAGNE, M. T.; VILJOEN, C. D. Genetic variability in pepper (*Capsicum annuum* L.) estimated by morphological data and amplified fragment length polymorphism markers. **Biodiver. Conserv.** v. 14, p. 2361-2375. 2005.
- HEIDEN, G. et al. Pimentas e pimentões do sul do Brasil: variedades crioulas mantidas pela Embrapa Clima Temperado. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 1, p. 841-844, 2007.
- IPGRI. (1995). **Descriptors for Capsicum (Capsicum spp.)**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 49 p.
- LEITE, P. S. da S. **Variabilidade intraespecífica para caracteres morfológicos, agrônômicos e moleculares entre acessos de Capsicum baccatum var. pendulum**. 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- MEDEIROS, A.M. **Capacidade combinatória e potencial agrônômico de híbridos de Capsicum baccatum var. pendulum nas condições da região Norte Fluminense**. 2012. 63f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes, 2012.
- MESQUITA, J. C. P. **Caracterização morfológica e divergência genética em populações F3 de pimenteiras ornamentais (Capsicum annum L.)**. 2015. 80 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Paraíba, Areia, 2015.
- MOSCONE, E. A. et al. The Evolution of Chili Peppers (*Capsicum* – Solanaceae): a Cytogenetic Perspective. VI International Solanaceae Conference. **Acta Hort**, v. 745, p. 138-139, 2007.
- NASCIMENTO, M. F. **Diversidade genética e estudo de geração em características morfológicas de pimenteiras ornamentais (Capsicum annum)**. 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- NASCIMENTO, N. F. F. **Heterose e diversidade genética em híbridos intra e interespecífico de pimenteiras ornamentais (Capsicum spp.)**. 2013. 105vf. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2013.
- NEITZKE, R. S. et al. Divergência genética entre variedades locais de *Capsicum baccatum* utilizando caracteres multicategóricos. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 20, n. 3, p. 249-255, 2008.
- NEITZKE, R. S. Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 47-53, 2010.
- PINO, J. et al. Characterization of total capsaicinoids, color and volatile compounds of habanero chili

pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivars in Yucatan. **Food Chemistry**, Barking, v. 104, n. 4, p. 1682-1686, 2007.

SUDRÉ, C. P. et al. Variáveis multicatóricas na determinação da divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 88-93, 2006.

ULHOA, A. B. **Caracterização morfológica e molecular de linhagens de pimenta do tipo jalapeño amarelo (*Capsicum annuum* var. *annuum*)**. 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2013.

VASCONCELOS, E. S. de et al. Método alternativo para análise de agrupamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, Brasília, 2007.

## DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DO BANCO DE GERMOPLASMA DE MACIEIRA DA EPAGRI

### **Filipe Schmidt Schuh**

Universidade Estadual de Maringá (UEM),  
Programa de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento Vegetal (PGM), Maringá – Paraná.

### **Pedro Soares Vidigal Filho**

Universidade Estadual de Maringá (UEM),  
Programa de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento Vegetal (PGM), Maringá – Paraná.

### **Marcus Vinicius Kvistchal**

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão  
Rural de Santa Catarina (Epagri) – Estação  
Experimental de Caçador (EECd), Caçador -  
Santa Catarina.

### **Gentil Carneiro Gabardo**

Universidade do Estado de Santa Catarina  
(UDESC), Centro Agro Veterinário, (CAV),  
Programa de Pós-graduação em Produção  
Vegetal, Lages – Santa Catarina.

### **Danielle Caroline Manenti**

Universidade Estadual de Maringá (UEM),  
Programa de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento Vegetal (PGM), Maringá – Paraná.

### **Giseli Valentini**

Universidade Estadual de Maringá (UEM),  
Programa de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento Vegetal (PGM), Maringá – Paraná.

**RESUMO:** Amacieira (*Malus x domestica* Borkh.) apresenta naturalmente ampla variabilidade genética. Contudo, o sistema produtivo da macieira restringe cada vez mais o número

de cultivares utilizadas, o que pode incorrer no risco da vulnerabilidade genética. Além disso, a conservação da diversidade genética é de suma importância para a sustentabilidade dos programas de melhoramento genético da cultura. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade genética entre 115 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Maçã da Epagri (EECd) por meio de 66 descritores morfo-agronômicos. A coleta dos dados se deu nos anos de 2014 e 2015 na Epagri, Estação Experimental da Caçador, Santa Catarina. A matriz de dissimilaridade genética foi estimada pelo algoritmo de Gower, e para análise de agrupamento foi utilizado o método de UPGMA. Ampla variabilidade genética pôde ser observada pelos resultados da análise de dissimilaridade, a qual variou de 0,26 até 0,72, sendo que a combinação mais similar foi entre os acessos *M. aldenhamensis* e *M. eley*, e a mais dissimilar, entre os acessos 'Princesa' e 'Pome 19'. No dendrograma pôde-se observar a formação de 16 grupos distintos. As cultivares Princesa e Co-op 16 foram alocadas em grupos isolados, demonstrando que essas cultivares apresentam maior diversidade genética em relação aos demais acessos avaliados. Todas as cultivares silvestres foram alocadas no mesmo grupo, como esperado. As combinações de genótipos mais promissoras para o uso em programas de melhoramento genético foram as

combinações híbridas formadas entre os indivíduos dos grupos 1, combinados com os indivíduos dos grupos 11, 12, 13, 15 e 16.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Malus* spp.; dissimilaridade; divergência; Gower.

## GENETIC DIVERSITY AMONG APPLE ACCESSIONS FROM GERMPLASM BANK OF EPAGRI

**ABSTRACT:** Apple tree (*Malus x domestica* Borkh.) shows naturally broad genetic variability. However, the apple tree grown system have been restricted, leading to a few number of cultivars being used, which may lead to risks of genetic vulnerability. Moreover, the conservation of the genetic diversity has a fundamental importance for the success of the apple breeding programs. Based on this, the present work aims to evaluate the genetic diversity between 115 apple accessions from the Apple Germplasm Bank of the Epagri (EECd), through 66 morpho-agronomic characters. Achievement data was in the years of 2014 and 2015 in the Epagri Experimental Station, located in Caçador, Santa Catarina state. The genetic dissimilarity matrices was estimated by Gower Algorithm, and for cluster analysis, was used UPGMA method. Wide genetic variability was observed by dissimilarity calculation, that ranged from 0.26 to 0.72, with average of 0.52. The most similar combination was between the accessions *M. aldenhamensis* and *M. eley*, and the most dissimilar was between the accessions 'Princesa' and 'Pome 19'. Analysis of the dendrogram allowed to observe the existence of 16 distinct groups. The cultivars Princesa and Co-op 16 were allocated in isolated groups, demonstrating these cultivars show genetic diversity higher than the other accessions evaluated. The wild cultivars were allocated into the same group, as expected. The most promising genotype combinations for use in breeding programs were the hybrid combinations between the individuals in group 1, combined with the individuals in groups 11, 12, 13, 15 and 16

**KEYWORDS:** *Malus* spp.; dissimilarity; divergence; Gower.

### 1 | INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus x domestica* Borkh.) é considerada uma das fruteiras de clima temperado de maior importância mundial (VELASCO et al., 2010). Essa cultura tem como centro de origem a região que se estende desde o Cáucaso até o Oeste da China (MUZHER et al., 2007), e atualmente encontra-se distribuída por todos os cinco continentes (BLEICHER, 2006). No Brasil, o maior potencial produtivo se encontra na região sul, sendo os estados do Rio Grande de Sul e Santa Catarina os produtores de maior relevância, somando aproximadamente 1,2 milhões de toneladas da fruta produzidas anualmente (CEPA, 2018).

Embora o gênero Rosaceae possua ampla variabilidade genética natural (MUZHER et al., 2007), a adoção de um número reduzido de cultivares pelo sistema produtivo têm levado ao estreitamento da base genética da cultura da macieira

(HOCKANSON et al., 1997). No Brasil, por exemplo, 95% dos pomares comerciais são compostos pelas cultivares Gala e Fuji e suas mutações, que em geral afetam a coloração da epiderme dos frutos (POMMER e BARBOSA, 2009; MELLO, 2006). Além disso, a maioria dessas cultivares possui susceptibilidade às principais doenças que afetam a cultura e não são plenamente adaptadas às principais regiões produtoras de maçã do país (PETRI et al., 1996; BONETI et al., 2006).

O estreitamento da base genética apresenta-se como um aspecto problemático para a cultura da macieira, visto que incorre em vulnerabilidade genética e potencializa a suscetibilidade das culturas ao surgimento de novas raças de patógenos e insetos (ROMAY et al., 2011). Ademais, a baixa variabilidade genética disponível é um aspecto que pode limitar ganhos genéticos em programas de melhoramento genético (HYTEN et al., 2006).

A variabilidade genética das espécies vegetais pode ser acessada a partir dos Recursos Genéticos Vegetais disponíveis principalmente nos centros de origem e nos bancos de germoplasma (LOPES e CARVALHO, 2008). A caracterização adequada desse germoplasma pode proporcionar ganhos consideráveis aos programas de melhoramento e também potencializar seu uso direto pelos agricultores (COELHO et al., 2007). O processamento das informações obtidas a partir da caracterização pode ser realizado de diversas maneiras, sendo a avaliação da diversidade genética uma das técnicas que fornece importantes informações para o conhecimento da variabilidade genética entre os acessos. Tal processo proporciona um melhor gerenciamento do banco de germoplasma e facilita a escolha dos genitores, que ao serem cruzados, possibilitam maior efeito heterótico nas progênies, aumentando as chances de obtenção de genótipos superiores em gerações segregantes (SUDRÉ et al., 2005; BUZAR et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade genética de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Macieira mantido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) a partir de informações de caracterização de descritores morfo-agronômicos, estimar a divergência genética entre os genótipos e indicar as combinações híbridas de maior potencial para uso no programa de melhoramento da macieira.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

No estudo foram avaliados 115 acessos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Macieira (BAG – Maçã) da Epagri (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), localizado na Estação Experimental de Caçador (EECd), às coordenadas geográficas 26° 49' 07" Sul, 50° 59' 30" Oeste, e altitude média de 950 m (MARCUIZZO et al., 2009). A precipitação média anual da região é de 1.280 mm, com temperatura média anual de 16,2 °C, temperatura média mínima de 4,6 °C e temperatura média máxima de 29,3 °C (MATTOS et al., 2007). A média

histórica de acúmulo de frio anual é de 557 Unidades de Frio (Método Carolina do Norte modificado), apresentando uma variação de 360 a 900 horas com temperatura abaixo de 7,2 °C (PETRI et al., 1996).

O BAG-Maçã é mantido na forma de coleção ativa de germoplasma à campo, cujos acessos são representados por duas plantas adultas, enxertadas sobre o porta-enxerto MM.106. As plantas são completamente podadas anualmente, a fim de garantir a produção de material de propagação. No entanto, para execução deste estudo, adotou-se não realizar poda em alguns ramos de ambas as plantas, com intuito de promover florescimento e frutificação. Os tratamentos fitossanitários e a rotina de nutrição mineral do BAG-Maçã foram realizados conforme recomendações básicas para a cultura da macieira (EPAGRI, 2006). O controle de doenças teve como finalidade evitar morte de plantas por incidência severa de doenças atribuídas à cultura.

Um total de 89 acessos, dentre os 115 acessos estudados, foram selecionados pela completa caracterização dos mesmos, ou seja, para os quais foi possível preencher os dados de todos os descritores utilizados. Os outros 26 acessos foram selecionados devido a atributos de resistência genética à sarna da macieira (*Venturia inaequalis*) e à mancha foliar de glomerella (*Colletotrichum* spp.), como descritos por Furlan et al. (2010).

A caracterização morfo-agronômica dos acessos de maçã através de 66 descritores morfo-agronômicos foi realizada durante os anos de 2015 e 2016, sendo 57 descritores atribuídos para a proteção de cultivares de macieira no Brasil (MAPA, 2013), e 9 descritores adicionais de interesse para o programa de melhoramento genético da macieira da Epagri.

Os descritores do MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) estão divididos em sete grupos de características relacionados à flores, folhas, estípulas, pecíolos, ramos, gemas e frutos, sendo que, cada grupo concentra um número diferente de descritores. Adicionalmente, foram realizadas avaliações de cor de fruto (cor de epiderme e cor de fundo) com base na cartilha de cores da Royal Horticultural Society (RHS, 2007).

Os descritores relacionados aos ramos foram avaliados durante o período de maio a agosto e a avaliação fenológica e floral foi feita durante o período de julho a novembro cada ano de avaliação. As características relacionadas às folhas e aos sintomas visuais de doenças foram realizadas durante todo período vegetativo, compreendido desde o início da brotação, até a senescência das folhas. Já para a descrição dos frutos, procedeu-se a colheita dos mesmos durante o período que se estendeu de janeiro a maio de cada ano de avaliação.

Os dados obtidos a partir dos 66 descritores morfo-agronômicos avaliados nos 115 acessos de maçã foram categorizados em quantitativos, qualitativos ordinais, qualitativos nominais e binários, de acordo com cada característica em questão e, então, utilizados na estimação da divergência genética.

Para o cálculo das distâncias genéticas foi utilizado método baseado no algoritmo

de Gower (GOWER, 1971), tendo em vista os diferentes tipos de variáveis utilizados na caracterização. As estimativas de dissimilaridade obtidas com base no algoritmo de Gower foram calculadas pela seguinte expressão:

$$d_{ij} = 1 - [\sum (W_{ijk} \cdot S_{ijk}) / \sum (W_{ijk})]$$

Onde:  $K$  = número de variáveis ( $k = 1, 2, \dots, p$ );  $i$  e  $j$  = dois indivíduos que representem um acesso;  $W_{ijk}$  = peso dado à comparação  $ijk$ , atribuindo valor **1** para comparações válidas e valor **0** para comparações inválidas (quando o valor da variável está ausente em um ou ambos indivíduos);  $S_{ijk}$  = contribuição da variável  $k$  na similaridade entre os indivíduos  $i$  e  $j$ , com valores entre **0** e **1**. Para uma variável qualitativa (nominal), se o valor da variável  $k$  é o mesmo para ambos os indivíduos,  $i$  e  $j$ , então  $S_{ijk} = 1$ , caso contrário, é igual a **0**; para uma variável quantitativa (contínua)  $S_{ijk} = 1 - |x_{ik} - x_{jk}| / R_k$  onde  $x_{ik}$  e  $x_{jk}$  são os valores da variável  $k$  para os indivíduos  $i$  e  $j$ , respectivamente, e  $R_k$  é o intervalo (valor máximo subtraído do valor mínimo), da variável  $k$  na amostra. A divisão por  $R_k$  elimina as diferenças entre escalas das variáveis, produzindo um valor dentro do intervalo **[0, 1]** e pesos iguais.

Para análise de agrupamento foi utilizado o método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (CRUZ e CARNEIRO, 2006), tendo como base a matriz de dissimilaridade estimada pelo algoritmo de Gower. Todas as análises, incluindo a construção do dendrograma, foram realizadas utilizando-se o pacote “Cluster” (MAECHLER et al., 2015) disponibilizado para o programa computacional estatístico ‘R’ (R CORE TEAM, 2015).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo da diversidade genética, realizado para os 115 acessos de macieira do banco de germoplasma da Epagri (BAG-Maçã), calculadas pelo algoritmo de “Gower” (GOWER, 1971), resultou em estimativas de dissimilaridade que variaram de 0,26 a 0,72 (Tabela 1), com dissimilaridade média observada de 52,9 %. Em relação ao agrupamento dos acessos pelo método de UPGMA, estabelecendo um ponto de corte ao nível de dissimilaridade de 52,0, o qual julgou-se mais conveniente tendo em vista a conformação dos grupos originados, pode-se observar a formação de 16 distintos grupos com diversidade entre os grupos variando de 53 a 62% conforme o dendrograma gerado (Figura 1).

A combinação geneticamente mais próxima, com base nos marcadores morfológicos, envolveu os acessos ‘*M. aldenhamensis*’ e ‘*M. eley*’, ambos de origem silvestre, que possuem diversas características similares, culminando em muitas coincidências de classes e, portanto, resultando na baixa dissimilaridade apresentada. Este fato também foi recíproco para outras cultivares silvestres e também para ‘Pome

28', o que contribuiu para o agrupamento de todos esses acessos no Grupo 14 (Figura 1).

Entre as 20 combinações mais similares, o acesso 'D1R103T245' foi o mais frequente, sendo geneticamente próximo aos acessos 'Belle de Boskoop', 'Jersey Mac', 'Empire', 'Baronesa', 'D1R63T94' e 'Pome 20' (Tabela 1). O acesso 'D1R103T245' foi introduzido no BAG-Maça Epagri a partir dos EUA em 1979, e se destaca pela resistência à mancha foliar de *glomerella* (FURLAN et al., 2010) e pela resistência à sarna da macieira.

O índice de dissimilaridade genética de '0,33' apresentado entre acessos 'Lisgala' e 'Ozark Gold' (Tabela 1) possivelmente está relacionado com sua ancestralidade comum, visto que o acesso Lisgala é uma mutação somática da cultivar Gala (DENARDI et al., 1997). As cultivares Gala e 'Ozark Gold', por sua vez, possuem a cultivar Golden Delicious como genitor comum. Segundo Zhang et al. (2012) a maioria dos genitores utilizados nos programas de melhoramento de maçã nos últimos anos, focou-se em uma estreita base genética, frequentemente envolvendo cruzamentos entre cultivares comercialmente populares.

Corroborando com isso, pode-se observar que o maior grupo (Grupo 1) apresentado no dendrograma da Figura 1, contém diversas cultivares descendentes de Golden Delicious, como é o caso dos acessos já mencionados 'Gala', 'Lisgala' e 'Ozark Gold', e de 'Jonatham', como 'Florina' e 'Priam'. Apesar de não estar entre as 20 combinações mais similares, a cultivar Wilmuta também se mostrou muito próxima geneticamente da cultivar Gala no dendrograma, contudo a genealogia dessa cultivar não é conhecida. Sugere-se que talvez esse acesso seja um clone de Gala, que foi introduzido a partir da Holanda pela Epagri no início dos anos 1990.

Sabe-se que o uso de genótipos aparentados em programas de melhoramento é depreciativo para o máximo aproveitamento da heterose nas progênes (BARBIERI et al, 2005). A exemplo disto, Hauagge e Bruckner (2002) citam que, em cruzamentos endógamos, como os envolvendo 'Golden Delicious' x 'Anna', a grande maioria da população resultante tem vigor suficiente para atingir a fase adulta, porém 20% dessas plantas seriam excessivamente fracas para produzir frutos. Por isso, não se recomenda a utilização dos acessos deste grupo como genitores, ou mesmo o intercruzamento entre elas, em programas de melhoramento para o desenvolvimento de novas cultivares.

A combinação mais dissimilar envolveu os genótipos 'Princesa' e 'Pome 19', com aproximadamente 72% de dissimilaridade, onde somente oito das 66 características avaliadas são coincidentes entre os dois acessos. A cultivar Princesa também se mostrou dissimilar em outras quatro das 20 combinações mais dissimilares, indicando alta dissimilaridade média no conjunto genotípico avaliado, o que também pode ser visualizado no dendrograma (Figura 1), visto que, a mesma foi alocada em um grupo isolado (Grupo 16). Em complemento, pode - se destacar que essa cultivar apresenta baixo requerimento de frio, é resistente à mancha foliar de *glomerella*,

tem boa coloração vermelha dos frutos, polpa crocante e succulenta, com sabor doce balanceado, adequado aos padrões de mercado brasileiro (CAMILO e DENARDI, 2006). Ademais, a cultivar Princesa foi amplamente utilizada como parental no Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri, sendo o genitor da cultivar Daiane, por exemplo. Essa, por sua vez, apresenta atualmente, alto potencial competitivo na cadeia produtiva da maçã no Brasil, evidenciando a boa capacidade de combinação da cultivar Princesa quando utilizada como germoplasma parental.

A combinação dos acessos *M. floribunda* 'e 'Imperatriz', presentes nos Grupo 2 e 14 (Figura 1) respectivamente, com dissimilaridade genética de 69,5%, se faz interessante pelo ponto de vista de programas de melhoramento que buscam a obtenção de cultivares com médio requerimento de frio e resistência à sarna da macieira e a mancha foliar de glomerella. A 'Imperatriz', cultivar desenvolvida pela Epagri, apresenta médio requerimento de frio hibernal, resistência a mancha foliar de glomerella e resistência horizontal à sarna. Já o acesso *M. floribunda*, 'clone 821', possui o gene *Rvi6* que confere resistência vertical à sarna da macieira (GALLI et al, 2010). Segundo Van Der Plank (1966), a integração da resistência vertical e horizontal se mostra positiva, pois o primeiro tipo de resistência atrasa a infecção inicial e o segundo diminui a taxa de infecção ao longo do tempo, resultando em mais estabilidade da resistência e melhor controle da doença. Sendo assim cruzamento entre esses dois genótipos poderia resultar em um híbrido com resistência mais estável para ambas as doenças mencionadas. De fato, alguns programas de melhoramento genético pelo mundo têm utilizado *M. floribunda* e outras espécies silvestres para desenvolver cultivares de macieiras com resistência mais duradoura à sarna da macieira, tal qual o programa o programa 'PRI' que envolve a Purdue University juntamente com a Rutgers University e University of Illinois, nos EUA, e o HIDRAs (High-quality Disease Resistant Apples for a Sustainable Agriculture) na Europa.

Contudo, deve-se atentar para o fato que cruzamentos envolvendo espécies silvestres, como as apresentadas no Grupo 14 (Figura 1), que em geral produzem frutos de tamanho muito pequeno e de sabor bastante adstringente, devem ser destinados a estratégias de pré-melhoramento, pois, de acordo com Janick et al. (1996) grande parte das progênies envolvendo um parental de frutos tipicamente pequenos, tende a expressar frutos menores que a média dos seus genitores. Isso poderia dificultar o processo de seleção, em função da frequência elevada de genótipos com frutos deste calibre.

Com o objetivo de explorar o máximo vigor híbrido das progênies, tendo como base os 16 grupos formados no dendrograma, podem ser sugeridos cruzamentos entre os acessos do grupo 1 com os acessos dos grupos 11, 12, 13, 15 e 16, em função da maior dissimilaridade observada entre eles, entre tanto, é relevante dar a devida atenção para a genealogia de cada indivíduo com o objetivo de evitar endogamia. Por exemplo, não é recomendado o cruzamento entre os acessos 'Princesa' e 'Baronesa', pois, mesmo estando em grupos distintos no dendrograma (Figura 1), as cultivares possuem alto

grau de parentesco, sendo genitor e progênie, respectivamente (DENARDI e CAMILO, 1997). Observar-se também, casos de algumas cultivares estarem no mesmo grupo, mas, não apresentarem genealogia em comum, com acontece no grupo 11, com os acessos 'Mutsu' e 'Senshu'. A cultivar Mutsu apresenta como genitores as cultivares Indo e Golden Delicious, enquanto que 'Senshu' é um híbrido entre 'Toko' e 'Fuji'. Sendo assim, o que influenciou tal agrupamento é o fato de elas coincidirem em 19 das 66 características, e com valores para caracteres quantitativos, muito próximos, para os quais, existem associações mais íntimas quando os valores estão mais próximos. Isso foi observado para as características de tamanho de fruto, por exemplo, com índice 6 para 'Senshu' e 7 para 'Mutsu'.

Um fator que pode ter ocasionado essas incongruências é o efeito ambiental exercido sobre os genótipos, pois o banco ativo de germoplasma de macieira consiste de apenas duas plantas por acesso e ocupa uma área de aproximadamente 0,4 hectares. Outro aspecto que deve ser ressaltado é que a avaliação dos descritores é bastante subjetiva e, portanto, sujeita a pequenas variações na avaliação e erros de leitura podem ocorrer em alguns casos.

Sendo assim, o melhorista de maçã deve considerar as características desejáveis a incorporar nas progênies, de forma que a magnitude da dissimilaridade apresentada entre os grupos formados no dendrograma exposto (Figura 1) sirva de auxílio na identificação dos grupos genotípicos supostamente mais heteróticos, facilitando a escolha dos genótipos para compor cruzamentos que sejam de interesse do melhorista.

## 4 | CONCLUSÕES

Uma ampla variabilidade genética é observada entre os 115 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de maçã da Epagri/EECd, com base nos 66 descritores morfo-agronômicos avaliados.

Com o estabelecimento do ponto de corte de 0.525 no dendrograma obtido pelo método de UPGMA, foram identificados 16 grupos distintos, sendo o grupo mais dissimilar composto apenas pelo acesso 'Princesa'.

Indicam-se como promissoras ao desenvolvimento de novas cultivares de maçã, as combinações híbridas formadas entre os indivíduos dos grupos 1, combinados com os indivíduos dos grupos 11, 12, 13, 15 e 16.

## REFERENCIAS

BARBIERI R. L.; LEITE D. L.; CHOER E.; SINIGAGLIA G. Divergência genética entre populações de cebola com base em marcadores morfológicos. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 303 – 308. 2005.

BLEICHER, J. História da Macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**, 1ª ed, Florianópolis: Pallotti, 2006. p. 29-36.

BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y.; BLEICHER, J. Doenças da Macieira. In: EPAGRI: **A cultura da macieira**, 1ª ed, Florianópolis: Pallotti, 2006. p. 527-608.

BUZAR, A. G. R.; OLIVEIRA, V. R.; BOITEUX, L. S. Estimativa da diversidade genética de germoplasma de cebola via descritores morfológicos, agronômicos e bioquímicos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 4, p. 527-532, 2007.

CAMILO A. P.; DENARDI F. Cultivares: descrição e comportamento no sul do Brasil, In: Epagri. **A Cultura da Macieira**: Florianópolis, Palotti, 2006, p. 113 – 158.

CEPA. Maça. In: **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina** (1976 – Atual), v.1, Florianópolis: Epagri/Cepa, 2018, p.65-76.

COELHO, C. M. M.; COIMBRA, J. L. M.; SOUZA, C. D.; BOGO, A.; GUIDOLIN, A. F. Diversidade genética em acessos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n. 5, p. 1241-1247, 2007.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. Diversidade genética. In: CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**, Viçosa: UFV, 2006, p. 51-58.

DENARDI F.; CAMILO, A. P. Novas cultivares de macieira: proposta de nova composição de pomares com polinizadoras / produtoras. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 10, n. 2, p. 25-30, 1997.

DENARDI F.; CAMILO A. P.; PETRI J. L. EPAGRI 407- Lisgala; mutação da cultivar de macieira Gala com epiderme mais colorida. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 10, n. 1, p. 55-56, 1997.

EPAGRI. **A cultura da macieira**, 1ª ed, Florianópolis: Pallotti, 2006. 743 p.

FURLAN, C. R. C.; DANTAS, C. de M.; DENARDI, F.; BECKER, W. F.; MANTOVANI, A. Resistência genética dos acessos do Banco de Germoplasma de macieira da Epagri à mancha foliar de glomerella (*colletotrichum gloeosporioides*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, n. 32, n. 2, p. 507-514, 2010.

GALLI, P.; BROGGINI, G. A.; GESSLER, C.; PATOCCHI, A. Phenotypic characterization of the RVIL5 (vr2) apple scab resistance. **Journal of Plant Pathology**, p. 219-226, 2010.

GOWER J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties, **Biometrics**, n. 27, n. 4, p. 857-874, 1971.

HAUAGGE, R.; BRUCKNER, C. H. Macieira. In: BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de Fruteiras de Clima Temperado**, 1ed, Viçosa: UFV, 2002, p. 27-88.

HOKANSON, S. C.; MCFERSON, J. R.; FORSLINE, P. L.; LAMBOY, W. F.; LUBY, J. J.; DJANGALIEV, A. D.; ALDWINCKLE, H. S. Collecting and managing wild *Malus* germplasm in its center of diversity. **HortScience**, v. 32, n. 2, p. 173-176, 1997.

HYTEN, D. L.; SONG, Q.; ZHU, Y.; CHOI, I. Y.; NELSON, R. L.; COSTA, J. M.; CREGAN, P. B. Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 45, p. 16666-16671, 2006.

JANICK, J.; CUMMINS, J.N.; BROWN, S.K.; HEMMAT, M.A. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Eds.). **Fruit breeding, tree and tropical fruits**. New York: John Wiley & Sons, 1996, p. 1-77.

LOPES, J. F.; CARVALHO, S. I. C. de. A Variabilidade Genética e o Pré-Melhoramento. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS Neto, A. L.; RIBEIROS Jr. W. Q. **Pré-Melhoramento, Melhoramento e Pós-**

**Melhoramento: estratégias e desafios. Planaltina**, Embrapa cerrado, 1ªed, v.1, 2008. p. 65-74.

MAECHLER, M.; ROUSSEUW, P.; STRUYF, A.; HUBERT, M.; HORNIK, K. Cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. **R package version 2.0.3**. v. 1, n. 2, 56 p. 2012.

MAPA, **Cenário da cadeia produtiva da maçã**. v.54. 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/politica-agricola/publicacoes/cenario-da-cadeia-produtiva>>. Acesso em: 11, novembro, 2015.

MARCUZZO L. L.; BECKER W.F.; FERNANDES, J. M. C. Alguns aspectos epidemiológicos da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro na região de Caçador/SC. **Summa Phytopathol**, v. 35, p. 132-135, 2009.

MATTOS, P. P de.; SANTOS, A. T dos.; RIVERA, H.; de OLIVEIRA, Y. M. M.; ROSOT, M. A. D.; Garrastazu, M. C. Crescimento de *Araucaria angustifolia* na Reserva Florestal Embrapa/Epagri, Caçador, SC. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 55, p. 107, 2007.

MELLO, L. M. R. de. Produção e mercado da maçã brasileira–Panorama 2005. **Embrapa Uva e Vinho Circular - Técnica**, Bento Gonçalves, 2006.

MUZHER, B. M.; YOUNIS, R. A.; EL-HALABI, O.; ISMAIL, O. M. Genetic identification of some Syrian local apple (*Malus* spp.) cultivars using molecular markers. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 3, n. 6, p. 704-713, 2007.

PETRI, J. L.; PALLADINI, L. A.; SHUCK, E.; DUCROQUET, J. H. J.; MATOS, C. S.; POLA, A. C. Dormência e indução da brotação de fruteiras de clima temperado. **Epagri**, 110p, 1996.

POMMER, C. V.; BARBOSA, W. The impact of breeding on fruit production in warm climates of Brazil. **Revista Brasileira de fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 612-634, 2009.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R **Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria 2015. > Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

ROMAY, M.C.; ORDÁS, B.; REVILLA, P.; ORDÁS, A. Three cycles of full-sib reciprocal recurrent selection in two Spanish maize populations. **Crop science**, v. 51, n. 3, p. 1016-1022, 2011.

R H S. Royal Horticultural Society colour chart. **Royal Hort. Soc.**, London and Flower Council of Holland, Leiden, 2007.

SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E. M.; KARASAWA, M.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 22-27, 2005.

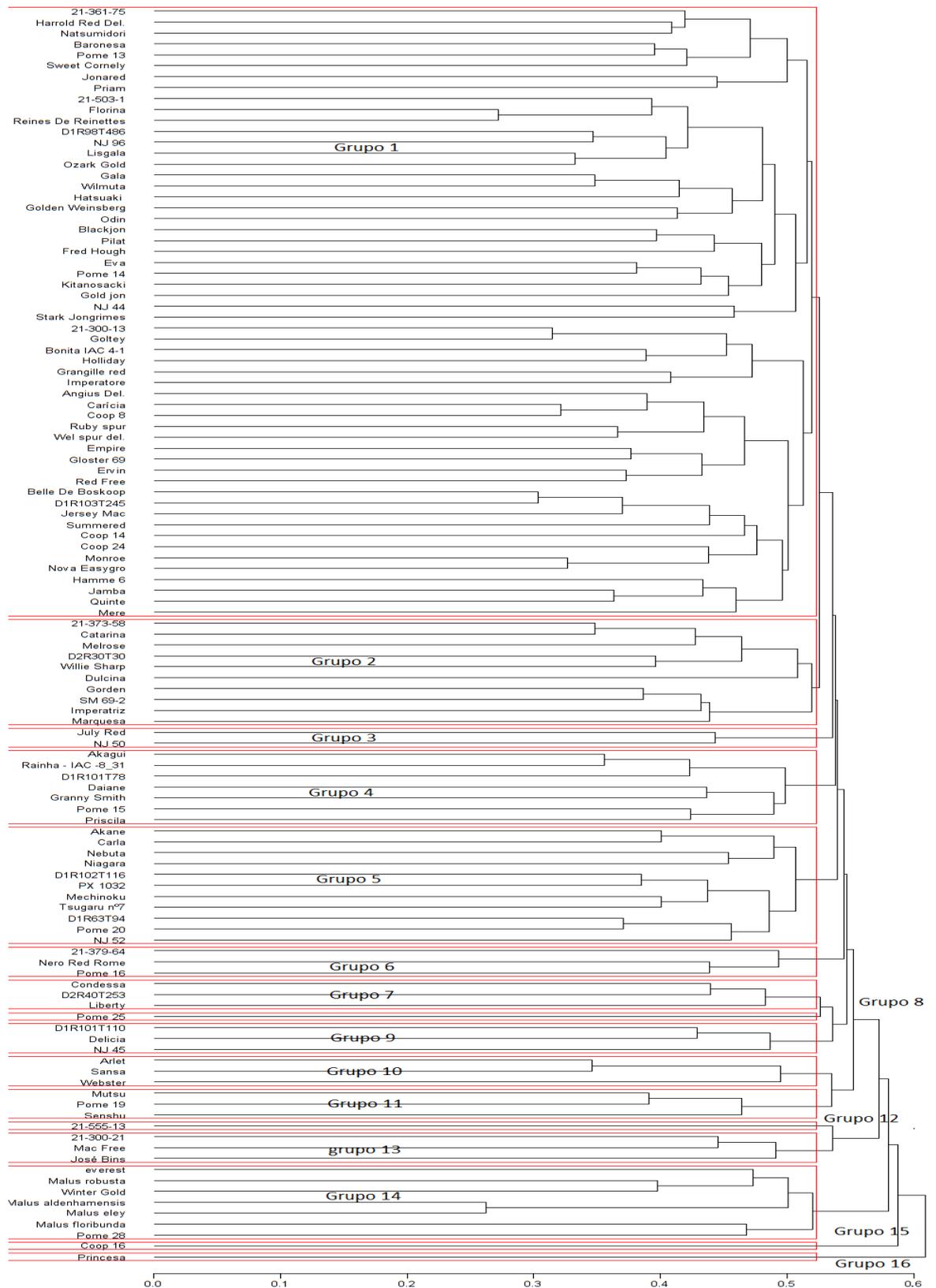
VAN DER PLANK, J. E. Horizontal (polygenic) and vertical (oligogenic) resistance against blight. **American Potato Journal**, v. 43, n. 2, p. 43-52, 1966.

VELASCO, R.; ZHARKIKH, A.; AFFOURTIT, J.; DHINGRA, A.; CESTARO, A.; KALYANARAMAN, A.; SALVI, S. The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Nature genetics**, v.42, n. 10, p.833-839, 2010.

ZHANG, Q.; LI J.; ZHAO Y.; KORBAN S. S.; HAN Y. Evaluation of genetic diversity in Chinese wild apple species along with apple cultivars using SSR markers. **Plant molecular biology reporter**, v. 30, n. 3, p. 539-546, 2012.

Combinações menos divergentes	D <sub>ij</sub>	Combinações mais divergentes	D <sub>ij</sub>
<i>M. eley</i> x <i>M. aldenhamensis</i>	0.2618	Princesa x Pome 19	0.7239
Reines des Reinettes x Florina	0.2711	Quinte x José Bins	0.7201
Florina x D1R103T94	0.3017	Mac Free x Florina	0.7073
Belle de Boskoop x D1R103T245	0.3026	Senshu x <i>M. floribunda</i>	0.7070
Jersey Mac x D1R103T245	0.3119	Quinte x <i>M. floribunda</i>	0.7068
Goltey x 21-300-13	0.3141	Pome 28 x Pome 19	0.7043
Empire x D1R103T245	0.3168	Nova Easygro x Mac Free	0.7040
Coop 8 x Carícia	0.3203	Princesa x Ozark Gold	0.7013
Florina x Empire	0.3204	Marquesa x Akane	0.7002
D1R103T245 x Baronesa	0.3229	Princesa x Mutsu	0.7002
Imperatore x 21-300-13	0.3253	Pome 25 x July Red	0.6987
Nova Easygro x Monroe	0.3262	NJ 45 x Imperatriz	0.6982
Wel spur del. x 21-300-13	0.3279	SM 69-2 x Senshu	0.6969
Lisgala x Ozark Gold	0.3316	<i>M. floribunda</i> x Imperatriz	0.6960
D1R63T94 x D1R103T245	0.3395	Akagui x 21-300-13	0.6955
Sansa x Arlet	0.3451	Princesa x Hatsuaki	0.6930
Pome 20 x D1R103T245	0.3454	Princesa x Everest	0.6913
NJ 96 x D1R98T486	0.3460	<i>M. aldenhamensis</i> x Mac Free	0.6908
Gala x Lisgala	0.3461	Senshu x Everest	0.6907
Coop 8 x 21-300-13	0.3461	Senshu x Pome 28	0.6902

**Tabela 1** – Dissimilaridade estimada entre as combinações menos e mais divergentes entre os 115 acessos de macieira do Banco Ativo de Germoplasma de Macieira da Epagri de Caçador, Santa Catarina, resultantes da avaliação de 66 descritores morfoagronômicos.



**Figura 1** – Dendrograma representativo do agrupamento dos 115 acessos de macieira do Banco Ativo de Germoplasma da Epagri/EECd, pelo método de UPGMA com base no algoritmo de ‘Gower’.

## DOF: FATOR DE TRANSCRIÇÃO IMPORTANTE EM PLANTAS DE INTERESSE AGRONÔMICO

### Tiago Benedito dos Santos

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE),  
Departamento de Agronomia e Pós-graduação em  
Agronomia, Presidente Prudente, São Paulo.

### Silvia Graciele Hulse de Souza

Universidade Paranaense (UNIPAR),  
Departamento de Engenharia Agronômica e  
Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à  
Agricultura, Umuarama, Paraná.

**RESUMO:** Brevemente neste capítulo iremos abordar e relatar os aspectos gerais sobre as múltiplas funções desempenhadas pelo fator de transcrição do Dof. A exploração dessas informações pode auxiliar novos estudos na caracterização funcional de genes Dof em culturas de grande importância no agronegócio.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dof (DNA-binding with One Zinc Finger), Bioinformática, Expressão de genes, estresse biótico e abiótico.

### DOF: TRANSCRIPTION FACTOR

### IMPORTANT IN PLANTS OF AGRONOMIC INTEREST

**ABSTRACT:** Briefly in this chapter we will discuss and report the general aspects about the multiple functions performed by the Dof transcription factor. The exploration of this

information may support new studies on the functional characterization of Dof genes in crops of great importance in agribusiness.

**KEYWORDS:** Dof (DNA-binding with One Zinc Finger), Bioinformatics, Gene expression, biotic and abiotic stress.

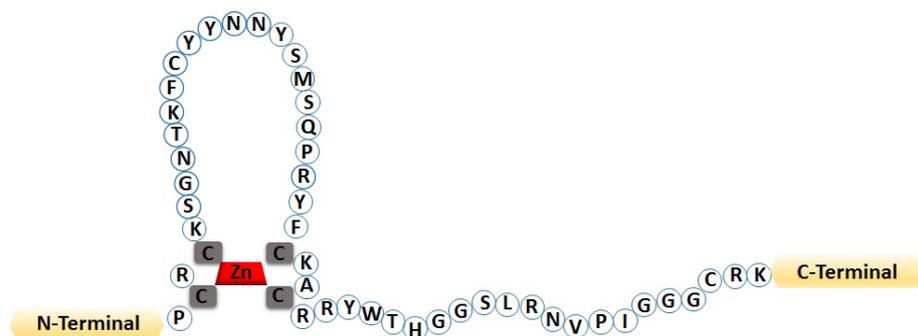
### 1 | INTRODUÇÃO

Em suma, os fatores de transcrição (FTs) correspondem a uma classe de proteínas, que controlam e regulam muitos dos processos biológicos. Inúmeros fatores de transcrição foram identificados em monocotiledôneas e dicotiledôneas. Alguns FTs são específicos para as plantas, como por exemplo a família de FT Dof. A família Dof (do inglês, *DNA-binding with One Finger*) compreende um grupo de FT específicos de plantas que desempenham papéis importantes em seu crescimento e desenvolvimento. Nos últimos anos o foco de muitos estudos está direcionado na identificação e catalogação de novos genes por meio das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS do inglês, *Next-Generation Sequencing*). Incontáveis estudos revelam uma imensa oportunidade de analisar os mais distintos genomas de plantas. Não obstante, também através da utilização de inúmeras ferramentas *in silico* publicamente disponíveis

têm auxiliando os estudos relacionados com a estrutura gênica e funcionais dos FTs Dof. A diversidade do número de número de genes da família de FT Dof, juntamente com as análises de *in silico*, investigação de sua estrutura, organização cromossômica, relações evolutivas e perfis de expressão em diferentes tecidos é revisada à luz de sua importância na biotecnologia de plantas para a melhoria das culturas. Até o presente momento, a maior parte das pesquisas sobre as funções dos genes *Dof* foram direcionadas em plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, sendo limitado os estudos em plantas de interesse agrônômico. Neste capítulo, conduziremos uma discussão sobre as principais características da família dos fatores de transcrição Dof.

## 2 | ESTRUTURA MOLECULAR DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA DOF

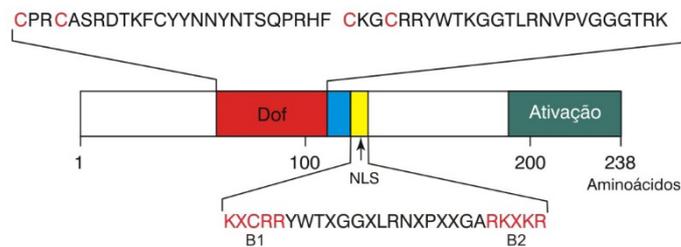
Estruturalmente, um típico FT de plantas é composto por domínio de ligação ao DNA, sítio de oligomerização, domínio de regulação da transcrição e um sinal de localização nuclear, respectivamente. Alguns FTs são específicos para as plantas, e agrupados em famílias de acordo com seu domínio de ligação ao DNA, como as proteínas de domínio Dof. Dof é considerada uma classe particular de domínio de ligação ao DNA do tipo dedo de zinco, os quais podem atuar como ativadores da transcrição gênica, além de estarem envolvidos em diversos processos biológicos (Yanagisawa, 2004; Wei et al., 2010; Noguerro et al., 2013; Gupta et al., 2015). FTs Dof são proteínas que apresentam um tamanho de aproximadamente de 200 a 400 resíduos de aminoácidos (revisado por Yanagisawa, 2016). Os Dofs estão presentes e são amplamente conservados em todo reino vegetal, representando uma classe única de FT por possuírem atividades de ligação bifuncionais (Gupta et al., 2015). De acordo com a figura 1, o domínio específico do Dof está localizado próximo da região N-terminal da proteína.



**Figura 1.** Representação do domínio Dof de ligação ao DNA. A estrutura Dof é formada a partir de quatro resíduos de cisteína (CX<sub>2</sub>CX<sub>21</sub>CX<sub>2</sub>C) que se ligam, posteriormente a um átomo de zinco (Zn<sup>2+</sup>) formando uma estrutura semelhante a um dedo de zinco (Dof). Figura revisada de Gupta et al. (2015) e adaptada de Garcia et al. (2018).

O domínio conservado está localizado em uma região altamente conservada





**Figura 3.** Esquema do *ZmDof 1* como um exemplo da estrutura do domínio da proteína Dof. O domínio Dof, um sinal de localização nuclear (NLS) e o domínio de ativação transcricional são indicados em vermelho, amarelo e verde, respectivamente. Um trecho de serina é indicado em azul. Os resíduos de cisteína para coordenação putativa do zinco são mostrados em letras vermelhas na sequência de aminoácidos do domínio Dof. As sequências de consenso do NLS bipartido (regiões básicas B1 e B2 em letras vermelhas) são baseadas em Krebs et al. (2010). (Figura adaptada de Yanagisawa, 2002 e Le Hir & Bellini, 2013).

Há relatos na literatura sugerindo que o domínio Dof também pode interagir com outros membros de famílias TFs, tais como: WRKY, MYB e bZIP (Vicente Carbajosa et al., 1997; Diaz et al., 2005; Zou et al., 2008; Wei et al., 2010). Em *A. thaliana* (OBP1) foi a primeira interação proteína-proteína a ser descrita contendo domínio Dof. Também é relatado a interação com os FTs bZIP de *Arabidopsis* (OBF4 e OBF5), onde essa interação é mediada pelo domínio Dof da OBP1 (Zhang et al., 1995).

É importante informarmos que de acordo com a similaridade apresentada entre as sequências Dof, elas podem ser organizadas em quatro grupos ou subfamílias (A, B, C e D), e os grupos B, C e D podem ser subdivididos em subgrupos (Lijavetzky et al., 2003; Ma et al., 2015; Feng et al., 2016; Wen et al., 2016). Modelo de classificação mais requerido entre os pesquisadores. Por exemplo, em *Arabidopsis* e *O. sativa* com base nas análises filogenéticas as sequências dos genes ortólogos foram previamente divididas em quatro subfamílias e 10 grupos denominados A, B1, B2, C1, C2.1, C2.2, C3, D1, D2 e D3 (Lijavetzky et al., 2003). Neste estudo ficou evidenciado a perda de genes e possíveis eventos de duplicação. Em *C. canephora* as proteínas Dof foram agrupadas em quatro grupos principais (A, B, C e D) e oito subgrupos: B1, B2, C1, C2.1, C2.2, C3, D1 e D2 (Garcia et al., 2018). Sabe-se que a análise das sequências de um determinado gene, bem como o estudo das relações filogenéticas são importantes para poder compreender a história evolutiva. Relatos indicam que FT Dof estão associados à evolução das plantas (Taylor & Raes, 2004; Shigyo et al., 2007). Contudo, como existe diferenças no número de proteínas entre as espécies de plantas, conseqüentemente também há variações na classificação entre os grupos e subgrupos Dof. Ao compararmos estudos de algas com as plantas superiores, observamos claramente uma enorme expansão dos membros do FT Dof no processo de evolução. Estas são algumas hipóteses e indicativos que TFs Dof em plantas podem ter passado por diferentes eventos de duplicação, desencadeando diversas funções nas plantas.

Nos últimos anos por meio das NGS, o conhecimento sobre o domínio e as

sequências *Dof* aumentaram significativamente, sugerindo o seu envolvimento em muitas redes regulatórias. A família dos FTs *Dof* estão envolvidos em diversas funções importantes (Noguero et al., 2013), tais como: ciclo cicardiano (Yang et al., 2010), assimilação de carbono e nitrogênio ( Santos et al., 2012), dormência (Ravindran et al. 2017), germinação (Rueda-Romero et al., 2012), regulação do desenvolvimento de estômatos (Negi et al., 2013), desenvolvimento do sistema vascular (Le Hir & Bellini, 2013), florescimento e desenvolvimento de sementes (Da Silva et al., 2016), estresses abióticos (Corrales et al., 2014; Zhang et al., 2017), bióticos (Kang et al., 2016).

### **3 | PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES *DOF* SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE BIÓTICO E ABIÓTICOS**

Estresses bióticos e abióticos, são eventos que reduzem significativamente a produtividade e o desenvolvimento das plantas, conseqüentemente, causando grandes perdas econômicas para os países, além de ser considerado uma das principais forças seletivas durante a evolução vegetal. Apesar disso, durante o processo evolutivo, as plantas foram capazes de desenvolver mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos sofisticados para ajustar o crescimento de acordo com a disponibilidade de recursos e com as condições ambientais. Neste tópico iremos discutir os principais estudos de membros da família do gene *Dof* envolvidos em condições de estresses bióticos e abióticos. Alguns estudos, suplementarmente sugerem que as proteínas *Dof* são sinalizadoras em respostas a estímulos bióticos/abióticos (Corrales et al., 2014; Ma et al., 2015; Sasaki et al., 2015).

A família do gene *Dof* foi amplamente estudada em diversos organismos, incluindo alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* e o musgo *Physcomitrella patens* (Moreno-Risueno et al., 2007). Originalmente os genes *Dof* provém de um ancestral comum, mantendo-se como cópia única na alga unicelular *C. reinhardtii*, e conseqüentemente foi expandido para outros grupos taxonômicos, aumentando o número de cópias por meio de eventos de duplicação (Moreno-Risueno et al., 2007; Gupta et al., 2015). Cronologicamente, o primeiro gene *Dof* relatado na literatura (*ZmDof1*) foi isolado e caracterizado a partir do milho (*Z. mays* L.), o qual demonstrou estar envolvido na regulação da expressão pela luz (Yanagisawa & Sheen, 1998). Nas monocotiledôneas e dicotiledôneas, o número de genes *Dof* são muito variáveis entre as espécies (Tabela 1).

