

Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento II



Organizadores

Fábio Demolinari de Miranda
Marcia Flores da Silva Ferreira
Paulo Cezar Cavatte
Taís Cristina Bastos Soares



Organizadores

Fábio Demolinari de Miranda

Marcia Flores da Silva Ferreira

Paulo Cezar Cavatte

Taís Cristina Bastos Soares

**Tópicos Especiais em
Genética e Melhoramento II**

Alegre, ES

CAUFES

2018

CCAUE-UFES
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias
Universidade Federal do Espírito Santo
Alto Universitário, s/n, Guararema, Alegre-ES
Telefone: (28) 3552-8955 – Fax (28) 3552-8903
<http://www.alegre.ufes.br/>

ISBN: 978-85-54343-09-5
Editora: CAUFES
Setembro 2018

Diagramação:
Wagner Nunes Rodrigues

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

T673 Tópicos especiais em genética e melhoramento II [recurso eletrônico] /
organizadores, Fábio Demolinari de Miranda ... [et al.]. - Dados eletrônicos.
- Alegre, ES : CCA-UFES, 2018. 310 p. : il.

ISBN: 978-85-54343-09-5

Modo de acesso: <www.geneticaemmelhoramento.ufes.br>

1. Biotecnologia. 2. Evolução (Biologia). 3. Citogenética. 4. Biologia molecular. 5. Variabilidade genética. 6. Melhoramento genético. I. Miranda, Fábio Demolinari de, 1978-.

CDU: 631.523

Bibliotecária: Lizzie de Almeida Chaves – CRB-6 ES-000871/O

Os textos apresentados nessa edição são de inteira responsabilidade dos autores. Os organizadores não se responsabilizam pela revisão ortográfica e gramatical dos trabalhos apresentados. Não é permitida a reprodução total ou parcial desta publicação sem a autorização expressa dos organizadores.

PREFÁCIO

O livro “Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento II” é a continuidade de um projeto iniciado em 2013, o qual vem sendo orientado pelos docentes do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFES (PPGGM/UFES - Alegre), e engajado com temas atuais relacionados à Genética e ao Melhoramento de Plantas. O comprometimento e a interação de todos os atores da obra corroboram com o papel do PPGGM em divulgar conhecimentos que contextualizam as diferentes áreas da Genética e do Melhoramento. Os temas percorridos nos capítulos também afluíram da curiosidade, dos desafios reportados nas bibliografias, dos obstáculos experimentais vivenciados na rotina da pesquisa, e das perspectivas em desenvolver novas linhas de estudos.

A edição 2018 de “Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento” contempla quatorze capítulos com temas interdisciplinares, básicos e aplicados, e de caráter atual, tais como: sequenciamento de nova geração, epigenética, mutagênese, filogeografia molecular, resistência a estresse biótico, melhoramento de espécies agrônômicas e florestais, dentre outros. Esta segunda edição proporciona o contato dos leitores com culturas de reconhecida relevância para o agronegócio brasileiro, indo além por também revelar outras espécies com grande potencial.

Assim, o livro oportuniza páginas repletas de inovações e dados diferenciais que proporcionam conhecimentos e reflexões, e que permitem encantar pela Genética e pelo Melhoramento. Ademais, em cada um dos capítulos, os autores buscaram diferentes bibliografias, como também se inspiraram nas suas rotinas de pesquisa e de ensino, assegurando revisões contextualizadas e, assim, permitindo ao leitor compreender as circunstâncias que permeiam cada tema. A intimidade e a profundidade dos capítulos com os fundamentos da Genética e do Melhoramento fazem do livro um instrumento útil, também, para disciplinas da graduação e pós-graduação, demonstrando o papel do PPGGM e dos seus parceiros com a formação de recursos humanos.

Por meio do livro “Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento II” é possível verificar que os autores conviveram, aprenderam, amadureceram e fortaleceram laços entre si e com diferentes parceiros e instituições. Todo este contexto resulta na construção de novas pontes e mostra que a educação é a base da cidadania, da ciência, da tecnologia e da inovação.

Com a satisfação de prefaciar este livro, um convite para conhecer o PPGGM, desejo que todos tenham uma ótima leitura.

Wellington Ronildo Clarindo

LISTA DE AUTORES

Adelson Lemes da Silva Júnior. Biólogo. Doutorando em Genética e Melhoramento. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: adelsonlemes@yahoo.com.br

Adésio Ferreira. Engenheiro Agrônomo. Doutor em Genética e Melhoramento. Professor Associado II. Departamento de Produção Vegetal. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: adesioferreira@gmail.com. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq – Nível 2.

Aléxia Gonçalves Pereira. Bacharel em Ciências Biológicas. Mestranda em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: alexiagp@gmail.com.