<b>Espécies</b>	<b>Grupo taxonômico</b>	<b>Número de genes</b>	<b>Referências</b>
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Alga	1	Moreno-Risueno et al. (2007)
<i>Physcomitrella patens</i>	Musco	9	Moreno-Risueno et al. (2007)
<i>Selaginella moellendorffii</i>	Samabaia	8	Moreno-Risueno et al. (2007)
<i>Pinus taeda</i>	Gimnosperma	8	Moreno-Risueno et al. (2007)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Angiosperma	36	Lijavetzky et al. (2003)
<i>Oryza sativa</i>	Angiosperma	30	Lijavetzky et al. (2003)
<i>Hordeum vulgare</i>	Angiosperma	24	Moreno-Risueno et al. (2007)
<i>Populus trichocarpa</i>	Angiosperma	41	Yang et al. (2006)
<i>Triticum aestivum</i>	Angiosperma	31	Shaw et al. (2009)
<i>Sorghum bicolor</i>	Angiosperma	28	Kushwaha et al. (2011)
<i>Zea mays</i>	Angiosperma	54	Jiang et al. (2012)
<i>Brachypodium distactylon</i>	Angiosperma	27	Hernando-Amado et al. (2012)
<i>Solanum lycopersicum</i>	Angiosperma	34	Cai et al. (2013)
<i>Ricinus communis</i> L.	Angiosperma	21	Jin et al. (2014)
<i>Saccharum officinarum</i>	Angiosperma	25	Gupta et al. (2014)
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.	Angiosperma	38	Malviya et al. (2015)
<i>Medicago truncatula</i>	Angiosperma	42	Shu et al. (2015)
<i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg.	Angiosperma	51	Zou et al. (2015)
<i>Solanum tuberosum</i>	Angiosperma	35	Venkatesh; Park (2015)
<i>Brassica rapa</i>	Angiosperma	76	Ma et al. (2016)
<i>Setaria italica</i>	Angiosperma	35	Zhang et al. (2017)
<i>Capsicum annuum</i> L.	Angiosperma	33	Wu et al. (2016)
<i>Vitis vinifera</i>	Angiosperma	25	da Silva et al. (2016)
<i>Cucumis sativus</i>	Angiosperma	36	Wen et al. (2016)
<i>Musa acuminata</i>	Angiosperma	75	Dong et al. (2016)
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Angiosperma	20	Song et al. (2016)
<i>Phyllostachys heterocycla</i> var. <i>pubescens</i>	Angiosperma	26	Wang et al. (2016)
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>Sativus</i>	Angiosperma	46	Huang et al. (2016)
<i>Prunus persica</i>	Angiosperma	25	Chen et al. (2017)
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Angiosperma	36	Ito et al. (2017)
<i>Malus domestica</i>	Angiosperma	60	Zhang et al. (2017)
<i>Boehmeria nivea</i> L. Gaud	Angiosperma	19	Xu et al. (2018)
<i>Phyllostachys edulis</i>	Angiosperma	26	Cheng et al. (2018)
<i>Solanum melongena</i> L.	Angiosperma	29	Wei et al. (2018)
<i>Coffea canephora</i>	Angiosperma	24	Garcia et al. (2018)
<i>Jatropha curcas</i> L.	Angiosperma	24	Wang et al. (2018)
<i>Ananas comosus</i>	Angiosperma	26	Azam et al. (2018)
<i>Gossypium hirsutum</i>	Angiosperma	114	Li et al. (2018)
<i>Eleusine coracana</i>	Angiosperma	32	Gupta et al. (2018)
<i>Ananas comosus</i> L.	Angiosperma	25	Hong et al. (2019)
<i>Manihot esculenta</i>	Angiosperma	45	Zou et al. (2019)
<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	Angiosperma	24	Guaberto et al. (2019)

Tabela 1. Lista de diferentes espécies que apresentam membros genes Dof.

Até o presente momento, na literatura, são poucos os estudos que fornecem informações do envolvimento da família Dof em respostas ao estresse biótico. Por exemplo, muitos membros da família Solanaceae são expostas a várias doenças, tais como: vírus do mosaico do tabaco (TMV), *Collectricum* spp, *Phytophthora capsici*, dentre outros patógenos. Em *Capsicum annuum* 'CM334' os *CaDofs* foram diferencialmente regulados, sugerindo que esses genes podem desempenhar um papel crucial na defesa contra estresses bióticos (Kang et al., 2016). Wen et al. (2016) dos 36 genes *CsDof* identificados em *C. sativus*, 22 responderam à inoculação do patógeno *Pseudoperonospora cubensis*. Ressaltando que neste estudo, *CsDof10*, *CsDof12*, *CsDof19* e *CsDof31* foram os genes que apresentaram maior expressão no primeiro dia após a inoculação com o patógeno, enquanto que a expressão de outros genes (*CsDof02*, *CsDof04*, *CsDof18*, *CsDof25*, *CsDof28*, *CsDof35* e *CsDof36*) foram diferencialmente expressos após o segundo dia de inoculação.

Neste íterim, Chen & Cao (2014), através de uma ampla análise comparativa

da família do FT Dof com *Z. mays*, estes autores observaram que entre os 46 genes identificados, três (*ZmDof16*, *ZmDof22* e *ZmDof36*), foram fortemente induzidos sob condições de estresse abiótico. Em *P. edulis*, 12 genes *PheDof* (*PheDof4*, 6, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 23, 24, 25 e 26) foram selecionados para análise de expressão em condições de salinidade, seca e frio. Os genes *PheDof6*, 10, 15 e 16, foram mais expressos em estresse salino, e *PheDof6* e 10, foram regulados positivamente pelo tratamento a frio. No tratamento da seca, os genes (*PheDof6*, 15 e 25) apresentaram maior acúmulo de transcritos. Cheng et al. (2018), ao compilarem esses dados, propõe que os genes *PheDof* em bambu são responsivos aos estresses abióticos. Em *Malus domestica*, uma planta economicamente importante, Zhang et al. (2017), identificaram 60 *MdDof*. Com efeito, a maioria dos membros da família *MdDof* foram caracterizados em desempenharem papéis importantes na tolerância das plantas ao estresse abiótico. Em *Arabidopsis*, Corrales et al. (2017) identificaram um grupo de genes Dof conhecidos como CDFs cuja expressão foi descrita como responsivo a diferentes estresses abióticos. Neste estudo, CDF3 controla a expressão de um determinado grupo de genes envolvidos em respostas a temperaturas extremas, seca e estresse osmótico, incluindo alguns reguladores de estresse abióticos centrais como, CBFs, DREB2A e ZAT12.

A análise da expressão gênica dos genes *GhDofA5.7*, *GhDofA7.4*, *GhDofA8.2*, *GhDof11.1*, *GhDofD7.2* e *GhDofD11.3* em *G. hirsutum* L. demonstraram ser significativamente responsivos ao estresse pelo frio, enquanto que *GhDofD9.6* foi responsivo ao estresse salino (Li et al., 2018).

Como relatado acima, os genes *Dof* são caracterizados como importantes moduladores no mecanismo de respostas aos estresses bióticos e abióticos em plantas (Ma et al., 2015; Cheng et al., 2018; Yang et al., 2018). Com base nessas informações, há uma necessidade de entender melhor a dinâmica evolutiva de redes regulatórias formado pelo domínio Dof e identificar e triar novos genes candidatos *Dof* associados a essas condições adversas, principalmente em plantas de interesse agrônomico.

#### 4 | PERSPECTIVAS

Os fatores de transcrição Dof estão associados a vários processos biológicos exclusivos em plantas. Nos últimos anos, a nossa compreensão sobre o mecanismo regulatório dos Dofs e seu papel durante o crescimento, desenvolvimento e respostas frente aos diferentes estresses em plantas modelo foi bastante estudado por diferentes abordagens genéticas. No entanto, ainda existem muitas lacunas a serem elucidadas e não temos uma compreensão profunda dos processos regulatórios desses fatores de transcrição. Por exemplo, ainda não está claro como os repressores Dofs regulam a repressão de genes? Como outros fatores de transcrição e proteínas sinalizadoras interagem com as proteínas Dofs e regula os diversos processos biológicos? Quais são

os genes e como são regulados pelos fatores de transcrição Dof? Essas são algumas das principais questões a serem abordadas. Embora, muitos genes candidatos que são regulados pelos Dofs foram identificados experimentalmente e por meio de análises de bioinformática nos últimos anos, será interessante entender a função desses genes e o mecanismo regulador de algumas proteínas importantes dos FTs. O grande desafio será integrar o conhecimento sobre a regulação dos Dofs em diferentes processos de desenvolvimento das plantas e entender como esses processos funcionam nas diferentes espécies de vegetais. Por fim, como alguns fatores de transcrição de Dof têm o potencial de aumentar o rendimento ou a produção de metabólitos em plantas, tal entendimento pode ser particularmente importante para o desenvolvimento de novas aplicações no melhoramento de plantas.

## REFERÊNCIAS

AZAM, S. M.; LIU, Y.; RAHMAN, Z. U.; ALI, H.; YAN, C.; WANG, L.; PRIYADARSHANI, S.V.G.N.; HU, B.; HUANG, X.; XIONG, J.; QIN, Y. Identification, Characterization and Expression Profiles of *Dof* Transcription Factors in Pineapple (*Ananas comosus* L.). **Tropical Plant Biology**, p. 1–16, 2018.

CAI, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, C.; ZHANG, T.; HU, T.; YE, J.; ZHANG, J.; WANG, T.; LI, H.; YE, Z. Genome-wide analysis of plant-specific *Dof* transcription factor family in tomato. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.55, n.6, p. 552–566, 2013.

CHEN, M.; LIU, X.; HUAN, L.; SUN, M.; LIU, L.; CHEN, X.; GAO, D.; LI, L. Genome-wide analysis of *Dof* family genes and their expression during bud dormancy in peach (*Prunus persica*). **Scientia Horticulturae**, v.214, p. 18–26, 2017.

CORRALES, A.R.; NEBAUER, S.G.; CARRILLO, L.; FERNANDEZ-NOHALES, P.; MARQUES, J.; RENAU-MORATA, B.; GRANELL, A.; POLLMANN, S.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; MOLINA, R.V.; MEDINA, J. Characterization of tomato Cycling *Dof* Factors reveals conserved and new functions in the control of flowering time and abiotic stress responses. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 995–1012, 2014.

CORRALES, A.R.; CARRILLO, L.; LASIERRA, P.; NEBAUER, S. G.; DOMÍNGUEZ-FIGUEROA, J.; RENAU-MORATA, B.; POLLMANN, S.; GRANELL, A.; MOLINA, R. V.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; MEDINA, J. Multifaceted role of cycling *Dof* Factor 3 (CDF3) in the regulation of flowering time and abiotic stress responses in Arabidopsis. **Plant Cell Environment**, v.40, p.748–764, 2017.

CHEN, Y.; CAO, J. Comparative analysis of *Dof* transcription factor family in maize. **Plant Molecular Biology Reports**, 33, 1245–1258, 2014.

CHENG, Z.; HOU, D.; LIU, J.; LI, X.; XIE, L.; MA, Y.; GAO, J. Characterization of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) *Dof* factors in floral development and abiotic stress responses. **Genome**, v.61, p. 151–156, 2018.

Da SILVA, D.C.; FALAVIGNA, V.S.; FASOLI, M.; BUFFON, V.; PORTO, D.D.; PAPPAS JR, G.J.; PEZZOTTI, M.; PASQUALI, G.; REVERS, L.F. Transcriptome Analyses of the *Dof*-Like Gene Family in Grapevine Reveal Its Involvement in Berry, Flower and Seed Development. **Horticulture Research**, v.3, n.16042, 2016.

DIAZ, I.; MARTINEZ, M.; ISABEL-LAMONEDA, I.; RUBIO-SOMOZA, I.; CARBONERO, P. The *Dof* protein, SAD, interacts with GAMYB in plant nuclei and activates transcription of endosperm-specific genes during barley seed development. **Plant Journal**, v. 42, p.652–662, 2005.

- FENG, B.H.; HAN, Y.C.; XIAO, Y.Y.; KUANG, J.F.; FAN, Z.Q.; CHEN, J.Y., et al. The banana fruit Dof transcription factor MaDof23 acts as a repressor and interacts with MaERF9 in regulating ripening-related genes. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 2263–2275, 2016.
- GARCIA, V.; RIBAS, A.F.; VIEIRA, L.G.E.; DOS SANTOS T.B. *In silico* analysis of the Dof transcription factor family in *Coffea canephora*. **Colloquium Agrariae**, v.14, n.4, p.99–111, 2018.
- GUPTA, S.; MALVIYA, N.; KUSHWAHA, H.; NASIM, J.; BISHT, N. C.; SINGH, V. K.; YADAV, D. Insights into structural and functional diversity of Dof (DNA binding with one finger) transcription factor. **Planta**, v. 241, n. 3, p. 549–562, 2015.
- HUANG, W.; HUANG, Y.; LI, M.Y.; WANG, F.; XU, Z.S.; XIONG, A.S. Dof transcription factors in carrot: genome-wide analysis and their response to abiotic stress. **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 145–155, 2016.
- HOU, Y.; WU, A. L.; HE, Y. Y.; LI, F. D.; WEI, C. L. Genome-wide characterization of the basic leucine zipper transcription factors in *Camellia sinensis*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 14, p. 27, 2018.
- ITO, T.M.; TREVIZAN, C.B.; DOS SANTOS, T.B.; DE SOUZA, S.G.H. Genome-Wide Identification and Characterization of the Dof Transcription Factor Gene Family in *Phaseolus vulgaris* L. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 3233–3257, 2017.
- JIN, Z.; CHANDRASEKARAN, U.; LIU, A. Genome-wide analysis of the Dof transcription factors in castor bean (*Ricinus communis* L.). **Genes Genomics**, v. 36, p. 527–537, 2014.
- KANG, W.H.; KIM, S.; LEE, H.A.; CHOI, D.; YEOM, S.I. Genome-wide Analysis of Dof Transcription Factors Reveals Functional Characteristics during Development and Response to Biotic Stresses in Pepper. **Scientific Reports**, v. 6, n. 33332, 2016.
- KISU, Y.; ONO, T.; SHIMOFURUTANI, N.; SUZUKI, M.; ESAKA, M. Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene. **Plant Cell Physiology**, v. 39, p. 1054–1064, 1998.
- KREBS, J.; MUELLER-ROEBER, B.; RUZICIC, S. A novel bipartite nuclear localization signal with an atypically long linker in Dof transcription factors. **Journal of Plant Physiology**, v.167, n.7, p.583–586, 2010.
- KUSHWAHA, H.; GUPTA, S.; SINGH, V.K.; RASTOGI, S.; YADAV, D. Genome wide identification of Dof transcription factor gene family in sorghum and its comparative phylogenetic analysis with rice and Arabidopsis. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 5037–5053, 2011.
- LE HIR, R.; BELLINI, C. The plant-specific dof transcription factors family: new players involved in vascular system development and functioning in Arabidopsis. **Frontiers Plant Science**, v.4, p.164, 2013.
- LI, H.; DOU, L.; LI, W.; WANG, P.; ZHAO, Q.; XI, R.; PEI X.; LIU Y.; REN, Z. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of the Dof Transcription Factor Gene Family in *Gossypium hirsutum* L. **Agronomy**, v.8, n.9, p. 186, 2018.
- LIJAVETZKY, D.; CARBONERO, P.; VICENTE-CARBAJOSA, J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and Arabidopsis Dof gene families. **BMC Evolutionary Biology**, v. 3, n.17, 2003.
- MA, J.; LI, M-Y.; WANG, F.; TANG, J.; XIONG, A. S. Genome-wide analysis of Dof family transcription factors and their responses to abiotic stresses in Chinese cabbage. **BMC Genomics**, v. 16, p. 33, 2015.

- MALVIYA, N.; GUPTA, S.; SINGH, V.K.; YADAV, M.K.; BISHT, N.C.; SARANGI, B.K.; YADAV, D. Genome wide *in silico* characterization of *Dof* gene families of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L) Millsp.). **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 2, p. 535–552, 2015.
- MORENO-RISUENO, M.Á.; DÍAZ, I.; CARRILLO, L.; FUENTES, R.; CARBONERO, P. The HvDof19 transcription factor mediates the abscisic acid-dependent repression of hydrolase genes in germinating barley aleurone. **Plant Journal**, v. 51, p.352–365, 2007.
- NEGI, J.; MORIWAKI, K.; KONISHI, M.; YOKOYAMA, R.; NAKANO, T.; KUSUMI, K.; HASHIMOTO-SUGIMOTO, M.; SCHROEDER, J.I.; NISHITANI, K.; YANAGISAWA, S.; IBA, K. A DOF transcription factor, SCAP1, is essential for the development of functional stomata in Arabidopsis. **Current Biology**, v.23, p. 479–484, 2013.
- NOGUERO, M.; ATIF, R.M.; OCHATT, S.; THOMPSON, R.D. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (Dof) transcription factor family in plants. **Plant Sci Int Journal of Experimental Plant Biology**, v.209, p. 32–45, 2013.
- RAVINDRAN, P.; VERMA, V.; STAMM, P.; KUMAR, P.P. A Novel RGL2–DOF6 Complex Contributes to Primary Seed Dormancy in Arabidopsis thaliana by Regulating a GATA Transcription Factor. **Molecular Plant**, v.10, n.10, p.1307–1320, 2017.
- RUEDA-ROMERO, P.; BARRERO-SICILIA, C.; GOMEZ-CADENAS, A.; CARBONERO, P.; ONATE-SANCHEZ, L. Arabidopsis thaliana DOF6 negatively affects germination in non-after-ripened seeds and interacts with TCP14. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.1937–1949, 2012.
- SASAKI, N.; MATSUMARU, M.; ODAIRA, S.; NAKATA, A.; NAKATA, K.; NAKAYAMA, I.; et al. Transient expression of tobacco BBF1-related Dof proteins, BBF2 and BBF3, upregulates genes involved in virus resistance and pathogen defense. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v.89, p.70–77, 2015.
- SHIGYO, M.; TABELI, N.; YONEYAMA, T.; YANAGISAWA, S. Evolutionary processes during the formation of the plant-specific Dof transcription factor family. **Plant Cell Physiology**, v.48, n1, p.179–85, 2007.
- SHU, Y.J.; SONG, L.L.; ZHANG, J.; LIU, Y.; GUO, C.H. Genome-wide identification and characterization of the *Dof* gene family in *Medicago truncatula*. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.3, p.10645–10657, 2015.
- SANTOS, L.A.; DE SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. OsDof25 expression alters carbon and nitrogen metabolism in Arabidopsis under high N-supply. **Plant Biotechnology Reports**, v.6, n.4, p. 327–337, 2012.
- SONG, A.; GAO, T.; LI, P.; CHEN, S.; WU, D.; XIN, J.; FAN, Q.; ZHAO, K.; CHEN, F. Transcriptome-Wide Identification and Expression Profiling of the Dof Transcription Factor Gene Family in *Chrysanthemum morifolium*. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p. 199, 2016.
- TAYLOR, J.S.; RAES, J. Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. **Annual Review of Genetics**, v.38, p. 615–43, 2004.
- UMEMURA, Y.; ISHIDUKA, T.; YAMAMOTO, R.; ESAKA, M. The Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain conserved only in higher plants, truly functions as a Cys2/Cys2 Zn finger domain. **Plant Journal**, v.37, p. 741–749, 2004.
- VENKATESH, J.; PARK, S.W. Genome-wide analysis and expression profiling of DNA-binding with one zinc finger (Dof) transcription factor family in potato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.94, p.73–85, 2015.

- VICENTE-CARBAJOSA, J.; MOOSE, S.P.; PARSONS, R.L.; SCHMIDT, R.J. A maize zinc-finger protein binds the prolamins box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.94, p. 7685–7690, 1997.
- WANG, T.; YUE, J.-J.; WANG, X.-J.; XU, L.; LI, L.-B.; GU, X.-P. Genome-Wide Identification and Characterization of the Dof Gene Family in Moso Bamboo (*Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens*). **Genes & Genomics**, v.38, n.733, 2016.
- WANG, P.; LI, J.; GAO, X.; ZHANG, D.; LI, A.; LIU, C. Genome-Wide Screening and Characterization of the Dof Gene Family in Physic Nut (*Jatropha curcas* L.). **International Journal of Molecular sciences**, v.19, n.6, p.1598, 2018.
- WEI, Q.; WANG, W.; HU, T.; HU, H.; MAO, W.; ZHU, Q.; BAO, C. Genome-wide identification and characterization of Dof transcription factors in eggplant (*Solanum melongena* L.). **PeerJ**, n. 6e4481, 2018.
- WEI, P.C.; TAN, F.; GAO, X.Q.; ZHANG, X.Q.; WANG, G.Q.; XU, H.; LI, L.J.; CHEN, J.; WANG, X.C. Overexpression of AtDof4.7, an Arabidopsis Dof family transcription factor, induces floral organ abscission deficiency in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.153, p. 1031–1045, 2010.
- WEN, C. L.; CHENG, Q.; ZHAO, L.; MAO, A.; YANG, J.; YU, S.; WENG, Y.; XU, Y. Identification and characterisation of Dof transcription factors in the cucumber genome. **Scientific Reports**, v. 6, n.23072, 2016.
- WU, Y.; YANG, W.; WEI, J.; YOON, H.; AN, G. Transcription factor *OsDOF18* controls ammonium uptake by inducing ammonium transporters in Rice Roots. **Molecules and Cells**, v.40, n.3, p.178-185, 2017.
- WU, Z.; CHENG, J.; CUI, J.; XU, X.; LIANG, G.; LUO, X.; CHEN, X.; TANG, X.; HU, K.; QIN, C. Genome-wide identification and expression profile of dof transcription factor gene family in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Frontiers in Plant Science**, v.7, n.574, 2016.
- XU, X.; LI, F.; WANG, Y.; TANG, S.; DAI, Q.; ZHU, S.; LIU, T. Identification of Dof transcription factors in ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud) and their expression in response to different nitrogen treatments. **3 Biotechnol**, v. 8, n. 12, p. 496, 2018.
- YANAGISAWA, S.; SHEEN J. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue specific and light-regulated gene expression. **The Plant Cell**, v.10, n.1, p.75–89, 1998.
- YANAGISAWA, S.; SCHMIDT, R.J. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. **Plant Journal**, v. 17, p. 209–214, 1999.
- YANAGISAWA, S. Dof domain proteins: Plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. **Plant Cell Physiology**, v.45, p. 386–391, 2004.
- YANAGISAWA, S. Structure, Function, and Evolution of the Dof Transcription Factor Family. In: *Plant Transcription Factors*. **Academic Press**, p. 183–197, 2016.
- YANAGISAWA, S., AKIYAMA, A., KISAKA, H., UCHIMIYA, H. AND MIWA, T. Metabolic engineering with DOF1 transcription factor in plants: improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 7833–7838, 2004.
- YANG, Q.; CHEN, Q.; ZHU, Y.; LI, T. Identification of *MdDof* genes in apple and analysis of their response to biotic or abiotic stress. **Functional Plant Biology**, v. 45, n. 5, p. 528–541, 2018.

YANG, J.; YANG, M.F.; WANG, D.; CHEN, F.; SHEN, S.H. JcDof1, a Dof transcription factor gene, is associated with the light-mediated circadian clock in *Jatropha curcas*. **Physiology Plant**, v. 139, p. 324–334, 2010.

ZHANG, B.; CHEN, W.; FOLEY, R.C.; BUTTNER, M.; SINGH, K.B. Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to ocs element promoter sequences. **Plant Cell**, v.7, p. 2241–2252, 1995.

ZHANG, L.; LIU, B.; ZHENG, G.; ZHANG, A.; LI, R. Genome-wide characterization of the *SiDof* gene family in foxtail millet (*Setaria italica*). **Biosystems**, v. 151, p. 27–33, 2017.

ZHANG, Z.; YUAN, L.; LIU, X.; CHEN, X.; WANG, X. Evolution analysis of Dof transcription factor family and their expression in response to multiple abiotic stresses in *Malus domestica*. **Gene**, v.639, p.137–148, 2017.

ZOU, Z.; ZHU, J.L.; ZHANG, X.C. Genome-wide identification and characterization of the Dof gene family in cassava (*Manihot esculenta*). **Gene**, v. 687, n. 1, p.298–307, 2019.

ZOU, X.; NEUMAN, D.; SHEN, Q.J. Interactions of two transcriptional repressors and two transcriptional activators in modulating gibberellin signaling in aleurone cells. **Plant Physiology**, v.148, p. 176–186, 2008.

## FENOLOGIA REPRODUTIVA DE *Quassia amara* L. (SIMAROUBACEAE)

### **Ana Paula Ribeiro Medeiros**

Universidade Federal de Lavras, Departamento  
de agricultura  
Lavras-Minas Gerais

### **Osmar Alves Lameira**

Embrapa Amazônia Oriental  
Belém-Pará

### **Raphael Lobato Prado Neves**

Universidade Federal Rural da Amazônia  
Belém-Pará

### **Carolina Mesquita Germano**

Universidade Federal de Lavras, Departamento  
de agricultura  
Lavras-Minas Gerais

### **Helaine Cristine Gonçalves Pires**

Universidade Federal Rural da Amazônia  
Capitão Poço-Pará

### **Fábio Miranda Leão**

Universidade Federal Rural da Amazônia  
Belém-Pará

### **Mariana Gomes de Oliveira**

Universidade Federal Rural da Amazônia  
Belém-Pará

**RESUMO:** Objetivou-se analisar a frequência dos eventos de floração e frutificação de *Quassia amara* L., relacionando-os com as condições pluviométricas e de temperatura do período de estudo, visando determinar o melhor momento de coleta de material vegetal para uso

medicinal. Foram selecionados 21 indivíduos adultos para as observações dos eventos fenológicos, realizadas diariamente de janeiro de 2009 a dezembro de 2014, registrando-se a presença ou ausência de flores e frutos por indivíduo. Os dados foram submetidos à análise estatística e as médias foram comparadas a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Para analisar a relação da precipitação pluviométrica com a fenologia da espécie, foram comparadas as médias da precipitação pluviométrica do período estudado com os registros fenológicos. Tanto floração quanto frutificação, ocorreram durante todo o ano, sendo os picos de intensidade destes eventos inversamente proporcional em relação a média de precipitação pluviométrica. Os resultados desta pesquisa reforçam a necessidade de estudos específicos para cada ambiente de cultivo da espécie como auxílio no planejamento de coleta de material vegetal utilizado de acordo com o uso pretendido.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fenofase reprodutiva, planta medicinal, precipitação pluviométrica.

### REPRODUCTIVE PHENOLOGY OF *Quassia amara* L. (SIMAROUBACEAE)

**ABSTRACT:** The aim of this study was to analyze the frequency of flowering and fruiting events of *Quassia amara* L., relating them to the rainfall and temperature conditions of the study

period, in order to determine the best time for collecting plant material for medicinal use. Twenty-one adult individuals were selected for the observations of phenological events, performed daily from January 2009 to December 2014, registering the presence or absence of flowers and fruits per specimen. The data were submitted to statistical analysis and the means were compared to a 5% probability by the Scott-Knott test. In order to analyze the relation between rainfall and phenology, the rainfall averages of the studied period were compared with the phenological records. Both flowering and fruiting occurred throughout the year, with the intensity peaks of these events being inversely proportional to the mean rainfall. The results of this research reinforce the need of specific studies for each growing environment of the species as an aid in planning the collection of plant material used according to the intended use

**KEYWORDS:** Phenophase reproductive, medicinal plant, pluviometric precipitation.

## 1 | INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca dos outros países por possuir um terço da flora mundial, com destaque para a Amazônia como maior reserva de produtos naturais com ação fitoterápica do planeta. A riqueza dessa biodiversidade vegetal impulsiona as pesquisas e ao desenvolvimento de produtos vegetais num cenário científico em escala mundial (FRANÇA et al., 2008; SANTOS et al., 2011).

Oficialmente há registrado 3.286 espécies ameaçadas de extinção para a biota brasileira. Destas espécies, 2.113 são vegetais, desta forma o grande desafio do país é crescer economicamente de maneira sustentável com a biodiversidade (STEHMANN; SOBRAL, 2017).

*Quassia amara* L. (Simaroubaceae), conhecida popularmente como quássia-amarga, quássia-de-caiena, pau-amarelo, pau-tenente, quássia-da-jamaica, quássia-do-suriname, cássia, pau-amargo, pau-de-surinã, pau-quassia (SÁEZ; SOTO, 2008), é uma espécie de hábito arbustivo, nativa e não endêmica do Brasil. Ocorre preferencialmente em floresta de Terra Firme, podendo ser encontrada nos Estados do Amazonas, Amapá, Pará, Roraima e Maranhão (PIRANI; THOMAS, 2015). Essa espécie é muito utilizada como tônico e reivindicada a ser um antimalárico eficaz em toda parte norte da bacia amazônica (BERTANI et al., 2012).

A fenologia tem como base a observação de fenofases das espécies, que correspondem aos estádios de desenvolvimento, como a emergência das gemas, o desenvolvimento das folhas, a floração, a frutificação, a descoloração das folhas e a senescência (FREIRE et al., 2013). Esse estudo subsidia várias análises, inclusive no auxílio de prospecções químicas posteriores, pois a identificação de algumas substâncias pode ocorrer em quantidades não detectáveis em função de condições edáficas e climáticas e, como os compostos apresentam uma função ecológica, verificam-se variações de acordo com o período vegetativo da planta (POSER; MENTZ, 2010). Ressalta-se que as fases fenológicas de uma planta variam conforme

as condições climáticas, sendo precipitação e temperatura do ar os fatores que causam mais efeitos (SCORIZA; PIÑA-RODRIGUES, 2014).

Dessa maneira, objetivou-se estimar a frequência dos eventos de floração e frutificação de *Quassia amara* L., relacionando-os com as condições pluviométricas e de temperatura da área, visando determinar a época mais indicada para coleta de material vegetal para uso medicinal.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Horto de plantas medicinais (1° 27' 21'' S e 48° 30' 14'' W) da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, estado do Pará. Segundo a classificação de Köppen, a cidade de Belém possui o padrão climático Afi, com temperatura média anual de 25,9°C, variando entre 21 °C e 31,6 °C, com umidade relativa do ar de 84% e precipitação pluviométrica anual de 2.900 mm, com trimestre mais chuvoso entre os meses de janeiro e março (PEEL et al., 2007).

Para as observações fenológicas foram selecionados 21 indivíduos de *Q. amara*. A identificação botânica foi realizada no Laboratório de Botânica da Embrapa Amazônia Oriental, pela Dra. Silvane Tavares Rodrigues, e as exsicatas, encontram-se no Herbário IAN da mesma instituição. Foram realizadas avaliações diárias durante o período de janeiro de 2009 e dezembro de 2014. A duração das fenofases (floração e frutificação) foi anotada em fichas de campo e posteriormente tabuladas em planilhas, sendo caracterizadas pela média do período que ocorreu o fenômeno.

Os valores de precipitação e temperaturas foram obtidos por meio do banco de dados meteorológico da Estação Climatológica da Embrapa Amazônia Oriental, onde foram utilizadas as médias mensais acumuladas. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando a análise de variância (ANOVA) para comparar o número de dias das fenofases entre os meses do período avaliado.

As médias dos tratamentos foram comparadas a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott, relacionando-os posteriormente com a precipitação pluviométrica acumulada mensal.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições climatológicas de precipitação e temperatura para o período experimental de 2009 a 2014, mostraram que entre os meses de janeiro a maio houve as maiores precipitações pluviométricas acumuladas, destacando-se os meses de março (426mm) e abril (436mm), enquanto de agosto a dezembro ocorreram os maiores valores médios de temperatura (Figura 1).

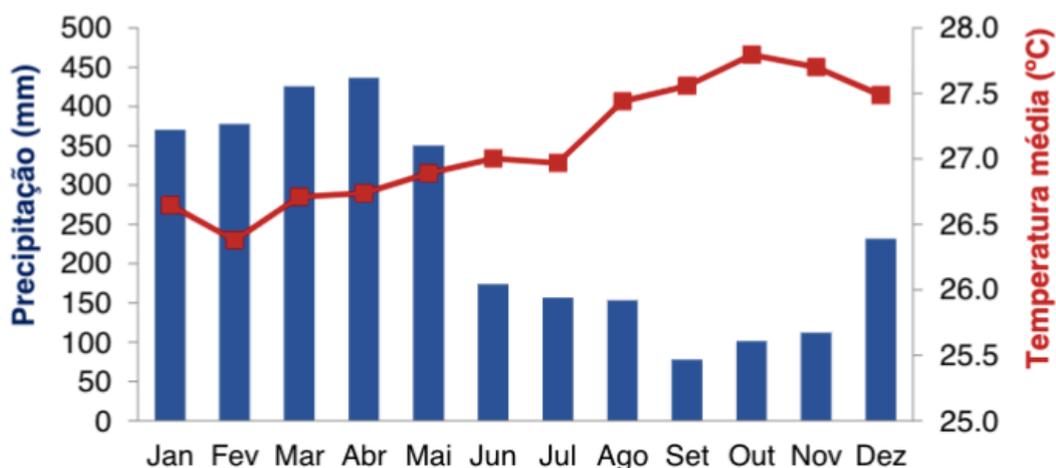


Figura 1. Variação mensal das condições climatológicas de precipitação e temperatura para o período experimental de 2009 a 2014. Belém, PA.

De acordo com Silva e Almeida (2017), as variações dos elementos meteorológicos precipitação pluviométrica e temperatura, a exemplo, são fatores limitantes para o crescimento, desenvolvimento e produtividade das espécies vegetais, sendo o seu efeito proporcional à duração e à intensidade das condições meteorológicas.

Análise de variância mostrou que houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) entre os meses do período de estudo para a fenofase frutificação da espécie e não significativo para a fenofase floração, apresentando um coeficiente de variação de 67,70% (Tabela 1).

Variável	GL	F	P
<b>Floração</b>			
Meses	11	0,628 <sup>ns</sup>	0,7917
C.V. (%)	61,27		
<b>Frutificação</b>			
Meses	11	2,853*	0,0102
C.V. (%)	67,7		

Tabela 1. Análise de variância (ANOVA) para as fenofases (floração e frutificação) de Q. amara.

CV: coeficiente de variação; GL: grau de liberdade; ns: não significativo pelo teste F; \* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; p: significância do teste aplicado.

Na Figura 2 observa-se que a espécie apresentou flores e frutos durante todos os meses durante o acompanhamento fenológico, sendo mais expressiva nos períodos de menores precipitações pluviométricas, onde o maior percentual de indivíduos florando (59%) foi registrado em agosto e indivíduos frutificando (52%) no mês de outubro. Pode-se inferir que em condições de precipitações menores as do estudo, a espécie pode apresentar comportamento semelhante, uma vez que ela apresenta sistema radicular mais profundo, suprimindo sua necessidade hídrica em camadas de

solo mais profundas.

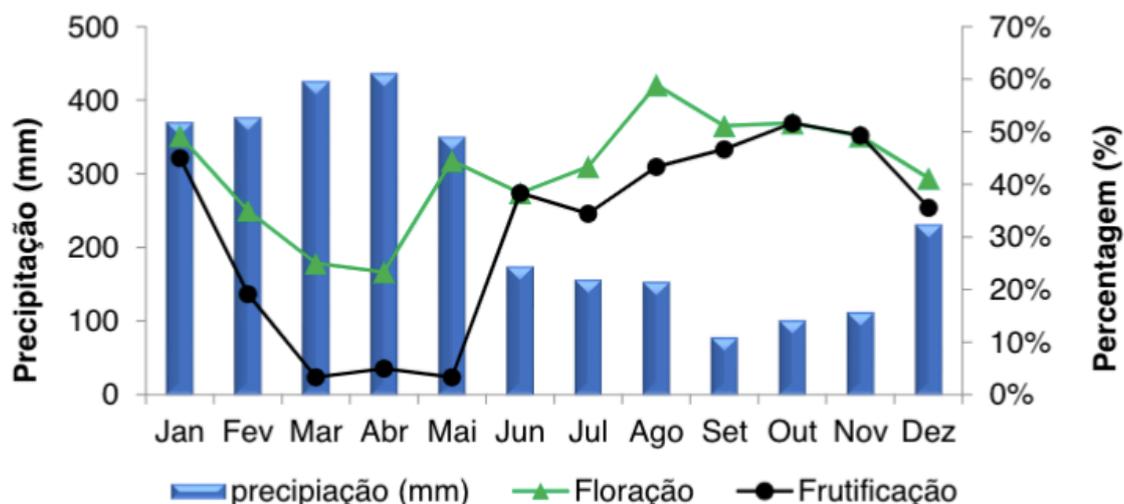


Figura 2. Médias mensais de precipitação para as fases reprodutivas de *Quassia amara* L., no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2014. Belém, PA.

A precipitação é um dos fatores abióticos que pode influenciar na floração e frutificação das plantas por afetar sua capacidade de produzir flores ou de afetarem os agentes polinizadores (RATHCKE; LACEY, 1985).

Estudos realizados por Freitas et al. (2015), indicaram que os maiores períodos de precipitação pluviométrica e transição seco/chuvoso afetam as fenofases floração e frutificação, respectivamente, como foi observado para as espécies *Dinizia excelsa* Ducke, *Peltogyne paradoxa* Ducke e *Goupia glabra* Aubl. Em contrapartida, Farias et al. (2015) trabalhando com a espécie *Aniba parviflora* (Meins.) no estado do Pará, verificaram que o período chuvoso foi o que mais influenciou na floração da espécie e o período seco na sua frutificação.

Lima e Rodal (2010), afirmam que algumas espécies não dependem essencialmente da precipitação pluviométrica para iniciar suas fenofases, pois estas apresentam características próprias de acúmulo de água e podem, inclusive, iniciarem sua floração no período hídrico menos favorável. Para Caradonna et al. (2014), a fenologia é um calendário sazonal de eventos biológicos considerado um dos mais fortes bioindicadores de alterações climáticas.

Quanto a temperatura, verificou-se maiores percentuais de floração e frutificação nos meses de agosto à outubro. As temperaturas mínimas mensais variaram entre 23,23°C e 23,91°C, e as máximas entre 31,4°C e 33,4°C, havendo pouca variação dentro de cada parâmetro meteorológico, tornando o clima mais seco nesse período (Figura 3).

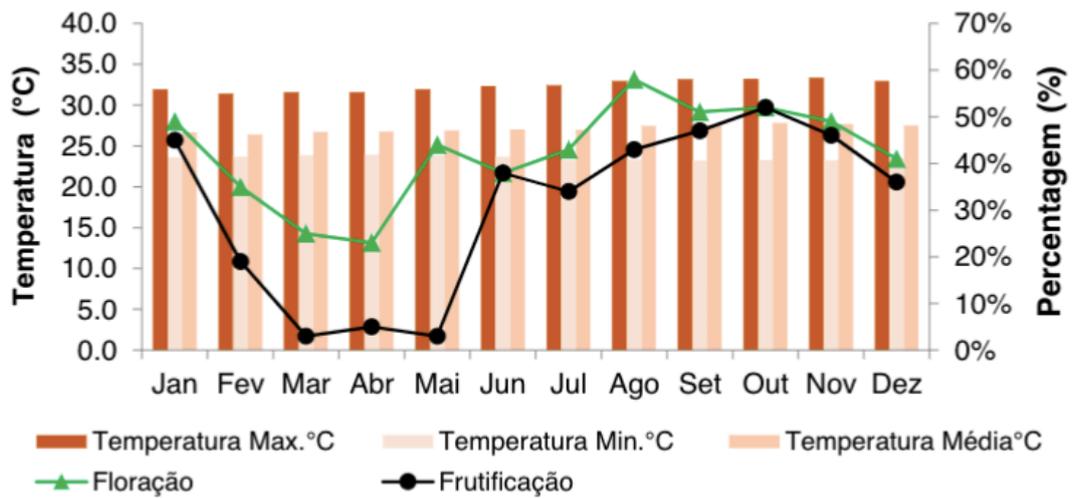


Figura 3. Médias mensais de temperatura para as fases reprodutivas de *Quassia amara* L., no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2014.

Valentini et al. (2013) estudando a fenologia da espécie arbórea *Siparuna guianensis* Aublet, que também ocorre na Amazônia, verificaram que a maior incidência de botões florais ocorreu no período seco e a intensa floração na transição entre o período seco e o chuvoso. Já o período de frutificação somente aconteceu no período chuvoso, fato este oposto ao que foi observado no presente estudo.

Por tratar-se de uma planta que possui uso medicinal, o conhecimento da ocorrência do seu padrão fenológico torna-se fundamental para a determinação do melhor momento de coleta de material vegetal para uso, no caso as folhas e a casca. Assim, principalmente as folhas coletadas, poderão estar com uma concentração muito baixa dessas substâncias o que consequentemente, prejudicaria o uso dessa parte do vegetal. Nesse trabalho foi observado que os meses de março e abril seriam os mais indicados para coleta de material vegetal para uso medicinal por apresentarem os menores dias com as fenofases de floração e frutificação.

#### 4 | CONCLUSÃO

A espécie *Q. amara* L. floresce e frutifica durante todo o ano, nas condições ambientais da área de estudo. A precipitação pluviométrica pode ser considerada como o fator climático que mais influencia na floração e frutificação da espécie, reforçando que a fenologia de uma espécie é dependente da variação dos fatores climáticos.

O período com maior índice de precipitação pluviométrica é o mais favorável para a coleta de folhas e casca para uso em manipulações medicinais, em virtude de apresentar menor ocorrência da presença desses eventos fenológicos.

#### REFERÊNCIAS

BERTANI, S.; HOUËL, E.; JULLIAN, V.; BOURDY, G.; VALENTIN, A.; STIEN, D.; DEHARO, E. **New findings on Simalikalactone D, an antimalarial compound from *Quassia amara* L.**

- (**Simaroubaceae**). *Experimental Parasitology*, v.130, n.4, p. 341-347, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.013>>.doi:10.1016/j.exppara.2012.02.013.
- CARADONNA, P. J.; ILER, A. M.; INOUE, D. W. **Shifts in flowering phenology reshape a subalpine plant community**. *Proceedings of the National Academy of Sciences, United States of America*, v.111, n. 13, p.4916-4921, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1323073111>>. doi: 10.1073/pnas.1323073111.
- FARIAS, V.D. da S.; COSTA, D.L.P.; SOUZA, P.J. de O.P. de; TAKAKI, A.Y.; LIMA, M.J.A. de. **Temperaturas basais e necessidade térmica para o ciclo de desenvolvimento do feijão-caupi**. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, v.11 n.21; p. 1781-1792, 2015
- FRANÇA I.S.X; SOUZA J.A; BAPTISTA R.S; BRITTO V.R.S. **Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais**. *Revista Brasileira Enfermagem*, v.61, n.2, p.201-8, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71672008000200009>>. doi.org/10.1590/S0034-71672008000200009.
- FREIRE, J.M.; AZEVEDO, M.C.; CUNHA, C.F. da; SILVA, T.F. da; RESENDE, A.S. de. **Fenologia reprodutiva de espécies arbóreas em área fragmentada de Mata Atlântica em Itaboraí, RJ**. *Pesquisa Florestal Brasileiro*, v.33, n.75, p.243-252, 2013. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/91393/1/PFB243-251.pdf>>. doi.10.4336/2013.pfb.33.75.454.
- FREITAS, J. da L.; SILVA, R. B. L.; CRUZ JÚNIOR, F. de O.; BARBOSA FILHO, M. N.; CANTUÁRIA, P. de C. **Fenologia reprodutiva de cinco espécies arbóreas em ecossistema de terra firme na Amazônia Brasileira**. *Biota Amazônia*, v. 5, n. 2, p. 38-44, 2015. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v5n2p38-44>>. doi. 10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v5n2p38-44
- LIMA, A.L.A.; RODAL, M.J.N. **Phenology and wood density of plants growing in the semi-arid region of northeastern Brazil**. *Journal of Arid Environments*, v. 74, n.11 p.1363- 1373. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2010.05.009>>. doi. 10.1016/j.jaridenv.2010.05.009.
- PIRANI, J.R.; THOMAS, W.W. 2015. **Simaroubaceae**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB1315>>.
- POSER, G.L.V; MENTZ, L.A. **Diversidade biológica e sistemas de classificação**. In: Simões M.O. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. 1 reimp. – Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/Ed. da UFSC, 2010. p.1104.
- RATHCKE, B.; LACEY, E. P. **Phenological patterns of terrestrial plants**. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Palo Alto, v. 16, p.179-214, Nov. 1985.
- SÁEZ, J.A.L.; SOTO, J.P. **Etnofarmacología y actividad biológica de *Quassia amara* (Simaroubaceae): Estado de la cuestión**. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v. 7, n. 5, p. 234–246, 2008.
- SANTOS R.L, GUIMARÃES G.P., NOBRE M.S.C, PORTELA A.S. **Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde**. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.13, n.4, p.486-91, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000400014>>.doi10.1590/S1516-05722011000400014.
- SCORIZA, R. N.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. **Influência da precipitação e temperatura do ar na produção de serapilheira em trecho de floresta estacional em sorocaba, SP**. *FLORESTA*, v. 44, n. 4, p. 687 - 696, 2014. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.5380/ufv.v44i4.34274>>. doi.org/10.5380/ufv.v44i4.34274.
- SILVA, T.J.J. DA.; ALMEIDA, F. F. DE. **Relações entre a variabilidade da precipitação pluviométrica e a produção agrícola no estado de Pernambuco entre 2000 e 2013**. *Revista*

Agropecuária Técnica, Areia-PB, v. 38, n. 1, p. 26-33, 2017 DOI: [dx.doi.org/10.25066/agrotec.v38i1.32402](https://doi.org/10.25066/agrotec.v38i1.32402)

STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. **Biodiversidade no Brasil**. In: Simões, C. M. O. et al. (ed.). Farmacognosia: Da planta ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 486.

VALENTINI, C.M.A.; ALMEIDA, J.D. DE.; COELHO, M. DE F. B.; RODRÍGUEZ-ORTÍZ, C. E. **Fenologia da *Siparuna guianensis* aublet em dois bosques de preservação ambiental em Cuiabá-MT**. Cerne, Lavras, v. 19, n. 4, p. 581-591, 2013. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-77602013000400008>>. doi.org/10.1590/S0104-77602013000400008.

## IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO RHINELLA (BUFONIDAE) DE OCORRÊNCIA NOS BIOMAS DO MEIO NORTE DO BRASIL

### **Sulamita Pereira Guimarães**

Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, Campus, São Luís/MA;

### **Aryel Moraes de Queiroz**

Mestrado em biodiversidade, Ambiente e Saúde da Universidade Estadual do Maranhão, Campus Caxias/MA;

### **Elmary da Costa Fraga**

Mestrado em biodiversidade, Ambiente e Saúde da Universidade Estadual do Maranhão, Campus Caxias/MA

### **Maria Claudene Barros**

Mestrado em biodiversidade, Ambiente e Saúde da Universidade Estadual do Maranhão, Campus Caxias/MA

**RESUMO:** Anfíbios do gênero *Rhinella*, pertencem a família Bufonidae e possuem 92 espécies distribuídas em todo o Texas, México, América Central, América do Sul, Japão, Nova Guiné, Austrália e muitas ilhas do Pacífico. A sistemática taxonômica das espécies deste gênero são discordantes ou pouco conclusivas. Este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar, por análise genética, as espécies do gênero *Rhinella* que ocorrem no Meio Norte do Brasil. Os espécimes foram obtidos através do método de amostragem em sítios reprodutivos. O DNA total foi extraído do tecido muscular usando o kit Promega Wizard

Genomic DNA Purification. O gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I foi amplificado utilizando primers específicos. As amostras foram sequenciadas usando o kit Big Dye em um sequenciador automático ABI Prism™ 3500. As sequências foram analisadas nos softwares Bioedit e MEGA e plotadas na plataforma BOLDSystems para obtenção da similaridade genética. Os dados genéticos revelaram a formação de dois complexos: Complexo marinha e complexo granulosa e cinco unidades taxonômicas: *Rhinella marina*, *Rhinella jimi*, *Rhinella diptycha*, *Rhinella granulosa* e *Rhinella mirandaribeiroi*. O complexo marinha alocando as espécies *R. marina*, *R. diptycha* e *R. jimi* e o complexo granulosa compreendendo as espécies *R. granulosa* e *R. mirandaribeiroi*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sapo-cururu, DNA mitocondrial, Sistemática

### MOLECULAR IDENTIFICATION SPECIES OF RHINELLA GENUS (BUFONIDAE) THAT OCCUR IN THE NORTH BIOMES FROM BRAZIL

**ABSTRACT:** Amphibians from the genus *Rhinella* are part of the family Bufonidae. They comprise 92 species distributed along the Texas, Mexico, Central and South America, Japan, New Guinea, Australia and some Pacific Islands. Until

now the systematics and taxonomy for these species are discordant or inconclusive. Here we aim to identify and characterize through genetic tools the species of *Rhinella* occurring in the middle-north of Brazil. We collected the specimens in their reproductive sites. The total DNA was extracted from the muscle tissue by using Promega Wizard Genomic DNA Purification kit. The mitochondrial gene Cytochrome C Oxidase subunit I was amplified by using specific primers. The samples were sequenced by using Big Dye kit in an automatic DNA sequencer ABI Prism™ 3500. After that the sequences were analysed in Bioedit and Mega softwares and included in the BOLDSystems platform for comparisons about genetic similarities. Our results showed the formation of two complex of species: *Rhinella marina* and *Rhinella granulosa* group of species. Five taxonomic units were recognized: *Rhinella marina*, *Rhinella jimi*, *Rhinella diptycha*, *Rhinella granulosa* e *Rhinella mirandaribeiroi*. The *R. marina* complex formed by *R. marina*, *R. diptycha* and *R. jimi*; while *R. granulosa* was formed by *R. granulosa* and *R. mirandaribeiroi*.

**KEYWORDS:** Cururu toad, mitochondrial DNA, Systematic.

## 1 | INTRODUÇÃO

Anfíbios do gênero *Rhinella*, pertencem a família Bufonidae e apresentam sapos distribuídos amplamente em todo o Texas, México, América Central, América do Sul, Japão, Nova Guiné, Austrália e muitas ilhas do Pacífico. Atualmente o gênero compreende 92 espécies, destas 62 são oriundas do Brasil (SBH, 2016; FROST, 2019). Devido a uma sistemática pouco esclarecida e principalmente por uma insuficiência de dados morfológicos, acústicos e ecológicos concretos o gênero *Rhinella* tem sofrido várias realocações nos níveis inter e intraespecíficos, discussões tem sido realizada quanto ao real status taxonômicos de determinadas espécies dentro de complexos do gênero (FROST et al. 2006).

A região Meio Norte do Brasil é considerada uma área de transição entre os biomas Amazônico, Cerrado e Caatinga, formando áreas de ecótonos, Amazônia/Cerrado e Cerrado/Caatinga. Nessas áreas há constante contato entre diferentes comunidades ecológicas e suas interações, sendo abundante nesse tipo de ecossistema espécies provenientes dos biomas que o formam ou até mesmo espécies endêmicas. Para esta região de estudo há registro de 20 espécies de *Rhinella* (FROST, 2019), contudo, muitas de suas espécies estão representadas por complexos de espécies, evidenciando uma problemática taxonômica para este gênero.

Os aspectos da variação morfológica sempre foram incorporados na taxonomia de anuros, mais recentemente a resolução taxonômica tem combinado dados morfológicos com diversificação genética para elucidar, por exemplo, a diversificação de linhagens nas espécies crípticas (ORTEGA-ANDRADE et al. 2015; CLEMENTE-CARVALHO et al. 2016).

O uso de marcadores moleculares tem mostrado resultados importantes em

estudos que envolvem padrões de variação genética, estrutura de populações, filogenia, filogeografia, sistemática e identificação de espécies (PEREYRA et al. 2015; ACEVEDO et al. 2016).

Genes individuais do genoma mitocondrial vêm sendo utilizados como marcadores, com a finalidade de fazer inferências sobre as características de uma população, tais como variabilidade, padrões de migração, seleção e deriva genética. Evolutivamente o genoma mitocondrial possui conteúdo genético conservado e com elevada taxa evolutiva, e é uma importante ferramenta na resolução de incertezas taxonômicas (ARIAS et al. 2003).

A identificação genética de espécies via DNA por Barcode foi proposto por Hebert et al. (2003). Essa técnica é uma ferramenta de apoio à sistemática, baseando-se na sequência do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) localizado no DNA mitocondrial, sendo um sistema “bioidentificador”, pois possui divergências intraespecíficas menores que as interespecíficas funcionando como um bom marcador molecular apresentando um código de barra único para cada espécie (HEBERT et al. 2003; SILVA et al. 2012). O DNA Barcode é utilizado em grande escala como um método de rotina para auxiliar na identificação de espécies de vertebrados e tem sido proposto como marcador universal de espécies (HENRIQUES, 2010; CAMINER; RON, 2014).

A identificação ao nível molecular via essa técnica, mostra uma excelente opção para confirmar a sistemática clássica, principalmente em espécies de difícil identificação por meio da observação de características morfológicas. O uso do barcode tem mostrado resultados positivos tanto em casos de gêneros, como para espécies cuja taxonomia pode ser duvidosa. Além de mostrar divergências genéticas entre espécies geograficamente distintas, revelando mecanismos de manutenção de populações (TRESBACH et al., 2015).

O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade críptica dos complexos *Rhinella marina* e *Rhinella granulosa* a fim de identificar e caracterizar, por análise genética, as espécies do gênero *Rhinella* que ocorrem nos biomas do Meio-Norte do Brasil.

## 2 | MATERIAL DE MÉTODOS

As coletas foram realizadas em vários pontos dos três biomas presentes na área de estudo: Amazônia, Cerrado e Caatinga compreendendo os estados do Pará, Maranhão e Piauí. Para a coleta foi utilizado a metodologia de amostragem em sítios reprodutivos (HEYER et al. 1994).

Os espécimes foram alocados em sacos plástico, transportados ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão – CESC/UEMA, onde foram fotografados, ortotanasiados por superdosagem de anestésico contendo Cloridrato de Lidocaína 2% e registrados os seguintes dados: data, tipo de coleta, gênero, espécie. Amostras

de tecido muscular foram coletadas dos membros inferiores e fígado, que foram armazenadas em microtubos contendo álcool 70%. Após este procedimento os espécimes foram fixados em formol a 10% e após 48 horas retirados e fixados em álcool 70% e armazenados apropriadamente em recipientes de vidro ou plástico. A identificação morfológica dos espécimes coletados foi realizada com auxílio de bibliografia especializada (e.g. STEVAUX, 2002; PRAMUK, 2006; KWET et al. 2007; MACIEL et al. 2007; NARVAES; RODRIGUES, 2009; FROST, 2019).

O DNA total foi isolado a partir de tecido muscular, utilizando-se o kit Promega Wizard Genomic DNA Purification, com protocolo específico. O isolamento e amplificação das regiões genômicas, foram realizados pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando-se primers específicos para o gene Citocromo oxidase subunidade I (M13F-AnF1/M13R-AnR1-Mariana Lira, com pessoal). Os produtos de PCRs purificados foram sequenciados utilizando-se o método didesoxiterminal (SANGER et al. 1977), usando o kit Big Dye em um sequenciador automático de DNA, ABI Prism™ 3500. As amostras obtidas para o gene COI foram plotadas na plataforma bioinformática BOLD (The *Barcode of Life Data Systems* – URL: <http://www.boldsystems.org/>.) para verificar a similaridade genética das espécies (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

Os softwares Bioedit 7.0.5.3 (HALL, 1999) e MEGA 7.0 (KUMAR et al., 2016) foram usados para edição, alinhamento das sequencias e obtenção das árvores filogenéticas e matriz de distância respectivamente. A significância dos agrupamentos foi estimada pela análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) e uma sequência do genbank, DQ502739.1, *Melanophryniscus klappenbachi*, foi adicionada ao banco de dados como grupo externo.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi sequenciados um fragmento de 589 pb do gene COI, sendo 447 sítios conservados, 142 variáveis e 94 informativos para parcimônia. O grau de similaridade na plataforma BOLDsystems mostra a identificação genética para as espécies *Rhinella jimi*, *Rhinella diptycha*, *Rhinella marina*, *Rhinella mirandaribeiroi* e *Rhinella granulosa* (Tabela 1).

Identificação Morfológica	Identificação BOLDSystems	Similaridade (%)	BIOMAS
<i>R. jimi</i>	<i>R. jimi</i>	100	Caatinga
<i>R. diptycha</i>		99,82	
<i>R. jimi</i>		99,47	Cerrado
<i>Rhinella</i> sp.		100	Amazônia
<i>Rhinella</i> sp.		100	
<i>Rhinella</i> sp.		99,64	
<i>Rhinella</i> sp.		99,47	Cerrado
<i>Rhinella</i> sp.		<i>R. diptycha</i>	99,63
<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. Jimi</i>	99,29	
<i>Rhinella</i> sp.		99,82	
<i>Rhinella</i> sp.		99,47	Cerrado
<i>Rhinella</i> sp.		99,64	Caatinga
<i>Rhinella</i> sp.		99,47	Amazônia
<i>Rhinella</i> sp.		99,47	
<i>Rhinella</i> sp.	99,47		
<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. marina</i>	99,47	Amazônia
<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. jimi</i>	99,29	
<i>R. jimi</i>		99,29	
<i>R. jimi</i>		99,64	Cerrado
<i>R. jimi</i>		99,29	
<i>R. jimi</i>		99,64	Caatinga
<i>R. diptycha</i>		<i>R. diptycha</i>	
<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. granulosa</i>	99,82	Cerrado
<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. mirandaribeiroi</i>	99,47	

**Tabela 1.** Similaridade obtidas para as espécies do gênero *Rhinella* de ocorrência no Meio Norte do Brasil na plataforma BoldSystems.

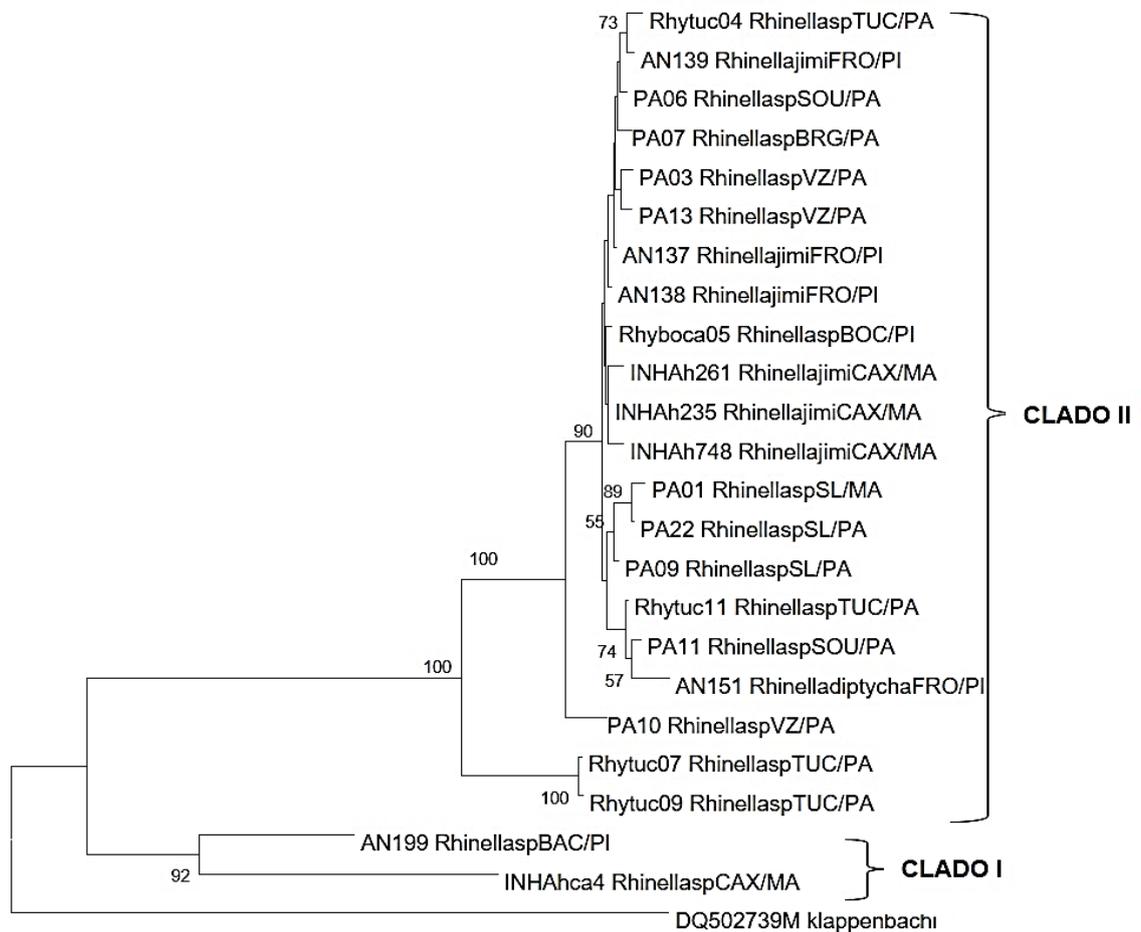
A matriz de divergência genética mostrou uma variação interespecífica de 0,2 a 22,2% evidenciando, portanto mais de uma unidade taxonômica para o gênero. As espécies pertencentes ao complexo marina revelou uma divergência que variou de 0,2 a 7,1 %. No entanto foram evidenciadas duas unidades taxonômicas para este complexo, pois a divergência interespecífica de *R. jimi* e *R. diptycha* variou de apenas 0,2 a 3,4% por outro lado foi encontrado uma divergência dentro do complexo marina com variação de 6,1 a 7,1%. Estes dados indicam que geneticamente, no mínimo há duas unidades evolutivas independentes, isto é a ocorrência de no mínimo duas espécies no complexo marina: *R. diptycha/jimi* e *R. marina* (Tabela 2). Entre o complexo granulosa foi evidenciado uma divergência de 10,2% evidenciando assim como no bold systems duas espécies *R. granulosa* e *R. mirandaribeiroi*.

ESPÉCIES	DIVERGÊNCIA GENÉTICA																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1.AN137_RhinellajimiFRO/PI	-																							
2.AN138_RhinellajimiFRO/PI	0,2																							
3.PA01_RhinellaspSL/MA	1,6	1,4																						
4.PA03_RhinellaspVZ/PA	0,5	0,7	1,4																					
5.PA06_RhinellaspSOU/PA	0,3	0,5	1,2	0,5																				
6.PA07_RhinellaspBRG/PA	0,5	0,7	1,4	0,7	0,5																			
7.PA09_RhinellaspSL/PA	0,7	0,5	0,9	1,2	1,1	1,2																		
8.PA10_RhinellaspVZ/PA	1,9	2,1	2,8	2,1	1,9	2,1	2,3																	
9.PA11_RhinellaspSOU/PA	1,1	1,2	1,4	1,6	1,4	1,2	1,1	2,7																
10.PA13_RhinellaspVZ/PA	0,3	0,5	1,9	0,5	0,7	0,9	1,1	2,3	1,4															
11.PA22_RhinellaspSL/PA	1,2	1,0	0,3	1,0	1,2	1,4	0,5	2,5	1,4	1,6														
12.Rhyboca05_RhinellaspBOC/PI	0,5	0,3	1,0	0,7	0,5	0,7	0,5	1,8	1,2	0,9	0,7													
13.Rhytuc04_RhinellaspTUC/PA	0,7	0,9	1,9	0,9	0,7	0,9	1,4	2,3	1,8	1,1	1,6	0,9												
14.Rhytuc07_RhinellaspTUC/PA	6,1	6,3	7,1	6,7	6,5	6,3	6,5	5,9	6,1	6,5	7,1	6,3	6,9											
15.Rhytuc09_RhinellaspTUC/PA	6,3	6,5	6,9	6,5	6,3	6,1	6,7	5,7	6,3	6,7	6,9	6,1	6,7	0,2										
16.Rhytuc11_RhinellaspTUC/PA	0,7	0,9	1,6	1,2	1,1	1,2	0,7	2,3	0,3	1,1	1,2	0,9	1,4	6,1	6,3									
17.INHAh261_RhinellajimiCAX/MA	0,7	0,5	1,6	1,2	1,1	1,2	0,7	2,3	1,4	1,1	1,2	0,5	1,4	6,1	6,3	1,1								
18.INHAh235_RhinellajimiCAX/MA	0,3	0,2	1,2	0,9	0,7	0,9	0,3	1,9	1,1	0,7	0,9	0,2	1,1	6,1	6,3	0,7	0,3							
19.INHAh748_RhinellajimiCAX/MA	0,7	0,5	1,6	1,2	1,1	0,9	0,7	2,3	1,4	1,1	1,2	0,5	1,4	6,5	6,7	1,1	0,7	0,3						
20.AN139_RhinellajimiFRO/PI	0,5	0,7	1,8	0,7	0,5	0,7	1,2	2,1	1,6	0,9	1,4	0,7	0,5	6,7	6,5	1,2	1,2	0,9	1,2					
21.AN151_RhinelladiptychaFRO/PI	1,8	1,9	1,9	1,6	2,1	1,9	1,8	3,4	1,1	1,8	1,9	1,9	2,5	6,9	7,1	1,1	2,1	1,8	2,1	2,1				
22.AN199_RhinellaspBAC/PI	17,5	17,5	18,9	17,7	18,0	17,7	18,1	17,0	17,9	17,5	18,9	18,0	18,4	18,2	18,4	17,9	17,7	17,7	18,2	18,1	18,4			
23.INHAhca4_RhinellaspCAX/MA	21,0	21,0	22,5	21,8	21,6	21,3	21,2	20,7	21,5	21,6	21,9	21,0	21,8	20,9	21,2	21,0	20,7	20,7	20,7	21,5	22,2	10,2		
24.DQ502739M_klappenbachi	28,4	28,1	28,9	28,7	28,7	28,1	28,7	29,1	28,1	28,4	29,2	28,7	29,3	26,6	26,9	28,8	29,0	28,4	28,4	29,2	29,2	23,8	24,6	-

FRO = Fronteira; SL = São Luís; VZ = Vizeu; SOU = Soure; BRG = Bragança; BOC = Bocaina; TUC = Tucuruí; CAX = Caxias; BAC = Baixa da Carnaúba

**Tabela 2.** Divergência nucleotídica utilizando o modelo Tamura 3- parâmetro para haplótipos do gênero *Rhinella* do Meio Norte do Brasil, com base em sequências do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COIFRO = Fronteira; SL = São Luís; VZ = Vizeu; SOU = Soure; BRG = Bragança; BOC = Bocaina; TUC = Tucuruí; CAX = Caxias; BAC = Baixa da Carnaúba)

As árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia (MP) e Agrupamento de Vizinhos (NJ) mostraram topologias similares, formando dois clados, um clado com as espécies do complexo granulosa: *R. mirandariberoi* e *R. granulosa* representada por *Rhinella* sp (clado I) e o clado II foi formado pelo complexo marina compreendendo as espécies *Rhinella* sp (representando a espécie *R. marina*) e *R. diptycha/jimi* (Figura 1).



**Figura 1.** Árvore filogenética obtida pela abordagem de agrupamento de vizinhos (NJ) usando o algoritmo Tamura-3 Parâmetro para as espécies do gênero *Rhinella* do Meio Norte do Brasil, com base no gene COI.

O gene COI por possuir uma taxa evolutiva rápida, tem sido usado para identificar espécies, assim como, auxiliar na descoberta de espécies crípticas (XIA et al., 2012). Neste estudo o grau de similaridade genética foi corroborado no que se refere a identificação das espécies *R. jimi*, *R. diptycha*, *R. marina*, *R. granulosa* e *R. mirandaribeiroi*, onde os valores de similaridade mostraram-se significativos para cada espécie, pois quando se considera Rubinoff (2006) este afirma que para identificar espécies via DNA *Barcode* é necessária uma estimativa percentual maior que 99% de similaridade a uma sequência de referência, valor este encontrado neste estudo (veja tabela 1).

A matriz de divergência genética mostrou uma variação baixa entre os espécimes de *R. diptycha* e *R. jimi* (alcançando apenas 3,4%) corroborando com os achados de Cunha (2016) em estudo com essas espécies que observou padrões semelhantes em áreas de cerrado, onde dados genéticos mostraram *R. jimi* compartilhando alelos típicos de *R. diptycha* em um ou mais loci.

De acordo com Tresbach et al. (2015) a identificação ao nível molecular com o uso da técnica de código de barras de DNA mostra uma excelente opção para confirmar a sistemática clássica, principalmente em espécies e/ou gêneros de difícil identificação por meio da observação de características morfológicas. Nesse estudo

foi possível elucidar a identificação das espécies que estavam sem definição (*Rhinella* sp) e ainda demonstrar pela divergência genética e na árvore filogenética, clado II, o agrupamento das espécies *R. diptycha*, *R. jimi* e *R. marina* confirmando assim essas espécies como do complexo marina. E as espécies *R. granulosa* e *R. Mirandaribeiroi* formando o complexo granulosa.

#### 4 | CONCLUSÃO

Os dados evidenciam, portanto, dois complexos para o gênero *Rhinella* do Meio Norte do Brasil: Complexo marina e Complexo granulosa. No qual o complexo marina compreende as espécies *R. diptycha*, *R. jimi* e *R. marina* e o complexo granulosa com as espécies *R. granulosa* e *R. mirandaribeiroi*.

#### REFERENCIAS

- ACEVEDO, A. A.; LAMPO, M.; CIPRIANI, R. **The cane or marine toad, *Rhinella marina* (Anura, Bufonidae): two genetically and morphologically distinct species.** Zootaxa, 4103 (6): 574-586. 2016.
- ARIAS, M.E.; ARENAS, M.; RODRIGUEZ, J.; SOLIVERI, J.; BALL, A.S.; HERNANDEZ M. **Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335.** Appl Environ Microbiol. 2003.
- CAMINER, M.A.; RON, S.R. **Systematics of treefrogs of the *Hypsiboas calcaratus* and *Hypsiboas fasciatus* species complex (Anura, Hylidae) with the description of four new species.** ZooKeys 370: 1-68, 2014.
- CLEMENTE-CARVALHO, R.B.G; PEREZ, S.I.; TONHATTI, C.H.; CONDEZ, T.H.; SAWAYA, R.J.; HADDAD, C.F.B; dos REIS, S.F. **Boundaries of morphological and molecular variation and the distribution range of a miniaturized froglet, *Brachycephalus nodoterga* (Anura: Brachycephalidae).** Journal of Herpetology 50:169-178. 2016.
- CUNHA, D. B. **Caracterização Genética e morfológica de espécies de sapos *Rhinella marina*, *R. diptycha* e *R. jimi* (Anura: Bufonidae):** Estudo de zona híbrida. 2016. Tese (Doutorado - Programa Biologia Animal) - Universidade Federal do Pará, Pará. 2016.
- FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.** Evolution. 1985.
- FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an Online Reference.** Version 6.0. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA, 2019. (Acesso em fevereiro de 2019)
- FROST, D.R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R.H.; HAAS A.; HADDAD, C.F.B.; DE SÁ, R.O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S.C.; RAXWORTHY, C.J.; CAMPBELL, J.A.; BLOTTO, B.L.; MOLER, P.; DREWES, R.C.; NUSSBAUM, R.A.; LYNCH, J.D; GREEN, D.M.; WHEELER W.C. **The Amphibian Tree of Life.** Bulletin of the american museum of natural history Number 297, 370 pp., 71 2006.
- HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT Nucleic Acids Symposium Series.** 1999.

- HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; e DEWAARD, J.R. **Biological identifications through DNA barcodes**. Proceedings of the Royal Society of London, v.270, n.1512, p.313-321, 2003
- HENRIQUES, J.M. **Identificação molecular (DNA Barcorde) dos peixes pertencentes a Bacia do rio Ribeira de Iguape e dos Rios Costeiros do estado de São Paulo**. 105f. Dissertação (mestrado Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências. Botucatu. 2010.
- HEYER, W.R.; DONNELLY, M.A.; MCDIARMID, R.W.; HAYEK, L.C. E FOSTER, M.S. **Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for Amphibians**. Smithsonian Institution Press, Washington, 1994.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. **Mega 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Vesion 7.0 for Bigger Dataset**. Molecular Biology and Evolution. 2016.
- KWET, A.; DI-BERNARDO, M. E.; MANEYRO, R. **First record of *Chaunus achavali* (Anura, Bufonidae) from Rio Grande do Sul, Brazil, with a key for the identification of the species in the *Chaunus marinus* group**. 2007.
- MACIEL, N.M.; BRANDÃO, R.A.; CAMPOS, L.B.; SEBEN, A. **A large new species of *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from Cerrado of Brazil**. Zootaxa 1627: 23-39.2007.
- NARVAES, P.; RODRIGUES, M.T. **Taxonomic revision of *Rhinella granulosa* species group (Amphibia, Anura, Bufonidae), with a description of a new species**. 2009.
- ORTEGA-ANDRADE, H. M.; ROJAS-SOTO, O. R.; VALENCIA, J. H.; DE LOS MONTEROS, A. E.; MORRONE, J. J.; RON, S. R.; CANNATELLA, D. C. **Insights from integrative systematics reveal cryptic diversity in *Pristimantis* frogs (Anura: Craugastoridae) from the Upper Amazon Basin**. PloS ONE, v. 10, p.e 0143392, 2015.
- PEREYRA, M.O.; BALDO, D.; BLOTTO, B.L.; IGLESIAS, P.P.; THOMÉ, M.T.C.; HADDAD, C.F.B; BARRIO-AMORÓS, C.; IBÁÑEZ, R.; FAIVOVICH, J. **Phylogenetic relationships of toads of the *Rhinella granulosa* group (Anura: Bufonidae): a molecular perspective with comments on hybridization and introgression**. Cladistics, 1-18. 2015.
- PRAMUK, J.B. **Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence**. 2006.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. **BOLD: The Barcode of Life Data System** ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). Molecular Ecology Notes 7, 355–364. 2007.
- RUBINOFF, D. **Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation**. Conservation Biology. 2006.
- SANGER, F.; NICHLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain termination inhibitors**. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1977.
- SBH (Sociedade Brasileira de Herpetologia). **Lista oficial de espécies de anfíbios do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Disponível em [www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm](http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm) (acessado em janeiro de 2016).
- SILVA, S.A.; KAVALCO, K.F.; PAZZA, R. **Uso do sequenciamento de genes mitocondriais na identificação de files de salmão**. Evolução e Conservação da Biodiversidade. 2012.
- STEVAUX, M.N. **A new species of Bufo Laurenti (Anura, Bufonidae) from northeastern Brazil**. 2002.

TRESBACH, H. R.; CERQUEIRA, M. N.; MEDEIROS, R.S. et al. **DNA Barcoding: uma ferramenta de apoio molecular para identificação de espécies de peixes.** Scientia Agraria Paranaensis – SAP; ISSN: 1983-1471 v. 14, n. 2, abr./jun., p. 77-81, 2015.

XIA, Y.; HAI-FENG, G.; PENG, R.; CHEN, Q.; ZHENG, Y.; MURPHY, R.W.; ZENG, X.M. **COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae).** Molecular Ecology Resources. 2012.

## INCIDÊNCIA DE ESPINHA BÍFIDA NO ESTADO DO MARANHÃO, PRÉ- E PÓS-FORTIFICAÇÃO DE FARINHAS COM ÁCIDO FÓLICO

### Rômulo Cesar Rezzo Pires

Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão em Enfermagem (NIPE) da Faculdade do Maranhão (FACAM), São Luís - Maranhão

### Vanalda Costa Silva

Escola Técnica do SUS, São Luís - Maranhão

### Beatriz Fernanda Santos da Silva

Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão em Enfermagem (NIPE) da Faculdade do Maranhão (FACAM), São Luís - Maranhão

**RESUMO:** A espinha bífida (EB) é o defeito do tubo neural mais comum. O uso de ácido fólico (AF), através da fortificação compulsória de farinhas parece exercer efeito protetor na incidência de tais defeitos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da fortificação das farinhas de trigo e milho com AF no estado do Maranhão na prevenção da EB. Realizou-se um estudo com os casos notificados de espinha entre nascidos vivos no estado do Maranhão entre 2000 e 2008. Foram contabilizadas as frequências de espinha bífida. O efeito da fortificação pelo AF foi avaliado pelo *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% a partir da incidência depois (2005-2008) e antes da fortificação (2000-2003). Durante o período de estudo nasceram vivas 968714 crianças, das quais 43 apresentaram EB (4.43 casos por 100 mil nascidos vivos). A partir do ano 2004 houve

diminuição não significativa na incidência de EB no estado do Maranhão até 2007, ano com menor coeficiente. A suplementação com AF não diminuiu de forma significativa a incidência de espinha bífida no estado do Maranhão (OR=1.01, IC<sub>95%</sub> 0.56-1.86, p=0.92) no período estudado. Apesar do comprovado efeito deste tipo de fortificação na maioria dos países e estados brasileiros, outros fatores devem ser considerados em sua etiologia, tais como as elevadas taxas de insegurança alimentar apresentadas pelo estado no período. Dessa forma, a investigação de fatores socioeconômicos, ambientais e nutricionais poderia contribuir para compreensão da etiologia da EB no estado do Maranhão.

**PALAVRAS-CHAVE:** Espinha bífida, Ácido fólico, Epidemiologia

### SPINA BIFIDA INCIDENCE IN THE STATE OF MARANHÃO, PRE- AND POST-FORTIFICATION OF FLOUR WITH FOLIC ACID

**ABSTRACT:** Spina bifida (SB) is the most common defect of the neural tube. The use of folic acid (FA), through mandatory fortification of flour appears to have a protective effect on the incidence of such defects. The aim of this study was to evaluate the effect of flour fortification of

wheat and corn with FA in the state of Maranhão in preventing SB. We conducted a study of reported cases of spine between live births in the state of Maranhão between 2000 and 2008 were accounted for the spina bifida frequencies. The effect of fortification by FA was evaluated by odds ratio (OR) with 95% confidence interval from the reserve later (2005-2008) and before fortification (2000-2003). During the study period they were born alive 968,714 children, of whom 43 had SB (4:43 cases per 100,000 live births). From the year 2004 there was no significant decrease in the incidence of SB in the state of Maranhão until 2007, with lower coefficient. The FA supplementation did not reduce significantly the incidence of spina bifida in the state of Maranhão (OR = 1.01 95% CI 0.56-1.86, p = 0.92) during the study period. Despite the proven effect of this type of fortification in most countries and Brazilian states, other factors must be considered in its etiology, such as the high rates of food insecurity brought by the state in the period. Thus, the investigation of socioeconomic, environmental and nutritional factors could contribute to understanding the etiology of SB in the state of Maranhão.

**KEYWORDS:** Spina bifida, Folate, Epidemiology.

## 1 | INTRODUÇÃO

Defeitos do tubo neural (DTN) são malformações congênitas complexas comuns do sistema nervoso central que resultam de falha de fechamento do tubo neural entre a terceira e quinta semana da embriogênese (AU; ASHLEY-KOCH; NORTHRUP, 2010).

A prevalência dos DTN varia de 1 a 10 por mil nascimentos, dependendo da região geográfica e grupo étnico, o que os torna uma das malformações mais frequentes (AU; ASHLEY-KOCH; NORTHRUP, 2010).

Espinha bífida (EB) é o DTN mais prevalente na América e no Brasil, com uma prevalência estimada de 1.5:1000 nascimentos (CASTILLA; ORIOLI, 1985, NAZER ET AL., 2001).

No Brasil, o efeito protetor da fortificação de farinhas com ácido fólico foi da ordem de 39%. Entretanto, nem todos os estados apresentaram este efeito (ORIOLI et al., 2011).

Levando-se em consideração as diferenças regionais no consumo de ácido fólico (FERREIRA; GIUGLIANI, 2008) e a escassez de estudos epidemiológicos sobre a efetividade da fortificação de farinhas, avaliou-se seu possível efeito protetor no estado do Maranhão.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da fortificação de farinha de milho e trigo com ácido fólico no estado do Maranhão e identificar os fatores maternos que afetam o padrão de ocorrência da espinha bífida no Maranhão.

## 2 | METODOLOGIA

Realizou-se um estudo com delineamento ecológico transversal descritivo e

comparativo para estimar a prevalência de espinha bífida (EB) em dois intervalos de 04 anos: (2000-2003) e (2005-2008), com ano mediano 2004 (ano da fortificação de farinhas), designados respectivamente de período pré-fortificação e pós-fortificação de farinhas com ácido fólico. O período total do estudo compreendeu os anos de 2000 a 2012, o qual serviu de suporte para a análise de tendência temporal.

O estudo foi compreendido por todos os casos de espinha bífida (Q05), que inclui meningocele e mielomeningocele da Décima Classificação Internacional de Doenças (CID-10). Os dados foram obtidos pelo Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC) da Secretaria de Estado da Saúde, disponíveis *online* e tabulados no *software* TabWin 32 (Departamento de Informática do SUS (DATASUS)).

A prevalência de EB para o estado do Maranhão foi calculada, dividindo-se o número de casos de EB entre nascidos vivos pelo total de crianças nascidas vivas nos períodos antes e após a fortificação das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico (por mil nascidos vivos).

A prevalência de EB no estado foi analisada segundo características maternas, por período (antes e após a fortificação). As variáveis maternas estudadas foram: idade (anos), escolaridade (anos), número de consultas pré-natal e duração da gestação (semanas).

A força de associação entre as variáveis estudadas foi medida pelo *Odds ratio* (OR) e seus respectivos intervalos de 95% de confiança (IC95%) com o uso do *software Bioestat 5.0*.

A análise de tendência na incidência de EB foi realizada pela análise de regressão por seleção do ajustamento de curvas, considerando-se como melhor modelo, aquele com maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e nível de significância de 5%.

Optou-se por utilizar a variável de forma centralizada ( $X - 2006$ ), já que o ano de 2006 é o ponto médio da série histórica, evitando, assim, a auto-correlação entre os termos da equação de regressão. Neste caso o modelo estimado é  $Y = \beta_0 + \beta_1 (X - 2006)$ , onde  $Y$ = incidência de EB em nascidos vivos, o  $\beta_0$ = coeficiente médio no período,  $\beta_1$ = incremento médio anual e  $X$ = ano calendário.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve oscilação nos coeficientes de incidência por EB ao longo dos 13 anos de estudo (Figura 1). Até 2004 a tendência foi de aumento. Após este ano, os coeficientes de incidência por EB diminuíram até 2007, em seguida voltaram a aumentar até a incidência máxima de 0.12 por mil NV no ano de 2011.

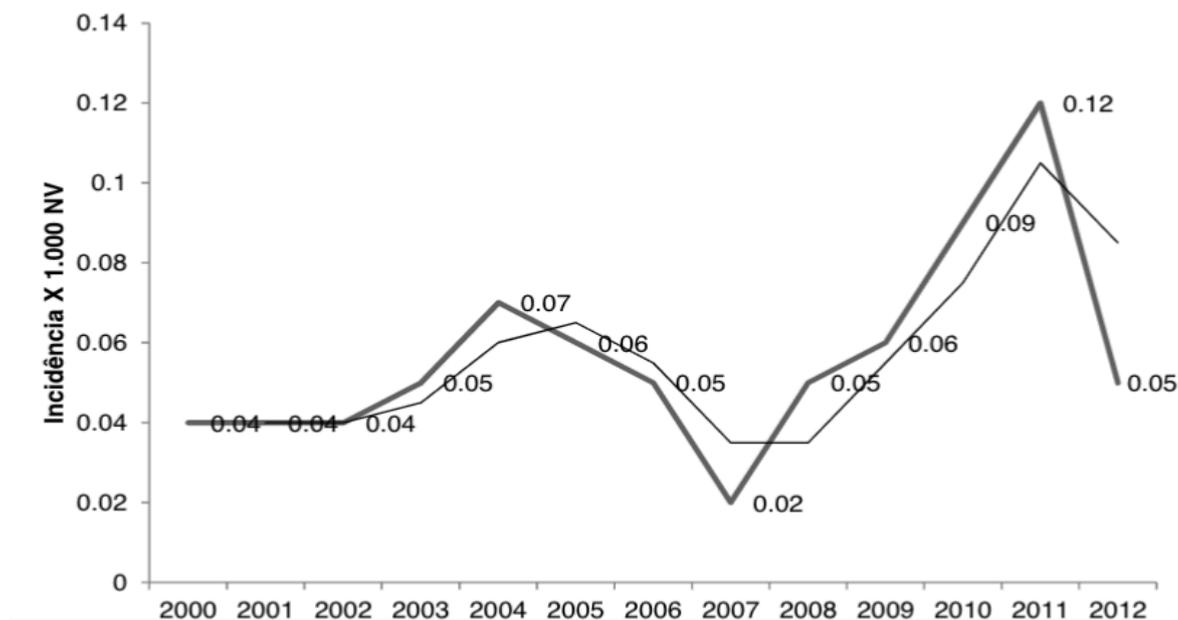


Figura 1. Evolução dos casos de EB no estado do Maranhão (2000-2012).

Fonte: SINASC/DATASUS/MS

Orioli et al (2011) estudaram a evolução na incidência de EB no Brasil comparando o ano de 2004 e 2006 (pós-fortificação) e seus achados mostraram redução na ordem de 39% na incidência de espinha bífida em 2006. Quando os dados foram ajustados por nascimentos para cada estado, a redução foi ainda maior (40%). Apesar desta redução, apenas cinco estados apresentaram decréscimo significativo na ocorrência de espinha bífida após a fortificação de farinhas com ácido fólico, a saber: Minas Gerais, Pernambuco, Paraná, São Paulo e Alagoas. O estado da Bahia mostrou aumento significativo na prevalência de EB no ano de 2006.

As explicações para estas diferenças devem ser avaliadas com cautela, mas o estado do Maranhão possui indicadores insatisfatórios de segurança alimentar. Desse modo, a baixa escolaridade, aliada a condições de insegurança alimentar poderiam em parte explicar a ausência de efeito protetor da fortificação de farinhas com ácido fólico. Isto não descarta a investigação de fatores ambientais, tais como a presença de gases poluentes e a exposição a elevados níveis de radiação, além da susceptibilidade genética de uma população geneticamente miscigenada.

A suplementação com AF não diminuiu de forma significativa a incidência de EB no estado do Maranhão (OR=1.01, IC95% 0.56-1.86, p=0.92) no período estudado (Tabela 1).

	Espinha bífida		OR	IC <sub>95%</sub>	p
	Presente	Ausente			
<b>Pré-fortificação</b>	23	513536	1.01	0.56-1.86	0.92
<b>Pós-fortificação</b>	20	455155			

Tabela 1. Risco de desenvolver EB no estado do Maranhão no período pós-fortificação com

Casos de EB foram mais freqüentes no sexo feminino e em mulheres com idade entre 20 e 34 anos, que realizaram de 4 a 6 consultas pré-natais e com 4 a 7 anos de escolaridade (Tabela 2).

Uma metanálise de 33 estudos que avaliou a influência da idade materna sobre risco de defeitos do tubo neural mostrou que há associação entre maior (40 anos e mais) e menor (menos de 19 anos) idade materna e certas formas de defeitos do tubo neural. Porém o mesmo não concerne com os casos de EB observados havendo maior incidência em mulheres com idades de 20-34 anos e menor acima de 35 anos (VIEIRA; TAUCHER, 2005).

Baixo nível educacional materno também tem sido avaliado como importante preditor para ocorrência de defeitos do tubo neural (GREWAL et al., 2009). Ainda em relação à escolaridade, estudo desenvolvido por Pereira (2007) mostrou que o consumo de alimentos médio de farinha de folato aumentava significativamente com o aumento do nível de escolaridade das gestantes, em decorrência do maior consumo médio de fontes de ácido fólico e também do maior consumo médio de farinha fortificada. Tal aspecto é evidenciado no efeito provocado nessa variável, no estado.

A partir do ano 2004 houve diminuição não significativa na incidência de EB no estado do Maranhão até 2007, ano com menor coeficiente.

A redução significativa na prevalência de defeitos do tubo neural após a fortificação somente entre as mães que realizaram sete consultas ou mais de pré-natal sugere início precoce do pré-natal e provável suplementação medicamentosa com ácido fólico no primeiro trimestre da gestação, condição comprovadamente associada a prevenção de defeitos do tubo neural (LUNLEY et al., 2001). No que diz respeito ao estudo, esse efeito não foi suficiente para as ocorrências de EB nas consultas de pré-natais tendo maior repercussão entre 4-6 consultas pré-natais. O Ministério da Saúde recomenda o início precoce do pré-natal, a realização de sete ou mais consultas pré-natais (BRASIL, 2005).

Variável	Pré-fortificação		Pós-fortificação		OR	p
	n	p	n	P		
<b>Idade (anos)</b>						
≤14	01	0.002	01	0.001	0.86	0.53
15-19	08	0.017	04	0.007	0.31	0.19
20-34	11	0.024	16	0.031	8.47	0.07
35+	-	-	02	0.003	-	-
<b>Escolaridade (anos)</b>						
Nenhuma	02	0.004	01	0.001	0.40	0.87
1-3	02	0.004	02	0.003	0.85	0.71

4-7	09	0.019	06	0.011	0.42	0.31
8-11	05	0.010	11	0.021	0.80	0.91
12+	01	0.002	02	0.003	1.80	0.89
<b>Consultas pré-natais</b>						
<4	04	0.008	07	0.013	1.87	0.60
4-6	10	0.021	07	0.013	0.45	0.36
7+	05	0.010	07	0.013	0.90	0.82
<b>Idade gestacional (semanas)</b>						
32-36	02	0.004	03	0.005	1.42	0.90
37+	17	0.037	18	0.035	0.71	0.90
<b>Sexo</b>						
Masculino	08	0.017	14	0.027	2.33	0.29
Feminino	12	0.026	09	0.017	0.43	0.29

Tabela 2. Prevalência de EB em nascidos vivos em função de características maternas pré- e pós- fortificação com ácido fólico no Maranhão.

Fonte: SINASC/DATASUS/MS

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo demonstrou que houve diminuição na incidência de EB no estado do Maranhão a partir de 2004, entretanto sem o efeito protetor do AF.

Apesar do comprovado efeito deste tipo de fortificação na maioria dos países e estados brasileiros, outros fatores devem ser considerados em sua etiologia, tais como as elevadas taxas de insegurança alimentar apresentadas pelo estado no período. Dessa forma, a investigação de fatores socioeconômicos, ambientais e nutricionais poderia contribuir para compreensão da etiologia da EB no estado do Maranhão.

#### REFERÊNCIAS

- AU, K. S.; ASHLEY-KOCH, A.; NORTHRUP, H. Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects. **Dev. Disabil. Res. Rev.** v.16, p. 6–15, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Pré-natal e puerpério: atenção qualificada e humanizada.** Manual técnico . Brasília, DF, 2005.
- CASTILLA, E. E.; ORIOLI, I. M. Epidemiology of neural tube defects in South America. **Am J Med Genet.** v. 22, p. 695-702, 1985.
- FERREIRA, A.F.S.; GIUGLIANI, R. Consumption of folic acid-fortified flour and folate-rich foods among women at reproductive age in South Brazil. **Comm Genet.** v.11, p.179-18, 2008.
- GREWAL, J.; CARMICHAEL, S.L.; SONG, J.; SWAW, G.M. Neural tube defects: an analysis of neighbourhood-and individual-level sócio-economic characteristics. **Paediatr Perinat Epidemiol.** v. 23, p.16-24, 2009.
- LUNLEY, J.; WATSON, L.; WATSON, M; BOWER, C. Periconceptional supplementation with folate and/ or multivitamins for preventing neural tube defects. **Cochrane Database Syst Rev.** v.3: CD001056, 2001.

NAZER-H, J.; LOPEZ-CAMELO, J. S.; CASTILLA, E.E. ECLAMC: Estudio de 30 anos de vigilancia epidemiológica de defectos de tubo neural em Chile y en Latino América. **Rev Med Chile.** v.129, p. 531-539, 2001.

ORIOLI, I. M.; NASCIMENTO, M.C.L. DO; LÓPEZ-CAMELO, J.S.; CASTILLA E.E. Effects of Folic Acid Fortification on Spina Bifida Prevalence in Brazil. **Birth Defects Research (Part A).** v.91, p.831-835, 2011.

PEREIRA, M. Z. **Consumo alimentar em gestantes e os possíveis efeitos da fortificação de farinhas com ácido fólico na ocorrência de defeitos do tubo neural no Distrito Federal.** 2007. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana, UNB, 2007.

VIEIRA, A.R.; TAUCHER, S.C. Edad materna y defectos del tubo neural: evidencia para un efecto mayor en espina bífida que anencefalia. **Rev Méd Chile.** v.133, p.62-70, 2005.

## MARCADORES MOLECULARES CONFIRMAM A OCORRÊNCIA DA OSTRAS *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) NO LITORAL MARANHENSE

### Rodolf Gabriel Prazeres Silva Lopes

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA),  
Departamento de Engenharia de Pesca, São Luís-  
MA

### Ícaro Gomes Antônio

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA),  
Departamento de Engenharia de Pesca, São Luís-  
MA

### Lígia Tchaika

Universidade Estadual do Maranhão (CESC/  
UEMA), Departamento de Química e Biologia,  
São Luís- MA

### Maria Claudene Barros

Universidade Estadual do Maranhão (CESC/  
UEMA), Departamento de Química e Biologia,  
Caxias- MA

### Elmary da Costa Fraga

Universidade Estadual do Maranhão (CESC/  
UEMA), Departamento de Química e Biologia,  
Caxias- MA

**RESUMO:** O presente estudo teve por objetivo identificar as espécies nativas de ostras presentes ao longo do litoral do Maranhão. Para isso aplicou-se a metodologia DNA *Barcoding*, na qual utilizou-se um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases do gene COI. As amostras foram obtidas durante um período de um ano (2014 -2015) em sete pontos do litoral maranhense. Para uma primeira análise de diferenciação das

espécies foi aplicado à metodologia de PCR Multiplex. O isolamento e amplificação da região genômica COI foi realizado utilizando-se *primers* universais e específicos. Os produtos das PCRs foram sequenciados e a análise dos dados foi realizada em softwares específicos. O PCR Multiplex confirmou, pela primeira vez, a presença da espécie *Crassostrea rhizophorae* no litoral maranhense, além da espécie *Crassostrea gasar*. No sequenciamento de 98 amostras obteve-se fragmentos do gene COI de 695pb para *C. gasar* e de 640 pb para *C. rhizophorae*. A árvore haplótípica agrupou fortemente as duas espécies em clados diferentes com 100% de *bootstrap*. Entretanto houve um agrupamento das sequências de *Crassostrea brasiliiana*, obtidas no GenBank, com sequências de *Crassostrea gasar* geradas neste estudo evidenciando a problemática taxonômica deste grupo e a necessidade da realização de novos estudos.

**Palavras-chave:** *Crassostrea*, DNA Mitoconrial, COI, Maranhão.

MOLECULAR MARKERS CONFIRM  
THE OCCURRENCE OF THE OYSTER  
*Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) IN  
MARANHENSE COAST

**ABSTRACT:** The present study aimed to identify

which native species of oysters are present in Maranhao state and its distribution along the coastline. For this purpose was used the DNA *barcoding* methodology, which uses a fragment of approximately 650 pairs of bases of the COI gene. Samples were taken over a period of one year (2014-2015) in seven localities of the Maranhao state coast. DNA was isolated using the saline protocol. For a first analyses of species differentiation was applied the multiplex PCR methodology. The isolation and amplification of the genomic region was performed by PCR using universal primers. Products of PCR were sequenced and the data analysis was performed on specific software. The Multiplex PCR confirmed for the first time the presence of the species *Crassostrea rhizophorae* in the Maranhão coast, besides the species *Crassostrea gasar*. The sequencing of 98 samples obtained COI gene fragments of 695bp to *C. gasar* and of 640bp to *C. rhizophorae*. The haplotype tree tightly grouped two species in different clades with 100% bootstrap. However, there was a clustering of the *Crassostrea brasiliensis* sequences obtained in GenBank, with sequences of *Crassostrea gasar* generated in this study evidencing the taxonomic problem of this group and the necessity of the realization of new studies.

**KEYWORDS:** *Crassostrea*, mitochondrial DNA, COI, Maranhao.

## 1 | INTRODUÇÃO

Os indivíduos do gênero *Crassostrea* (SACCO, 1897) são os mais cultivados em todo o mundo, em função do domínio das técnicas de criação já serem bem estabelecidas e serem economicamente viáveis (MANZONI & SCHMITT, 2006). Embora as técnicas de cultivo de ostras sejam bem difundidas também no Brasil, o gargalo dessa atividade ainda se concentra no modo de obtenção desses organismos (TURECK, 2010).

Reconhecendo as dificuldades de se identificar as espécies de ostras nativas brasileiras por um padrão morfológico, têm se recorrido, com sucesso, ao uso de protocolos baseados em biologia molecular para a elucidação das questões taxonômicas e de distribuição das diferentes espécies do gênero *Crassostrea* (LAPÈGUE et al., 2002; PIE et al., 2006; VARELA et al. 2007; MELO et. al 2010; TUREK, 2010).

No Maranhão, as ostras são encontradas em toda sua extensão litoral, em bancos naturais distribuídos em ambientes de estuários, fixados em raízes de plantas do mangue, e em regiões de praias, fixadas em costões rochosos. Entretanto a falta de estudos mais detalhados sobre a identificação das espécies nativas, distribuição nos diferentes habitats e biologia reprodutiva, representam um grande entrave para o desenvolvimento da ostreicultura assim como a adoção de melhores planos de gestão desse recurso voltados para a pesca.

## 2 | METODOLOGIA

As amostras de ostras foram obtidas durante o período de um ano (2014-2015) em sete pontos do litoral maranhense, sendo dois pontos referentes ao Litoral Ocidental do estado, dois pontos no Litoral Oriental e três pontos na região do Golfão Maranhense. Desse modo os municípios correspondentes aos pontos de coletas foram: Carutapera, Cururupu, São José de Ribamar, Paço do Lumiar, Raposa, Primeira Cruz e Tutóia (Figura 1).

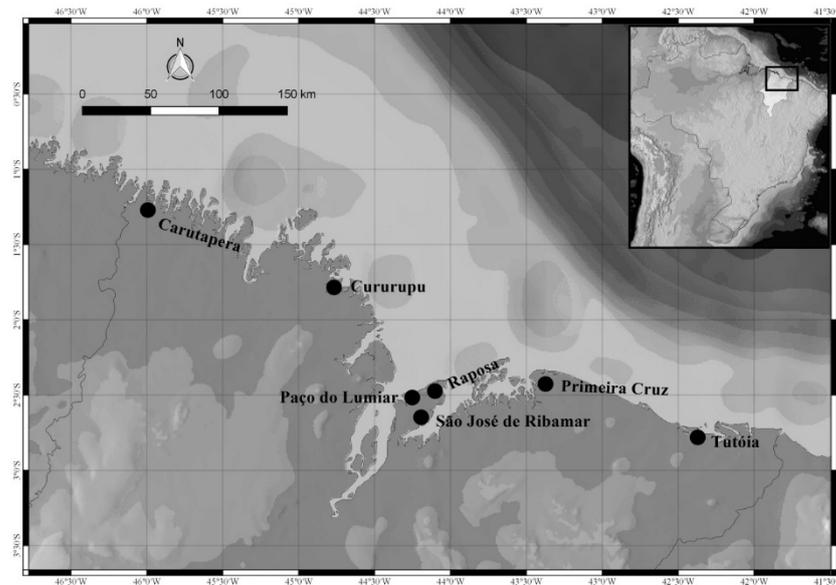


Figura 1 – Mapa dos locais de coletas no litoral atlântico nordeste ocidental, costa do Maranhão, Brasil.

Foram coletados 135 amostras de ostras de todos os pontos selecionados do litoral maranhense. O DNA total foi isolado a partir de tecido muscular, utilizando-se o protocolo salino padronizado por Medrano (1990).

Para a identificação prévia das espécies foi realizado um PCR multiplex como descrito por Melo et al., (2013). O isolamento e amplificação da região genômica, foi realizado através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os primers descritos por Folmer et al., (1994) e Melo et al., (2010). O protocolo de amplificação se deu como descrito por MELO et al., (2010).

Os produtos das PCRs foram visualizados em gel de Agarose a 1% e purificados com ExoSAP-IT segundo o protocolo sugerido pelo fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada pelo método de Sanger et al., (1977). As amostras foram precipitadas em EDTA-Acetato de Sódio-Etanol e em seguida submetidas à análise no sequenciador de DNA automático (ABI 3500/Life Technologies).

As sequências foram editadas e alinhadas com a ferramenta ClustalW (THOMPSON et al., 1994) no programa BIOEDIT, v 7.0.5.2, (HALL, 1999). As médias de distância genética e análises filogenéticas foram geradas no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos,

modelo Kimura-2-parâmetros (SAITOU; NEI, 1987). Para verificar a significância dos agrupamentos utilizou-se a análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). Para a análise da diversidade haplotípica e nucleotídica foi utilizado o programa DnaSP v5 (LIBRADO & ROZAS, 2009). A relação entre os haplótipos foi realizada por meio da construção de uma rede de haplótipos não enraizada, obtida através do programa NETWORK 4.5.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>) usando o método de mediam-joining (BANDELT et al., 1999). A identificação molecular a partir do gene COI foi realizada por comparação de sequências do presente estudo com dados disponíveis na plataforma bioinformática BOLDSYSTEMS (*Barcode of Life Data Systems*) (HEBERT, 2003). Foi incorporado ao banco de dados uma sequência do gene COI obtida do GenBank da espécie *Crassostrea* sp. Canela (HM003525) da região de Bragança-PA, utilizada como grupo externo. Sequências de *C. gasar* (HM 003499, HM003507, HM003515, HM3519 e FJ717611) e *C. brasiliana* (FJ717640, F717641, F717642, F717643, F717644, F717645, F717646, F717647, F717648, F717649, F717650 e FJ717651) foram também incluídas no banco de dados.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Uso da PCR Multiplex na identificação de espécies de ostra do litoral do Maranhão

As amostras de Carutapera, Cururupu, São José de Ribamar, Paço do Lumiar, Raposa, Primeira Cruz e Tutóia foram testadas com o PCR Multiplex, totalizando 135 amostras (Tabela 1).

LOCALIDADES	<i>C. gasar</i>	<i>C. rhizophorae</i>	TOTAL
CARUTAPERA	20	-	20
CURURUPU	20	-	20
SÃO JOSÉ DE RIBAMAR	03	17	20
PAÇO DO LUMIAR	15	10	25
RAPOSA	10	-	10
PRIMEIRA CRUZ	20	-	20
TUTÓIA	20	-	20
<b>TOTAL</b>	<b>108</b>	<b>27</b>	<b>135</b>

Tabela1 - Número de amostras por localidade de coleta testadas e amplificadas por meio do PCR Multiplex em ostras do gênero *Crassostrea* do litoral maranhense,

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados obtidos evidenciaram a ocorrência de duas espécies no litoral maranhense. Na análise das ampliações em gel de agarose foi possível observar padrões de bandas correspondentes às espécies *C. gasar* e *C. rhizophorae* (Figura

2). Nos municípios de Carutapera, Cururupu, Raposa, Primeira Cruz e Tutóia foram obtidos ampliações com o padrão de banda única, indicando que a espécie presente é *C. gasar*, já que apenas a região de ITS 1 com 718 pb foi amplificada (Figura 1). Nas amostras dos municípios de São José de Ribamar e Paço do Lumiar foram obtidos dois padrões de banda, confirmando a presença da espécie *C. rhizophorae* nas localidades amostradas (Figura 2).

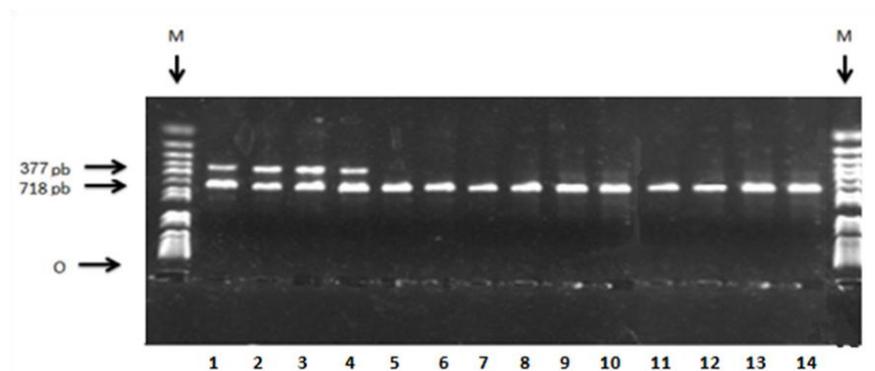


Figura 2 - Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio mostrando as ampliações obtidas pela PCR Multiplex (Amostras de São José de Ribamar e Paço do Lumiar: 1 - 4 correspondem a espécie *C. rhizophorae*; e 5 a 14 correspondem a espécie *C. gasar* - Amostras de Carutapera, Cururupu, Raposa, Primeira Cruz e Tutóia).

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados obtidos pelo PCR multiplex apontaram a ocorrência da *C. rhizophorae*, até então desconhecida nos domínios do estado, além da *C. gasar*, já citada por De Paula et al., (2008), Melo et al., (2010) e Lazoski et al., (2011). A certeza da existência de duas espécies no litoral maranhense, já confirmadas pelo sequenciamento de um fragmento do gene COI, reforçam a necessidade da seleção de pontos específicos na captação de sementes para o cultivo.

A hipótese de que as espécies *C. rhizophorae* e *C. gasar* possuíam distribuições diferentes nos ambientes aquáticos, como defendida por Christo (2006), que afirma que a espécie *C. rhizophorae* ocorre na região entre marés e que *C. gasar*, conhecida como “ostra- de-fundo”, ocorre no infralitoral, não é validada pelos resultados encontrados neste estudo. Nos municípios de São José de Ribamar e Paço do Lumiar foram encontradas as duas espécies co-habitando em um mesmo espaço. É importante ressaltar que as características desses dois pontos de coleta (São José de Ribamar e Paço do Lumiar) são bem diferentes, já que o primeiro é uma região de praia, com as ostras fixadas em estruturas de concreto e rochas, e o segundo caracteriza-se por ser um típico ambiente de estuário, com as ostras fixadas nas raízes das plantas.

O litoral ocidental e oriental apresentaram grande potencial de desenvolvimento da atividade do cultivo, uma vez que foi identificada a presença de uma única espécie. Outro aspecto favorável é que a espécie em questão foi a *C. gasar*. Ainda que todas as espécies nativas de ostra possam ser cultivadas e comercializadas, a *C. gasar* é a

que apresenta uma melhor taxa de crescimento, o que faz com que a opção do cultivo dessa espécie seja mais interessante (ABSHERS, 1989).

### 3.2 Identificação molecular e variabilidade genética de ostras nativas do Maranhão utilizando o gene COI

Um total de 98 sequências de um fragmento de gene COI foi obtido para as espécies de ostras do gênero *Crassostrea*, sendo 78 sequências correspondentes à espécie *C. gasar*, com um fragmento de 695 pb e 20 sequências à espécie *C. rhizophorae* com um fragmento de 640 pb.

Oito haplótipos foram encontrados na análise conjunta das amostras de *C. rhizophorae*, com uma diversidade haplotípica ( $h$ ) de 0,795 e nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,002. Quando analisado isoladamente cada população, observou-se que os maiores valores de diversidade haplotípica ocorreram para as amostras de São José de Ribamar com  $h = 0,933$  (Tabela 2). Valores semelhantes em populações agrupadas de *C. rhizophorae* com COI na costa brasileira foram encontrado por Lazoski et al., (2011). Dentre os oito haplótipos encontrados, os haplótipos H1 e H3 foram os mais frequentes, ocorrendo nas duas populações com frequência de oito e cinco vezes, respectivamente. Foram observados quatro haplótipos exclusivos para a população de São José de Ribamar (H4, H5, H6 e H7) e um para população de Paço do Lumiar (H2). O haplótipo H8 ocorreu duas vezes e foi exclusivo da população de São José de Ribamar. A rede de haplótipos não enraizada mostrada na figura 3 ilustra a distribuição dos oito haplótipos obtidos para espécie *C. rhizophorae*. Os números representam a posição das mutações que separam os haplótipos, e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência com que estes ocorrem. Foi observada a existência de haplótipos compartilhados (H1 e H3) pelas duas localidades amostradas e haplótipos únicos.

Populações	N	NH	S	Índice de Diversidade Molecular	
				H	$\pi$
Paço do Lumiar	10	3	02	0,600	0,001
São José de Ribamar	10	7	07	0,933	0,002
Populações agrupadas	20	8	08	0,795	0,002

Tabela 2 - Diversidade molecular em ostras *Crassostrea rhizophorae* baseado em 640 pb do gene COI.

N = número amostral NH = número de haplótipos S = sítios polimórficos h = diversidade haplotípica e  $\pi$  = diversidade nucleotídica

Fonte: Elaborado pelo autor

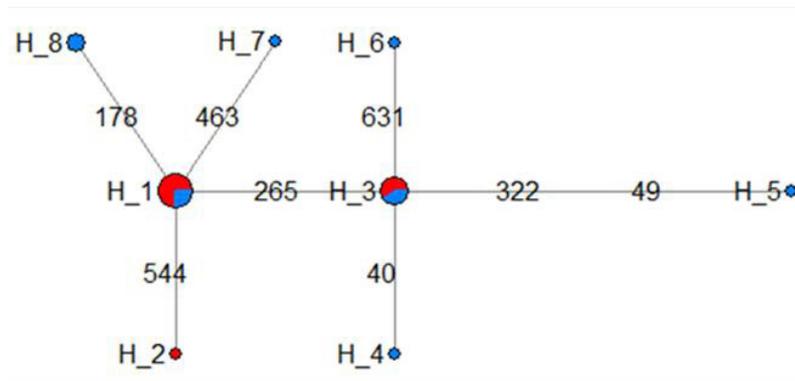


Figura 3 - Rede de haplótipos de *C. rhizophorae* com base no gene COI. A população de Paço do Lumiar está representada pela cor vermelha e a população de São José de Ribamar pela cor azul.

Na análise das sequências de *C. gasar* quinze haplótipos foram encontrados, com uma diversidade haplotípica ( $h$ ) de 0,428 e nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,002 (Tabela 3). Valores semelhantes foram observados por Lazoski et al., (2011) para populações de *C. gasar* da costa do Brasil. Na análise isolada de cada população observou-se valores elevados de  $h = 0,879$  e  $\pi = 0,0051$  para as amostras de Primeira Cruz e valores baixos para amostras de Cururupu ( $h = 0,195$  e  $\pi = 0,0002$ ). Dentre os quinze haplótipos encontrados, o H1 foi o mais frequente ocorrendo 59 vezes, distribuídas em todas as populações analisadas. Haplótipos únicos foram observados na população de Primeira Cruz (H3, H4, H5 e H7), Carutapera (H8, H9, H10 e H11), Cururupu (H14 e H15) e em Tutóia (H12). O Haplótipo 13 ocorreu duas vezes exclusivamente em Tutóia. O haplótipo H2 foi compartilhado pelas populações de Primeira Cruz e Tutóia enquanto o haplótipo H6 foi compartilhado em Primeira Cruz e Carutapera. Nos resultados encontrados o número de haplótipos (4) observados para espécie de *C. gasar* em Tutóia foi semelhante aos resultados publicados por Melo (2010), para essa mesma população.

A rede de haplótipos não enraizada da figura 4 mostra a relação entre os quinze haplótipos obtidos para espécie *C. gasar*. O Haplótipo H1 foi mais frequente e compartilhado por todas as localidades amostradas. Segundo Kidd & Ritchie (2006), os haplótipos mais frequentes são mais antigos e geralmente encontram-se no interior da rede e os de menor frequência são os mais recentes e ocupam as extremidades. De acordo com os resultados o H1 possivelmente seja o mais antigo.

Para ambas as espécies (*C. rhizophorae* e *C. gasar*) o compartilhamento de haplótipos sugere que as populações possuam uma baixa diferenciação. Para Frankham et al., (2004), toda população de uma determinada espécie pode exibir vários níveis de divergência genética de outras populações baseado no nível de fluxo gênico entre elas, ou seja, populações próximas geograficamente, e que possuem fluxo gênico regular, tenderão a ser mais semelhantes geneticamente entre si do que com populações afastadas geograficamente com fluxo gênico reduzido ou fluxo gênico ausente.

Populações	N	NH	S	Índice de Diversidade Molecular	
				H	$\pi$
Primeira Cruz	12	7	11	0,879	0,0051
Tutóia	17	4	08	0,419	0,0015
Raposa	10	1	0	0,000	0,0000
Cururupu	20	3	2	0,195	0,0002
Carutapera	19	6	11	0,468	0,0025
Populações agrupadas	78	15	20	0,428	0,0020

Tabela 3 - Diversidade molecular em ostras *Crassostrea gasar* baseado em 695 pb do gene COI.

**N** = número amostral **NH** = número de haplótipos **S** = sítios polimórficos **h** = diversidade haplotípica e  $\pi$  = diversidade nucleotídica

Fonte: Elaborado pelo autor

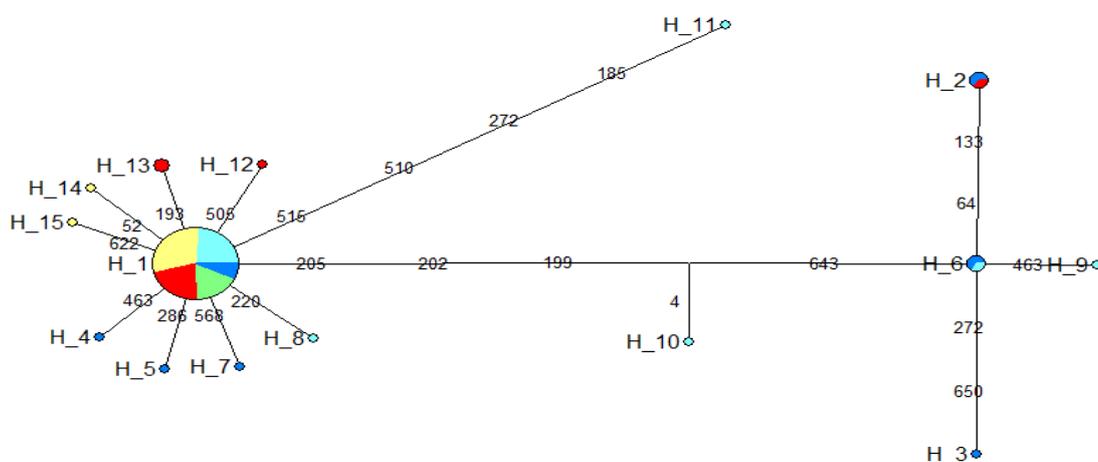


Figura 4 - Rede de haplótipos com base no gene COI. O tamanho do círculo é proporcional à frequência com que o haplótipo ocorreu na população. Nas representações por cores de cada população, amarelo = Cururupu; vermelho = Tutóia, azul escuro = Primeira Cruz; verde = Raposa; azul claro = Carutapera.

Os valores dos resultados da relação intra e interespecíficas obtidas para *C. gasar* e *C. rhizophorae* (Tabela 4) validam a proposta do DNA BARCODE em identificar e discriminar diferentes espécies. Para o sucesso do código de barras de DNA, as sequências de DNA dentro de uma mesma espécie necessitam apresentar maior similaridade do que entre espécies (CARVALHO et al., 2008).

Categoria	Espécie	N	Divergência K2P (%)
			Média
Intraespecífica	<i>C. rhizophorae</i>	20	0,20
	<i>C. gasar</i>	78	0,20
Interespecífica	-	98	23,6

Tabela 4 - Divergência genética (K2P) intra e interespecífica de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Maranhão.

Fonte: Elaborado pelo autor

As sequências de COI obtidas foram submetidas na plataforma BOLDSYSTEMS (*Barcode of Life Data Systems*) a fim de se obter a identificação molecular a partir da comparação com sequências presentes nesse sistema. A porcentagem de identificação das espécies no BOLDSYSTEMS variou de 97,01% a 98,37% de similaridade de sequências para a espécie *C. rhizophorae*. Na comparação das sequências de *C. gasar* observou-se que os percentuais de similaridade foram compatíveis tanto para *C. brasiliiana*, quanto para *C. gasar* com percentuais de similaridade variando de 97,55% a 99,84% evidenciando uma problemática na sua taxonomia. Varela et al., (2007), já apontava que as sequências descritas por Pie et al., (2006), para *C. brasiliiana* e por Lapègue et al., (2002), para *C. gasar*, na realidade se tratavam da mesma espécie.

A árvore de haplótipos gerada baseada utilizando a abordagem de agrupamento de vizinhos (NJ) através do modelo de Kimura-2-Parâmetros (K2P) revelou a formação de clados fortemente suportados agrupando todos os haplótipos de *C. rhizophorae* em um clado basal (100% de *bootstrap*). Os haplótipos de *C. gasar* constituíram um segundo clado fortemente suportado (Figura 5). A clara separação de *C. rhizophorae* e *C. gasar* em grupos distintos confirma a ocorrência de duas espécies de *Crassostrea* no litoral maranhense. As sequências do Genbank de *C. gasar* e de *C. brasiliiana* foram utilizadas para testar uma possível distinção entre os táxons. Os resultados observados mostraram um agrupamento robusto corroborando para condição de sinonímia entre *C. gasar* e *C. brasiliiana* (Figura 5).

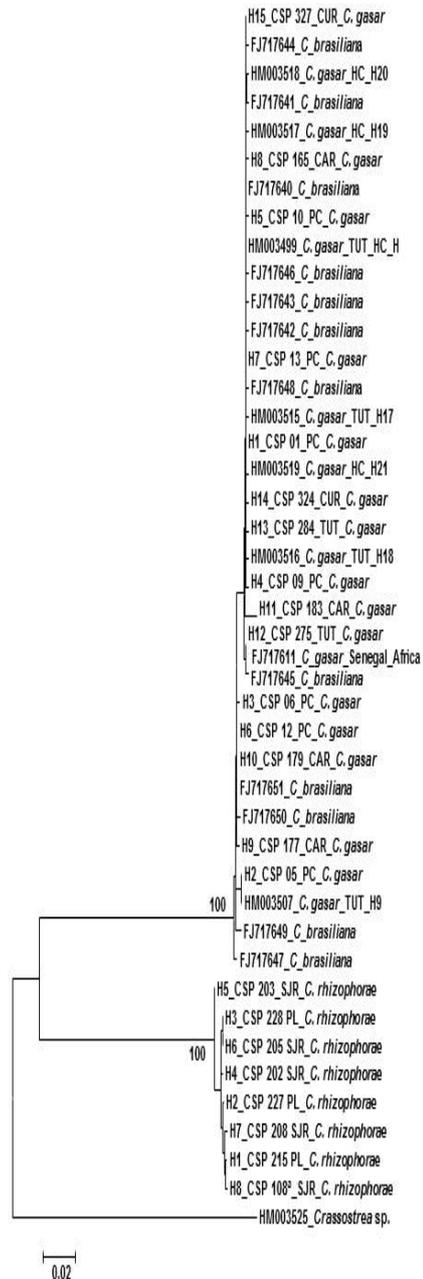


Figura 5 - Árvore de haplótipos de agrupamento de vizinhos (NJ) utilizando o modelo K2P baseada em sequências do gene COI em ostras do gênero *Crassostrea*. Os números dos nós representam os valores de bootstrap (1000 réplicas). CAR = Carutapera, CUR= Cururupu, PC= Primeira Cruz e TUT = Tutóia, SJR= São José de Ribamar e PL= Paço do Lumiar.

A identificação molecular das espécies de ostras nativas do litoral do Maranhão pelo marcador COI validou os resultados gerados pelo PCR Multiplex. Do ponto de vista da aquicultura os resultados obtidos revelam que no estado do Maranhão existem condições de obtenção de sementes de ostra com qualidade em ambiente natural.

#### 4 | CONCLUSÃO

O PCR Multiplex demonstrou-se eficaz na identificação das espécies de ostra do gênero *Crassostrea*, do litoral maranhense. Os valores da distância genética intra e interespecífica e o percentual de similaridade das comparações das sequências de

COI na plataforma BoldSystems permitiu inferir quanto à identificação de *C. gasar* e *C. rhizophorae* no litoral maranhense.

A confirmação das espécies *C. rhizophorae* e da *C. gasar* como nativas no litoral maranhense implica na necessidade de estudos da biologia reprodutiva, de ambas mais detalhados, para que seja possível avaliar as condições reais desse recurso pesqueiro. Portanto, novas pesquisas, com maiores amostragens genéticas devem ser geradas para os grupos de ostras do litoral maranhense como forma de esclarecimento das condições desse recurso pesqueiro e dados mais informativos sobre as populações existentes.

## REFERÊNCIAS

- ABSHER, T. M. **Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná: desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento.** 1989. 140p. Tese (PhD) - Instituto de Oceanografia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.
- BANDELT, Hans-Jurgen; FORSTER, Peter; RÖHL, Arne. **Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies.** *Molecular biology and evolution*, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.
- CARVALHO, D. C.; SEERIG, A.; MELO, D. C. de; SOUSA, A. B. de; PIMENTA, D.; OLIVEIRA, D. A. A. **Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.).** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 215-219, 2008
- CHRISTO, S. W. **Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea sacco*, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná–Brasil): Um subsídio ao cultivo.** 2006. 146f. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- DE PAULA, N. R. F.; GOMES, L. A.; MELO, A. G. C.; BEASLEY, C. R.; TAGLIARO, C.H. Estudos populacionais de *Crassostrea gasar* do Pará e do Maranhão usando o gene COI. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA. 54., 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. p. 398.
- FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.** *Evolution*, Washington, v. 39, n.4, p. 783-791. 1985.
- FOLMER, O.; BLACK, M. B.; HOCH, W.; LUTZ, R. A.; VRIJEHOEK, R. C. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. ***Molecular Marine Biology and Biotechnology***, v.3, n. 5, p. 294-299. 1994.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics.** Cambridge: Cambridge University Press, 2004.
- HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucleic acids symposium series*, Oxford, v. 41, p. 95-98. 1999.
- HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. **Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species.** *Proc. R. Soc. Lond. B, London*, v. 270, p. S96-S99, 2003. Suplemento.
- KIDD, D. M.; RITCHIE, M. G. **Phylogeographic information systems: putting the geography into phylogeography.** *Journal of Biogeography*, v. 33, n. 11, p. 1851-1865, 2006.

- LAPÈGUE, S.; BOUTET, I.; LEITÃO, A.; HEURTEBISE, S.; GARCIA, P. THIRIOT-QUIÉVREUX, C.; BOUDRY, P. **Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16s mtDNA and karyological analyses.** The Biological Bulletin, Woods Hole, v.202, n.3, p.232-242, jun. 2002.
- LAZOSKI, C.; GUSMÃO, J.; BOUDRY, P.; SOLÉ-CAVA, A. M. **Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance.** Marine Ecology Progress Series, v.426, p. 197-212, mar. 2011.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. **DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** Bioinformatics, v. 25, n.11, p. 1451-1452. jun. 2009.
- MANZONI, Gilberto Caetano; SCHMITT, Jean Franco. Cultivo de ostras japonesas *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia), na Armação do Itapocoroy, Penha, SC. **BRANCO, JO; MARENZI, AWC Bases ecológicas para um desenvolvimento sustentável: estudos de caso em Penha, SC.** Itajaí: Editora da UNIVALI, p. 245-252, 2006.
- MEDRANO, J. F; AESEN, E; SHARROW, L. **DNA Extraction from nucleated red blood cells.** Biotechniques, v. 8, n. 1, p. 43. jan.1990.
- MELO, A. G. C.; VARELA, E. S.; BEASLEY, C. R.; SCHNEIDER, H., SAMPAIO, I.; GAFFNEY, P. M.; REECE, K. S.; TAGLIARO, C. H. **Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*).** Genetics and Molecular Biology. São Paulo, v. 33, n. 3, p.564–572, 2010.
- MELO, M. A. D.; SILVA, A. R. B.; BEASLEY, C. R.; TAGLIARO, C. H. **Multiplex species-specific PCR identification of native and non-native oysters (*Crassostrea*) in Brazil: a useful tool for application in oyster culture and stock management.** Aquaculture international, v. 21, n. 6, p. 1325-1332. dez. 2013.
- PIE, M. R; RIBEIRO, R. O.; BOEGER, W. A.; OSTRENSKY, A.; FALLEIROS, R. M.; ANGELO, L. **A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rizhophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil.** Aquaculture Research, Malden, v. 37, n.15, 2006, p.1598-1600. 2006.
- SAITOU, N.; NEI, M. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** Molecular Biology and Evolution, v. 4, n. 4, p. 406-425, jul. 1987.
- SANGER, F.; NICHLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain termination inhibitors.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v. 74, p. 5463-5468, 1977.
- TAMURA, K; STECHER, G; PETERSON, D; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. **MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0.** Molecular Biology and Evolution, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, dez. 2013.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice.** Nucleic Acids Research. v. 22, n. 22, p. 4673-4680. nov. 1994
- TURECK, C. R. **Sementes de ostras nativas no litoral de Santa Catarina/Brasil, como subsídio ao cultivo.** 2010. 140f. Tese (Doutorado em Aquicultura) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- VARELA, E. S.; BEASLEY, C. R.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; MARQUES-SILVA, N. S.; TAGLIARO, C. H. **Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil.** J. Mollus. Stud., v.73, n. 3, p.229-234. ago. 2007.

## PADRÕES PARA O CULTIVO DE HORTALIÇAS EM ESPAÇOS RESIDENCIAIS NO INTERIOR DO MARANHÃO

**Alaide Silva de castro**

**Larissa Pinheiro Alves**

**Mayara Cardoso Araújo Lima**

**Ramile Vieira de Oliveira**

**Allana Tereza Mesquita de Lima**

**Ivanayra da Silva Mendes**

**Gabriela Nunes da Piedade**

**Joanderson Marques Silva**

**Raquel Sobral da Silva**

Universidade Federal do Maranhão – UFMA,  
Discentes do Centro de Ciências Agrárias e  
Ambientais – CCAA.

**Jardel Oliveira Santos**

Universidade Federal do Maranhão, Centro de  
Ciências Agrárias e Ambientais, Docente da  
Coordenação de Biologia.  
Chapadinha – MA

**RESUMO:** O cultivo urbano de hortaliças, desenvolvido em pequenas cidades no interior do Maranhão favorece, sobretudo a conservação da agrobiodiversidade. Assim, a fim de prospectar informações sobre a conservação e manejo da agrobiodiversidade e, conseqüentemente dos RGV's, objetivou-se conhecer padrões de cultivos das hortaliças nos municípios de Anapurus e Mata Roma. A pesquisa de campo foi realizada a partir da aplicação de um questionário semiestruturado com treze perguntas, em 30 pessoas dentro

de cada um dos municípios: Anapurus e Mata Roma. Constatou-se que o padrão de cultivo entre os municípios de Anapurus e Mata Roma foram similares com 58% e 42%, respectivamente, onde os canteiros suspensos são a forma mais utilizada no plantio das hortaliças. Para aquisição das sementes, 91% dos entrevistados em Anapurus e 60% em Mata Roma, adquirem-na por meio de compra, um dado preocupante para conservação dos RGV's. Em Mata Roma, 90% das pessoas entrevistadas utilizam receitas caseiras para controle de pragas. Já em Anapurus, o controle químico é utilizado em 50% dos casos. Em ambos os municípios ocorre a preferência pela produção do próprio substrato, os compostos mais utilizados são esterco bovino e solo, esterco caprino e solo e composto orgânico de palmeira. Os padrões de cultivos das hortaliças nos municípios de Anapurus e Mata Roma são similares e se caracterizam pela rusticidade e simplicidade da estrutura física usada do plantio ao manejo. Entretanto, a aquisição das sementes em lojas agropecuárias e o não armazenamento e conservação para cultivos posteriores pode influenciar negativamente a manutenção da agrobiodiversidade.

**PALAVRAS-CHAVES:** Hortaliças, Cultivo urbano, Conservação de RGV.

## PATTERNS OF THE CULTIVATION OF VEGETABLES IN HOME IN THE ANAPURUS AND MATA ROMA, MARANHÃO STATE

**ABSTRACT:** The cultivation of vegetables developed in township of Maranhão State favors the conservation of agrobiodiversity. Thus, in order to prospect information on the conservation and management of agrobiodiversity and, consequently, the RGV's, the objective of this work was to know patterns of vegetable crops in the cities of Anapurus and Mata Roma, Maranhão State. Data collection was carried out through participative, formal, and inductive interviews following a semi-structured questionnaire with 13 questions, applied in 30 people in each township. There is a similarity of 58% in Anapurus and 42% in Mata Roma, where hanging gardens are the most used form of planting the vegetables between the cities mentioned. The way of acquiring seeds constitutes a concern for the conservation of RGV's, since 91% in Anapurus and 60% in Mata Roma, acquire seeds through purchase in agricultural stores. Household recipes for pest control are used by 90% of the people interviewed in Mata Roma. While the chemical control is applied in 50% of cases in Anapurus. The population of the municipalities opts for the preference to produce, and is often composed of cattle manure plus soil, goat manure plus soil and palm trees of stem. The maintenance of agrobiodiversity is influenced negatively by the acquisition of seeds in agricultural stores and by the fact that no seeds are stored and conserved for later crops.

**KEYWORDS:** Vegetables, Urban cultivation, RGV conservation.

### 1 | INTRODUÇÃO

A agricultura urbana e periurbana (AUP) adquiriu destaque no cenário nacional a partir da década de 1990, afirmando-se como mecanismo de inclusão nos sistemas de crescimento sustentável das pessoas e do ambiente (COSTA, 2015).

Desta forma, o cultivo de hortaliças no perímetro urbano é uma prática que pode colaborar para diminuição da pobreza da população, tendo em vista a criação de um cenário que provoca o fortalecimento na obtenção de renda. Possibilitando, assim, a expansão no desenvolvimento socioeconômico das famílias, além de fornecer melhorias nutricionais para dieta dessas famílias (CASTELO BRANCO, 2007).

O ambiente urbano pode ser estimulado pelas iniciativas do desenvolvimento de práticas agrícolas e ambientais que atuam de maneira eficiente e sustentável, contando que estejam associados a todos os processos de manejo do meio ambiente, incluindo os fatores referentes à ecologia e à biodiversidade (MACHADO; MACHADO, 2002).

Neste sentido, a agricultura urbana pode ser associada com a segurança alimentar e desenvolvimento da biodiversidade, tendo em vista o favorecimento de melhor aproveitamento dos espaços, manejo adequado dos recursos de solo e água, bem como às questões ambientais (MACHADO; MACHADO, 2002).

Diante do exposto, verificou-se a necessidade de entender o funcionamento da

atividade agrícola em áreas residências do Maranhão, uma vez que esta prática se apresenta constantemente nas pequenas cidades do estado. Desta forma, objetivou-se com o presente trabalho, conhecer e compreender os padrões de cultivos de hortaliças nas cidades de Anapurus e Mata Roma, a fim de obter informações a respeito da conservação e manejo da agrobiodiversidade.

## 2 | METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada no estado do Maranhão, nos municípios de Anapurus, localizado à uma altitude de 82 metros, sob as coordenadas: latitude 03°40'18" S e longitude 43°06'58" W; e Mata Roma, localizado à uma altitude de 80 metros, sob as coordenadas: latitude 03°37'30" S e longitude 43°06'40" W. Segundo o IBGE (2010), a população dos municípios totaliza-se 13.939 e 15.150 habitantes. A coleta de dados foi realizada entre os meses de setembro e novembro de 2016.

Para o levantamento de dados foi elaborado um questionário semiestruturado, composto por treze perguntas, aplicados em 30 pessoas de cada município, sendo contempladas questões inerentes a forma de cultivo, origem das sementes, espécies cultivadas, tipo de substrato, orientação fitotécnica (manejo de daninhas, pragas e doenças). A aplicação do mesmo foi realizada por meio de entrevista, de forma individual e aleatória.

Posteriormente à aplicação, os dados foram organizados e analisados a partir de agrupamento considerando as variáveis já citadas, permitindo assim, a aproximação de indivíduos ou variáveis numéricas em conjuntos de dados expressos em porcentagem, podendo-se fazer inferências sobre cultivo/produção de hortaliças em espaços residenciais nas cidades de Anapurus e Mata Roma, MA.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Constatou-se que o padrão de cultivo entre os municípios de Anapurus e Mata Roma foram similares a 58% e 42% (Figura 1). Pessoa et al (2006), descreve que o cultivo de espécies alimentares em hortas domésticas favorece o acesso de alimentos frescos em quantidade e qualidade, cooperando para a segurança alimentar e nutricional. Contribuindo de maneira positiva para a saúde, pois além de agirem como alimentos funcionais, beneficiam uma ou mais função orgânica, além de reduzirem o risco de doenças. (CARVALHO et al., 2006).

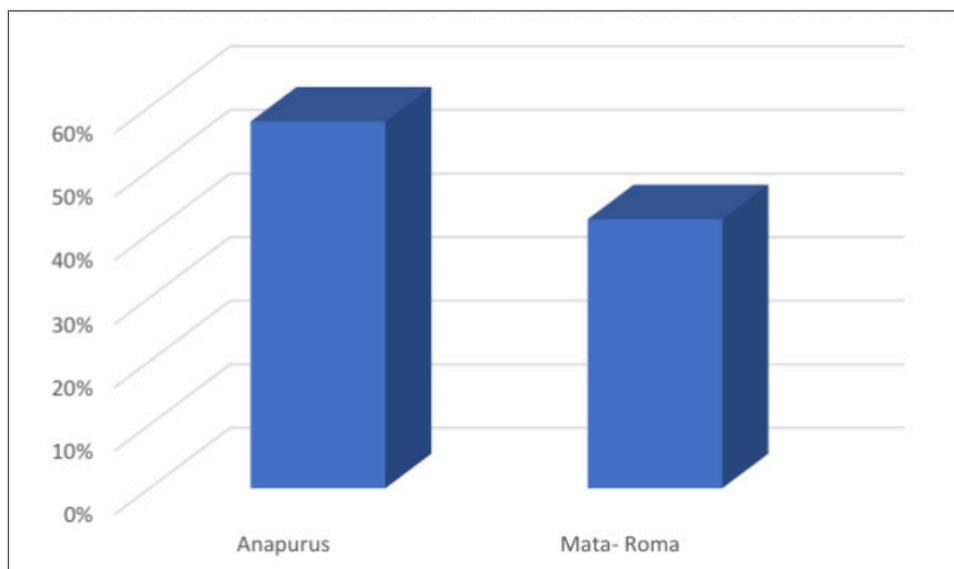


Figura 1: Padrão de cultivo de hortaliças desenvolvido pelos moradores no perímetro urbano dos municípios de Anapurus e Mata Roma no estado do Maranhão. UFMA, 2016.

Três formas de cultivos foram adotadas pelos moradores dos municípios estudados (Figura 2), onde 47% cultivam em canteiro suspenso, 38% cultivam em canteiros no chão e 11% em vasos. A utilização da prática de cultivar hortaliças em canteiros suspensos é uma estratégia de diversificação e ampliação da capacidade produtiva do sistema de produção. Pois através desta forma de cultivo várias espécies vegetais são mantidas no espaço, permitindo a produção de hortaliças continuamente, durante o ano todo, fazendo-se o uso de substratos preparados pelos próprios residentes (KANEKO, 2006; NODA, 2007).

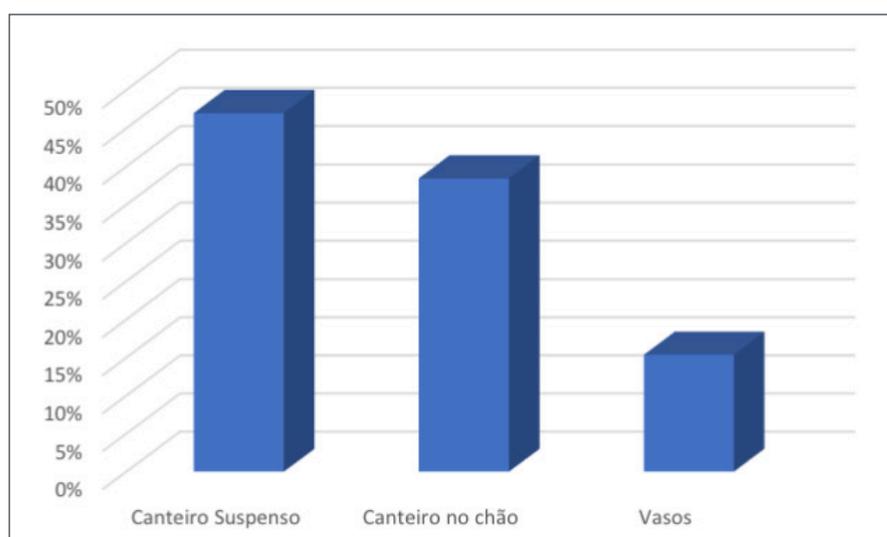


Figura 2: Local de cultivo das hortaliças em espaços residenciais nas cidades de Anapurus e Mata Roma, MA. UFMA, 2016.

No que se refere ao processo de aquisição de sementes (figura 3), 91% das pessoas entrevistadas em Anapurus e 60% em Mata Roma adquirem por meio de compra, sendo um dado alarmante por não conservar a diversidade dos RG's dos

municípios. A obtenção de sementes via multiplicação e por meio de doações nos municípios tornou-se deficiente, poucas famílias continuam com hábito de guardar sementes, enfraquecendo cada vez mais o conhecimento que era passado de geração para geração, limitando a interação com outras localidades e outras famílias, reduzindo o resgate de sementes que se encontram em situação crítica para se perder.

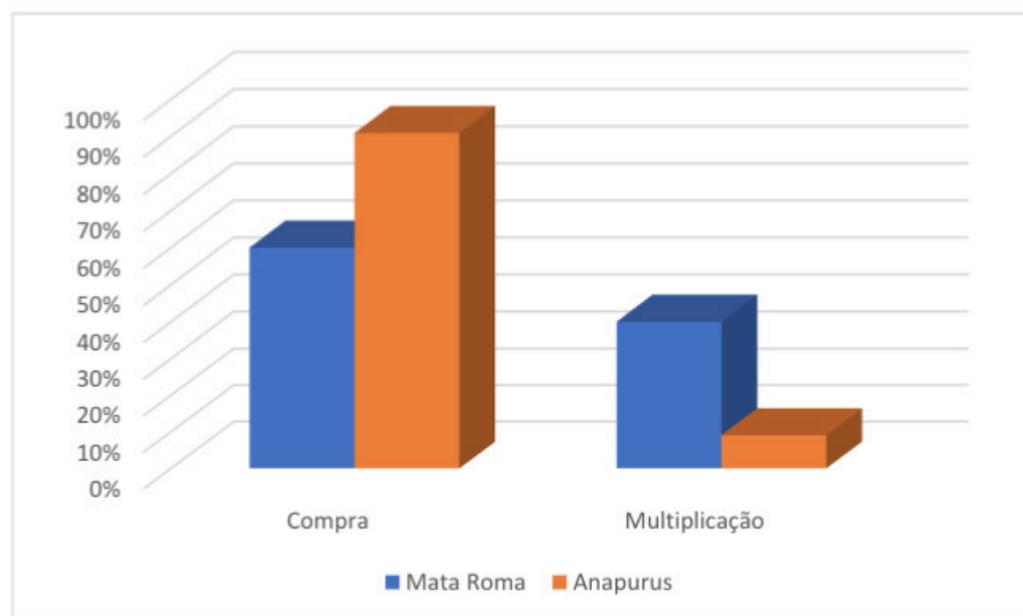


Figura 3: Origem das sementes de hortaliças cultivadas pelos entrevistados nos municípios de Anapurus e Mata Roma, MA. UFMA, 2016.

As técnicas de cultivo, métodos de controle de pragas dos entrevistados que cultivam hortaliças em suas residências é decorrente da influência dos pais, sendo este hábito repassado entre as gerações, mantendo o hábito de plantar e colher espécies alimentares, os métodos de controle de pragas mais utilizados pelos entrevistados são: receitas caseiras (90% em Mata Roma) e controle químico (50% em Anapurus) (Figura 4).

Identificando o tipo de substrato utilizado ainda há a preferência, em ambos os municípios, 100% dos entrevistados produzem seu próprio composto a partir de materiais disponíveis nas localidades, substituindo, assim, o uso de substratos comerciais. Os compostos mais comuns utilizados são: esterco bovino + solo; esterco caprino + solo; composto orgânico de palmeira.

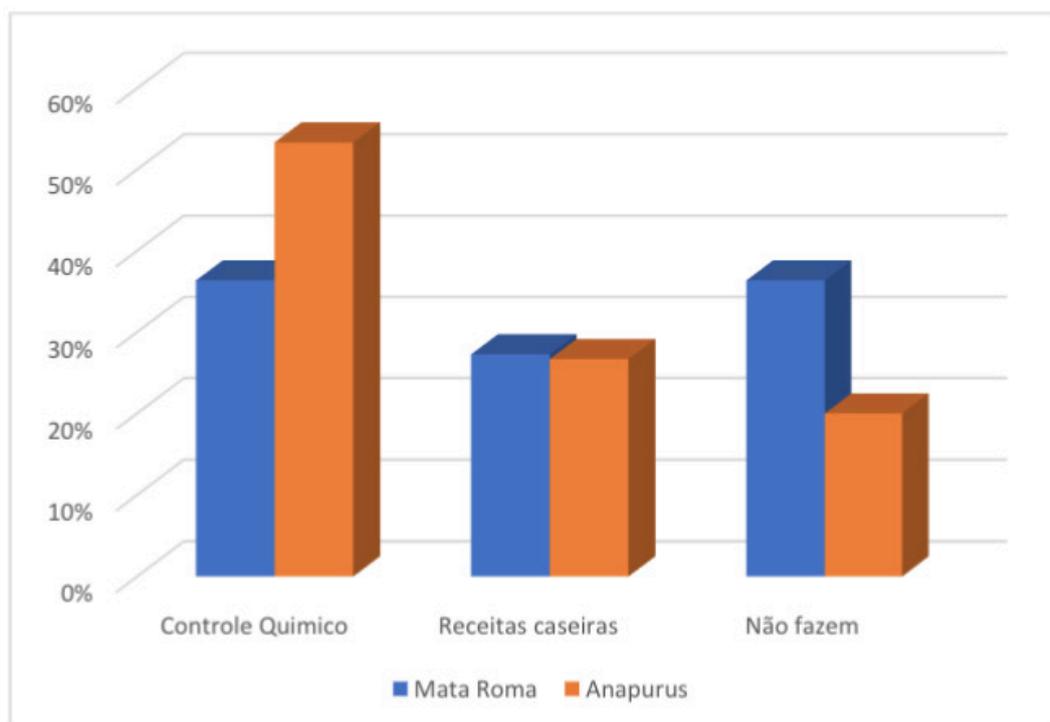


Figura 4: Métodos para o controle de pragas utilizadas pelos entrevistados nos municípios de Anapurus e Mata Roma, MA. UFMA, 2016.

Os tipos de substratos utilizados para a produção devem proporcionar condições adequadas à germinação e a um bom desenvolvimento de sistema radicular, devendo possuir boa textura e estrutura, pH adequado, fertilidade e livre de patógenos, fatores que caracterizam o hábito de cultivo decorrente das influências dos pais, denotando a permanência de uma herança cultural. (GODOY; FARINACIO, 2007).

#### 4 | CONCLUSÕES

Os padrões de cultivos das hortaliças nos municípios de Anapurus e Mata Roma são similares e se caracterizam pela rusticidade e simplicidade da estrutura física usada do plantio ao manejo; e por manter o cultivo tradicional das hortaliças em algum espaço do perímetro urbano.

A manutenção da agrobiodiversidade é influenciada negativamente pela compra de sementes em lojas agropecuárias e o não armazenamento e conservação para cultivos posteriores.

#### REFERÊNCIAS

CARVALHO, P.G.B., MACHADO, C.M.M., MORETTI, C.L., FONSECA, M.E.N. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**: Brasília, v.34, n.12, p.303-304.2006.

CASTELO BRANCO, M. Uma revisão da agricultura urbana no mundo em desenvolvimento. In: \_\_\_\_\_; MELO, P.E. de; ALCÂNTARA, F.A. de (Org). **Hortas Comunitárias: O Projeto Horta Urbana de Santo Antônio do Descoberto**. 1. Ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007.p13.

COSTA, C. G. A.; GARCIA, M. T.; RIBEIRO, S. M.; SALANDINI, M. F. S. de.; BÓGUS, C. M. Hortas comunitárias como atividade promotora de saúde: uma experiência em Unidades Básicas de Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**. São Paulo. Vol.20, n.10, p.3099-3110.2015.

GODOY, W.I.; FARINACIO, D. Comparação de substratos alternativos para a produção de mudas de tomateiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, o. 1095-1098, 2007.

KANECO, M. G. **Produção de coentro e cebolinha em substratos regionais da Amazônia à base de madeira em decomposição (Paú)**. 2006. 58 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

MACHADO, A.T.; MACHADO C.T.T. **Agricultura Urbana**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. (Embrapa Cerrados, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 48).

NODA, S. do N. org. **Agricultura Familiar na Amazônia das Águas**. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2007.

PESSOA C.C.; SOUZA, M.; SCHUCH, I. **Agricultura urbana e Segurança Alimentar: estudo no município de Santa Maria – RS**. Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, v.13, n.1, p.23-27, 2006. Disponível em:< [http://www.unemat.br/revistas/rcaa/docs/vol8/7\\_artigo\\_v8.pdf](http://www.unemat.br/revistas/rcaa/docs/vol8/7_artigo_v8.pdf)> . Acesso em: abril. 2019.

## RECEPTIVIDADE ESTIGMÁTICA, VIABILIDADE E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DO PÓLEN DA ESPÉCIE *Delonix regia* (Bojerex Hook.) RAF. NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA – UEFS

### Hortênciã Kardec da Silva

Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em Recursos  
Genéticos Vegetais, Feira de Santana- BA.

### Jéssica Barros Andrade

Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em Recursos  
Genéticos Vegetais, Feira de Santana- BA.

### Joseane Inácio da Silva Moraes

Universidade Federal do Piauí, Programa de  
Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de  
Plantas, Teresina-PI.

### Katiane Oliveira Porto

Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em Recursos  
Genéticos Vegetais, Feira de Santana- BA.

**RESUMO:** A espécie *Delonix regia* (BojerexHook.) Raf. conhecida popularmente como flamboyant apresenta potencial ornamental, alimentício e medicinal. É uma espécie bastante estudada pelo mundo, contudo no Brasil as pesquisas ainda são escassas. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade e a germinação *in vitro* do pólen e a receptividade estigmática da espécie. As flores foram coletadas no período da manhã, em plantas localizadas no módulo um, na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), sendo avaliadas cinco plantas em um total de 29 presentes no respectivo módulo.

Para a viabilidade polínica, foram adotados os testes com os corantes: lactofenol azul de anilina, tetrazólio e carmim acético. Para a taxa de germinação ocorreu a exposição dos grãos de pólen em dois meios de cultura: (M1) meio BCa e (M2) meio BMg. Para a receptividade, os estigmas foram imersos assim que retirados em Placas de Petri contendo Peróxido de Hidrogênio (PH) a 3%. O melhor corante para avaliar a viabilidade do pólen foi o lactofenol, com um índice de 95.6% de polens viáveis, contudo vale ressaltar que todos apresentaram altas taxas de coloração. Enquanto que para a germinação, os meios de cultura não apresentaram diferença significativa. No entanto, a receptividade estigmática apresentou taxas acima de 80% em todos os indivíduos avaliados. Assim, conclui-se que são necessários mais estudos e que levem em consideração outros aspectos da biologia reprodutiva da espécie.

**PALAVRAS-CHAVE:** Flamboyant; Germinação *in vitro*; Receptividade estigmática; Viabilidade Polínica.

ESTIGMATIC RECEPTIVITY, VIABILITY AND  
*IN VITRO* GERMINATION OF POLLEN OF  
SPECIES *Delonix regia* (Bojerex Hook.) RAF.  
IN THE STATE UNIVERSITY OF FEIRA DE

**ABSTRACT:** The species *Delonix regia* (Bojerex Hook.) Raf. popularly known as flamboyant presents ornamental, food and medicinal potential. It is a species well studied by the world, however in Brazil the researches are still scarce. The objective of this study was to evaluate the viability and *in vitro* germination of pollen and the stigmatic receptivity of the species. The flowers were collected in the morning, in plants located in module one, in the State University of Feira de Santana (UEFS), being evaluated five plants in a total of 29 present in the respective module. For the pollen viability, the tests with the dyes were adopted: lactophenol blue of aniline, tetrazolium and carmine acetic. For the germination rate, the pollen grains were exposed in two culture media: (M1) medium BCa and (M2) medium BMg. For receptivity, the stigmas were immersed as they were withdrawn in Petri dishes containing 3% Hydrogen Peroxide (PH). The best dye to evaluate the viability of pollen was lactophenol, with a rate of 95.6% of viable pollen, however it is worth mentioning that all presented high staining rates. While for the germination, the culture media did not present significant difference. However, stigmatic receptivity presented rates above 80% in all individuals evaluated. Thus, it is concluded that further studies are necessary and that they take into account other aspects of the reproductive biology of the species.

**KEYWORDS:** Flamboyant; *In vitro* germination; Stigmatic receptivity; Pollination viability.

## 1 | INTRODUÇÃO

*Delonix regia* (Bojerex Hook.) Raf., pertencente à família Fabaceae, é conhecida popularmente como flamboyant, trata-se de uma espécie florestal exótica, originária de Madagascar e adaptada às condições ambientais de clima tropical (LUCENA et al., 2006; ATAÍDE et al., 2013). Por ser uma espécie bastante florífera e ornamental, ela é muito utilizada na arborização de parques e ornamentação de jardins. (LORENZI et al., 2003). Além disso, a espécie possui potencial alimentício (PANDO et al., 2001) e farmacológico (LÓPEZ, 2010).

Estudos envolvendo a viabilidade polínica e receptividade estigmática fazem parte do conhecimento sobre a biologia reprodutiva da espécie e auxiliam em programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos vegetais (SEREJO et al., 2012). Assim, pesquisas relacionados a reprodução vegetal são de suma importância, principalmente, para melhorar a renda dos produtores, pois visam o aumento tanto no nível de produção como no tamanho e na qualidade dos frutos uma vez que a taxa do pólen germinado é proporcional a quantidade de sementes e frutos produzidos (VIANA et al., 2007).

A viabilidade polínica pode ser comprometida por fatores ambientais que podem afetar o valor nutricional da planta e interferir tanto na qualidade como na quantidade do pólen produzido (CRUDEN, 2000). Uma das formas de observar este método é por meio de coloração com diferentes tipos de corantes e estimação da porcentagem de

polens viáveis obtidos através da contagem dos grãos de pólen mais corados no teste colorimétrico (KELLY et al., 2002; TECHIO et al., 2006).

A germinação do pólen *in vitro* auxilia na compreensão do processo de crescimento do tubo polínico, sendo possível assim obter uma maior confiabilidade ao teste de viabilidade polínica, uma vez que este método permite verificar a porcentagem de germinação em meio de cultura apropriado, observando após 24 horas a presença ou ausência da formação do tubo polínico, cujo comprimento é maior que o diâmetro do pólen e assim aferindo uma relação com a porcentagem do método de contagem de polens viáveis com a de polens germinados (SALLES et al., 2006).

A receptividade estigmática é um fator fundamental, no qual se determina o melhor período para que ocorra a deposição do grão do pólen no estigma e assim a germinação ou possível sincronismo entre a sua receptividade e viabilidade do pólen da mesma planta seja determinado. É uma técnica realizada através de testes histoquímicos usando peróxido de hidrogênio, o qual se caracteriza em um teste rápido e de baixo custo (DAFNI, 1992; BRITO et al., 2010).

Em levantamentos realizados na literatura sobre a espécie *D. regia*, apenas um estudo sobre viabilidade polínica e índice meiótico foi encontrado (NASCIMENTO et al., 2014), portanto pesquisas que visem ampliar o conhecimento sobre a biologia reprodutiva da espécie são essenciais. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o percentual de viabilidade, germinação *in vitro* do pólen e receptividade estigmática da espécie *D. regia*.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta e Armazenamento dos grãos de pólen

O presente trabalho foi realizado no período da manhã em plantas localizadas no módulo um da Universidade Estadual de Feira de Santana, latitude 12°16' sul e longitude 38°58' oeste. Nesta área da universidade encontram-se o total de 29 árvores de flamboyant, mas para as análises foram utilizadas cinco plantas.

Os estigmas foram coletados e depositados em placas de Petri contendo Peróxido de Hidrogênio (PH) a 3%, cuja análise foi realizada no próprio local de estudo. Enquanto que a coleta e o armazenamento das anteras foram feitos a partir da retirada das mesmas, depositando-as em tubos Falcon de 15 ml, e conduzindo-as até ao Laboratório de Germinação do Horto Florestal em caixa de isopor.

### 2.2 Viabilidade polínica

A viabilidade dos grãos de pólen foi realizada por meio de testes a partir do uso de três tipos de corantes: tetrazólio (TTC), com coloração amarela; carmim acético, com coloração vermelha; e lactofenol azul de anilina, com coloração azul. Assim, para

todos os corantes, a metodologia para identificar a viabilidade polínica foi determinada de acordo com o nível de coloração, sendo classificado como pólen viável aqueles polens corados e pólen inviável aqueles que apresentaram forma irregular e incolor ou pouco corado (SOUSA, 2015).

Foram montadas para cada indivíduo quatro lâminas de cada corante com finalidade de repetição da análise. Assim, para cada lâmina foram contados 100 grãos de pólen e observado a quantidade de grãos corados e não corados, totalizando assim uma análise de 400 grãos de pólen para cada corante e 1200 grãos de polens por indivíduos (SOUSA, 2015).

### 2.3 Germinação *in vitro*

Os meios de cultura que receberam os grãos de pólen foram os seguintes: (M1) meio BCa ( $H_3BO_3$  0,01% +  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  0,03% + Ágar 0,4%) (SOUSA, 2015) e (M2) meio BMg ( $H_3BO_3$  0,01% +  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,02% +  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  0,03% + Ágar 0,4%) (BREWBAKER; KWACK, 1963). Os grãos de pólen foram dispostos em quatro lâminas para cada meio utilizado. O conjunto de lâminas contendo os grãos de pólen foram mantidos em placas de Petri com papel filtro umedecido com água destilada e armazenados em câmara B.O.D. (Biological Oxygen Demand) a 30°C durante 24 horas.

Após um dia na câmara, foi adicionado ao meio o corante azul de anilina a fim de corar os tubos polínicos e melhorar a observação dos mesmos, sendo assim, as taxas de germinação foram determinadas em 400 grãos de pólen (100/lâmina) para cada amostra. Os grãos de pólen foram considerados germinados quando o comprimento do tubo polínico foi maior que o dobro do diâmetro do grão de pólen (SOUSA et al., 2013).

### 2.4 Receptividade do estigma

Foram coletadas flores em antese no período da manhã. Os estigmas foram retirados e imersos em Placas de Petri contendo Peróxido de Hidrogênio (PH) a 3% e em seguida foi observada a formação ou não de bolhas, a formação destas ocorre pela presença da enzima peroxidase, sendo possível afirmar que o estigma se encontra receptivo (SOUZA et al., 2004).

### 2.5 Análise estatística

Para efeito de análise estatística, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, considerando as cinco amostras. Os dados relativos à viabilidade, germinabilidade e receptividade foram analisados através da ANOVA com 95% de confiabilidade e para efeito de diferenças entre tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Viabilidade polínica e Germinação *in vitro*

Os resultados obtidos por meio da Análise de Variância para a viabilidade do pólen estão expostos na Tabela 1. Nesta, pode-se observar que os diferentes corantes utilizados apresentaram médias significativas em nível de 5% de probabilidade.

FV	GL	SQ	QM	Valor p
Indivíduos	4	323.566667	80.891667	0.1043
Corantes	2	478.900000	239.450000	0.0047*
Indivíduo * Corantes	8	273.933333	34.241667	0.5525
Erro	45	1781.250000	39.583333	

**Tabela 1:** Resultado da Análise de Variância referente aos dados de viabilidade polínica, mostrando significância para o fator tipos de corantes.

\*Significância a nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 2 encontram-se as médias de coloração de cada corante para os indivíduos analisados. Mostrando que o indivíduo cinco foi o único que apresentou diferença significativa entre os corantes avaliados, com o lactofenol azul de anilina sendo o mais representativo do que o carmim acético e tetrazólio. Além disso, o lactofenol azul de anilina apresentou maiores taxas de viabilidade polínica para todos os indivíduos avaliados no presente trabalho, resultando em uma média geral de 95,75% dos grãos viáveis. Tal resultado pode ser explicado por Sousa et al. (2013), estes dizem que o uso deste corante, o lactofenol azul de anilina, apresenta uma baixa taxa de falso positivo quando comparados a outros métodos avaliativos.

Indivíduos	CC	TTC	LAA
1	94.75 a	89.25 a	97.50 a
2	87.25 a	84.50 a	91.00 a
3	89.25 a	94.00 a	95.25 a
4	93.00 a	90.00 a	97.25 a
5	89.00 ab	85.00 a	97.75 b
Total	<b>90.65</b>	<b>88.55</b>	<b>95.75</b>

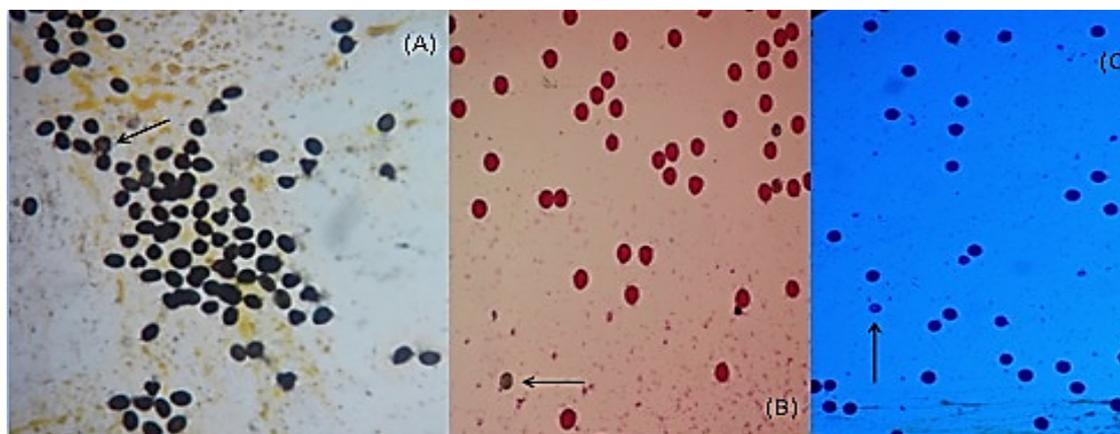
**Tabela 2:** Médias de polens viáveis por corante avaliado e sua significância resultante do teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. Onde: CC – Carmim Acético, TTC – Tetrazólio e LAA – Lactofenol Azul de Anilina.

\*Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si.

Chandrawat et al. (2012) também estudaram a viabilidade polínica de *D. regia* com o corante carmim acético e observaram uma taxa de 98,3% de polens viáveis, sendo este valor maior que o encontrado no presente trabalho. No entanto, Souza et

al. (2002) consideram alta as taxas acima de 70% para a viabilidade polínica, pois essas não causariam danos em trabalhos de melhoramento da espécie. Contudo, Silva (2008) ressalta que está técnica colorimétrica de viabilidade é bastante relativa e por isso a considera um método de utilização indireto.

Na Figura 6, pode-se observar fotos das lâminas contendo os polens viáveis e não viáveis em microscópios ópticos, representadas de acordo com o corante utilizado.



**Figura 6:** Coloração obtida a partir dos três corantes utilizados para a espécie *Delonix regia* e com presença de setas marcando os polens não viáveis. Onde: A) com Tetrazólio, B) com Carmim Acético e C) com Lactofenol Azul de Anilina.

Quanto ao teste de germinação *in vitro* de grãos de polens, a Tabela 3 mostra que os indivíduos apresentaram médias significativamente distintas entre si, no entanto, o meio de cultura não influenciou tal observação.

FV	GL	SQ	QM	Valor p
Indivíduos	4	6198.350000	1549.587500	0.0003**
Meio de cultura	1	105.625000	105.625000	0.4891
Indivíduo * Meio de cultura	4	487.750000	121.937500	0.6890
Erro	30	6459.250000	215.308333	

**Tabela 3:** Resultado da Análise de Variância para a germinação *in vitro* dos grãos de polens.

\*\*Significância a nível de 1% de probabilidade.

Podemos observar na Tabela 4, que o meio de cultura 1 (BCa), o qual foi constituído por sacarose, nitrato de cálcio e ácido bórico foi o que obteve maior representatividade na germinação dos grãos. No entanto, o meio de cultura 2 (BMg) difere do primeiro meio apenas pela presença de íons  $Mg^{+2}$ , o qual vem sendo fortemente utilizado para a germinação *in vitro* em espécies agrícolas, ornamentais e florestais (AKORODA, 1984; RATHORE; CHAUHAN, 1985; BOWES, 1990; CONNOR; TOWILL, 1993; KAKANI et al., 2005; PRASSAD et al., 2011).

Contudo, estudos em *Luffa aegyptica* (PRAJAPATI; JAIN, 2010) e *Borassus flabellifer* (Saha et al., 2016) apresentaram resultados semelhantes ao melhor meio de

cultura obtido no presente trabalho e comentam também sobre a melhor eficiência no uso do nitrato de cálcio para a germinação *in vitro* de grãos de polens.

Indivíduos	M1 – BCa	M2 - BMg
1	34.50 a	21.75 a
2	12.25 a	8.25 a
3	17.25 a	9.25 a
4	9.75 a	11.00 a
5	38.25 a	45.50 a
<b>Total</b>	<b>22.40</b>	<b>20.35</b>

**Tabela 4:** Médias de grãos de polens germinados *in vitro* nos meios de cultura M1 – BCa e M2 – BMg bem como o teste de significância de Tukey a nível de 5% de probabilidade para os indivíduos analisados.

\*Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si.

Segundo Soares et al. (2008) e Souza et al. (2014), o sucesso da germinação *in vitro* de grãos de pólen está relacionado a fatores endógenos e exógenos como o estado nutricional das plantas, horário e método de coleta dos grãos, fotoperíodo, temperatura, período de incubação e, por fim, a composição do meio de cultura. Como por exemplo, a sacarose é necessária para a nutrição do pólen, o controle osmótico e, em combinação com o boro, promove a formação do complexo açúcar-borato, o qual é facilmente translocável ao invés da sacarose sozinha (GAUCH; DUGGER, 1953). Enquanto que a forma ácida do boro promove o crescimento do tubo polínico (DABGAR; JAIN, 2001; ACAR et al., 2010) e sua deficiência resulta em baixa viabilidade e germinação do pólen e redução do crescimento do tubo polínico (NYOMORA; BROWN, 1997). No entanto, o cálcio também ajuda no crescimento, permeabilidade e integridade da membrana celular do tubo (BREWBAKER; MAJUMDER, 1961; BREWBAKER; KWACK, 1963; THERIOS et al., 1985; MILLER et al., 1992; BROWN et al., 1994; AK et al., 1995; SHORROCKS, 1997; ACAR; AK, 1998), uma vez que o cálcio se liga as pectinas presentes nas paredes do tubo polínico (KWACK, 1967).

Com relação às amostras de polens que foram testadas, observa-se que apesar de apresentarem uma boa viabilidade polínica os grãos de pólen da espécie estudada não tiveram uma boa taxa de germinação *in vitro* (Tabela 2;4). Esse resultado está de acordo com o que foi postulado por Galletta (1983), que diz:

“Métodos que utilizam corantes apresentam vantagens quanto à rapidez e facilidade em relação à germinação de pólen *in vitro*, mas superestimam a viabilidade do pólen, já que grãos de pólen inviáveis podem ser corados devido à presença de enzimas, amido ou outras substâncias”.

### 3.2 Receptividade do estigma

Rech et al. (2014) estudou o órgão reprodutor feminino do flamboyant (*Delonix regia*) e observou que o mesmo apresenta um ovário supero e um estigma projetado

acima das anteras. E isto descreve um mecanismo estrutural de hercogamia, ou seja, há uma incompatibilidade de polinização direta nesta espécie.

No Gráfico 1, encontra-se exposto a quantidade de estigmas totais analisados e receptivos, sendo que dos cinco indivíduos avaliados, três apresentaram 100%, um com 90% (indivíduo 2) e outro com 81,8% (indivíduo 5) dos estigmas receptíveis. Considerando também estes dois últimos como sendo uma taxa alta e satisfatória para a espécie. No entanto, mesmo apresentando uma incompatibilidade, os órgãos apresentaram viáveis na mesma planta e período de retirada do grão de pólen.

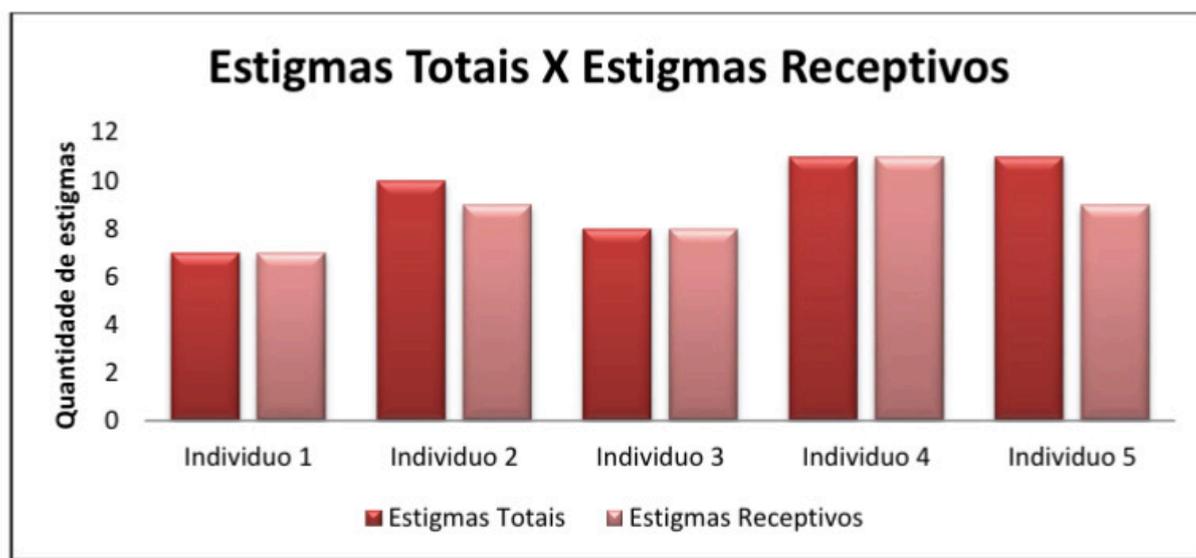


Gráfico 1: Quantidade de estigmas totais e receptivos dos indivíduos de *Delonix regia* analisados no presente trabalho.

#### 4 | CONCLUSÃO

Assim, se pode concluir que a planta apresenta elevados índices de viabilidade e receptividade estigmática, contudo uma baixa taxa de germinação *in vitro*, a qual pode ser devido ao meio de cultura utilizado. Por isso, se faz necessário maior aprofundamento nos temas aqui abordados devido à grande importância deste estudo para trabalhos futuros que visam avaliar melhor a receptividade estigmática no quesito desenvolvimento do tubo polínico através de técnica como a microscopia por epifluorescência e também para a germinação *in vitro* do pólen, testando diferentes níveis de nutrientes e diferentes períodos de germinação em B.O.D.

#### REFERÊNCIAS

ACAR, I.; AK, B. E. **An investigation on pollen germination rates of some selected male tree Sat Ceylanpinar State Farm.** Cahiers Options Mediterraneennes, v.33, p. 63-66, 1998.

ACAR, I. et al. **Effect of boron and gibberellic acidon in vitro pollen germination of Pistachio**

(*Pistacia vera* L.). African J. Biotechnol., v.9,n. 32,p. 5126-5130, 2010.

AK, B. E. et al. **An investigation on determining the ability of some Pistacias p. pollen germination.** Acta Hort., v. 419, p. 43- 48, 1995.

AKORODA, M. O. **Estimating pollen viability for controlled hybridization in whiteyam.** Crop Research, v. 24, p. 11-22, 1984.

ATAÍDE, G.M. et al. **Superação da dormência das sementes de *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf.** Revista Árvore, v.37, n.6, p.1145-1152, 2013.

BOWES, S. A. **Longterm storage of narcissus anthers and pollen in liquid nitrogen.** Euphytica, v. 48, n.3, p. 275-278, 1990.

BREWBAKER, J. L.; MAJUMDER, S. K. **Cultural studies of pollen population effect and self incompatibility in hibition.** American Journal Botany, v. 48, n.6, p. 457-464, 1961.

BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. **The essential role of Calciumion in pollen germination and pollen tube growth.** American Journal of Botany, v. 50, p. 859- 865, 1963.

BRITO, A. C. et al. **Propriedades do pólen e do estigma de *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita) para aumentar a eficiência de cruzamentos em programas de melhoramento.** Revista Brasileira de Plantas medicinais, v.12, n. 2, p.208 - 214, 2010.

BROWN, P. H. et al. **Boron nutrition of Pistachio: Thirdyear report. California Pistachio Industry.** Annual Report-Crop year 1992-1993, p. 60-63, 1994.

CHANDRAWAT, P. et al. **Cytological studies of two species of genus *Delonix*.** International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, vol. 3, n. 2, p.596-599, 2012.

CONNOR, K. F.; TOWILL, L. E. **Pollen handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-termstorage.** Euphytica, v. 68, p. 77-84, 1993.

CRUDEN, R. W. **Pollen grains: Why so many?** Plant Systematics and Evolution, v. 222, n.1, p. 143-165, 2000.

DABGAR, Y. B.; JAIN, B. K. **Effect of sucrose, boron, calcium and magnesium during in vitro pollen germination and tube growth in *Abelmoschus esculentus* Moench.** J. Swamy Bot. Club., v.8, p. 25-29, 2001.

DAFNI, A. **Pollination Ecology: A Practical Approach.** Oxford University Press: Oxford, 1992.

GALLETTA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J. N.; JANICK, J. (Ed.). **Methods in fruits breeding.** Indiana: Purdue University Press., p.23- 47, 1983.

GAUCH, H. G.; DUGGER, W. M. **The role of boron in the translocation of sucrose.** Plant Physiology, v.28, p. 457-466, 1953.

KAKANI, V. G. **Differences in in vitro pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature.** Annals of Botany, v. 96, p. 59-67, 2005.

KELLY, J. K. et al. **A method to estimate pollen viability from Pollen size variation.** American Journal of Botany, v. 89, n. 6, p.1021–1023, 2002.

KWACK, B. H. **Studies on cellular site of calcium action in promoting pollen tube growth.** Plant Physiology, v. 20, p.825-833. 1967.

- LORENZI, H. et al. *Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas*. 1. ed. Nova Odessa: Plantarum. 2003. 368 p.
- LUCENA, A. M. A. et al. **Emprego de substratos irrigados com água de abastecimento e residuária na propagação do flamboyant**. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v.6, n.1, p.115-121, 2006.
- LÓPEZ, R. E. S. ***Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raffin (Fabaceae)**. Revista Fitos, v.5, n.2, p.45-51, 2010.
- MILLER, D. D.; CALLAHAM, D. A.; GROSS, D. J.; HEPLER, P. K. **Free Ca<sup>2+</sup> gradient in growing pollen tubes of *Lilium***. Journal of Cell Science, v.101, p. 7-12, 1992.
- NASCIMENTO, L. S. et al. **Estimativa da viabilidade polínica e índice meiótico de *Delonix regia***. Estudos, Goiânia, v. 41, especial, p. 83-88, 2014.
- NYOMORA, A. M. S.; BROWN, P. H. **Fall foliar applied boron increases tissue boron concentration and nut set of almond**. J. Am. Soc. Hort. Sci, v.122, n.3, p.405-410, 1997.
- PANDO, S.C. et al. **Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds**. Phytochemistry, v.57, n.5, p.625–631, 2001.
- PRAJAPATI, P. P.; JAIN, B. K. **Effect of sucrose, boron, calcium, magnesium and nitrate during in vitro pollen germination in *Luffa aegyptica* Mill**. Prajna, v.18, p. 5-8, 2010.
- PRASSAD, P. V. V. et al. **Longevity and temperature response of pollen as affected by elevated growth temperature and carbondioxide in peanut and grain sorghum**. Environmental and Experimental Botany, v. 70, p. 51–57, 2011.
- RATHORE, V.; CHAUHAN, S. V. S. **In vitro pollen germination in some Bignoniaceae**. Indian Journal of Forestry, v. 8, n. 2, p. 99-102, 1985.
- RECH, A. R. et al. **Biologia da polinização**. Editora: Projeto Cultural. 1.ed. Rio de Janeiro, 2014.
- SAHA, H. et al. **Studies on *in vitro* pollen germination and tube development of *Borassus flabellifer* L**. International Journal of Recent Scientific Research, n.6, p.11985-11989, 2016.
- SALLES, L. A. et al. **Sacarose e pH na germinação *in vitro* dce grãos de pólen de citros**. Ciência e Agrotecnologia, v. 30, n. 1, p. 170-174, 2006.
- SEREJO, J. A. S. et al. **Efeito da desidratação na viabilidade de pólen de bananeira**. In: II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2012, Belém. Anais... Distrito Federal: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012.
- SHORROCKS, V. M. **The occurrence and correction of boron deficiency**. Plant and Soil, v.193, p. 121-148, 1997.
- SILVA, G. S. **Contribuição à taxonomia do gênero *Arachis*—secção à luz do estudo de espécies e híbridos interespecíficos**. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2008.
- SOARES, T. L. et al. **In vitro germination and viability of pollen grains of banana diploids**. Crop Breeding and Applied Biotechnology, v.8, p. 111-118, 2008.
- SOUZA, M. M. et al. **Microsporogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera**

**e viabilidade polínica em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener).** Ciência e Agrotecnologia, v. 26, p.1209-1217, 2002.

SOUZA, M. M. et al. **Flower receptivity and fruit characteristics associated to time of pollination in the yellow passion fruit *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (Passifloraceae).** Scientia Horticulturae, v.101, p. 373–385, 2004.

SOUSA, A. S. et al. **Viability and action of CPL lectin on in vitro germinability of pollen grains of *Malpighia marginata* DC. (Malpighiaceae).** American Journal of Plant Sciences, v. 4, p. 53-58, 2013.

SOUZA, E. H. et al. **Viability, storage and ultra structure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest.** Euphytica, v. 44, p. 37-42, 2014.

SOUSA, A. S. **Viabilidade e ação de lectinas na germinação *in vitro* de grãos de pólen de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq. – Arecaceae).** 2015. 57 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.

TECHIO, V. H. et al. **Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho).** Acta Scientiarum Biological Sciences, v. 28, n.1, p. 7-12, 2006.

THERIOS, I. N.; TSIRAKOGLU, V. M.; DIMOSSI-THERIOU, K. N. Physiological aspects of pistachio (*Pistacia Vera* L.) pollen germination. **Rivista Orto florofruttlaly**, v. 69, p. 161-170, 1985.

VIANNA, M. R. et al. **Manejo de polinizadores e o incremento da produtividade agrícola: uma abordagem sustentável dos serviços do ecossistema.** Revista Brasileira de Agroecologia, v. 2, n. 1, p. 144-147, 2007.

## RECURSOS GENÉTICOS DE VIDEIRA NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

**Patrícia Coelho de Souza Leão**

Embrapa Semi árido, BR 428, km 152, Zona Rural, Petrolina, PE, patricia.leao@embrapa.br

**RESUMO:** Os recursos genéticos de videira conservados principalmente em Bancos de Germoplasma são a fonte de variabilidade genética para o desenvolvimento de novas cultivares com diferentes objetivos: consumo in natura, passas e vinhos e sucos, associadas a características como adaptação, elevada produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças. O Banco de Germoplasma de Uva da Embrapa Semiárido é o único presente no Nordeste do Brasil, em clima tropical semi-árido e representa um recurso estratégico para a sustentabilidade da vitivinicultura tropical. Atualmente, a coleção é composta por 268 genótipos: 54% são uvas de mesa e uvas passas, 34% são uvas para vinho e suco, 4,8% são de origem desconhecida, 5,2% são porta-enxertos e 1,9% são espécies americanas selvagens. Em relação à classificação botânica, 62,6% pertencem à espécie *V. vinifera* L., sendo os híbridos interespecíficos o segundo grupo com maior número de genótipos (27,2%). Há duas safras por ano para caracterização agrônômica. O Banco de Germoplasma de Uva da Embrapa Semiárido tem sido utilizado como fonte de germoplasma para o programa de melhoramento

de uva visando o desenvolvimento de novas cultivares de uvas de mesa sem sementes adaptadas ao ambiente tropical semiárido do Nordeste do Brasil, além de ser utilizado em outros estudos como divergência genética, triagem de genótipos de resistência a doenças, caracterização de compostos bioativos. Os resultados foram importantes para o fortalecimento e sustentabilidade da indústria de viticultura brasileira.

**PALAVRAS-CHAVE:** germoplasma; videira; uva; recursos genéticos; cultivares

### GRAPEVINE GENETIC RESOURCES IN THE BRAZILIAN SEMI ARID

**ABSTRACT:** Grapevine genetic resources conserved mainly in germplasm banks are the source of genetic variability for the development of new cultivars with different objectives: table grapes, raisins, wines and juices, associated with characteristics such as adaptation, high productivity, quality of fruits and disease resistance. The Grape Germplasm Bank of Embrapa Semiarid is the only one present in the Northeast of Brazil, in a semi-arid tropical climate and represents a strategic resource for the sustainability of the tropical viticulture. Currently, the collection is compound by 268 genotypes: 54% are table grapes and raisins

cultivars, 34% are grapes for wine and juice, 4.8% are of unknown origin, 5.2% are rootstocks and 1.9% are wild American species. Regards to the botanical classification, 62.6% belong to the species *V. vinifera* L., the interspecific hybrids being the second group with the highest number of genotypes (27.2%). There are two harvests per year for agronomic characterization. The Grape Germplasm Bank of Embrapa Semiarid has been used as the source of germplasm for the grape breeding program aiming development of new seedless table grapes cultivars adapted to the semiarid tropical environment of Northeast Brazil, in addition to being used in other studies like genetic divergence, screening for diseases resistance genotypes, characterization for bioactive compound. The results have been important for the strengthening and sustainability of the Brazilian viticulture industry.

**KEYWORDS:** germplasm; grapevine; grape; genetic resources; cultivar

## 1 | INTRODUÇÃO

A variabilidade genética da videira (*Vitis* sp.) é resultado de eventos de cruzamentos espontâneos e mutações que ocorreram ao longo de séculos de domesticação e cultivo das espécies e disseminada para as mais distantes regiões do mundo. A preservação do genótipo original foi possível por meio da propagação vegetativa, sendo a conservação *ex situ*, em Bancos de Germoplasma, a principal forma de conservação do gênero *Vitis* e suas espécies. A caracterização do germoplasma de videira tem sido tradicionalmente baseados na ampelografia, mas nas últimas décadas, os marcadores moleculares são utilizados com os mais diferentes objetivos na caracterização e manejo do germoplasma de videira.

No Brasil, a conservação do germoplasma de videira é responsabilidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, composta por duas coleções, localizadas em duas regiões vitícolas distintas do país. A principal coleção está na Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul. Este Banco de Germoplasma destaca-se como a maior coleção de germoplasma de videira da América Latina com 1418 acessos. Possui espécies de *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca* e espécies americanas tropicais silvestres, como *Vitis caribaea*, *Vitis gigas*, *Vitis smalliana* e *Vitis schuttleworthii*. Híbridos interespecíficos complexos desenvolvidos em programas de melhoramento genético na Europa, após a disseminação da filoxera, como “Seibel” e “SeyveVillard”, resultados de cruzamentos entre *V. vinifera* e espécies americanas como *V. rupestris*, *V. riparia*, *V. aestivalis*, *V. cinerea*, *V. berlandieri*, *V. bourquina* e *V. labrusca*, também estão incluídos neste Banco de Germoplasma e são utilizados pelo programa de melhoramento genético da Embrapa, principalmente como fonte de resistência as principais pragas e doenças que afetam a videira (<https://www.embrapa.br/en/uva-e-vinho/banco-ativo-de-germoplasma-de-uva>).

Este germoplasma foi caracterizado e avaliado nas condições de Bento Gonçalves, RS, obtendo-se informações importantes para o uso adequado de cada

acesso (espécie, cultivar, clone) pelas diferentes linhas de pesquisa e por diferentes elos da cadeia da uva e do vinho (vitivinicultores, pesquisadores, técnicos, empresários e outros (<https://www.embrapa.br/en/uva-e-vinho/banco-ativo-de-germoplasma-de-uva>)).

No Nordeste do Brasil, região que abrange o Vale do Submédio São Francisco, está localizada a segunda coleção que compõe o Banco de Germoplasma de Videira da Embrapa. Este Banco de Germoplasma é mantido, conservado, caracterizado e documentado pela EMBRAPA Semiárido e destaca-se por ser o único presente em condições tropicais semi áridas no país, constituindo-se um recurso e fonte de informações estratégico para a vitivinicultura tropical.

Este Banco de Germoplasma originou-se de uma pequena coleção estabelecida em 1965, constituída por genótipos coletados na região semi árida do Nordeste e enriquecida nos anos seguintes com cultivares importados da FAO e do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em São Paulo. A partir da década de 1980, iniciaram-se pesquisas de avaliação morfo agrônômica dos genótipos, com destaque para cultivares com características desejáveis para serem recomendadas para cultivo comercial ou utilizadas no melhoramento genético. Borges et al. (2008), Leão et al. (2010; 2011) e Nunes et al. (2015) analisaram a diversidade genética deste Banco de Germoplasma através de diferentes métodos estatísticos multivariados, resultando na recomendação de cruzamentos baseados em suas distâncias genéticas. Os resultados obtidos demonstraram a presença de variabilidade satisfatória entre os genótipos de uvas de mesa, no entanto, essa variabilidade foi menor entre as cultivares de uvas para vinho.

Como subsídios para pesquisas de melhoramento genético, o germoplasma de uva tem sido avaliado com o objetivo de selecionar fontes de resistência às doenças mais importantes que afetam a viticultura no Vale do Submédio São Francisco. Quatorze genótipos (Isabel, Gros Colman, Hinrod Seedless, H-4-49-69, Feher Szagos, Chenin Blanc, Semillon, Baco Blanc, Seara Nova, Tibouren, Aramon, Dattier de Saint Valler, Muscatde Sait Vallier e Reliance) foram identificados com resistência ao oídio (TAVARES et al., 1996).

A caracterização molecular de 81% dos acessos dessa coleção foi realizada por Leão et al. (2009) utilizando sete marcadores microssatélites. Este foi o primeiro estudo de caracterização molecular de uma coleção de germoplasma de videira no Brasil a partir de marcadores moleculares microssatélites. Os perfis alélicos obtidos foram comparados com bancos de dados internacionais, permitindo a identificação de acessos duplicados, sinonímias e erros de denominação, gerando uma robusta base de dados para a identificação de cultivares de videira.

A caracterização e os estudos de divergência genética em relação a compostos bioativos, atividade antioxidante e outros atributos de qualidade da uva também foi realizado, encontrando-se variabilidade genética entre os genótipos, destacando-se as cultivares Cardinal, Royalty, Máximo e Tampa pela riqueza em compostos bioativos

e atividade antioxidante, podendo ser recomendadas pelo seu maior potencial nutracêutico (BATISTA, 2014).

O germoplasma de videira conservado na EMBRAPA Semiárido tem sido utilizado ao longo de quatro décadas como base e fonte em pesquisas multidisciplinares, no entanto, um de seus principais objetivos é fornecer informações sobre o comportamento dos genótipos e a variabilidade necessária para as pesquisas de melhoramento genético. Esses projetos pretendem avançar nos próximos anos para o desenvolvimento de novas cultivares de uvas de mesa sem sementes adaptadas às condições tropicais do semi árido brasileiro.

## 2 | COMPOSIÇÃO E MANEJO DO GERMOPLASMA

O Banco de Germoplasma de Videira no semiárido é composto por 268 acessos, que podem ser classificados conforme a finalidade comercial da produção da uva: 54% correspondem a cultivares de uvas de mesa e passas, 34% são cultivares de uvas para processamento de vinho e suco, 4,8% tem origem desconhecida, 5,2% são porta-enxertos e 1,9% são espécies americanas silvestres. Em relação à classificação botânica, incluem 168 cultivares de *Vitis vinifera* L., 8 cultivares de *Vitis labrusca* L., 73 híbridos interespecíficos e 8 espécies americanas (*Vitis rupestris*, *Vitis riparia*, *Vitis champini*, *Vitis cinerea*, *Vitis gigas* Fennel, *Vitis candicans* Engelmann, *Vitis doaniana* Munson e *Vitis shuttleworthi* House), além de 10 acessos para os quais não foram encontradas informações sobre origem, espécie ou pedigree na literatura. Portanto, a maioria dos genótipos (62,6%) pertencem à espécie *Vitis vinifera* L., sendo os híbridos interespecíficos, o segundo grupo de maior importância com 27,2% dos genótipos. Os dados de passaporte e caracterização estão cadastrados na plataforma on line de recursos genéticos da Embrapa – Alelo.

O Banco de Germoplasma de Videira da Embrapa Semiárido está localizado no Campo Experimental de Mandacaru, município de Juazeiro, Bahia (9 ° 24 "S, 40 ° 26" W e altitude de 365,5m). O clima da região é classificado de acordo com Köppen, como BswH, região tropical com clima quente e seco. Os dados meteorológicos, médias históricas de 31 anos no Campo Experimental de Mandacaru são: precipitação média anual de 505 mm, umidade relativa média anual de 60,7%, temperatura média anual máxima e mínima de 26,7°C, 32,0°C e 20,8°C, respectivamente ([www.cpatsa.embrapa.br/servicos/dadosmet/cem-anual.html](http://www.cpatsa.embrapa.br/servicos/dadosmet/cem-anual.html)). Os solos predominantes no local são classificados como Vertissolo.



Figura 1. Placa de identificação do Banco de Germoplasma de Videira. Foto: Patrícia Coelho de Souza Leão

As videiras são conduzidas em espaldeira com crescimento vertical ascendente dos ramos (Figura 2), irrigação localizada do tipo gotejamento e espaçamento de 3 metros entre linhas de plantio e 2 metros entre plantas. Cada genótipo é composto por quatro plantas que são conduzidas em cordão bilateral esporonado, com duas podas anuais alternando poda curta (2 a 3 gemas) no ciclo de produção que se realiza no primeiro semestre (Figura 2A), e podas longas (7 a 8 gemas), realizadas no ciclo de produção do segundo semestre do ano (Figura 2B). São realizadas apenas práticas culturais básicas como desbrota, amarrio e desponte de ramos e tratamentos fitossanitários. A aplicação dos nutrientes é realizada por meio de fertirrigação de acordo com as necessidades da planta determinadas pelas análises de solo e folha.



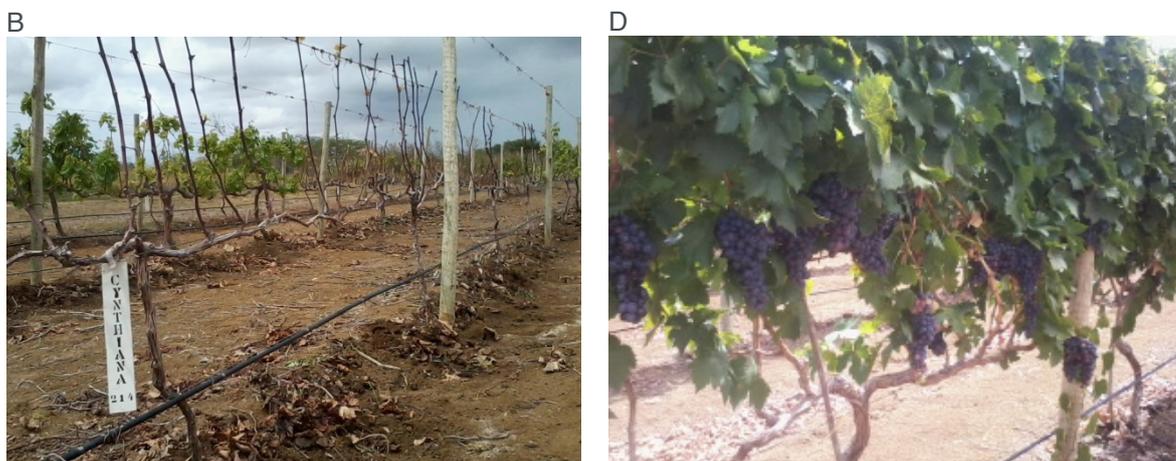


Figura 2. Videiras no Banco de Germoplasma em diferentes fases fenológicas: após a poda curta (A), poda longa (B), brotação (C) e fase final de maturação da uva (D). Fotos: Patrícia Coelho de Souza Leão

### 3 | CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DO GERMOPLASMA

A caracterização morfológica e agronômica baseia-se em uma lista mínima de características quantitativas e qualitativas adaptadas dos descritores de videira (IPGRI/UPOV/OIV 1997), incluindo a duração dos principais estádios fenológicos, produção, número de cachos, características dos cachos: massa, comprimento, largura, forma e compacidade, características das bagas: massa, comprimento, diâmetro, forma, cor, sabor, consistência da polpa, desgrane da baga e presença de sementes, teor de sólidos solúveis totais e acidez titulável.

As colheitas e avaliações foram iniciadas a partir de 2002 e realizadas continuamente no período de 2002 à 2019, correspondendo a trinta ciclos de produção.

Estatísticas descritivas foram obtidas: média, desvio padrão, máximo e mínimo, para todos os ciclos, bem como para os ciclos do primeiro e segundo semestre. Os genótipos foram divididos em três grupos: uvas de mesa com sementes, uvas de mesa sem sementes e uvas para processamento.

Os resultados indicam que há grande variação entre os genótipos e entre os ciclos de produção. O ciclo de produção que ocorre no segundo semestre do ano mostra um melhor desempenho agronômico dos genótipos, o que pode ser explicado pela maior carga de gemas na poda do segundo semestre em relação ao primeiro semestre. A maioria das cultivares de uvas sem sementes apresenta baixa fertilidade de gemas na poda curta.

No grupo de uvas de mesa, a maioria dos genótipos apresentam frutos verdes amarelados (35%), sabor neutro (64%), consistência de polpa carnosa (48%), cachos cilíndricos (37%) e baga globosa (44%). As cultivares de uvas com sementes apresentam valores para os componentes de produção e medidas biométricas de cachos e bagas maiores que as de uvas sem sementes (Leão et al., 2017a).

No grupo de cultivares de uvas com sementes, cultivares do tipo moscatel, como

‘Moscatel de Hamburgo’, ‘Moscatel de Jundiaí’, ‘Moscatel Nazareno’, ‘Muscat Noir’ e ‘Muscat Caillaba’ estão entre as mais produtivas e com maior número de cachos. As principais cultivares comerciais de uvas de mesa cultivadas no Vale do Submédio São Francisco, como ‘Italia’ e suas mutações naturais de cor vermelha, ‘Benitaka’ e ‘Brasil’ destacam-se pela sua massa, tamanho do cacho e da baga. O teor de sólidos solúveis varia de 12,8 a 22,2 °Brix, enquanto a acidez titulável máxima foi 2,0% e mínima de 0,3%.

No grupo de cultivares de uvas sem sementes, destacaram-se ‘A Dona’, ‘Feal’, ‘Júpiter’, bem como cultivares desenvolvidas pela Embrapa: ‘BRS Isis’, ‘BRS Linda’ e ‘BRS Vitória’. Estas últimas, além da cultivar comercial Sugaone, também apresentaram maior massa e tamanho das bagas. O teor de sólidos solúveis totais está compreendido na faixa de 20,7 à 14,2° Brix, enquanto a acidez titulável, varia entre 0,4 e 1,0%.

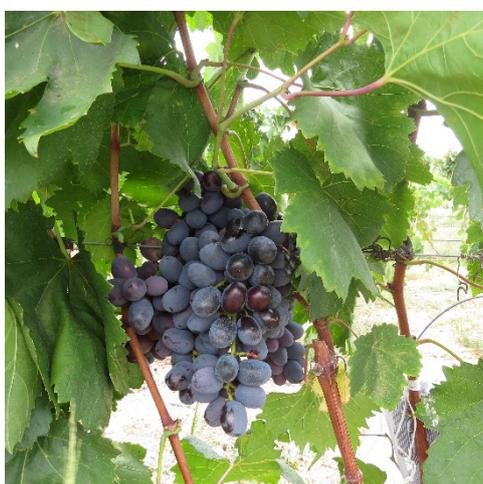




Figura 3 – Variabilidade nas características dos cachos e bagas em diferentes genótipos de videira no Banco de Germoplasma da EMBRAPA Semiárido. Fotos: Patrícia Coelho de Souza Leão

Considerando-se o grupo de genótipos de videira utilizados para a elaboração de sucos e vinhos, a maioria das cultivares apresenta cor da baga preta (50%), sabor neutro (85%), consistência da polpa mucilaginosa (86%), formato do cacho cilíndrico alado (70%) e baga com formato globoso (68%) (Leão et al., 2017b). A cultivar de origem portuguesa ‘Castelão’ da qual são elaborados vinhos tintos e a cultivar americana ‘Isabel Precoce’, principal cultivar para elaboração de sucos de uva no Brasil, destacaram-se entre as mais produtivas. Por outro lado, a cultivar ‘Olivette Noir’ que apresenta dupla finalidade, sendo utilizada como uva de mesa e produção de vinhos, apresenta maior massa do cacho e da baga. O teor de sólidos solúveis entre os genótipos de videira para processamento são mais elevados do que aqueles observados nos grupos de uvas de mesa, e variam em torno de 19 até 21°Brix.

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação, caracterização e documentação dos recursos genéticos de videira em condições tropicais semiáridas constituem a base para o melhoramento genético e desenvolvimento de novas cultivares de videira. A variabilidade genética e as informações geradas sobre comportamento e adaptação dos genótipos são utilizadas na seleção de genitores e realização de cruzamentos e na recomendação direta de cultivares para o setor produtivo de uvas no Vale do São Francisco.

#### REFERÊNCIAS

Nunes, B.T.G.; Rego, J.I.S.; Nascimento, J.H.B.; Souza, E.M.C.; Leão, P.C.S. (2015). Divergência fenotípica de uvas de mesa utilizando caracteres morfo-agronômicos no Vale do São Francisco. In: II Simpósio da Rede de Recursos Genéticos Vegetais do Nordeste, 2015, Fortaleza. Anais do II Simpósio da RGV Nordeste. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical.

Batista. P.F. (2014). Qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante de variedades de videiras do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. 2014. 161f. Tese (Doutorado) –

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró.

Borges, R. M. E.; Gonçalves, N. P. da S.; Gomes, A. P. de O.; Alves, E. O. dos. (2008). Divergência fenotípica entre acessos de uvas de mesa no Semi-Árido brasileiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 8, p. 1025-1030.

IPGRI; UPOV; OIV. Descriptors for grapevine: *Vitis* spp. International Plant Genetic Resources Institute. Roma. International Union for the Protection of New Varieties of Plants, Geneva. Office International de la Vigne et du Vin, Paris. 1997. 62 p. il.

Leão, P. C. de S., Cruz, C. D., Motoike, S. Y. (2011). Genetic diversity of table grape based on morphoagronomic traits (2011). *Scientia Agrícola*, n. 68, p.42 - 49.

Leão, P. C. de S., Cruz, C. D., Motoike, S. Y. (2010). Genetic diversity of a Brazilian wine grape germplasm collection based on morphoagronomic traits. *Revista Brasileira de Fruticultura*, n.32, p.1164 - 1172.

Leão, P. C. de S.; Lira, M. M. C. de ; Moraes, D. S.; Silva, E. R.; Sales, W. S. Banco de germoplasma de videira no Semiárido: 15 anos de caracterização de uvas de mesa. In: *Revista RG News*, 2017, Aracaju. Edição Especial dos Anais do 3 Simpósio da Rede de Recursos Genéticos Vegetais do Nordeste. Brasília, DF, 2017a. v.3. p.43.

Tavares, S.C.C. de H.; Melo, G. C.; Perez, J.O.; Silva, W. A.; Karasawa, M. (1996). Fontes de resistência de videira ao oídio no Nordeste brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14.; REUNIÃO INTERAMERICANA DE HORTICULTURA TROPICAL, 42.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MIRTACEA, 1996, Curitiba. Resumos... Londrina: IAPAR, p. 399.

Lopes, D. B.; Cabral. C. P.; Nunes, Y. R.; Rodrigues, G. L.; Costa, A. V. S.; Costa, F. M.; Azevedo, A. Leão, P. C. de S. (2005). Reação de genótipos de videira a epidemias espontâneas de oídio (*Uncinula necator*), nas condições do semi-árido nordestino. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v. 30, p. 150, Suplemento.

Tavares, S. C. C. de H.; Amorim, L. R. de; Menezes, W. A. de; Cruz, S. C. da.(1998). Comportamento de uva sem semente perante algumas doenças no Semi-Árido brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 15., 1998, Poços de Caldas. Resumos... Lavras:UFLA, p.728.

Leao, P. C. de S.; Riaz, S.; Graziani, R.; Dangl, G. S.; Motoike, S. Y.; Walker, M. A. (2009). Characterization of a brazilian grape germplasm collection using microsatellite markers. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v. 60, n. 4, p. 517-524.

## SELEÇÃO DE HÍBRIDOS DE MAMONEIRA PARA ALTA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES

### **Sebastião Soares de Oliveira Neto**

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP  
Botucatu – SP

### **Odila Friss Ebertz**

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP  
Botucatu – SP

### **Larissa Chamma**

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP  
Botucatu – SP

### **Maria Márcia Pereira Sartori**

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP  
Botucatu – SP

### **Maurício Dutra Zanotto**

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP  
Botucatu – SP

fisiológica superior é fundamental para o desenvolvimento de lavouras focando alta produtividade. Objetivou-se neste trabalho verificar a qualidade fisiológica de sementes de híbridos de mamoneira desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento Genético Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias da UNESP Botucatu, selecionando os melhores híbridos para registro no RNC/MAPA e cultivo em larga escala. Após a colheita, as sementes dos híbridos HIB1, HIB2, HIB3, HIB4, HIB5, HIB6, HIB7, HIB8, HIB9, HIB10, HIB11 e HIB12 foram avaliadas no Laboratório de Sementes do Departamento de Agricultura da FCA - UNESP Botucatu. O experimento foi realizado em DIC com três repetições de 25 sementes, distribuídas em papel Germitest®, umedecidos com água deionizada. Foram avaliadas as características: comprimento de raiz de plântula; comprimento de parte aérea de plântula; massa de matéria seca de raiz; massa de matéria seca de parte aérea, porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Scott-Knott através do software SISVAR® ao nível de 5% de significância e à análise de componentes principais pelo software Minitab 17®. Os híbridos HIB12, HIB6 e HIB9 foram selecionados como genótipos promissores para o cultivo em larga escala por apresentarem alta qualidade fisiológica de sementes.

**RESUMO:** A mamoneira (*Ricinus communis* L.) pertence à família das Euforbiáceas e é cultivada principalmente em função do óleo de rícino, utilizado para diversos fins. A seleção de genótipos com sementes de qualidade

**PALAVRAS-CHAVE:** qualidade de sementes; seleção de plantas; melhoramento genético da mamoneira;

**ABSTRACT:** The castor bean (*Ricinus communis* L.) belongs to the Euphorbiaceae family and is cultivated mainly in relation to castor oil, used for various purposes. The selection of genotypes with seeds of higher physiological quality is fundamental for the development of crops focusing on high productivity. The objective of this work was to verify the physiological quality of seed of castor bean hybrids developed by the Plant Genetic Improvement Program of the Faculty of Agricultural Sciences of UNESP Botucatu, selecting the best hybrids for RNC / MAPA registration and large scale cultivation. After the harvest, the seeds of the hybrids HIB1, HIB3, HIB4, HIB5, HIB6, HIB7, HIB8, HIB9, HIB10, HIB11 and HIB12 were evaluated in the Seeds Laboratory of the FCA - UNESP Botucatu Department of Agriculture. The experiment was performed in DIC with three replicates of 25 seeds, distributed on Germitest® paper, moistened with deionized water. The following characteristics were evaluated: seedling root length; length of seedling aerial part; root dry matter mass; mass of dry matter of aerial part, percentage of germination and index of speed germination. Data were submitted to analysis of variance and Scott-Knott's test using SISVAR® software at the 5% level of significance and analysis of principal components by Minitab 17® software. The hybrids HIB12, HIB6 and HIB9 were selected as promising genotypes for large-scale cultivation because of the high physiological quality of seeds.

**KEYWORDS:** seed quality; plant selection; castor bean breeding;

## 1 | INTRODUÇÃO

Pertencente à família das Euforbiáceas, a mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa que tem recebido destaque no mercado mundial pela qualidade e aplicabilidade do óleo extraído de suas sementes, caracterizado por possuir alta viscosidade e solubilidade em álcool. A semente da mamona não é comestível por possuir em sua composição ricina, ricinina e outras substâncias tóxicas a humanos e animais (OGUNNIYI, 2006). Desta forma, não compete com culturas alimentícias e se torna extremamente interessante para a indústria de biocombustíveis, bioquímicos e biopolímeros (MUTLU & MEIER, 2010).

As sementes são estruturas vitais, resultado da reprodução sexuada de uma espécie. São responsáveis pela manutenção do germoplasma, por possibilitar um novo ciclo de geração de plantas, e por melhorar a capacidade produtiva (SHARIFIFAR et al., 2015; RIFNA et al., 2019).

Nas culturas de grãos, a semente geralmente assume importância de geração de alimento, e a sua conservação é primordial para manter a segurança alimentar de muitas populações (DOUNIAS, 2019, ULIAN et al., 2019).

O aumento crescente da demanda por sementes de mamona para extração de óleo e produção de biodiesel no Brasil, tem exigido a expansão das áreas de cultivo e

de materiais genéticos com alta produtividade. Estratégias para atingir esses objetivos compreendem o desenvolvimento de pesquisas referentes a exploração da heterose na produção de híbridos e determinação da qualidade fisiológica de sementes, de forma que o cultivo da mamoneira se torne competitivo quando comparado as demais oleaginosas (FANAM et al., 2009).

A porcentagem de germinação das sementes é um indicativo de sucesso ou não no estabelecimento e desenvolvimento da planta. Desta forma, o uso de sementes de qualidade no momento da implantação do cultivo é essencial para se obter uma população de plantas desejada, taxa de crescimento satisfatório e alta produtividade (SANTOS et al., 2008; SOLEYMANI, 2019).

Baixas produtividades em mamoneira estão associadas ao uso de lotes de sementes que apresentaram baixa germinação, vigor reduzido e presença de agentes contaminantes (AZEVEDO et al., 2007).

A germinação representa apenas parte do sucesso de estabelecimento das culturas agrícolas à campo. Outras características, como a velocidade de germinação e emergência de plântulas também são importantes e podem ser usadas para avaliar o vigor das sementes (YAGUSHI et al., 2014; FINCH-SAVAGE & BASSEL, 2016; MARCOS-FILHO, 2016).

Entretanto, um dos maiores entraves para a expansão da cultura deve-se à baixa qualidade das sementes dos materiais disponíveis no mercado. Nesse sentido, é importante salientar que a utilização de sementes com boa qualidade física, fisiológica e sanitária, são fatores de fundamental importância para o sucesso na produção. Este estudo foi desenvolvido com o intuito de investigar a variabilidade genética para a qualidade fisiológica de sementes de híbridos de mamoneira desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento Genético Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP Botucatu e por meio dos resultados obtidos, indicar aqueles com qualidade fisiológica de sementes superior para o Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Foi verificada a qualidade fisiológica de sementes de 12 híbridos de mamona (HIB1, HIB2, HIB3, HIB4, HIB5, HIB6, HIB7, HIB8, HIB9, HIB10, HIB11 e HIB12) desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) da UNESP-Botucatu e produzidos no mesmo período e nas mesmas condições edafoclimáticas na Fazenda Experimental da UNESP em São Manuel - SP.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sementes do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP em Botucatu – SP.

O teste de germinação foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições de 25 sementes, distribuídas em papel Germitest®, umedecidos com água deionizada em cerca de duas vezes e meia o peso do papel. A fim de quebrar a dormência física das sementes, diminuindo a resistência e o tempo para a germinação, as sementes foram escarificadas uma a uma com o auxílio de uma lixa. Após a montagem das repetições, as mesmas foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e colocadas no germinador, tipo B.O.D., mantidas à 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. A porcentagem de germinação (%G) foi obtida com duas leituras (aos sete e 14 dias). Para a determinação do resultado, foi verificada a quantidade de plântulas normais que haviam germinado em cada repetição na primeira e na segunda leitura. Os resultados foram transformados em porcentagem.

Para o teste de vigor foram avaliadas as seguintes características: comprimento de raiz de plântulas (CR); comprimento de parte aérea de plântulas (CPA) massa de matéria seca de raiz de plântulas (MSR); massa de matéria seca de parte aérea de plântulas (MSPA). Para a determinação de CR e CPA, aos sete dias após a embebição foram cortados a raiz junto ao epicótilo das plântulas normais e então medidos o tamanho de ambos, em seguida foram acomodadas em sacos de papel e levados para estufa à 65°C por três dias e, posteriormente, pesadas para a determinação de MSR e MSPA.

Foi calculado o índice de velocidade de germinação (IVG) pela metodologia de Maguire (1962), utilizando-se a fórmula  $IVG = \sum (n_i / t_i)$ , em que:  $n_i$  = número de sementes que germinaram no tempo 'i';  $t_i$  = tempo após instalação do teste;  $i$  = horas, onde durante o experimento observou-se a cada 6h a quantidade de sementes com radícula igual ou superior a 2 mm.

Os dados de CR, CPA, MSR, MSPA, %G e IVG foram submetidos à análise de variância e de Scott-Knott (1974) através do software estatístico SISVAR®.

Foi realizada uma análise de componentes principais, para os caracteres porcentagem de germinação (%G), comprimento de plântula (CP), dado pela soma entre CR e CPA, em centímetros, massa de matéria seca de plântulas (MSP), dado pela soma entre MSR e MSPA e índice de velocidade de germinação (IVG) sendo utilizado o software Minitab 17®.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância para as características de qualidade fisiológica de sementes de 12 híbridos de mamoneira demonstrou a ocorrência de diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre todos os parâmetros estudados, exceto para MSPA (Tabela 1).

QUADRADO MÉDIO				
FV	GL	CR	CPA	MSR
Híbridos	11	22,12*	0,14*	0,0007*
Erro	33	27,83	0,04	0,0000
CV(%)		11,28	16,63	41,35

QUADRADO MÉDIO				
FV	GL	MSPA	%G	IVG
Acessos	11	0,0000ns	375,77*	0,0081*
Erro	33	0,0000	85,54	0,0015
CV(%)		18,66	12,95	15,67

Tabela 1. Resumo da análise de variância e coeficientes de variação de características avaliadas em 12 híbridos de mamoneira

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; CR: comprimento de raiz de plântulas (cm); CPA: comprimento de parte aérea de plântulas (cm); MSR: massa de matéria seca de plântulas (g); MSPA: massa de matéria seca de parte aérea (g); %G: porcentagem de germinação; IVG: índice de velocidade de germinação;

\* significativo a 5%, pelo teste de F (P<0,01)

Os híbridos HIB3, HIB6, HIB8, HIB9, HIB10 e HIB12 obtiveram elevadas porcentagens de germinação (acima de 73%), de acordo com Brasil (2013), para a comercialização de sementes básicas de híbridos de mamoneira, recomenda-se no mínimo uma germinação de 70%. Para esse critério observou-se uma grande variabilidade entre os híbridos, com valores de 56% (HIB7) a 87% (HIB12). Os resultados do teste de Scot-Knott demonstram apenas dois grupos de resposta: alta germinação e baixa germinação (Figura 1).

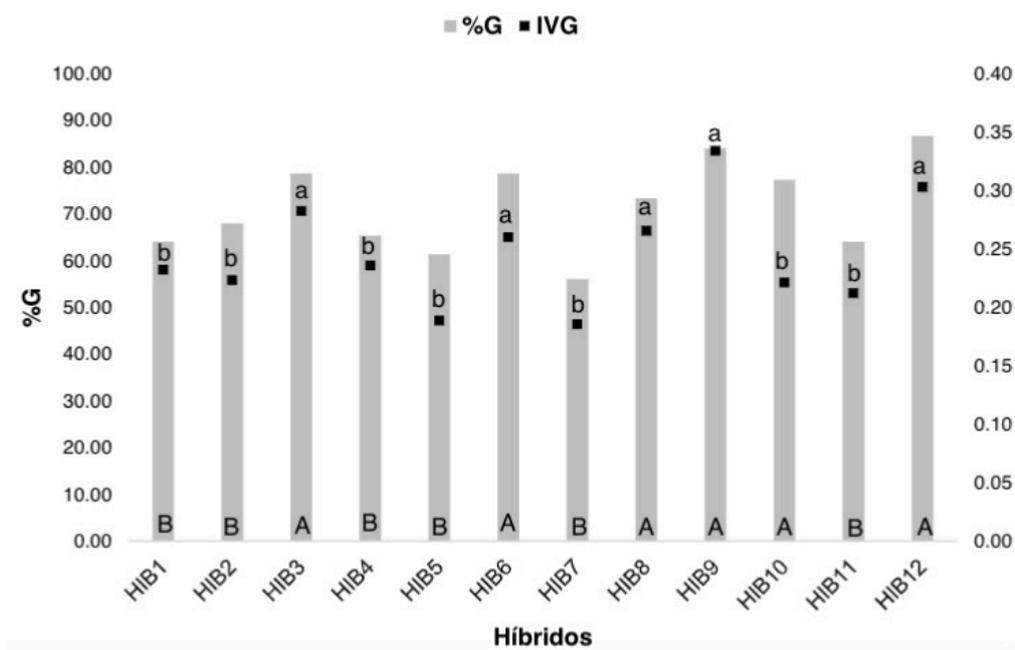
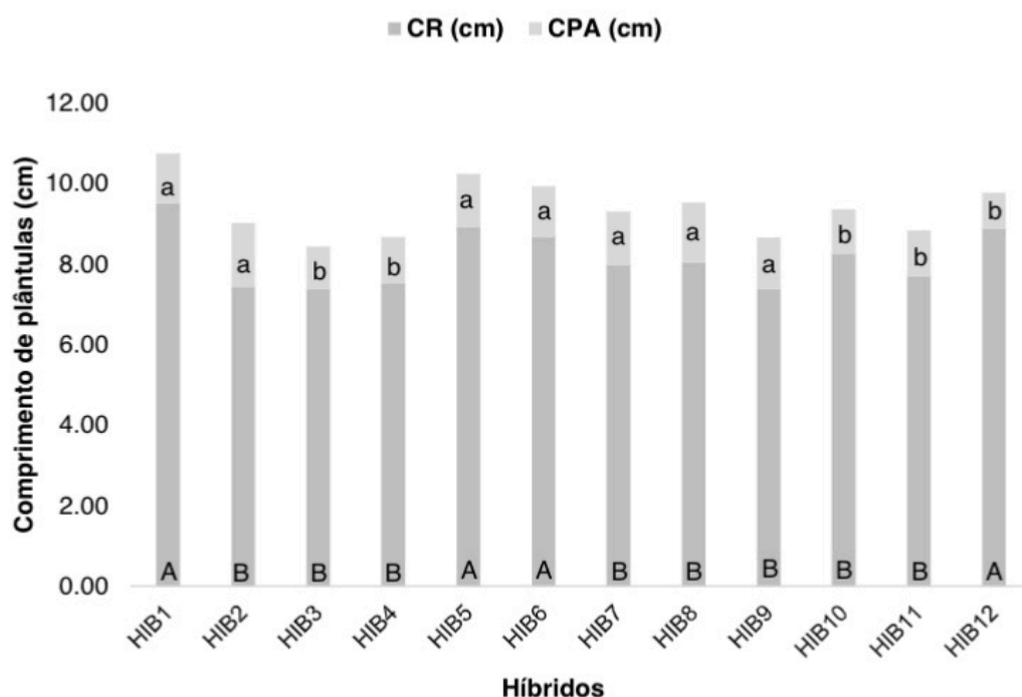


Figura 1. Porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG) e teste de Scott-Knott para 12 híbridos de mamoneira

\*Médias seguidas da mesma letra não são diferentes estatisticamente

Já para IVG, observou-se que todos os híbridos classificados com altas porcentagens de germinação também apresentaram altos índices de velocidade de germinação, sendo categorizados pelo teste de Scott-Knott nos mesmos grupos de resposta (Figura 1). De acordo com Finch-Savage & Bassel (2016) e Zhu & Benková, (2016), uma germinação tardia aumenta o risco de a plântula ser exposta a condições estressantes durante o estabelecimento que poderia resultar em problemas no crescimento.

Em relação ao parâmetro CR (Figura 2), observou-se que HIB1, HIB5, HIB6, HIB12, apresentaram os maiores valores, sendo respectivamente, 9,5 cm, 8,9 cm, 8,7 cm e 8,9 cm, ao passo que para CPA, observou-se um alto comprimento de parte área para sete híbridos (HIB1, HIB2, HIB5, HIB6, HIB7, HIB8 e HIB9). Quanto ao comprimento total de plântulas, o HIB1 obteve superioridade aos demais (10,25 cm).

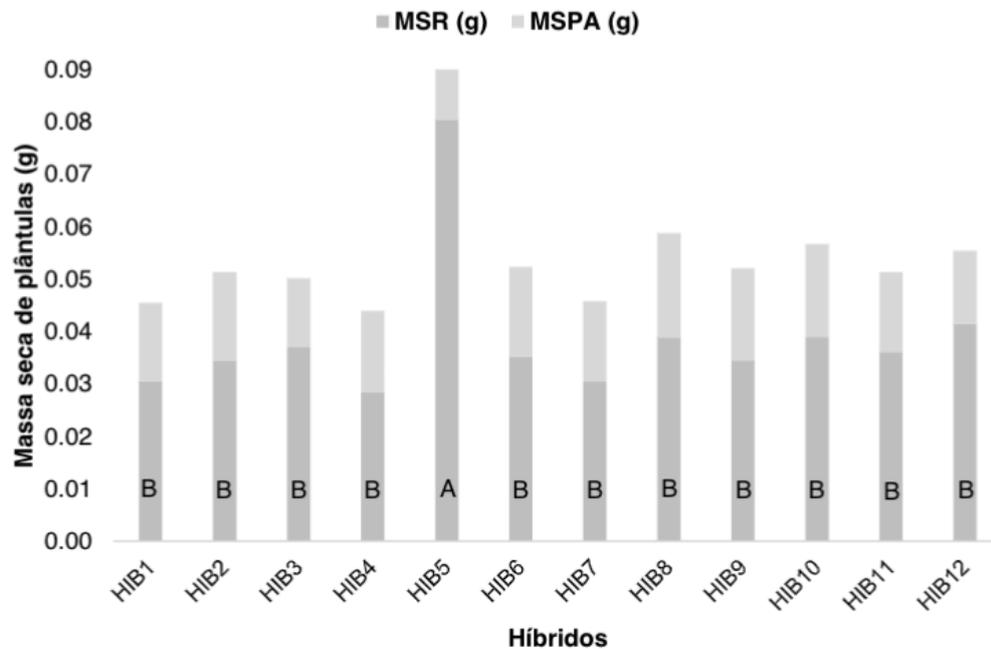


**Figura 2.** Médias de comprimento de plântulas (sendo, CR: comprimento de raiz e CPA: comprimento de parte aérea), em centímetros, e teste de Scott-Knott para 12 híbridos de mamoneira

\*Médias seguidas da mesma letra não são diferentes estatisticamente

Em relação a MSPA, não constatou-se diferença entre os materiais, já para MSR (Figura 3), o híbrido HIB5 destacou-se em relação aos demais. Considerando o massa de matéria seca de plântulas, HIB5 apresentou-se como o material com maior resultado (0,1g) e conseqüentemente maior quantidade de reservas.

Como o estabelecimento de plântulas depende do rápido alongamento do hipocótilo e do sistema radicular, e esse crescimento necessita da mobilização de reservas até o início da fotossíntese, esse genótipo merece destaque.



**Figura 3.** Médias de massa de matéria seca de plântulas (sendo, MSR: massa de matéria seca de raiz e MSPA: massa de matéria seca de parte aérea), em gramas, e teste de Scott-Knott para 12 híbridos de mamoneira

\*Médias seguidas da mesma letra não são diferentes estatisticamente

Genótipos com maior massa de matéria seca e comprimento de plântulas exibem maior e mais rápida mobilização de reservas, sendo importante para o vigor das sementes. O surgimento bem-sucedido de plântulas em espécies epigeais, como a mamona, depende do alongamento forte e rápido do hipocótilo e do sistema radicular que é sustentado pela mobilização de energia das reservas até o caule embrionário (LILLEY et al., 2012; ZHONG et al., 2014; PEREIRA et al., 2015).

Observou-se respostas discrepantes entre os materiais avaliados nas mesmas condições climáticas, podemos inferir que a alta porcentagem de germinação observada para os híbridos H9 (84,00%) e H12 (86,67%) é explicada por questões genéticas.

A componente principal 1 (CP1) explicou cerca de 40% dos dados, enquanto a CP2 explicou 26% e as demais componentes 36% (Tabela 3).

Quanto maior o valor dos auto vetores mais representativa é a variável no modelo, ou seja, as que forem mais próximas a -1 e 1 são as mais importantes. Os maiores valores observado para CP1 foi 0,583 e 0,526 para as variáveis MSP e CP, respectivamente. Já para CP2 o auto vetor 0,624 se destacou como o mais importante representado pela variável IVG. Os híbridos associados a esses auto vetores são considerados de qualidade fisiológica de sementes superiores.

Componente principal	$\lambda$	% VCP	%VCP (acumulada)
CP1	1,59	0,40	0,40
CP2	1,03	0,26	0,66

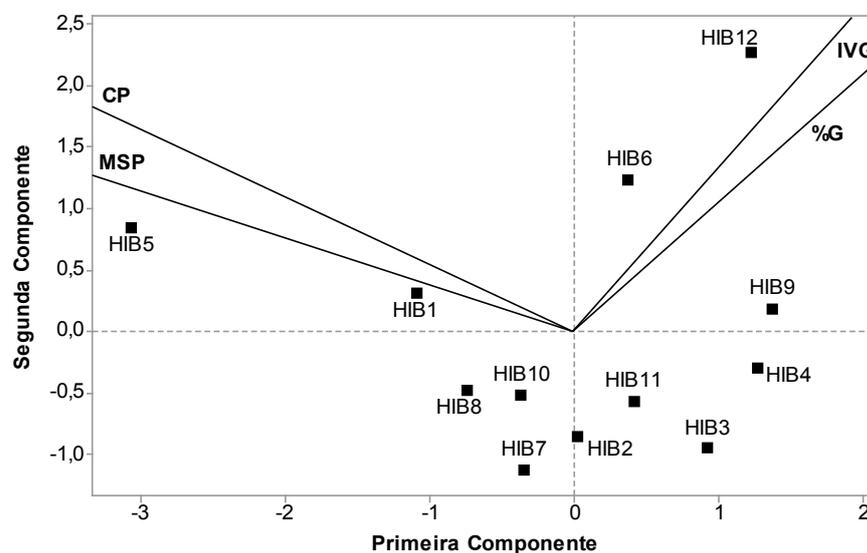
<b>CP3</b>	0,84	0,221	0,87
<b>CP4</b>	0,53	0,13	1,00
<b>Variáveis</b>	-	CP1	CP2
<b>%G</b>	-	0,443	0,460
<b>IVG</b>	-	0,432	0,624
<b>CP</b>	-	-0,526	0,546
<b>MSP</b>	-	-0,583	0,319

Tabela 3. Componentes principais, autovalores ( $\lambda$ ) e porcentagem da variância explicada pelos componentes (%VCP) nos caracteres testados em 12 híbridos de mamoneira

%G: porcentagem de germinação; IVG: índice de velocidade de germinação; CP: comprimento de plântulas (cm); MSP: massa de matéria seca de plântulas (g);

Os híbridos foram selecionados na primeira componente quanto aos caracteres que representam o vigor de sementes (CP e MSP), ao passo que na segunda componente eles foram selecionados considerando a velocidade de germinação de sementes (IVG) (Figura 4).

O híbrido HIB5 se destaca em relação aos parâmetros massa de matéria seca e comprimento de plântulas. Já os híbridos HIB12 e HIB6 apresentam comportamento intermediário para os caracteres de vigor (MSP, CP e IVG) e %G, sendo selecionados como genótipos com superioridade na qualidade fisiológica de sementes.



**Figura 4.** Análise de componentes principais para os caracteres %G (porcentagem de germinação), CP (comprimento de plântula), em centímetros, MSP (massa de matéria seca de plântulas), em gramas, e IVG (índice de velocidade de germinação) de 12 híbridos de mamoneira

A germinação e a emergência de plântulas em campo são importantes critérios para seleção de genótipos, pois os resultados do teste de germinação

podem ser utilizados para comparar a qualidade fisiológica de lotes, determinar a taxa de semeadura e como critério de aprovação de um lote de sementes para a comercialização (MARTINS et al., 2016; CARVALHO & NAKAGAWA, 2012). Desta forma, como para híbridos de mamoneira, a germinação mínima para comercialização de sementes no Brasil é de 70% (BRASIL, 2013), dentre todos os híbridos avaliados, HIB12, HIB6 e HIB9 foram selecionados como genótipos com potencial para registro e comercialização, no entanto, esses materiais não corresponderam aos de maior vigor de sementes.

A grande variabilidade entre os materiais para as características relacionadas a qualidade fisiológica de sementes, reflete na pouca importância que tem sido dada pelos programas de melhoramento a esses caracteres (KRZYZANOWSKI, 1998), uma vez que para a maioria das culturas agrícolas, como a mamona, têm sido priorizadas os caracteres de rendimento e adaptabilidade.

## 4 | CONCLUSÃO

Os híbridos HIB12, HIB6 e HIB9 foram selecionados como genótipos promissores para o cultivo em larga escala por apresentarem alta qualidade fisiológica de sementes.

## REFERÊNCIAS

AZEVEDO, D. M. P.; NOBREGA, L. B.; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S.; BELTRÃO, N. E. M.; SEVERINO, L. S. Manejo cultural. **O agronegócio da mamona no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão**, p. 121-160, 2007.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 45**, de 17 de setembro de 2013. D.O.U. do dia 20/09/13, Seção 1, 2013.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012, 590 p.

DOUNIAS, E. Food Storage as a Source of Stress for Seed Farmers in the Tropics. **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**, 2019.

FANAN, S.; MEDINA, P. F.; CAMARGO, M. B. P.; RAMOS, N. P. Influência da colheita e do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de mamona. **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2009.

FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 567-591, 2016. <https://academic.oup.com/jxb/article-pdf/67/3/567/9501658/erv490.pdf>.

KRZYZANOWSKI, F. C. Relationship between seed technology research and federal plant breeding programs. **Scientia Agricola**, v. 55, p. 83-87, 1998. Número especial.

LILLEY, J. L.; GEE, C. W.; SAIRANEN, I.; LJUNG, K.; NEMHAUSER, J. L. An endogenous carbon-sensing pathway triggers increased auxin flux and hypocotyl elongation. **Plant Physiology**, v.160, p.2261-2270, 2012. <http://www.plantphysiol.org/content/160/4/2261.full.pdf>.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p.176-77, 1962.

MARCOS-FILHO, J. **Seed physiology of cultivated plants**. Londrina: ABRATES, 2016. 616p.

MARTINS, C. C.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; MÔRO, G. V.; VIEIRA, R. D. Metodologia para seleção de linhagens de soja visando germinação, vigor e emergência em campo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 3, p. 455-461, 2016.

MUTLU, H.; MEIER, M. A. R. Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 1, p. 10-30, 2010.

OGUNNIYI, D. S. Castor oil: a vital industrial raw material. **Bioresource technology**, v. 97, n. 9, p. 1086-1091, 2006.

PEREIRA, W. A.; PEREIRA, S. M. A.; DIAS, D. C. F. S. Dynamics of reserves of soybean seeds during the development of seedlings of different commercial cultivars. **Journal of Seed Science**, v.37, p.63-69, 2015. <http://www.scielo.br/pdf/jss/v37n1/2317-1537-jss-37-01-00063.pdf>.

RIFNA, E. J; RAMANAN, K. R.; MAHENDRAN, R. Emerging technology applications for improving seed germination. **Trends in Food Science & Technology**, 2019.

SANTOS, H. C.; VIANA, J. S.; GONÇALVES, E. P.; ALCÂNTARA BRUNO, R. L.; FRAGA, V. S. Qualidade fisiológica de sementes de sorgo em resposta à adubação com cobre e zinco. **Revista Caatinga**, v. 21, n. 1, 2008.

SHARIFIFAR, A.; NAZARI, M.; ASGHARI, H. R. Effect of ultrasonic waves on seed germination of *Atriplex lentiformis*, *Cuminum cyminum*, and *Zygophyllum eurypterum*. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 3, p. 102-104, 2015.

SOLEYMANI, A. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed vigor tests for the prediction of field emergence. **Industrial Crops and Products**, 2019.

ULIAN, T.; PRITCHARD, H. W.; COCKEL, C. P.; MATTANA, E. Enhancing Food Security Through Seed Banking and Use of Wild Plants: Case Studies From the Royal Botanic Gardens, Kew. **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**, 2019.

YAGUSHI, J. T.; COSTA, D. S.; FRANÇA-NETO, J. B. Saturated salt accelerated aging and computerized analysis of seedling images to evaluate soybean seed performance. **Journal of Seed Science**, v.36, n.2, p.213-221, 2014. <http://www.scielo.br/pdf/jss/v36n2/v36n2a10.pdf>.

ZHONG, S.; SHI, H.; XUE, C.; WEI, N.; GUO, H.; DENG, W. X. Ethylene-orchestrated circuitry coordinates a seedling's response to soil cover and etiolated growth. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.111, p.3913-3920, 2014. <http://www.pnas.org/content/111/11/3913.full.pdf>.

ZHU, Q.; BENKOVÁ, E. Seedlings' strategy to overcome a soil barrier. **Trends in Plant Science**, v. 21, p. 809-811, 2016. [http://www.cell.com/trends/plant-science/pdf/S1360-1385\(16\)30113-3.pdf](http://www.cell.com/trends/plant-science/pdf/S1360-1385(16)30113-3.pdf).

## USO DE DADOS DE MARCADORES MOLECULARES EM SIMULAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DE FRAGMENTOS DE *LUEHEA DIVARICATA* MART. & ZUCC. NO BIOMA PAMPA

### **Caetano Miguel Lemos Serrote**

Departamento de Silvicultura e Manejo Florestal,  
Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade  
Lúrio, Campus Universitário, Unango,  
Mozambique

Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento,  
Universidade Federal de Santa Maria, Campus  
Sede, Santa Maria, RS, Brasil

### **Lia Rejane Silveira Reiniger**

Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento,  
Universidade Federal de Santa Maria, Campus  
Sede, Santa Maria, RS, Brasil

### **Valdir Marcos Stefenon**

Núcleo de Genômica e Ecologia Molecular,  
Universidade Federal do Pampa, Campus São  
Gabriel, São Gabriel, RS, Brasil

### **Aline Ritter Curti**

Departamento de Fitotecnia, Faculdade de  
Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal  
de Pelotas, Campus Universitário, Capão do  
Leão, RS, Brasil

### **Leonardo Severo Da Costa**

Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento,  
Universidade Federal de Santa Maria, Campus  
Sede, Santa Maria, RS, Brasil

### **Aline Ferreira Paim**

Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento,  
Universidade Federal de Santa Maria, Campus  
Sede, Santa Maria, RS, Brasil

constituem de uma importante ferramenta para o desenvolvimento de estratégias de conservação de espécies florestais. No presente trabalho foram utilizadas simulações para estudar padrões genéticos, ecológicos e reprodutivos relacionados à estrutura genética de cinco fragmentos da espécie arbórea florestal *Luehea divaricata* Mart. & Zucc, em desenvolvimento em área brasileira do bioma Pampa. Com recurso ao programa *Easypop* foram determinadas as taxas de autofecundação e de migração equivalentes aos dados da estrutura genética avaliada mediante o uso de marcadores microsstélites (com base nos parâmetros heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada). O resultado da simulação sugere a classificação da população, quanto ao modo reprodutivo, como mista com predominância de cruzamentos (taxa = 0,7). Esse dado é consistente com o sistema de autoincompatibilidade existente nessa espécie, o qual reduz, mas não impede a autofecundação. A taxa de migração simulada foi de 0,02 a qual sugere que os fragmentos estavam isolados por distância, o que resultou no aumento dos coeficientes de endogamia. Com base na análise dos índices de diversidade genética de Nei, 94% da variabilidade genética está distribuída dentro dos fragmentos e apenas 6% da variabilidade genética foi causada por diferenças entre esses fragmentos. Ademais,

**RESUMO:** Simulações computacionais

os parâmetros para conservação genética (população mínima viável e área mínima viável), determinados para conservação em curto e longo prazo, sugerem que somente o fragmento da Fazenda Inhatinhum apresentou potencial para persistência em curto prazo. Porém, em longo prazo nenhum dos fragmentos se mostrou viável, necessitando assim de uma intervenção urgente para evitar o seu declínio. A criação de corredores ecológicos seria uma alternativa útil para conectar os fragmentos florestais entre si via fluxo gênico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Simulações em Easypop; Fluxo gênico; Fragmentação florestal; Análise de diversidade genética de Nei; Coeficientes de endogamia

## INTRODUÇÃO

A fragmentação que os diversos ecossistemas vêm sofrendo, pela ação do homem, representa uma ameaça para a manutenção e viabilidade das populações naturais. Espécies tropicais são particularmente muito vulneráveis aos efeitos da degradação do habitat devido às suas características demográficas e reprodutivas que incluem baixa densidade de ocorrência, sistemas complexos de autoincompatibilidade, altas taxas de cruzamentos e interações íntimas com polinizadores e dispersores de sementes. O isolamento geográfico pode resultar no isolamento reprodutivo na medida em que polinizadores terão seu movimento limitado pela sua distância de voo e densidade de recursos florais, e alguns dispersores de sementes não se moverão entre fragmentos pelo medo de predação, restringindo, assim, a maior parte dos cruzamentos ao interior dos fragmentos e resultando em maior atuação da deriva genética que fixará determinados alelos em detrimento de outros, reduzindo, assim, a variabilidade genética (Lowe et al., 2005; Quesada et al., 2013).

Em curto prazo, populações com variabilidade genética reduzida tem aumentada sua susceptibilidade a doenças e pragas e agentes abióticos como a ocorrência de geadas; além disso, a endogamia forçada pelo aumento nas taxas de cruzamentos biparentais e de autofecundação aumenta a suscetibilidade à depressão por endogamia, pois haverá maior expressão de alelos deletérios mascarados pela dominância em indivíduos heterozigotos. Em longo prazo, a redução da variabilidade genética reduz a flexibilidade evolutiva, isto é, a capacidade das populações em responder a alterações nas pressões de seleção. A variabilidade genética é reconhecida como a componente chave para a sustentabilidade das espécies, pois fornece matéria-prima para a adaptação, evolução e sobrevivência, especialmente sob mudanças ambientais e ataque por pragas e doenças. Consequentemente, é extremamente importante a conservação da variabilidade genética (Lowe et al., 2005; Vinson et al., 2015).

A integração de informações sobre processos históricos populacionais, incluindo a distribuição de alelos e genótipos, permite a seleção de áreas prioritárias para conservação (Moritz e Faith, 1998). O fluxo gênico é um fator crítico para a distribuição da variação genética, pois um fluxo gênico alto tende a homogeneizar a estrutura

genética, enquanto que baixo fluxo gênico permite a distribuição não aleatória de alelos e genótipos. Assim, o entendimento da conectividade dos indivíduos dentro e entre as populações é um aspecto primário da ecologia e evolução populacional (Nagel et al. 2015).

Dada a importância do tamanho populacional na preservação da variabilidade genética, esforços para a conservação resultaram no desenvolvimento do conceito de população mínima viável, o tamanho de uma população abaixo do qual os efeitos genéticos são mais severos, tornando o risco de extinção de espécies extremamente elevado. Considerando-se que esse parâmetro é dependente de aspectos reprodutivos, demográficos e genéticos, é fundamental o seu estudo nas populações alvo de conservação (Flather, 2011; Penget al., 2013).

Com os avanços na área da informática, novos métodos e programas de simulação foram desenvolvidos na área da biologia evolutiva para inferir sobre eventos passados a partir de dados atuais, permitindo desvendar as relações evolutivas entre caracteres moleculares simples, genes, genomas e espécies. Além dos programas que fazem a simulação para trás no tempo (coalescência), foram também desenvolvidos programas que realizam simulação para frente no tempo, permitindo prever fenômenos futuros sob cenários genéticos reais (Yuan et al., 2012; Dalquen et al., 2012). No presente trabalho recorreram-se a simulações com o programa EASYPOP (Balloux, 2001) a partir de dados de marcadores microssatélites obtidos em cinco fragmentos da espécie arbórea florestal *Luehea divaricata* Mart. & Zucc, em desenvolvimento em área brasileira do bioma Pampa, com o objetivo de estudar os padrões genéticos, ecológicos e reprodutivos que melhor explicam a sua estrutura genética e, deste modo, entender a história evolutiva e fornecer subsídios para o planejamento da sua conservação. Mais especificamente, focamos nas seguintes questões de pesquisa: 1) quais taxas de autofecundação e de migração correspondem melhor às informações derivadas de dados de microssatélites para *L. divaricata* ?; e 2) com base nesses resultados, quais dos cinco fragmentos florestais possuem populações viáveis de *L. divaricata* a curto e longo prazo?

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo

Os cinco fragmentos florestais estudados estão localizados no Estado do Rio Grande do Sul (Figura 1A e B). Mais especificamente, são: Camboazinho (100 indivíduos de *L. divaricata* estimados no fragmento), Canas (100 indivíduos), Inhatinhum (300 indivíduos), Cacequi (100 indivíduos) e BR290 (50 indivíduos). O número de indivíduos por fragmento foi estimado com base num levantamento fitossociológico realizado em 2013 (Stefenon VM, dados não publicados). Os dados usados para realizar as

simulações genéticas foram obtidos de Nagel et al. (2015). A espécie *L. divaricata* foi usada como modelo para este estudo de simulação, devido à sua importância ecológica e a possibilidade de ameaça local pela expansão da agricultura, pecuária e crescimento urbano no bioma Pampa. Marcadores genéticos microssatélites foram utilizados para avaliar a estrutura genética e o fluxo gênico de *L. divaricata* nos cinco fragmentos florestais.

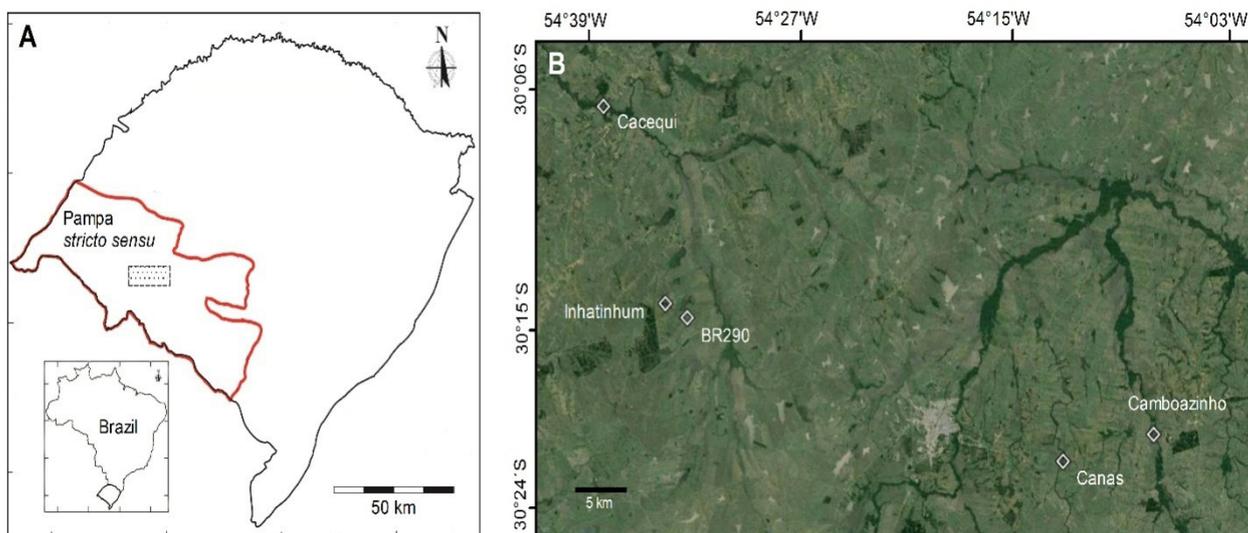


Figura 1. Delimitações do bioma Pampa *stricto sensu* no sul do Brasil, com a área amostral destacada (A). Localização dos cinco fragmentos de *L. divaricata* plotadas nas imagens de satélite do bioma Pampa, usadas na caracterização molecular e simulações do presente estudo (B). Fonte: Nagel et al. (2015).

## Definições do modelo e simulações

O programa EASYPOP 2.0.1 (Balloux, 2001) foi usado para determinar as taxas de autofecundação que melhor explicam os parâmetros obtidos mediante o uso de marcadores microssatélites por Nagel et al. (2015). Geralmente, este programa é usado para simular conjuntos de dados genéticos populacionais, incluindo diferentes modelos de migração e de mutação. Em nossas simulações, as taxas de autofecundação variaram de 0,1 a 0,5 com intervalos de 0,1 ao passo que as taxas de migração variaram entre 0,1 e 0,9 com intervalos de 0,1.

O modelo foi simulado para uma espécie diploide, hermafrodita, com cruzamentos não aleatórios e com ausência de reprodução clonal. Conforme a disposição geográfica dos fragmentos foi considerado o modelo de migração espacial, definido por duas dimensões, as quais foram obtidas por meio da alocação de linhas verticais e horizontais tracejadas no mapa, com intervalos de uma unidade, baseado nas coordenadas geográficas reais dos fragmentos (latitude e longitude).

Para as definições de mutação, foram simulados 5 e 10 locos evoluindo de acordo com o modelo de mutação misto *Single Step Mutation* - SSM com uma proporção 0,1 de eventos *K-allele Model* - KAM, sob 45 estados alélicos possíveis, conforme

dados obtidos por Ruas et al. (2009), Conson et al. (2012) e Nagel et al. (2015). Foi considerada uma taxa de mutação de 0,0004 mutações por loco por geração. A variabilidade da população inicial foi considerada máxima, tendo sido simuladas 400 gerações. Para cada combinação de taxa de autofecundação e de migração avaliada foram realizadas 100 repetições.

## Análises Fstat

Foram usados os valores de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) de 0,64 e 0,52 respectivamente, obtidos de Nagel et al. (2015), para selecionar o modelo com os valores mais próximos às observações de campo (Tabelas 1 e 2). Valores de  $H_o$  e  $H_e$  do modelo selecionado (taxas de autofecundação e de migração) foram comparados com outros por testes  $t$  para amostras independentes a 5% de probabilidade de erro.

Os arquivos de saída referentes ao modelo selecionado foram analisados no programa Fstat (Goudet, 1995). Fstat é um pacote estatístico que estima e testa diversidades e estatísticas de diferenciação genéticas. Com o uso desse pacote foram obtidas estatísticas para caracterizar os fragmentos, a saber: a riqueza alélica, a diversidade genética e os índices de diferenciação genética entre populações, segundo as abordagens de Wright (1965), Cockerham (1969) e Nei (1977). Em se tratando de análise de locos microssatélites, os quais evoluem de acordo com o modelo de mutação passo a passo, foi considerada, também, a estatística  $R_{ST}$ , que é a mais indicada para a análise da diferenciação genética entre populações. O fluxo gênico foi estimado pelo número médio de migrantes por geração, com base na proporção da variância genética na subpopulação ( $F_{ST}$ ) e  $R_{ST}$ .

O valor do coeficiente de endogamia dentro dos fragmentos ( $F_{IS}$ ) foi usado para estimar a taxa de cruzamentos aparente ( $t_a$ ), dada pela equação de Nei e Syakudo (1958):

$$t_a = \frac{1 - F_{IS}}{1 + F_{IS}} \quad (\text{Equação 1})$$

O fluxo gênico foi determinado em termos de número médio de migrantes por geração ( $Nm$ ) a partir do valor de  $R_{ST}$ , conforme a equação (Nagel et al., 2015):

$$Nm = \frac{1}{4} \left( \frac{1}{R_{ST}} - 1 \right) \quad (\text{Equação 2})$$

Foram também estimados os valores de  $Nm$  para cada par de fragmentos, baseado nos valores respectivos de  $F_{ST}$  par a par.

## Parâmetros genéticos para a conservação de populações naturais de *L.*

### *divaricata*

Com base nas estatísticas obtidas, foram determinados os seguintes parâmetros para a conservação: o Tamanho Efetivo Populacional ( $N_e$ ), a População Mínima Viável (PMV) e a Área Mínima Viável (AMV) para cada fragmento. O  $N_e$  determinado foi o de endogamia, o qual correspondeu ao tamanho representativo do fragmento de tamanho  $n$  em termos de identidade por descendência de alelos amostrados aleatoriamente, dado o coeficiente de endogamia  $f$ , sendo usada a equação de Pollak e Sabran (1992:

$$N_e = \frac{n}{1+f} \quad (\text{Equação 3}).$$

A PMV foi estimada para cada fragmento através da divisão do tamanho efetivo de referência ( $N_{e(\text{ref.})}$ ) pela razão  $N_e/n$ , conforme Vieira e Carvalho (2008). A diferença ( $D$ ) entre o tamanho amostral e o PMV foi calculada da seguinte forma (Vieira e Carvalho, 2008):

$$D = d * A - \frac{N_{e(\text{ref.})}}{N_e/n} \quad (\text{Equação 4}).$$

em que  $d$  é a densidade da espécie (foi usado o valor de 26,32 indivíduos  $\text{ha}^{-1}$  estimado previamente por Figueiredo (2014) para *L. divaricata* no bioma Pampa),  $A$  é a área do fragmento (ha),  $n$  é o tamanho amostral de cada fragmento e  $N_{e(\text{ref.})}$  é o tamanho efetivo de referência adotado para 100 ou 1000, para conservação em curto ou longo prazo, respectivamente, de acordo com Nunney e Campbell (1993). Fragmentos com valores positivos de  $D$  foram considerados viáveis para conservação ao passo que aqueles com valores negativos foram classificados como inviáveis. A AMV foi estimada com base na seguinte equação de (Silva et al., 2014):

$$AMV = \frac{n * N_{e(\text{ref.})}}{d * N_e} \quad (\text{Equação 5}).$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seleção dos parâmetros de modelos

As simulações em Easypop resultaram em valores de heterozigidade (observada e esperada) semelhantes para todas as taxas de autofecundação e de

migração testadas (teste *t* a 5% de probabilidade de erro) (Tabelas 1 e 2). Consoante o comportamento dos dados, foram testadas taxas de migração adicionais na taxa de autofecundação de 0,3. Foi selecionado o modelo com a taxa de autofecundação de 0,3 e taxa de migração de 0,02 (2%) como sendo aquele que melhor se ajusta aos dados obtidos por marcadores microssatélites, com diferença significativa em relação às outras taxas testadas (teste *t* ao nível de 5% de probabilidade de erro).

Taxa de migração	Taxa de autofecundação									
	0,1		0,2		0,3		0,4		0,5	
	<i>Ho</i>	<i>Hs</i>	<i>Ho</i>	<i>Hs</i>	<i>Ho</i>	<i>Hs</i>	<i>Ho</i>	<i>Hs</i>	<i>Ho</i>	<i>Hs</i>
0,01					0,510	0,612				
0,02					0,524	0,630				
0,03					0,533	0,646				
0,05					0,536	0,650				
0,1	0,660	0,695	0,601	0,675	0,548	0,667	0,487	0,646	0,417	0,624
0,2	0,666	0,702	0,611	0,685	0,556	0,672	0,502	0,665	0,434	0,649
0,3	0,668	0,705	0,619	0,696	0,566	0,686	0,505	0,673	0,434	0,652
0,4	0,677	0,713	0,626	0,704	0,573	0,692	0,510	0,680	0,448	0,671
0,5	0,688	0,726	0,642	0,720	0,579	0,702	0,517	0,688	0,456	0,680
0,6	0,697	0,734	0,641	0,721	0,583	0,705	0,515	0,690	0,460	0,687
0,7	0,790	0,740	0,655	0,735	0,594	0,721	0,527	0,700	0,459	0,689
0,8	0,695	0,733	0,654	0,734	0,595	0,722	0,526	0,701	0,460	0,690
0,9	0,704	0,742	0,646	0,726	0,594	0,721	0,525	0,702	0,455	0,682

Tabela 1 – Estimativas de heterozigosidade observada (*Ho*) e heterozigosidade esperada (*Hs*) geradas por simulações no programa EASYPOP, em função de diferentes taxas de autofecundação e de migração, para 5 locos e 45 estados alélicos possíveis, de cinco fragmentos de *L. divaricata*.

## Caracterização dos fragmentos florestais

Para a caracterização genética dos fragmentos e análises subsequentes foi utilizado o modelo com 10 locos e 45 estados alélicos possíveis (Tabela 2), haja vista que os valores foram semelhantes ao modelo com 5 locos e 45 estados alélicos possíveis. De um modo geral, a população pode ser caracterizada, quanto ao modo de reprodução, como mista com predomínio de cruzamentos, conforme a classificação de Destro e Montalván (1999). A taxa de cruzamentos foi de 0,7, sugerindo a presença de algum sistema de autoincompatibilidade nessa espécie, o qual reduz mas não impede a autofecundação. Segundo Brewbaker (1959) e Bawa (1974), a autoincompatibilidade é um mecanismo muito frequente em angiospermas, com vistas a prevenir os efeitos adversos da endogamia e da perda de variabilidade genética.

Taxa de migração	Taxa de autofecundação									
	0,1		0,2		0,3		0,4		0,5	
	<i>Ho</i>	<i>Hs</i>	<i>Ho</i>	<i>Hs</i>	<i>Ho</i>	<i>Hs</i>	<i>Ho</i>	<i>Hs</i>	<i>Ho</i>	<i>Hs</i>

0,01					0,510	0,612				
0,01					0,510	0,615				
0,02					0,525	0,636				
0,03					0,535	0,647				
0,05					0,542	0,658				
0,1	0,655	0,690	0,601	0,675	0,543	0,659	0,487	0,646	0,417	0,625
0,2	0,671	0,707	0,611	0,685	0,556	0,672	0,502	0,665	0,434	0,643
0,3	0,668	0,706	0,619	0,696	0,568	0,689	0,505	0,673	0,437	0,653
0,4	0,679	0,715	0,626	0,704	0,567	0,688	0,510	0,680	0,443	0,663
0,5	0,692	0,730	0,642	0,720	0,576	0,698	0,517	0,688	0,452	0,678
0,6	0,697	0,736	0,641	0,721	0,585	0,709	0,515	0,690	0,452	0,678
0,7	0,699	0,736	0,655	0,735	0,589	0,714	0,527	0,700	0,462	0,692
0,8	0,696	0,735	0,654	0,734	0,587	0,713	0,526	0,701	0,458	0,686
0,9	0,701	0,739	0,646	0,726	0,587	0,713	0,525	0,702	0,457	0,687

Tabela 2 – Estimativas de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_s$ ) geradas por simulações no programa EASYPOP, em função de diferentes taxas de autofecundação e de migração, para 10 locos e 45 estados alélicos possíveis, de cinco fragmentos de *L. divaricata*.

Taxas de autofecundação e de cruzamentos em espécies com sistema misto de reprodução dependem de fatores ecológicos como densidade populacional, abundância e efetividade de polinizadores (Lobo et al. 2013). Em ambientes fragmentados ou perturbados, as espécies respondem à escassez de polinizadores com um aumento nas taxas de autofecundação de modo a garantir a reprodução. Desse modo, a fragmentação e o conseqüente isolamento reprodutivo de seus fragmentos (o fluxo gênico restrito aos fragmentos próximos) resultaram na redução da taxa de cruzamentos, abaixo inclusive da média registrada em populações naturais de espécies arbóreas folhosas, que é de 0,88 (Sebbenn, 2002; Sobierajskiet al., 2006), sugerindo, também, uma perda de alelos de autoincompatibilidade pela deriva genética, que permitiu os indivíduos de autofecundar com sucesso em taxas maiores. Lobo et al. (2013) estudaram o sistema reprodutivo em uma população perturbada de *Ceiba pentandra* (Malvaceae) em diferentes anos, obtendo como resultado uma taxa de cruzamentos igual a 0,759 (no ano de 2007) e 0,624 (em 2009). Esses valores são próximos aos obtidos no presente trabalho e são provavelmente o resultado da redução no fluxo gênico causada pela fragmentação.

Por outro lado, a presença de sistemas de autoincompatibilidade em espécies hermafroditas e homogâmicas é importante para evitar a depressão por endogamia e permitir o potencial evolutivo. Quesada et al. (2013) observaram durante um período de 4 anos, em *Ceiba aesculifolia* (Malvaceae), taxas de cruzamento próximas a 1,0 em ambientes perturbados e não perturbados, devido à presença, na espécie, de um rigoroso mecanismo de autoincompatibilidade. Já Moraes e Monteiro (2002), estimando as taxas de cruzamento aparente em *Cryptocaryamoschata*, observaram uma vantagem diferencial de indivíduos oriundos de sementes de exocruzamento em relação àqueles de sementes autofecundadas, sugerindo a existência de alguma

seleção contra os indivíduos oriundos de sementes endogâmicas devido à depressão por endogamia.

A taxa de migração de 0,02 subestima a quantidade real de movimento de pólen e sementes, pois considera somente os migrantes bem sucedidos. Nesse contexto, todo o pólen que migra de um fragmento para outro deverá ser viável, pousar sobre o estigma de alguma flor, o qual deverá estar igualmente receptivo, vencer as barreiras de incompatibilidade e formar o tubo polínico, para, na sequência, produzir uma semente viável que irá, posteriormente, em condições ambientais favoráveis, germinar, emergir, crescer e se desenvolver; na maturidade, contribuirá com seus genes para as gerações futuras. Em relação ao fluxo via semente, sua viabilidade seria, também, condição primordial, além da sua obrigatoriedade em pousar em um solo com condições adequadas para sua germinação, crescimento, desenvolvimento, maturação e reprodução.

O isolamento por distância restringe a maior parte dos cruzamentos ao interior dos fragmentos, aumentando a taxa de cruzamentos biparentais e de autofecundação pela limitação do movimento de agentes polinizadores e dispersores de sementes, resultando no aumento do coeficiente de endogamia. A análise da Figura 1 e das distâncias entre os fragmentos, estimados por Nagelet al. (2015) sugerem que a troca de genes ocorre entre Canas e Camboazinho (que distam 8.513 m) e entre Inhatinhum, Cacequi e BR290 (Inhatinhum e BR290 distam 2.200 m, Inhatinhum e Cacequi distam 16.084 m, e Cacequi e BR290 distam 18.063 m). Os demais pares de fragmentos estão separados por distâncias entre 36.224 m (Canas e BR290) e 56.167 (Camboazinho e Cacequi). Essa análise está em concordância com o dendrograma obtido por Nagel et al. (2015) usando estimativas de distância genética obtida a partir de dados de microssatélites.

Por se tratar de dados de microssatélites, o modelo de mutação de único passo SSM (perda ou ganho de uma única repetição por vez) limitado a 45 estados alélicos é adequado, com ocorrência de eventos KAM na proporção de 0,1. Em outras palavras, 90% das mutações resultam em um estado alélico cujo tamanho depende do anterior, sendo que, em 10% dos casos, resulta em um alelo de qualquer um dos estados alélicos possíveis com igual probabilidade. O modelo de variabilidade máxima inicial explica a redução da variabilidade genética ao longo das 400 gerações em função da endogamia e da deriva genética ocasionados pela fragmentação. Apesar das mutações agirem no sentido de aumentar a variabilidade, sua taxa muito baixa não foi suficiente para se contrapor aos efeitos do isolamento e do consequente baixo fluxo de genes entre fragmentos.

### **Estrutura genética dos fragmentos florestais**

Os parâmetros da estrutura genética resumidos na Tabela 2 demonstram que os valores da riqueza alélica e da variabilidade genética aumentam de acordo com o tamanho do fragmento, porém, sem grande diferença entre si, o que é ratificado pelos

respectivos valores da riqueza alélica. Stefenon e Costa (2012) realizaram simulações para analisar o efeito da fragmentação na riqueza alélica e no coeficiente de endogamia ao longo do tempo. Dessas simulações resultou que, com o passar de gerações, as populações de menor tamanho tiveram níveis maiores de redução na riqueza alélica e de aumento no coeficiente de endogamia, comparado às populações mais numerosas. Essa constatação reforça a importância do tamanho da população na preservação da variabilidade genética com vistas a minimizar o seu risco de extinção.

Na Figura 2 está representado o comportamento do número de alelos no decorrer das 400 gerações. Uma acentuada taxa de perda de alelos é observada nas primeiras gerações, com uma relativa estabilidade a partir da geração de número 100, momento em que metade do número inicial de alelos já se teria sido perdida pela endogamia e deriva genética. Ao final de 400 gerações, o número de alelos por loco reduziu-se de 45 para 5.

O fragmento Inhatinhum teve a maior riqueza alélica (5,52; Tabela 3). A reduzida diferenciação genética entre os fragmentos, avaliada pelos índices de diferenciação genética ( $G_{ST}$ ,  $F_{ST}$  e  $\theta$ ; Tabela 4), indica que há similaridade em suas frequências alélicas. Isso sugere que, apesar do isolamento reprodutivo, existe semelhança nos modelos evolutivos dos fragmentos, a saber, intensidade e direção da deriva genética, da seleção natural, e taxas e modelos de mutação.

	Camboazinho	Canas	Inhatinhum	Cacequi	BR290	Total
N	100	100	300	100	50	650
$Na$	5	5	6	5	5	5
$Ar$	5,27	5,31	5,52	5,24	5,18	6,24
$Hs$	0,637	0,635	0,641	0,637	0,631	0,636
$Fis$	0,183	0,168	0,180	0,175	0,173	0,176
$\hat{t}_a$	0,691	0,712	0,694	0,702	0,705	0,701

Tabela 3 – Número de indivíduos no fragmento (N), número de alelos ( $Na$ ), riqueza alélica ( $Ar$ ), heterozigosidade esperada ( $Hs$ ), coeficiente de endogamia dentro do fragmento ( $Fis$ ) e taxa de cruzamento aparente ( $\hat{t}_a$ ) por fragmento de *Luehea divaricata*, obtidos a partir de dados microssatélites e análises no programa FSTAT.

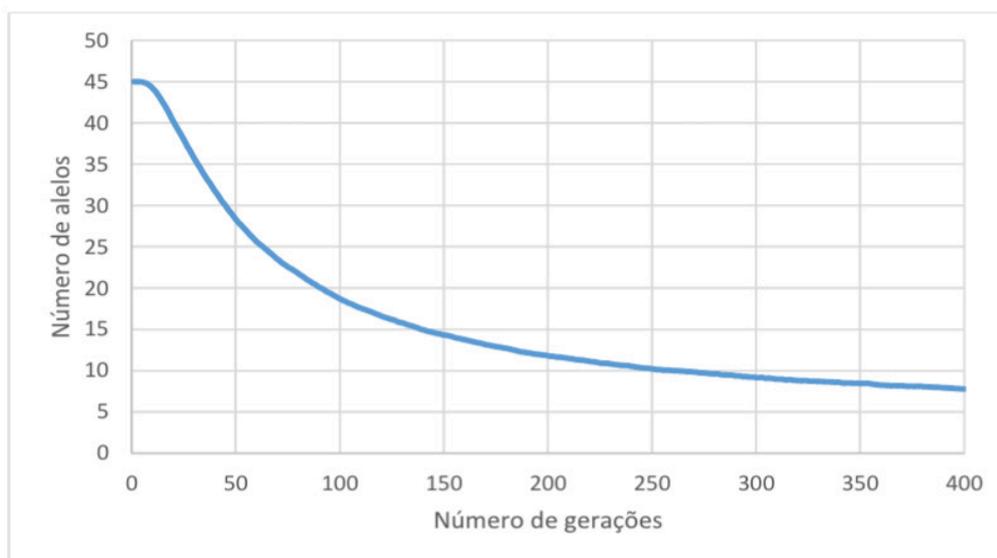


Figura 3 - Evolução do número de alelos com o passar das 400 gerações em cinco fragmentos de *Luehea divaricata*.

Com base nos índices de diversidade genética de Nei (Tabela 5), 94% da variabilidade genética está distribuída dentro dos fragmentos, sendo que apenas 6% se encontra distribuída entre eles. A grande variabilidade observada dentro dos fragmentos resulta da elevada taxa de cruzamento, o que ratifica os resultados anteriores em relação ao modo de reprodução misto com predomínio de cruzamentos. Resultado semelhante foi obtido por Conson (2012) na análise de locos microssatélites de nove populações dessa mesma espécie na Mata Atlântica. Conson observou que 93,16% da variação está distribuída dentro de populações e, apenas 6,84% entre populações.

Estatísticas de Nei	$H_o$	0,524
	$H_s$	0,636
	$H_T$	0,678
	$D_{ST}$	0,042
	$G_{ST}$	0,061
	$G_{IS}$	0,176
Estatísticas de Cockerham	$F$	0,238
	$\theta$	0,075
	$F$	0,176
Estatísticas F de Wright	$F_{IT}$	0,226
	$F_{ST}$	0,061
	$F_{IS}$	0,176
Estatística de diferenciação genética adaptada para microssatélites	$R_{ST}$	0,076
Fluxo gênico	$Nm$	3,8

Tabela 4 – Estatísticas de estrutura genética sob diversas abordagens, geradas pelo programa FSTAT para cinco fragmentos de *Luehea divaricata*.

$H_o$ : heterozigosidade observada dentro de fragmentos;  $H_s$ : heterozigosidade esperada dentro de fragmentos;  $H_T$ : heterozigosidade total;  $D_{ST}$ : diversidade genética entre fragmentos;  $G_{ST}$ : coeficiente de divergência genética entre

populações (diversidade relativa);  $G_{IS}$ : diversidade relativa dentro de fragmentos;  $F$ : coeficiente de coancestria total;  $\theta$ : coeficiente de correlação de gametas entre fragmentos;  $f$ : coeficiente de coancestria dentro dos fragmentos;  $F_{IT}$ : coeficiente de endogamia total;  $F_{ST}$ : coeficiente de endogamia entre fragmentos;  $F_{IS}$ : coeficiente de endogamia dentro dos fragmentos.

Fonte de Variação	Diversidade absoluta	Diversidade relativa
Entre populações ( $D_{ST}$ )	0,042	0,06
Dentro de populações ( $H_S$ )	0,636	0,94
Total ( $H_T$ )	0,678	

Tabela 5 – Índices de diversidade genética de Nei entre e dentro de cinco fragmentos de *Lueheadivaricata*.

As estatísticas de diferenciação dentro ( $G_{IS}$ ,  $f$  e  $F_{IS}$ ) e entre fragmentos ( $G_{ST}$ ,  $\theta$ ,  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$ ) estimadas sob diferentes abordagens foram similares (Tabela 4). O fato de os valores de  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  terem sido semelhantes sugere que os fragmentos estão evoluindo na mesma direção, uma vez que, segundo Valle et al. (2011), a diferença entre essas estatísticas se deve ao processo de evolução desses fragmentos, ou seja, o quanto eles estão divergindo no tempo em decorrência de seus modelos evolutivos. A estimativa de  $R_{ST}$  foi mais similar a  $\theta$ , conforme esperado (Slatkin, 1995), pois ambas são baseadas em componentes de variância interpopulacional. Seus valores (0,076 e 0,075 respectivamente) revelam uma diferenciação moderada entre os fragmentos, segundo a escala apresentada em Hartl e Clark (2010).

O fragmento Camboazinho apresentou o maior coeficiente de endogamia em função de possuir a menor taxa de cruzamentos (0,691), sendo que Canas, que possui a maior taxa de cruzamentos (0,712), apresentou o menor coeficiente de endogamia. Usando marcadores microssatélites, Alves et al. (2013) fizeram a caracterização genética de 24 acessos de *Theobroma grandium* em diferentes centros de pesquisa da Embrapa no Brasil, como CPAFRO (município de Porto Velho – RO), CPAA (Manaus – AM) e CPATU (Belém – PA) e não observaram endogamia na população ( $f = 0,003$ ), o valor médio de coancestria foi baixo ( $\theta = 0,0199$ ) e o número de alelos observados foi de 45. Resultados similares ( $f = 0,002$  e  $F = 0,07$ ) foram obtidos por Moura et al. (2012) estudando a estrutura genética em populações fragmentadas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. A região do Cerrado do Brasil. Segundo Slatkin (1995), os valores de  $F_{IS}$  podem ser superestimados devido às altas taxas de mutação dos locos microssatélites. Como consequência existe maior probabilidade de os alelos serem idênticos por estado (mutações que resultam em um tamanho igual de unidades de repetição) do que por descendência. Além disso, o tamanho amostral desempenha papel importante na precisão da estimativa da endogamia devido a erros de amostragem, haja vista que, com amostras pequenas, é menos provável capturar todos os genótipos possíveis de cada loco, resultando em superestimativa da endogamia.

O fluxo gênico, em termos de número médio de migrantes por geração foi

estimado em 3,8 (Tabela 4), um valor alto, segundo a escala definida por Govindaraju (1989) que distingue três níveis de fluxo gênico, a saber: alto ( $N_m > 1$ ), intermediário ( $0,25 < N_m < 0,99$ ) e baixo ( $N_m < 0,25$ ). Fluxo gênico alto seria suficiente para se contrapor aos efeitos das forças evolutivas (endogamia e deriva genética) e resultar em menor diferenciação entre os fragmentos. Porém, se trata de um valor superestimado, contando que a expressão usada para estimar o número de migrantes por geração foi desenvolvida para o modelo de ilhas de Wright, diferente do modelo de isolamento por distância do caso em estudo, o qual restringe o fluxo aos fragmentos mais próximos.

A diferenciação par a par indica uma maior diferenciação entre os fragmentos Cacequi e BR290 (resultado do menor fluxo de genes entre si) (Tabela 6). Por outro lado, e em resultado do maior fluxo entre si, os fragmentos Canas e Inhatinhum possuem a menor diferenciação genética. Esses dados contrastam com a primeira lei da geografia (Tobber, 1970). De acordo com essa lei, era esperada menor diferenciação entre os pares de fragmentos Canas e Camboazinho, e Inhatinhum e BR290, por serem geograficamente mais próximos entre si. De igual modo, era esperada maior diferenciação entre os fragmentos mais distantes, como Cacequi e Camboazinho, e Cacequi e Canas. Porém, aspectos como autoincompatibilidade, restrição de fluxo gênico ou o insucesso reprodutivo de migrantes podem explicar a não aplicabilidade dessa lei aos nossos dados. Similarmente, não foi observada correlação significativa entre os valores de  $F_{ST}$  par a par e as distâncias geográficas. Aparentemente, proximidade geográfica entre fragmentos não significa, necessariamente Conson (2012). Ademais, Medri et al. (2011) observaram correlação significativa entre a diferenciação genética e a distância geográfica entre nove subpopulações da espécie arbórea florestal *Aegiphila sellowiana* (Lauraceae), no Brasil.

	Camboazinho	Canas	Inhatinhum	Cacequi	BR290
Camboazinho	–	0,078	0,065	0,077	0,081
Canas	2,974	–	0,061	0,076	0,078
Inhatinhum	3,610	3,853	–	0,064	0,058
Cacequi	2,976	3,041	3,666	–	0,082
BR290	2,826	2,950	4,055	2,793	–

Tabela 6 – Estimativas de  $F_{ST}$  (diagonal superior) e fluxo gênico (diagonal inferior) par a par de cinco fragmentos de *L. divaricata*.

Os valores referentes ao número de migrantes por geração entre pares de fragmentos são superestimados, uma vez que existem pares que não trocam genes entre si, em função das distâncias entre eles. Além disso, a estatística  $F_{ST}$  não é adequada para análise genética de locos microssatélites devido ao fato de evoluírem de acordo com o modelo de mutação passo a passo, sendo a estatística  $R_{ST}$  a mais indicada. Portanto, devido à limitação do programa usado para a análise dos dados (programa FSTAT), que não determina os valores de  $R_{ST}$  par a par, as taxas de

fluxo entre os pares de fragmentos foram estimadas mediante valores  $F_{ST}$  par a par. Ademais, a estimativa indireta do fluxo gênico com base na estatística de diferenciação genética ( $F_{ST}$  ou  $R_{ST}$ ) pressupõe estrutura genética sob o modelo de Wright (o qual assume uniformidade e constância, no tempo e no espaço, do tamanho populacional e da taxa de migração), não condizente com o modelo de migração observado nesse trabalho, com fragmentos isolados por distância. Apesar do modelo de ilhas ser o mais convencional, ele não reflete, segundo Sorketal. (1999), o movimento contemporâneo dos genes ou as alterações no processo de dispersão entre populações (sendo por isso o fluxo denominado histórico ou aparente), mas fornece informações valiosas sobre efeitos cumulativos de fluxo gênico na estrutura genética de populações.

Os decréscimos no número de alelos e na heterozigosidade com o passar das gerações são ilustrados nas Figuras 2 e 3. No início, uma elevada taxa de perda de alelos, reduzidos a cerca de 18 alelos no final de 100 gerações, a partir do qual estabiliza, terminando com cerca de sete alelos após 400 gerações. A perda de alelos ao longo do tempo foi acompanhada por uma redução da heterozigosidade, tanto observada como esperada, cujos valores iniciais foram 0,83 e 0,97, respectivamente, e, no final de 400 gerações, 0,52 e 0,64 respectivamente. A redução na heterozigosidade ocorreu em uma proporção inferior àquela do número de alelos observada nas primeiras 100 gerações, denotando a importância dos cruzamentos na recombinação dos alelos remanescentes para gerar variabilidade.

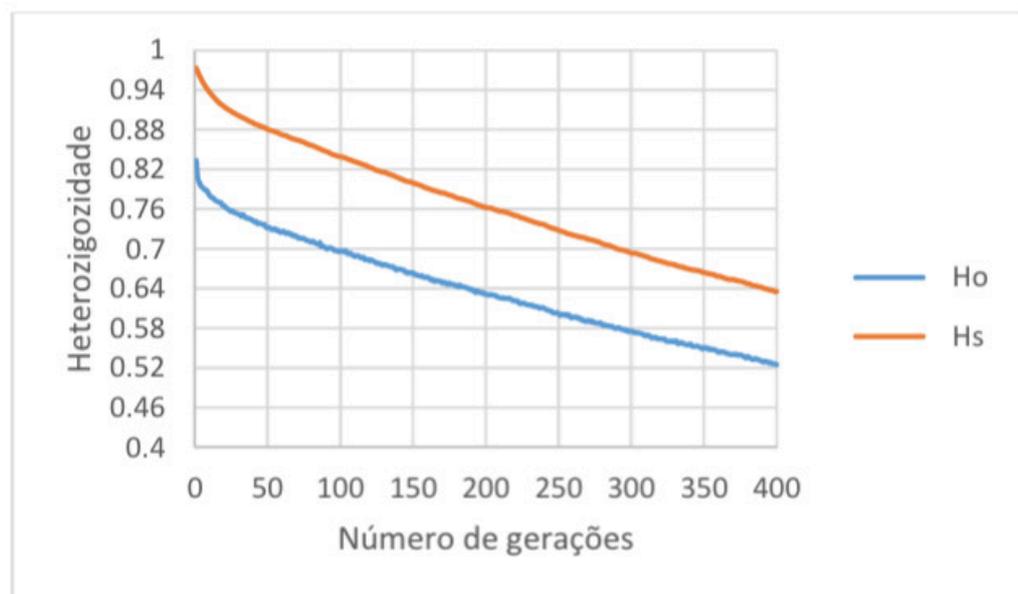


Figura 3 – Comportamento da heterozigosidade observada (Ho) e esperada (Hs) ao longo de 400 gerações em cinco fragmentos de *Luehea divaricata*.

Os valores de heterozigosidade foram plotados em função do número de gerações para taxa de migração inferior (0,01; Figura 4A) e superior (0,9; Figura 4B), para ilustrar o efeito da taxa de migração sobre a perda da variabilidade genética. A Figura 4A mostra que um fluxo gênico na taxa de 0,01 resultaria nos valores

atuais de heteroziguidade (0,52 e 0,64) após 360 gerações. Por outro lado, sob um fluxo superior, essa heteroziguidade teria sido alcançada após 400 gerações e a variabilidade genética seria ainda maior (Figura 4B). Esses dados ratificam, mais uma vez, o papel do fluxo gênico no controle da perda de variabilidade genética em populações.

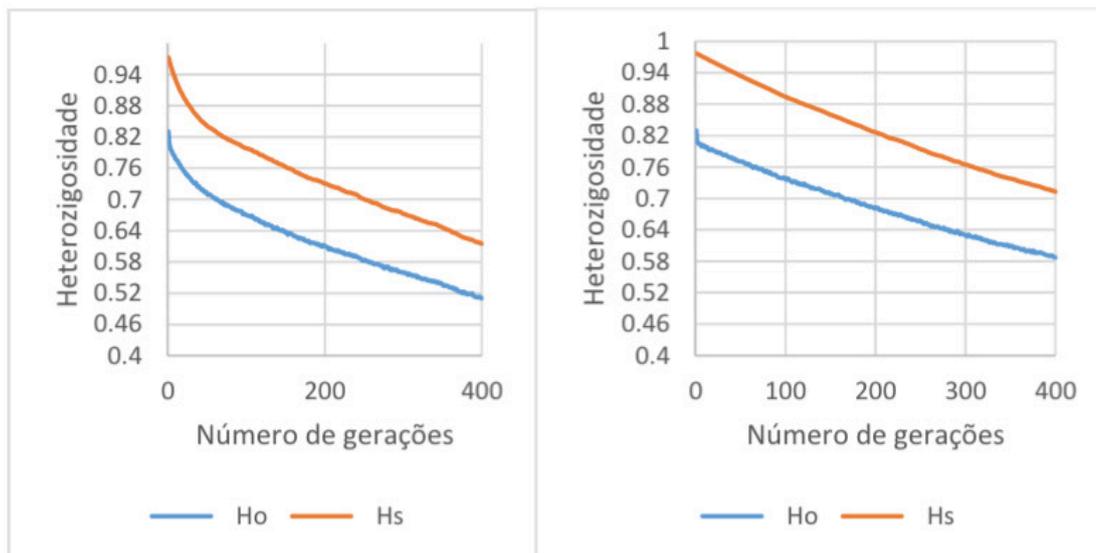


Figura 4 – Heteroziguidade observada e esperada considerando-se taxas de migração de 0,01 (A) e 0,9 (B) em cinco fragmentos de *L. divaricata*.

A área entre as curvas das heteroziguidades esperada e observada tende a reduzir com o passar das gerações (Figura 4B),

Essas diferenças entre os parâmetros ( $H_s - H_o$ ), juntamente com os coeficientes de endogamia para as taxas de migração de 0,02 e 0,9, ilustram o impacto do fluxo gênico sobre a endogamia nos cinco fragmentos (Figura 5). A curva de  $H_s - H_o$  para a taxa de migração de 0,02 foi mais íngreme que a de 0,9. Além disso, houve uma estabilização do coeficiente de endogamia para ambas as taxas de migração, apesar de uma ligeira tendência ascendente na taxa de migração de 0,02, sobretudo nas gerações iniciais. Porém, com o passar das gerações, as heteroziguidades observadas tendem a se aproximar das esperadas para o Equilíbrio. No entanto, a população com a taxa de migração de 0,02 possui tendência de atingir primeiro o equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação àquela de 0,9, sob os mesmos valores iniciais de heteroziguidade. Isso acontece porque na taxa de migração de 0,02, a perda da heteroziguidade é mais rápida e a heteroziguidade esperada reduz com maior velocidade que a observada, atingindo mais cedo o equilíbrio apesar do baixo fluxo gênico.

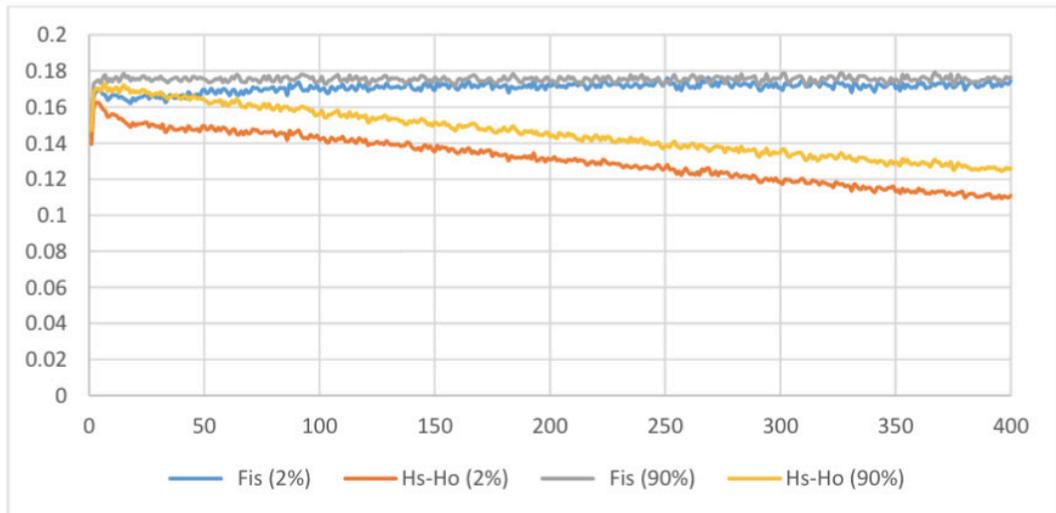


Figura 5 – Diferenças entre as heterozigosidades (Hs-Ho) e índices de fixação em função do número de gerações em cinco fragmentos de *L. divaricata*.

Uma plotagem das estatísticas  $F$  ilustra o quão os efeitos do isolamento dos fragmentos e o sistema reprodutivo contribui na endogamia total ( $F_{IT}$ ) (Figura 6A e B). Devido à ausência de diferenciação entre os fragmentos, as curvas de  $F_{IS}$  e  $F_{IT}$  se sobrepõem na taxa de migração de 0,9. Isso indica que a endogamia devido à subdivisão é insignificante, sendo que a endogamia observada foi virtualmente causada pelo sistema reprodutivo. Por outro lado, a taxa de migração de 0,02 concede espaço para a ocorrência de endogamia em função do isolamento, para além do efeito do sistema reprodutivo.

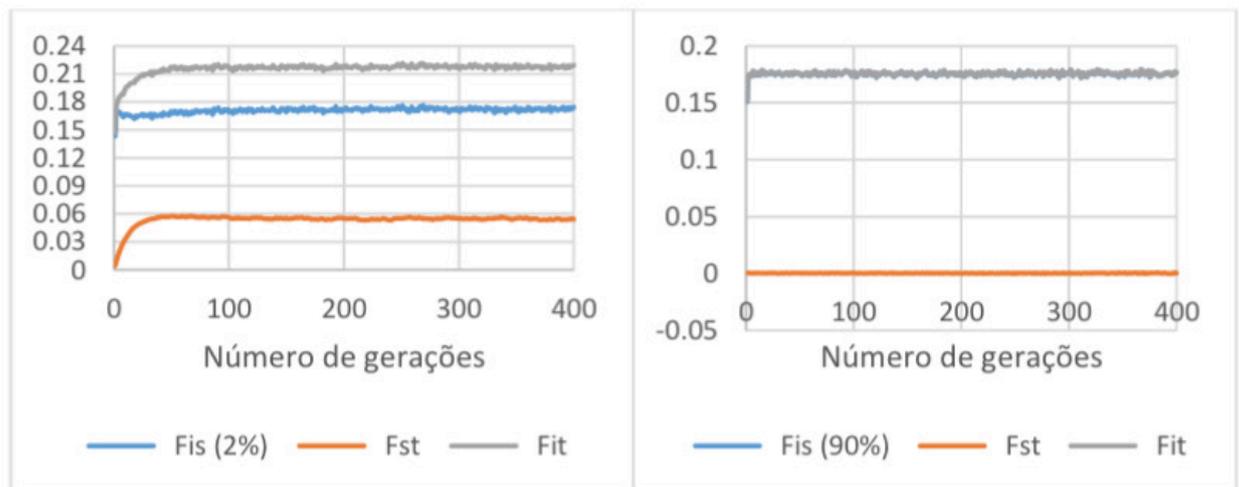


Figura 6 – Plotagem das estatísticas  $F$  de Wright para uma taxa de migração de 0,02 (em A) e de 0,9 (em B) em cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul.

## Parâmetros para a Conservação Genética

Com vistas à conservação dos recursos genéticos, o Tamanho Mínimo Efetivo e a Área Mínima Viável (Tabela 7) revestem-se de grande importância na medida em que minimizam os efeitos dos fatores que conduzem à extinção de alelos e,

consequentemente, à extinção de espécies.

	Camboazinho	Arroio Canas	Fazenda Inhatinhum	Rio Cacequi	BR290
n	100	100	300	100	50
Fis	0,183	0,168	0,18	0,175	0,173
Ne	84,53	85,62	254,24	85,11	42,63
Ne/n	0,85	0,86	0,85	0,85	0,85
D	26,32	26,32	26,32	26,32	26,32
A	3,8	3,8	11,4	3,8	1,9
PMV <sub>(100)</sub>	118	117	118	117	117
D <sub>(100)</sub>	-18	-17	182	-17	-67
PMV <sub>(1000)</sub>	1183	1168	1180	1175	1173
D <sub>(1000)</sub>	-1083	-1068	-880	-1075	-1123
AMV <sub>(100)</sub>	4,5	4,4	4,5	4,5	4,5
AMV <sub>(1000)</sub>	45	44,4	44,8	44,6	44,6

Tabela 7 – Parâmetros para conservação genética da população em cinco fragmentos de *L. divaricata*.

n: tamanho do fragmento; Ne: Tamanho Efetivo Populacional; Fis: coeficiente de endogamia dentro dos fragmentos; d: densidade populacional (indivíduos ha<sup>-1</sup>); A: área do fragmento em hectares; PMV(100) e PMV<sub>(1000)</sub>: População Mínima Viável para conservação em curto e longo prazo, respectivamente; AMV(100) e AMV<sub>(1000)</sub>: Área Mínima Viável para conservação em curto e longo prazo, respectivamente; D<sub>(100)</sub> e D<sub>(1000)</sub>: diferença entre o tamanho e a PMV do fragmento em curto e longo prazo, respectivamente.

O Tamanho Efetivo para todas as populações é inferior ao número de indivíduos amostrados, devido à ocorrência de endogamia ( $F_{IS} > 0$ ). O fragmento Inhatinhum, que possui maior tamanho e menor coeficiente de endogamia, possui o maior Ne. Os valores da Tabela 7 sugerem que uma amostra de 85 indivíduos selecionados de maneira aleatória representará a variabilidade genética existente na população Camboazinho com 100 indivíduos. Já a população Canas, com o mesmo número de indivíduos, porém com uma taxa de fixação ligeiramente inferior, é representada geneticamente por 86 indivíduos. A diferença deve-se ao fato da endogamia reduzir a variabilidade genética da população, estando concentrada em um tamanho populacional inferior ao tamanho total. Em um extremo, se o índice de fixação ou coeficiente de endogamia for igual a zero, a variabilidade genética total estará distribuída em todos os indivíduos da população. Na amostragem de 20 indivíduos de duas populações da espécie arbórea florestal *Calophyllum brasiliense*, Botrel et al. (2006) obtiveram os tamanhos efetivos de endogamia de 18,24 e 19,59, para fins de conservação, usando a mesma expressão empregada no presente trabalho.

A razão Ne/n é um importante parâmetro nas atividades de preservação do germoplasma, coleção de sementes e conservação genética *in situ* (Vieira e Carvalho, 2008). Uma vez que o índice de fixação teve valores semelhantes nos cinco fragmentos, a razão Ne/n resultou, igualmente, em valores semelhantes, fazendo com que nenhuma subpopulação tenha prioridade para conservação sobre as demais (fragmentos com

menor razão  $N_e/n$  são prioritários para conservação) ou estratégia diferente de coleta de sementes (maior quantidade de amostragem é necessária em fragmentos com menor razão  $N_e/n$  para garantir a manutenção da variabilidade genética e mínima endogamia nas sementes). De qualquer maneira, devido aos elevados coeficientes de endogamia que resultaram em uma baixa razão  $N_e/n$ , são necessárias estratégias para a conservação e a coleta de sementes, as quais devem ser realizadas de maneira aleatória (não de sementes, mas de árvores matrizes).

A População Mínima Viável, determinada para prevenir a depressão endogâmica (curto prazo) e para manter o potencial evolutivo (longo prazo), foi determinada para os tamanhos efetivos de referência de 100 e 1000, respectivamente, conforme recomendado por Nuney e Campbell (1993). De acordo com Lynch (1998), a variância genética média (decorrente da deriva genética) torna-se independente do tamanho populacional quando o tamanho efetivo excede 1000 indivíduos, sendo esse o limite adequado para a conservação em longo prazo. No presente trabalho, foi assumida a mesma densidade ( $d$ ) em todas subpopulações, com base no valor obtido no levantamento realizado por Figueiredo (2014), no município de São Martinho da Serra, e os resultados mostraram que somente o fragmento da Fazenda Inhatinhum apresentou possibilidades de manutenção da diversidade de equilíbrio genético em curto prazo, pois obteve um valor positivo do parâmetro  $D$ , a diferença entre o tamanho da população estimada e a PMV. Porém, em longo prazo nenhum dos fragmentos se mostrou viável para preservar seu potencial evolutivo (todos os valores de  $D$  são negativos), aumentando, assim, a probabilidade de oscilações genéticas aleatórias que poderão levar ao seu declínio, constituindo-se em mais um motivo da necessidade de intervenção. Vieira e Carvalho (2008) obtiveram também valores negativos de  $D$  para a conservação em curto e em longo prazo. Desse modo, estratégias urgentes para reduzir a endogamia e a perda de alelos por deriva são necessárias. Uma solução para os nossos fragmentos seria a criação e proteção de corredores ecológicos para manter o fluxo gênico entre si.

A conversão da PMV em termos de área (AMV) sugere que cada fragmento necessita de pelo menos de 4,5 ha para a conservação em curto prazo e 45 ha para a conservação em longo prazo. Condizente com o parágrafo anterior, somente a Fazenda Inhatinhum possui uma área (11 ha) capaz de prevenir a depressão endogâmica (curto prazo). Isso significa que, caso se mantenha assim e sem fluxo, chegaria ao declínio. Conectando-se os fragmentos Canas e Camboazinho, que juntas somam 7,6 ha, ter-se-ia um tamanho suficiente para sua viabilidade em curto prazo. Para as restantes três subpopulações, dada a sua localização geográfica, seria necessário conectá-las todas elas, permitindo um fluxo gênico intenso, de modo a que se comportem como única população panmítica. Porém, a conexão das três subpopulações (área total de 24,7 ha) não seria suficiente para se obter AMV para a conservação de longo prazo (45 ha), ou para a manutenção do seu potencial evolutivo (longo prazo). Porém, uma vez que a endogamia foi o efeito determinante na redução do tamanho efetivo,

com o consequente aumento da PMV, a conexão dos cinco fragmentos através de fluxo gênico, diminuiria a perda de alelos pela deriva e reduziria a endogamia. Essa ação resultaria em uma PMV (e AMV) ainda menor, tornando-a mais próxima ou até inferior à área atual de 24,7 ha. À título de ilustração, se o coeficiente de endogamia no primeiro fragmento (Camboazinho) fosse igual a zero, seu tamanho efetivo teria sido igual ao tamanho populacional e a área mínima viável seria igual a 3,8 e 38 ha, para conservação em curto e longo prazo, respectivamente.

Nas condições desta simulação, em que foram observados altos níveis de endogamia devido ao isolamento reprodutivo, o tamanho do fragmento florestal por si só não é suficiente para preservar seu potencial evolutivo a longo prazo, a menos que os fragmentos florestais estejam conectados por algum tipo de fluxo gênico. No curto prazo, apenas o fragmento florestal de Inhatinhum possui um tamanho suficiente para se contrapor aos efeitos da depressão endogâmica. Assim, propomos a construção de corredores ecológicos conectando os fragmentos Canas e BR290, e os fragmentos Inhatinhum e Cacequi. Desta forma, o fluxo gênico seria facilitado pelo chamado 'modelo de alpodras', através do qual cada fragmento troca genes com fragmentos adjacentes. Isso permitiria o fluxo gênico entre os fragmentos e, conseqüentemente, minimizaria os efeitos da deriva genética e endogamia. Além disso, o fluxo gênico facilitaria a distribuição de alelos, incluindo aqueles gerados por mutações, e aumentaria a diversidade genética e a capacidade adaptativa de toda a população em função de alterações ambientais.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

Alves RM, Silva CRS, Silva MSC, Silva DCS, et al. (2013). Diversidade genética em coleções amazônicas de germoplasma de cupuaçuzeiro. *Rev. Bras. Frutic.* 35: 818-828. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000300019>

Balloux F (2001). EASYPOP (version 1.7): a computer program for population genetics simulations. *J. Hered.* 92: 301- 302. <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/92.3.301>

Bawa KS (1974). Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution* 28: 85-92.

Botrel MCG, Souza AM, Carvalho D, Pinto SIC, et al. (2006). Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. em duas populações de mata ciliar. *Rev. Arvore* 30: 821-827. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622006000500016>

Cascante A, Quesada M, Lobo JJ and Fuchs EA (2002). Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conserv. Biol.* 16: 137-

147. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.00317.x>

Cockerham CC (1969). Variance of gene frequency. *Evolution* 23: 72-84.

Conson ARO (2012). Estrutura Genética em Populações de *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae). 58f. Master's thesis, Genetics and Molecular Biology, UEL, Londrina. [http://www.uel.br/portal/frmOpcao.php?opcao=http://www.bibliotecadigital.uel.br/teses\\_dissertacoes.php](http://www.uel.br/portal/frmOpcao.php?opcao=http://www.bibliotecadigital.uel.br/teses_dissertacoes.php). Accessed June 11, 2016.

Destro D and Montalván R (1999). Melhoramento Genético de Plantas. 1st edn. UEL Press, Londrina.

Didham RK, Ghazoul J, Stork NE and Davis AJ (1996). Insects in fragmented forests: a functional approach. *Trends Ecol. Evol.* 11: 255-260. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)20047-3](http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347(96)20047-3)

do Valle GE, Zucchi MI, Stabellini NS, Lourenção AL, et al. (2011). Estrutura genética populacional de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) utilizando marcadores microsatélites. *Neotrop. Entomol.* 40: 204-211. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2011000200008>

Figueiredo MCS (2014). Florística de mata ciliar em São Martinho da Serra, RS, Brasil. 65f. Dissertação, Master's thesis, UFSM, Santa Maria. <http://w3.ufsm.br/ppgagrobio/MariaCarolina.pdf>. Accessed June 8, 2016.

Goudet J (1995). FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86: 485-486.

Govindaraju DR (1989). Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. *J. Evol. Biol.* 2: 173- 181. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1420-9101.1989.2030173.x>

Hartl DL and Clark AC (2010). Princípios de genética de populações, 4th edn. Artmed Press, Porto Alegre.

Lobo J, Solis S, Fuchs EJ and Quesada M (2013). Individual and temporal variation in outcrossing rates and pollen flow patterns in *Ceiba pentandra* (Malvaceae: Bombacoidea). *Biotropica* 45: 185-194. <http://dx.doi.org/10.1111/btp.12001>

Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CF, et al. (2005). Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for Neotropical trees. *Heredity* 95: 255-273. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6800725>

Lynch M and Lande R (1998). The critical effective size for a genetically secure population. *Anim. Conserv.* 1: 70-72. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-1795.1998.tb00229.x>

Medri C, Ruas EA, Ruas CF, Medri PS, et al. (2011). Population genetic structure of the tropical tree species *Aegiphila sellowiana* (Lamiaceae). *Genet. Mol. Res.* 10: 3186-3198. <http://dx.doi.org/10.4238/2011.December.20.3>

Moraes PLR and Monteiro R (2002). Taxas de cruzamento em uma população natural de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). *Biota Neotrop.* 2: 1-10.

Moritz C and Faith DP (1998). Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Mol. Ecol.* 7: 419-429. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00317.x>

Moura TM, Martins K, Sujii PS, Sebbenn AM, et al. (2012). Genetic structure in fragmented populations of *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. with distinct anthropogenic histories in a Cerrado region of Brazil. *Genet. Mol. Res.* 11: 2674- 2682. <http://dx.doi.org/10.4238/2012.July.10.16>

- Nagel JC, Ceconi DE, Poletto I and Stefenon VM (2015). Historical gene flow within and among populations of *Luehea divaricata* in the Brazilian Pampa. *Genetica* 143: 317-329. <http://dx.doi.org/10.1007/s10709-015-9830-9>
- Nei M (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41: 225-233. [http:// dx.doi.org/10.1111/j.1469-1809.1977.tb01918.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-1809.1977.tb01918.x)
- Nei M and Syakudo K (1958). The estimation of outcrossing in natural populations. *Jpn. J. Genet.* 33: 46-51. Available at [[https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs1921/33/2/33\\_2\\_46/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs1921/33/2/33_2_46/_pdf)]. Accessed June 11, 2016. <http://dx.doi.org/10.1266/jjg.33.46>
- Nunney L and Campbell KA (1993). Assessing minimum viable population size: Demography meets population genetics. *Trends Ecol. Evol.* 8: 234-239. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90197-W](http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347(93)90197-W)
- Peng B, Chen HS, Mechanic LE, Racine B, et al. (2013). Genetic Simulation Resources: a website for the registration and discovery of genetic data simulators. *Bioinformatics* 29: 1101-1102. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt094>
- Pollak E and Sabran M (1992). On the theory of partially inbreeding finite populations. III. Fixation probabilities under partial selfing when heterozygotes are intermediate in viability. *Genetics* 131: 979-985.
- Quesada M, Herrerías-Diego Y, Lobo JA, Sánchez-Montoya G, et al. (2013). Long-term effects of habitat fragmentation on mating patterns and gene flow of a tropical dry forest tree, *Ceiba aesculifolia* (Malvaceae: *Bombacoideae*). *Am. J. Bot.* 100: 1095-1101. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1200542>
- Ruas EA, Conson ARO, Costa BF, Damasceno JO, et al. (2009). Isolation and characterization of ten microsatellite loci for the tree species *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) and intergeneric transferability. *Conserv. Genet. Resour.* 1: 245-248. <http://dx.doi.org/10.1007/s12686-009-9060-5>
- Silva SMM, Martins K, Mesquita AGG and Wadt LHO (2014). Parâmetros genéticos para a conservação de *Hymenaea courbaril* L. na Amazônia Sul-Occidental. *Cienc. Florest.* 24: 87-95. <http://dx.doi.org/10.5902/1980509813326>
- Slatkin M (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462. Available at [<http://www.genetics.org/content/genetics/139/1/457.full.pdf>].
- Sobierajski GR, Kageyama PY and Sebbenn AM (2006). Sistema de reprodução em nove populações de *Mimosa scabrella* Benth (Leguminosaceae). *Sci. Forestalis* 71: 37-49.
- Sork VL, Nason J, Campbell DR and Fernandez JF (1999). Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends Ecol. Evol.* 14: 219-224. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01585-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01585-7)
- Stefenon VM and Costa LS (2012). A simulation study on the behavior of allelic richness and inbreeding coefficient over generations in fragmented populations of tree species. *Ann. For. Res.* 55: 3-10.
- Tobler WR (1970). A computer movie simulating urban growth in the Detroit region. *Econ. Geogr.* 46: 234-240. [http:// dx.doi.org/10.2307/143141](http://dx.doi.org/10.2307/143141)
- Valdes AM, Slatkin M and Freimer NB (1993). Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* 133: 737-749.
- Vieira FA and Carvalho D (2008). Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. *Biodivers. Conserv.* 17: 2305-2321. <http://dx.doi.org/10.1007/s10531-008-9367-7>

Vinson CC, Kanashiro M, Harris SA and Boshier DH (2015). Impacts of selective logging on inbreeding and gene flow in two Amazonian timber species with contrasting ecological and reproductive characteristics. *Mol. Ecol.* 24: 38-53. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.13002>

Wright S (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.

Yuan X, Miller DJ, Zhang J, Herrington D, et al. (2012). An overview of population genetic data simulation. *J. Comput. Biol.* 19: 42-54. <http://dx.doi.org/10.1089/cmb.2010.0188>

## USO DE DADOS GENÔMICOS COMO INDICADORES DE IDENTIDADE E QUALIDADE NA GESTÃO DE COLEÇÕES MICROBIOLÓGICAS

### **Luciana de Almeida**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Programa de Pós-graduação em  
Ponta Grossa – Paraná

### **Mariely Cristine dos Santos**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Programa de Pós-graduação em  
Ponta Grossa – Paraná

### **Mariana Machado Fidelis Nascimento**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Programa de Pós-graduação em  
Ponta Grossa – Paraná

### **Luciano Medina-Macedo**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Programa de Pós-graduação em  
Ponta Grossa – Paraná

### **Juliana Vitória Messias Bittencourt**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Programa de Pós-graduação em  
Ponta Grossa – Paraná

**RESUMO:** As coleções de culturas têm grande importância na conservação e manutenção dos mais diversos microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) auxiliando desta forma na preservação do patrimônio genético de nosso país. O presente estudo buscou utilizar dados de sequências de DNA para confirmar a identidade taxonômica dos isolados depositados na Coleção Microbiológica

de Interesse Biotecnológico (CMIB). Todos os isolados depositados tiveram seu DNA genômico extraídos por diferentes técnicas. A amplificação e sequenciamento, dos DNAs extraídos, foi realizada por primers específicos para cada grupo de microrganismo (bactérias, fungos filamentosos e leveduras). Com o uso das técnicas moleculares foi possível identificar a espécie de 90% isolados depositados na CMIB.

**PALAVRAS-CHAVE:** conservação, microrganismos, Interesse biotecnológico

### USE OF GENOMIC DATA AS INDICATORS OF IDENTITY AND QUALITY IN THE MANAGEMENT OF MICROBIOLOGICAL COLLECTIONS

**ABSTRACT:** The cultures collections have great importance in the conservation and maintenance of the most diverse microorganisms (bacteria, yeasts, and filamentous fungi), helping in the preservation of the genetic patrimony of our country. The present study aimed to use DNA sequencing data to confirm the taxonomy of the isolates deposited in the Microbiological Collection of Biotechnological Interest (CMIB). All the deposited isolates had their genomic DNA extracted by different techniques. The amplification and sequencing of this DNA were

performed by specific primers for each microorganism group (bacteria, filamentous fungi, and yeasts). With the use of molecular analysis techniques, it was possible to identify 90% of the data deposited in the CMIB.

**KEYWORDS:** conservation, microorganisms, Biotechnological interest

## 1 | INTRODUÇÃO

Atualmente o tema biodiversidade tem sido muito abordado e estudado, uma vez que o conhecimento acerca da biodiversidade nos permite esclarecer e conhecer a composição das comunidades de organismos, bem como suas interações no ambiente em que estão inseridos (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006, CARDOSO et al., 2011). De acordo com Manfio (2003) no Brasil diferentes grupos de pesquisa tem se dedicado intensivamente no estudo da diversidade de microrganismos, sendo que a diversidade taxonômica é mais conhecida e melhor documentada para fungos filamentosos.

As coleções biológicas são um conjunto de organismos ou partes destes, preservados fora do ambiente natural (ARANDA, 2014). Nestes centros se realizam a identificação, catalogação, documentação da biodiversidade, compostos por diferentes acervos que representam uma coleção de dados da biodiversidade, garantindo desta forma o seu registro histórico (VAZOLLER; CANHOS, 2005, SILVA e SÁ, 2016). Dentre as finalidades das coleções biológicas tem-se, o conhecimento e registro histórico da biodiversidade, bem como o armazenamento seguro e eficiente de tais materiais de origens diversas, permitindo desta forma que estejam acessíveis para futuros acessos (KURY et al., 2006; SILVA e SÁ, 2016).

O armazenamento de material biológico e suas informações de espécie e população são essenciais para compreensão da vida no planeta, para projeção de cenários futuros, entendimento de mudanças da biodiversidade e seus impactos, também possui papel relevante para a saúde pública, agropecuária entre outros setores (KURY et al., 2006).

As coleções biológicas, em específico as de microrganismos, de maneira geral contribuem substancialmente para setores de pesquisa e inovação no país, uma vez que as informações contidas em tais acervos estabelecem estratégias rápidas para desenvolvimento tecnológico e científico de diferentes setores econômicos (SILVA E SÁ, 2016, PAIVA et al. 2013). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi utilizar dados de sequências de DNA como forma de confirmar a identidade taxonômica dos depósitos da CMIB - Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico da UTFPR/ Ponta Grossa.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Linhagens da coleção microbiológica de interesse biotecnológico

A “Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico” conta com um total de 149 isolados, os quais foram depositados por diferentes pesquisadores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná e outras instituições. Deste total de isolados, apenas 12 possuem identificação molecular. Por este motivo foi realizada a identificação molecular para os 137 isolados não identificados da CMIB, através da análise de regiões ITS para fungos e leveduras, e regiões 16S para bactérias.

### 2.2 Identificação molecular

A extração de DNA para fungos e leveduras foi realizada de acordo com metodologia estabelecida por Vicente et al. (2008). A colônia do microrganismo (fungos e leveduras) cultivados em meio Ágar Sabouraud foi raspada com auxílio de um bisturi e transferidas para microtubos de PCR de volume 1,5mL contendo tampão CTAB e uma mistura de sílica em pó (sílica gel/celite 2:1). O material foi triturado e adicionado clorofórmio obtendo-se fases. À fase aquosa foi coletada e transferida para tubos esterilizados, acrescentado etanol para a precipitação do DNA. Após a precipitação do DNA, foi procedida a lavagem com álcool 70% gelado.

Para bactérias a extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Moreira et al. (2010). Os isolados foram cultivados em Caldo Nutriente e após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas a 49000 x g por 2 min e o sedimento transferido para um microtubo de volume 1,5mL, contendo uma mistura de sílica em pó e celite 2:1, e tampão CTAB. Em seguida, foi aplicado três pulsos (30 seg) de ultrassom (potência 70), com intervalos de 30 s entre cada pulso, em banho de gelo, utilizando disruptor de célula ultrassônico. O DNA obtido dos diferentes microrganismos, pelos diferentes métodos de extração, teve sua qualidade e integridade verificada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio.

Para a amplificação e sequenciamento das regiões específicas para cada microrganismo (bactérias, leveduras e fungos) oligonucleotídeos foram selecionados, levando-se em consideração a especificidade de cada microrganismo, para que a correta identificação dos isolados possa ser realizada. Em relação aos isolados de bactérias foi realizado o sequenciamento da região 16S a qual normalmente é suficientemente grande (1500 pb) para fins de análise. Para fungos e leveduras foi realizado o sequenciamento da região ITS.

A edição das sequências foi realizada com o auxílio do pacote do programa Staden versão 1.6 (STADEN; JUDGE; BONFIELD, 2001). As sequências obtidas foram comparadas com sequências existentes no coleção de dados NCBI pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) e do Instituto Westerdijk (<http://www.westerdijkinstitute.nl/Collections/>), permitindo a detecção de similaridade com sequências caracterizadas

já existentes. Em seguida, as sequências foram alinhadas usando o programa MAFFT (KATO, 2002) e inspecionadas visualmente pelo programa MEGA versão 6 (TAMURA et al., 2013).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os microrganismos depositados na CMIB possuem grande potencial biotecnológico, sendo que alguns ainda não tiveram ainda seu potencial completamente elucidado e explorado. O quadro 1 apresenta os grupos de microrganismos depositados na CMIB, bem como seu possível potencial biotecnológico. De acordo com Aranda (2014) os acervos de coleções servem como repositórios de material biológico à pesquisa científica, além de subsidiar atividades de ensino e importante prestação de serviços.

Procariontes	Bactérias	Patógenos alimentares, Microrganismos indicadores de qualidade microbiológica, indicadores de eficiência na esterilização, produtores de biofilmes e celulose bacteriana, biosurfactante, biorremediação.
		Linhagens padrão adquiridas de instituições certificadas, e com identificação molecular, ex.: ATCC, INCQS
Eucariontes	Fungos	Microrganismos endofíticos com potencial de bioprospecção, obtidos de Bambu.
		Microrganismos obtidos de Furna com potencial de produção de celulase.
		Linhagens utilizados no controle de pragas e doenças e estimuladores de crescimento da planta em substituição aos agrotóxicos e fertilizantes.
	Leveduras	Linhagens com potencial biotecnológico na produção de aromas frutais e florais em fermentações de sidras e fermentados de maçã.
		Fermentos naturais extraídos de alimentos (batata, uva, cana, maçã, iogurte) com potencial biotecnológico a ser explorado.
		<i>Sacharomyces cerevisea</i> proveniente da produção de cervejas com uso potencial na produção de outros alimentos e bebidas.

Quadro 1: Grupos/classes de Microrganismos depositados na CMIB

Fonte: Almeida, 2018

De um total de 149 acessos que a CMIB contabilizava até Julho de 2018, cerca de 50% não apresentavam uma identificação precisa da espécie, e apenas 12 linhagens tinham sua identidade conhecida por se tratarem de linhagens tipo de coleções oficiais. Muitos dos microrganismos depositados haviam sido identificado, apenas através da caracterização fenotípica baseada nas características da morfologia das colônias e ainda no caso dos fungos observação de estruturas reprodutivas. De acordo com Paiva et al. (2013) caracterização fenotípica fornece informações muito importantes quanto as características fisiológicas e bioquímicas dos microrganismos como informações de cultivo e adaptabilidade, temperatura e pH ótimos de crescimento, fermentação de

açúcares, atividades enzimáticas,

Com o sequenciamento do DNA das linhagens foi possível identificar 90% dos microrganismos depositados a nível de espécie, enquanto que outros 10% foram identificados a nível de gênero, principalmente por se tratarem de novos acessos nunca antes caracterizados por sequências de DNA. Atualmente métodos genotípicos de identificação baseados principalmente no sequenciamento do DNA ribossomal (rDNA) tem sido muito utilizado para identificação e estudos da taxonomia (PAIVA et al. 2013), O estudo de Oliveira; Sette; Fantinatti-Garboggini, (2006) aponta que o grande volume de dados genômicos gerados de diferentes microrganismos tem possibilitado o desenvolvimento da biologia básica e aplicada, demonstrando assim a importância da identificação molecular destes organismos.

Esta caracterização molecular assegura não somente a identidade das amostras, mas também os Procedimentos Operacionais Padrões (POP's) mais indicados a serem aplicados para cada tipo de microrganismo. Este conjunto de informações asseguradas somente através do sequenciamento genômico permitem que o acesso destes microrganismos sejam facilitados para desempenhar processos biotecnológicos específicos. Aranda (2014) relata que o compartilhamento de dados ecológicos e taxonômicos, o desenvolvimento de metodologias de caracterização molecular como alguns dos fatores que podem levar ao impacto positivo no desenvolvimento de bioprodutos nas áreas de saúde, ambiente e indústria, mostrando desta forma a importância do conhecimento acerca da identidade molecular dos organismos depositados em coleções de culturas.

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente capítulo abordamos o uso de técnicas moleculares na identificação de microrganismos e como tais informações moleculares podem interferir diretamente na gestão de uma coleção de culturas microbiológicas. Atualmente as técnicas moleculares tem se tornado imprescindíveis na identificação correta de microrganismos, bem como permite conhecer a biodiversidade mantida e conseqüentemente leva a exploração da biodiversidade quanto ao seu potencial biotecnológico com maior segurança. O conhecimento da identidade taxonômica possibilita o desenvolvimento seguro de novos bioprocessos, capazes de produzir produtos com valor agregado e que tragam o desenvolvimento científico, tecnológico e econômico para toda a sociedade, através do desenvolvimento de novas indústrias de base biotecnológica.

Adicionalmente, estudos recentes voltados para a bioprospecção de diversidade microbiológica com potencial para desempenhar processos biotecnológicos específicos, mostrou que através do uso técnicas de metagenômica, a qual é baseada em sequenciamento genômico, tem permitido identificar a existência de microrganismos de difícil cultivo e que naturalmente existem em quantidades reduzidas em amostras complexas, mas que quando cultivados nas condições adequadas são capazes de

serem isolados de maneira segura e eficiente. Mostrando dessa forma como técnicas baseadas na identificação molecular podem auxiliar também na bioprospecção de microrganismos específicos se tornando assim uma técnica alternativa e muito útil.

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à CAPES, CNPq e a Fundação Araucária pelo suporte financeiro concedido para o desenvolvimento deste trabalho, bem como ao programa PNPd pela concessão de bolsa.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. de. **Gestão da coleção microbiológica de interesse biotecnológico na UTFPR Ponta Grossa**. 2018. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2018.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z; MILLER W, LIPMAN DJ. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402, 1997.
- ARANDA, A.T. **Coleções Biológicas: Conceitos básicos, curadoria e gestão, interface com a biodiversidade e saúde pública**. In: Terceiro Simpósio sobre a Biodiversidade da Mata Atlântica. 56p. São Paulo, 2014. ISBN: 978-85-99528-26-6.
- CARDOSO, A. M. et al. **Hunting for extremophiles in Rio de Janeiro**. *Frontiers in Microbiology*, Lausanne, v. 2, p. 100-103, 2011.
- KURY, A.B.; et al., **Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade**. Programa de Pesquisa em Biodiversidade. Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília, 2006
- MANFIO, G.P. **Microbiota – Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica no Brasil**. Campinas: NEPAM/UNICAMP, 2003.
- MOREIRA, M.; NOSCHANG, J.; NEIVA, I.F.; CARVALHO, Y.; HIGUTI, I.H.; VICENTE V.A. **Methodological Variations in the isolation of genomic DNA from *Streptococcus* bacteria**. *Braz Arch Biol Technol* 53(4):845-849, 2010.
- OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. **Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos**. *Multiciência (UNICAMP)*, v. 7, p. 1-19, 2006.
- PAIVA, C. A. O.; OLIVEIRA, M. C.; MARRIEL, I. E.; SOUZA, F. A. de; VALICENTE, F. H.; COTA, L. V. **Manual de Gestão da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 47 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 153).
- STADEN, R, JUDGE D.P.; BONFIELD, J.K., **Sequence assembly and finishing methods**. *Methods of Biochemical Analysis*, v.43, p.303-22, 2001.
- SILVA, M.; SÁ, M.R. **Coleções Vivas: As Coleções Microbiológicas da Fundação Oswaldo Cruz**. *Museologia e Interdisciplinaridade*, v. 9, n. 5, 2016.

TAMURA, K.; STECHER, G. PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0**. Molecular Biology and Evolution, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

VAZOLLER, R. F.; CANHOS, V. P. **Projeto: Diretrizes e Estratégias para a Modernização de Coleções Biológicas Brasileiras e a Consolidação de Sistemas Integrados de Informações sobre Biodiversidade - Coleções de Culturas e Serviços e Centros de Recursos Biológicos**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - Ciência, Tecnologia e Inovação. São Paulo, 2005.

VICENTE, V. A; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M. R. et al. **Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection**. Studies in mycology, v. 61, p. 137-44, 2008.

## VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS ESPONTÂNEOS DE MAMONEIRA COLETADOS EM DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS

### **Sebastião Soares de Oliveira Neto**

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP  
Botucatu – SP

### **Odila Friss Ebertz**

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP  
Botucatu – SP

### **Maria Márcia Pereira Sartori**

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP  
Botucatu – SP

### **Maurício Dutra Zanotto**

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP  
Botucatu – SP

**RESUMO:** A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa da família das Euforbiáceas que é encontrada em várias regiões do mundo devido a sua fácil propagação e adaptação. O estudo da variabilidade genética é primordial para o melhoramento vegetal visando à obtenção de novas cultivares e híbridos de mamoneira. O objetivo deste trabalho foi avaliar através de variáveis morfológicas a variabilidade genética

existente em acessos de mamoneira coletados em diferentes regiões do Brasil. A coleção de acessos de mamoneira foi obtida nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Norte foram semeados e caracterizados através de descritores morfológicos no Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA) em Botucatu – SP. Os dados obtidos nas avaliações foram submetidos à análise de similaridade pelo software Minitab 17. O BTC5 é o genótipo mais divergente e se torna promissor para constituir fonte de variabilidade no programa de melhoramento genético da mamoneira.

**PALAVRAS-CHAVE:** divergência genética; coleção de germoplasma; melhoramento da mamoneira;

### GENETIC VARIABILITY AMONG CASTOR BEAN SPONTANEOUS ACCESSES COLLECTED IN DIFFERENT BRAZILIAN REGIONS

**ABSTRACT:** The castor bean (*Ricinus communis* L.) is an oleaginous of the Euphorbiaceae family that is found in several regions of the world due to its easy propagation and adaptation. The study of the genetic variability is primordial for the breeding aiming to obtain new cultivars and hybrids of castor

bean. The objective of this work was to evaluate, through morphological variables, the genetic variability in castor bean accessions collected in different regions of Brazil. The castor bean accessions collection was obtained in the states of São Paulo, Minas Gerais and Rio Grande do Norte and characterized by morphological descriptors in the Department of Production and Breeding of the Faculty of Agronomic Sciences (FCA) in Botucatu - SP. The data obtained in the evaluations were submitted to similarity analysis by Minitab 17 software. BTC5 is the most divergent genotype and becomes promising to constitute a variability source in the castor bean breeding program.

**KEYWORDS:** genetic divergence; collection of germplasm; castor bean breeding;

## 1 | INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.), única espécie descrita para o gênero *Ricinus*, é uma oleaginosa da família das Euforbiáceas que se destaca por possuir alto valor comercial, mesmo que em suas sementes estejam presentes toxinas que as tornam não comestíveis para humanos e animais. As principais peculiaridades do óleo de mamona exploradas pela indústria são a sua solubilidade em álcool e o excelente desempenho em condições extremas de temperatura e pressão devido a sua alta viscosidade (OGUNNIYI, 2006).

Apesar de não haver um consenso sobre o centro de origem da espécie, o maior número de evidências sugere que seja a região da Etiópia, no continente africano (SCHMIDT et al., 2008). Devido à facilidade na propagação, a cultura foi se espalhando por quase todos os países do mundo, concentrando-se principalmente em regiões de clima tropical e subtropical. No Brasil, foi introduzida pelos portugueses com o objetivo de se tornar fonte do combustível para lampiões utilizados na iluminação das cidades e de óleo lubrificante para uso em eixos de carroças. Sua adaptação imediata ao clima tropical brasileiro favoreceu sua dispersão em todo o território nacional, sendo encontrada tanto em sua forma espontânea como em cultivos comerciais (SAVY FILHO, 2005; SANTOS et al., 2007).

A inserção da cultura da mamoneira em regiões com configuração de cultivo e características edafoclimáticas distintas, exige o desenvolvimento de materiais genéticos com padrões morfológicos específicos para cada realidade. Para tanto, os programas de melhoramento genético utilizam como recurso a variabilidade genética existente, encontrada de forma mais expressiva em germoplasma nativo ou espontâneo, e quando esta variabilidade é limitante, gera-se variabilidade por meio de recombinação, que permite incorporar várias características agrônômicas desejáveis ao genótipo (SINGH et al., 2015). Este processo de geração de variabilidade por hibridação é facilitado pelo sistema reprodutivo misto da espécie (BELTRÃO & AZEVEDO, 2007).

Após a inserção dos acessos em um banco de germoplasma, utilizado para promover a conservação dos recursos genéticos ou como fonte de variabilidade para o

desenvolvimento de novos cultivares em programas de melhoramento, a caracterização morfológica é obrigatória e auxilia na avaliação da variabilidade genética, identificação e diferenciação entre os acessos. Essa caracterização se trata da descrição de caracteres morfológicos quantitativos e qualitativos diferenciáveis visualmente e altamente herdáveis, geralmente controlados por um número reduzido de genes (BURLE & OLIVEIRA, 2010). A caracterização dos genótipos e sua variabilidade são o ponto de partida para a definição do ideótipo e na elaboração de estratégias de um programa de melhoramento para qualquer espécie (VIEIRA et al. 2013).

O objetivo do trabalho foi realizar a avaliação da variabilidade genética entre os acessos de mamoneira coletados em diferentes regiões brasileiras por meio de descritores morfológicos quantitativos e qualitativos, para facilitar a identificação, reconhecer traços de interesse disponíveis para composição do ideótipo e posteriormente elaborar estratégias de melhoramento.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Cinquenta acessos de mamoneira provenientes de coletas realizadas nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Norte (Brasil) foram utilizados neste estudo.

O experimento foi instalado em túnel plástico no Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – FCA/UNESP em Botucatu – SP (22°50'59.0"S e 48°25'55.6»W e altitude de 786 m).

O solo da área é classificado como Latossolo Vermelho distrófico (EMBRAPA, 2006). A semeadura foi realizada em abril de 2016, diretamente no solo, com adubação de base utilizando-se o produto formulado 8-20-20 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O), aplicando-se cerca de 200 kg.ha<sup>-1</sup>. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições.

O espaçamento adotado foi de 0,5 m entre plantas e 1,0 m entre linhas. Durante todo o ciclo produtivo, o ensaio foi irrigado por gotejamento, de acordo com as necessidades hídricas da cultura.

Foram utilizados descritores propostos por Brasil (2008), para a caracterização morfológica da mamoneira. Os descritores quantitativos estudados foram: altura da planta (ALT); inserção do racemo primário no caule (IR); diâmetro do caule (ØC); número de entrenós (N°E); número de racemos comerciais (N°R) e comprimento do racemo primário (CR).

Foram considerados os descritores qualitativos: cerosidade do caule (CC); coloração do caule (CoC); formato da face superior do limbo (FL); pigmentação das nervuras (PN); cerosidade da face superior do limbo (CL); flores masculinas no racemo (FM); densidade do racemo (DR); forma do racemo (FoR); coloração do estigma antes da polinização (CoE); cerosidade do fruto (CF); coloração do fruto (CoF); presença de

acúleos (PA); densidade dos acúleos (DA); coloração dos acúleos (CoA) e deiscência do fruto (DeF); coloração de sementes (CoS); forma de sementes (FS) e protuberância de carúncula (Prot).

Todos os descritores morfológicos foram avaliados conforme orientações e nos períodos recomendados pelas diretrizes dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade, e estabilidade da mamoneira (BRASIL, 2008).

Foram atribuídos códigos para os dados quantitativos e qualitativos, de acordo com Brasil (2008) e em seguida os dados da caracterização morfológica foram submetidos à análise multivariada de agrupamento hierárquico através do software Minitab 17 utilizando a distância euclidiana quadrada pelo método do vizinho mais próximo e distância euclidiana para o agrupamento das características quantitativas e qualitativas.

A constatação da variabilidade genética existente entre os acessos foi analisada pela similaridade entre os genótipos e determinada com base na análise de agrupamento pelo mesmo método.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os acessos apresentaram variação de altura (Figura 1) de 66,00 a 248,70 cm, corroborando com os resultados de Rodrigues et al. (2010), que ao avaliarem a diversidade genética entre 15 acessos de mamona por meio de caracteres agromorfológicos, observaram uma variação de altura de caule de 63,00 a 141,10 cm.

As menores altura de inserção de racemo (IR) (Figura 2) foram obtidos por BTC4 (53,00 cm), CJ1 (56,33 cm), PRAT1 (54,33 cm), SJC1 (41,00 cm) e os maiores por BTC5 (181,33) e BTC6 (170,66).

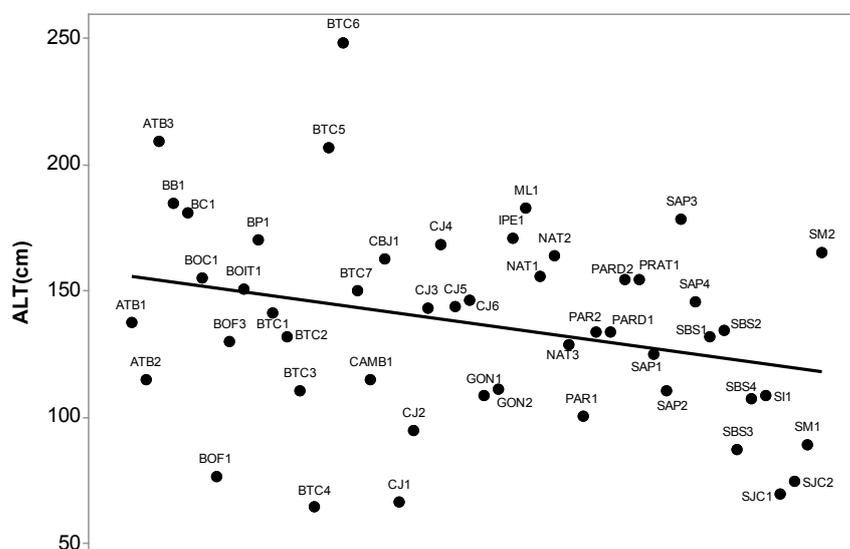


Figura 1. Altura de plantas (ALT), em centímetros, dos 50 acessos de mamoneira coletados em diferentes regiões brasileiras.



O número de entrenós (Figura 4) está intimamente ligado com a estatura da planta, de maneira geral, quanto menor o valor de N<sup>o</sup>E, menor o valor de ALT. Exatamente a metade dos acessos testados apresentaram baixo N<sup>o</sup>E, sendo observados os menores valores para ATB1 e SJC1 (respectivamente, 11,66 e 12,33).

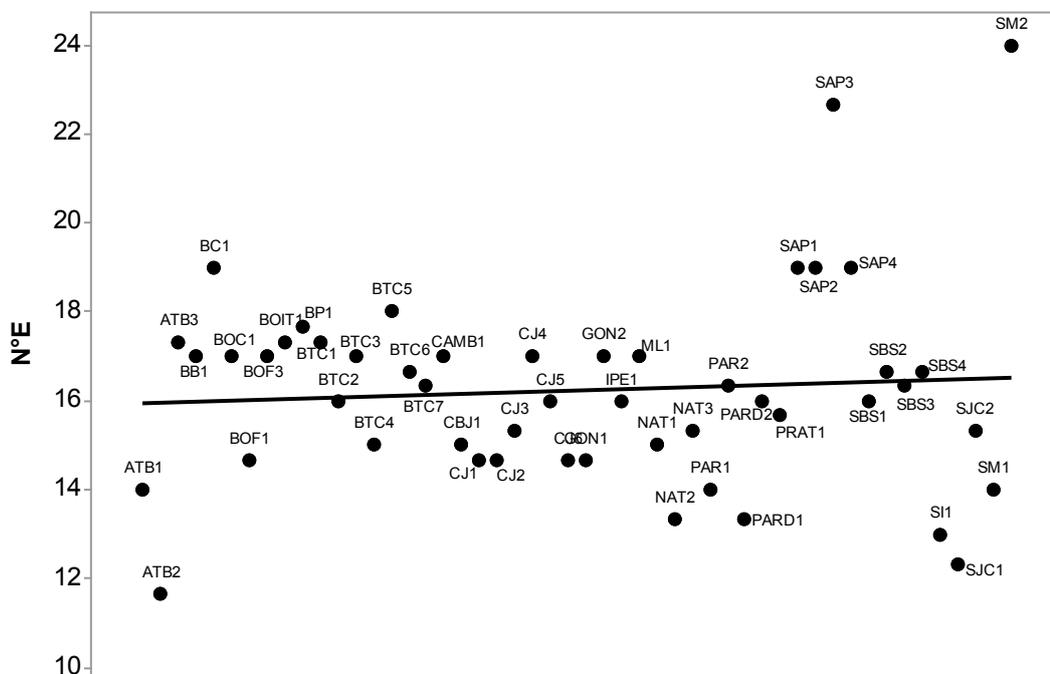


Figura 4. Número de entrenós (N<sup>o</sup>E) de 50 acessos de mamoneira coletados em diferentes regiões brasileiras.

O número de racemos (Figura 5) é importante para contribuir para a produtividade da cultura. Apresentaram um alto N<sup>o</sup>R (NÓBREGA et al. 2001), os acessos BC1 (10,33), BTC5 (9,67), ATB3 (7,66), BTC3 (8,33), BTC6 e NAT3 (ambos, 8,66).

O comprimento do racemo (Figura 6) tem implicação direta sobre o número de frutos da mamoneira (Nobre et al. 2012), influenciando na produtividade da cultura. O maior valor de CR foi obtido por BTC6 (56,56 cm), considerado como um acesso de racemo longo.

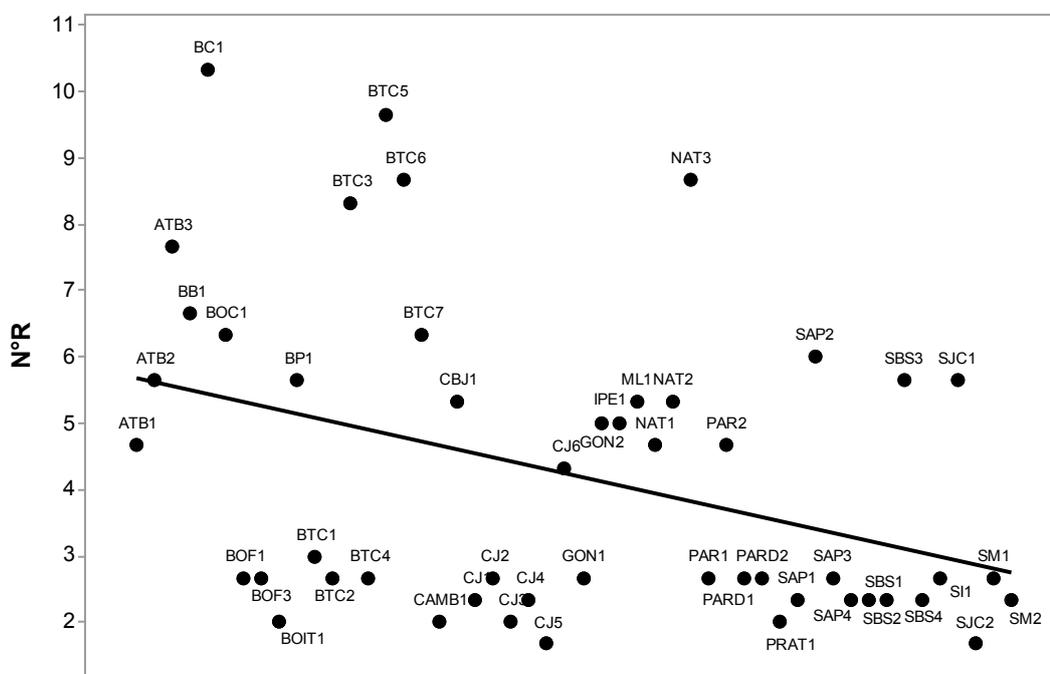


Figura 5. Número de ráceros (N°R) de 50 acessos de mamoneira coletados em diferentes regiões brasileiras.

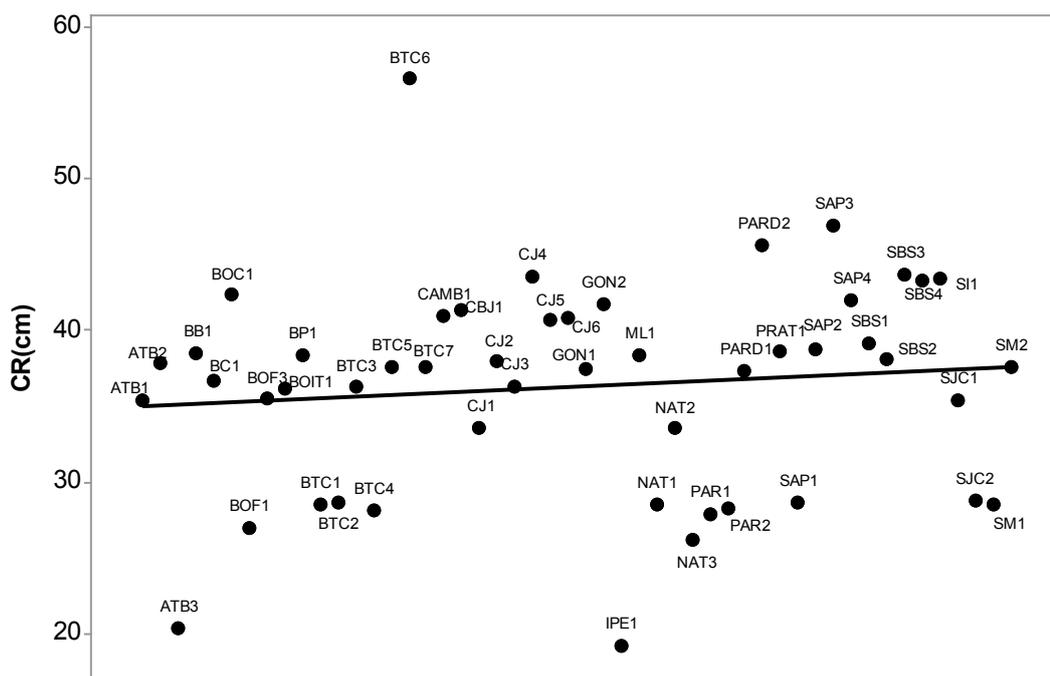


Figura 6. Comprimento de ráceros (CR) em centímetros de 50 acessos de mamoneira coletados em diferentes regiões brasileiras.

A Figura 7 traz a similaridade entre as características quantitativas e qualitativas analisadas nos acessos de mamoneira. Para as variáveis quantitativas, podemos observar a formação alguns grupos, sendo que ALT e IR possuem 78,6% de similaridade entre as respostas, enquanto as características N°R, ØC e N°E são 68,9% similares entre elas; isoladamente se encontra o CR que apresenta apenas 55,8% de

semelhança com as demais características avaliadas.

Já as características qualitativas foram categorizadas em seis grupos de resposta, sendo o grupo mais similar (60,2%) composto por 10 características. A característica deiscência de frutos (DeF) apresenta apenas 56% de similaridade para as demais. De maneira geral, todas as variáveis qualitativas possuem uma alta ligação entre elas.

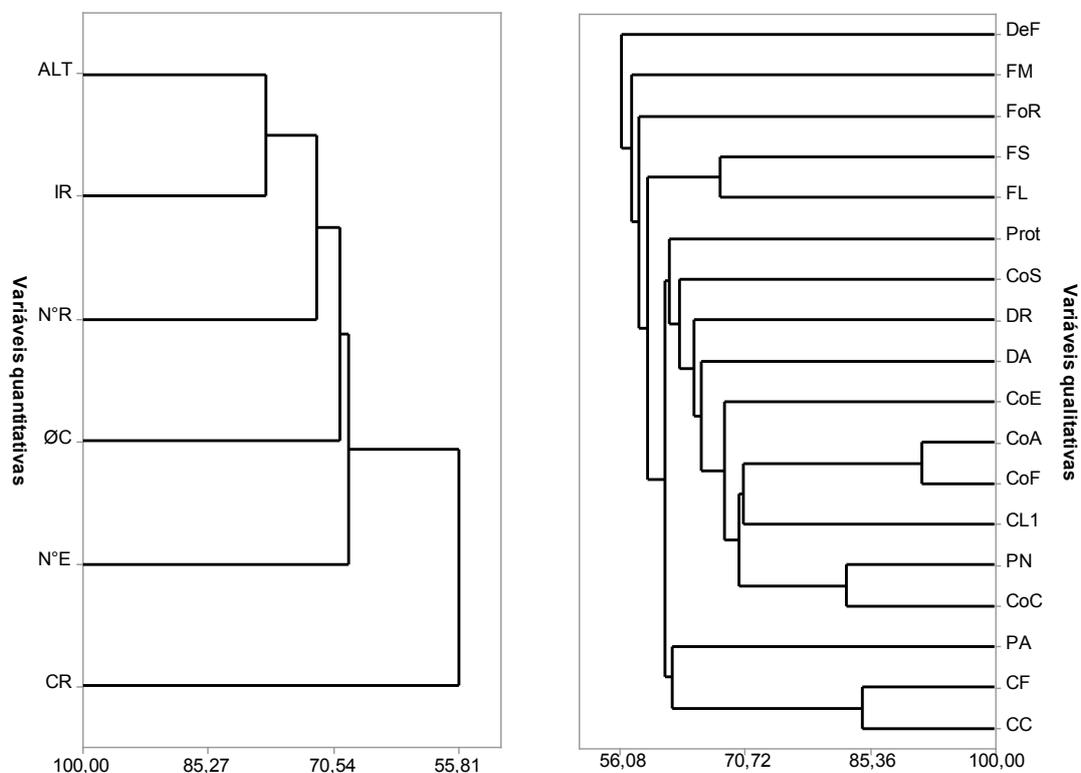


Figura 7. Similaridade entre as características quantitativas e qualitativas de 50 acessos de mamoneira coletados em diferentes regiões brasileiras.

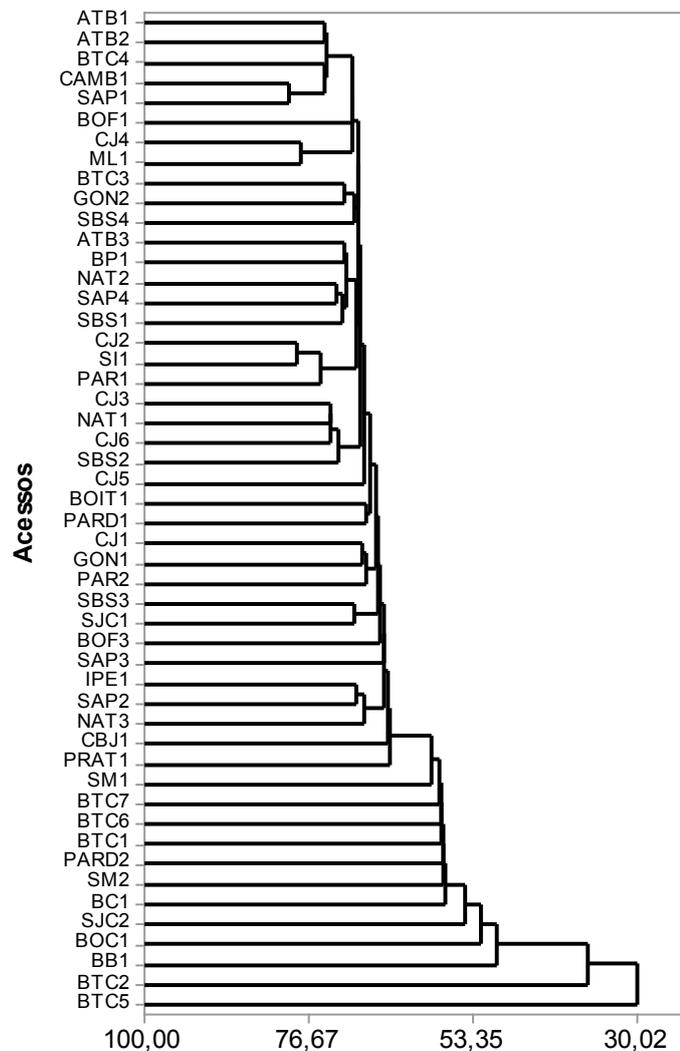


Figura 8. Similaridade para as características quantitativas e qualitativas entre 50 acessos de mamoneira coletados em diferentes regiões brasileiras.

A variabilidade genética constatada entre os acessos para todos os caracteres morfológicos (Figura 8) foi facilmente visualizada nas plantas utilizadas neste trabalho. Entre todos os acessos testados, CAMB1 e SAP1 são os genótipos com as características morfológicas mais semelhantes (79,6% de similaridade), enquanto o acesso BTC5 se mostrou o mais discrepante entre todos os analisados (apenas 30,2% de similaridade para os demais).

A utilização de genótipos com alta divergência genética é recomendada para que se mantenha a ocorrência de indivíduos segregantes superiores no melhoramento (MELÃO et al. 2015), sendo assim, quanto menos similares são os acessos, maior a probabilidade de que em cruzamentos seja obtida alta variabilidade.

Cruz et al. (2011) recomenda o cruzamento entre genótipos divergentes e aqueles com características agrônômicas desejáveis, portanto, acessos discrepantes são de grande interesse para os programas de melhoramento genético da mamoneira.

## 4 | CONCLUSÕES

Foi constatada a existência de grande variabilidade genética entre os acessos coletados em diferentes regiões brasileiras, sendo o BTC5 o genótipo mais divergente.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.)**. Brasília – DF, 2008, 10p. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/protexao-de-cultivar/agricolas>> Acesso em: 31 ago. 2017.

BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P.; Fisiologia. *In*: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. **O agronegócio da mamona no Brasil**. 2. ed. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2007. p. 139-150.

BURLE, M. L.; OLIVEIRA, M. S. P.; **Manual de curadores de germoplasma – vegetal: Caracterização morfológica**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2010. 15 p

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 620p.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: Embrapa-SPI; Rio de Janeiro: Embrapa-Solos, 2006. 306 p.

FERREIRA, M. G. C.; MARUYAMA, W. I.; SORATTO, R. P. Avaliação de cultivares de mamona em dois arranjos de plantas no outono-inverno em Cassilândia-MS. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.13, p.53-60, 2009.

LOPES, F. F. de M.; BELTRÃO, N. E. de M.; LOPES NETO, J. P.; PEDROZA, J. P. Crescimento inicial de genótipos de mamoneira com sementes submetidas ao envelhecimento acelerado. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.12, p.69-79, 2008.

MELÃO, A. V.; PEREIRA, M. G.; KRAUSE, W.; GONÇALVES, L. S. A.; MOREIRA, W. G.; Caracterização agrônômica e divergência genética entre acessos de abacaxizeiro nas condições do estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 4, p. 952-960, 2015.

NOBRE, R. G.; Lima, G. S.; GHEYI, H. R.; MEDEIROS, E. P.; SOARES L. A. A.; ALVES, A. N.; Teor de óleo e produtividade da mamoneira de acordo com a adubação nitrogenada e irrigação com água salina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.7, p. 991-999, 2012.

NÓBREGA, M. B. de M.; ANDRADE, F. P.; SANTOS, J. W.; LEITE, E. J. Germoplasma. *In*: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.257-280.

OGUNNIYI, D. S. **Castor oil: a vital industrial raw material**. *Bioresource technology*, v. 97, n. 9, p. 1086-1091, 2006.

RODRIGUES, H. C. A.; CARVALHO, S. P.; CARVALHO, A. A.; CARVALHO FILHO, J. S.; CUSTÓDIO, T. N.; Avaliação de diversidade genética entre acessos de mamoneira (*Ricinus communis* L.) por meio de caracteres morfoagronômicos. **Revista Ceres**, v.57, n.6, p. 773-777, 2010.

SANTOS, R. F.; KOURI, J.; BARROS, M. A. L.; MARQUES, F. M.; FIRMINO, P. T.; REQUIÃO, L. E. G. Aspectos econômicos do agronegócio da mamona. *In*: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. **O**

**agronegócio da mamona no Brasil.** 2. ed. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2007. p. 21-42.

SAVY FILHO, A. Melhoramento da mamona. *In*: BORÉM, Aluísio. **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa, 2005 p. 429-452.

SCHMIDT, D.A.M.; MAIA, L.C. & SILVA, J.A.G. Mamona. *In*: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e evolução de plantas cultivadas.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008.

SINGH, A. S.; KUMARIB, S.; MODIC, A. R.; GAJERAC, B. B.; NARAYANANC, S.; KUMARD, N. Role of conventional and biotechnological approaches in genetic improvement of castor (*Ricinus communis* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 55-62, 2015.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; FONSECA, K. G.; SILVA, M. S.; PAULA-MORAES, S. V.; CARVALHO, L. J. C. B. Caracterização fenotípica e molecular de acessos de mandioca de indústria com potencial de adaptação às condições do Cerrado do Brasil Central. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.2, p.567-582, 2013.

## **SOBRE O ORGANIZADOR**

**BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO** Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia. Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática. Também possui seu segundo Pós doutoramento pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com Análise Global da Genômica Funcional e aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany. Palestrante internacional nas áreas de inovações em saúde com experiência nas áreas de Microbiologia, Micologia Médica, Biotecnologia aplicada a Genômica, Engenharia Genética e Proteômica, Bioinformática Funcional, Biologia Molecular, Genética de microrganismos. É Sócio fundador da “Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde” (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente no centro-oeste do país. Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Como pesquisador, ligado ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG), o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Ácido fólico 148  
Análise de diversidade genética de Nei 205  
Análise Multivariada 93

### B

Bahia 24, 53, 54, 57, 60, 63, 64, 151, 188  
Banco de DNA 5, 54, 57, 63  
Bioaromas 38, 39  
Bioinformática 118, 244

### C

Camapu 47, 48, 59  
Capsicum sp. 93, 94, 95, 103  
Capsicum spp. 7, 8, 76, 77, 78, 81, 82, 93, 94, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104  
Caracterização morfoagronômica 47  
Coeficientes de endogamia 5, 205  
COI 140, 141, 144, 147, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165  
Componentes principais 201  
Conservação de RGV 167  
Crassostrea 9, 155, 156, 158, 160, 162, 163, 164, 165, 166  
Cultivares 5, 7, 86, 114, 196  
Cultivo urbano 167

### D

Dissimilaridade 104, 116  
Divergência 23, 104, 113, 115, 143, 162, 192, 193  
DNA Mitoconrial 155  
Dof (DNA-binding with One Zinc Finger) 118

### E

Epidemiologia 148  
Espécies Negligenciadas e Subutilizadas 54  
Espinha bífida 148, 149, 151  
Estabilidade genética 10  
Estudos genéticos 66  
Expressão de genes 118

## F

Fenofase reprodutiva 130  
Flamboyant 174, 175  
Fluxo gênico 205, 214, 216  
Fragmentação florestal 205

## G

Germinação in vitro 174, 177, 178  
Germoplasma 5, 1, 3, 11, 13, 15, 16, 61, 62, 64, 93, 106, 108, 113, 114, 116, 117, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 192, 242  
Gower 106, 107, 110, 117

## H

Herbário 53, 54, 57, 61, 132  
Hortaliças 61, 62, 64, 65, 167, 172

## I

Identificação Molecular 38, 40

## L

Leveduras não-Saccharomyces 38

## M

Malus spp. 107, 115  
Maranhão 9, 75, 76, 78, 80, 82, 93, 94, 95, 103, 131, 138, 140, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 155, 156, 157, 158, 160, 162, 164, 165, 167, 168, 169, 170  
Melhoramento genético 76  
Metabólitos secundários 66  
Microrganismos Patogênicos 25

## P

PANC 53, 54, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 63, 64  
Plantas medicinais 51, 182  
Precipitação 71, 72

## Q

Qualidade de sementes 5

## R

Receptividade estigmática 174

*Ricinus communis* L. 84, 85, 92, 126, 194, 195, 233, 234, 242, 243

Rubiaceae 13, 14, 16, 23, 59, 61

## S

Sanidade Animal 25

Sapo-cururu 138

SDS 66, 67, 68, 69, 72

Segurança Alimentar 25, 173

Seleção direta 76

Simulações em Easypop 205

Sistemática 138

## T

*Triticum aestivum* 1, 2, 11

Triton X-100 66, 67, 68, 69, 72

## U

Uva 115, 185, 186

## V

Variabilidade 47, 74, 104, 114, 192

Viabilidade Polínica 174

Videira 187, 188, 189

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-486-3



9 788572 474863