Ana Beatriz Rocha de Jesus Passos. Licenciada e Bacharel em Química. Doutora em Agroquímica com ênfase em Química Analítica. Pós-doutoranda do Programa de Genética e Melhoramento. Departamento de Agronomia. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: anabiapassos@yahoo.com.br.

Beatriz Murizini Carvalho. Engenheira Agrônoma. Mestre em Produção Vegetal/Fitossanidade. Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro E-mail: b.murizini@yahoo.com.

Camila Miranda Lopes-Ramos. Bióloga. Doutora em Ciências, Fundação Antônio Prudente, AC Camargo Cancer Center. Pós-doutoranda no Dana-Faber Cancer Institute, Harvard TH Chan School of Public Health. E-mail: lopesramos.ca@gmail.com.

Carla Cristina Gonçalves Rosado. Engenheira Florestal. Doutora em Genética e Melhoramento. Pós-doutoranda da Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: carlagrosado@yahoo.com.br.

Carlos Eduardo de Oliveira Roberto. Engenheiro Agrônomo. Mestrando em Produção Vegetal. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: duh_kadu@hotmail.com.

Cíntia Machado de Oliveira Moulin Carias. Agrônoma. Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas. Pós doutoranda. Departamento de Produção Vegetal. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: ciintia@yahoo.com.br.

Cyntia Meiry da Silva Machado. Engenheira Agrônoma. Mestre em Genética e Melhoramento. Doutoranda. Programa de Pós-Graduação e Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: cyntiameiry@gmail.com.

Drielli Canal. Bióloga. Mestranda em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: drielliufes@gmail.com. Bolsista de Produtividade em Pesquisa.

Fábio Demolinari de Miranda. Biólogo. Doutor em Genética e Melhoramento. Professor Associado I. Departamento de Biologia. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: fademolinari@yahoo.com.br.

Fabio Luiz Partelli. Engenheiro Agrônomo. Doutor em Produção Vegetal. Professor Associado. Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: partelli@yahoo.com.br. Bolsista Produtividade do CNPq.

Franciele Barros Souza Sobreira. Bióloga. Doutora em Genética e Melhoramento. Pós-doutoranda da Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: francielesouzza@gmail.com.

Francisco Davi da Silva. Engenheiro agrônomo. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: daviagro@alu.ufc.br.

Isane Vera Karsburg. Bióloga, Dra. Professora Adjunta Universidade do Estado de Mato Grosso – Alta Floresta MT. E-mail: isane9@gmail.com.

Ivoney Gontijo. Engenheiro Agrônomo. Doutor em Solos e Nutrição de Plantas. Professor Associado. Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: ivoneygontijo@yahoo.com.br.

Jaqueline Aparecida Gonçalves Soares. Bióloga. Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas. Universidade do Estado de Mato Grosso. E-mail: jacque_s.goncalves@hotmail.com.

Karla Daniele Araújo da Silva. Bióloga. Mestranda em Genética e Melhoramento. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: karlaaraujo690@gmail.com.

Leonardo Humberto Silva e Castro. Engenheiro Agrônomo. Mestre em Agronomia (Fitotecnia). Doutorando. Programa de Pós-Graduação e Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: leonardohumbertoagro@hotmail.com.

Liana Hilda Golin Mengarda. Doutora em Produção Vegetal. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: limengarda@gmail.com.

Liliana Aparecida Ribeiro Martins. Bióloga. Mestre em Produção Vegetal. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: liliana_arm15@hotmail.com.

Lindomar de Souza Machado. Engenheiro Agrônomo. Mestre em Produção Vegetal (Fitotecnia). Doutorando. Programa de Pós-Graduação e Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: lindomarsm@gmail.com.

Luara Lopes Sousa. Bióloga. Mestranda em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: luara-lopes@hotmail.com.

Lucimara Cruz de Souza. Bióloga. Mestre em Genética e Melhoramento. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: lucimaracruz@yahoo.com.

Luziane Brandão Alves. Licenciada em Ciências Biológicas. Mestranda em Genética e Melhoramento. Departamento de Agronomia. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: luzianealves@hotmail.com.

Marcelo Curitiba Espíndula. Engenheiro Agrônomo. Doutor em Fitotecnia. Pesquisador. Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. E-mail: marcelo.espindula@embrapa.br.

Marcia Flores da Silva Ferreira. Bióloga. Doutora em Genética e Melhoramento. Professora Associada I. Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: mffloressf@gmail.com, Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

Marcos Vinicius Winckler Caldeira. Engenheiro Florestal. Doutor em Ciências Florestais. Professor Associado I. Departamento de Ciências Florestais e da Madeira. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: mvwcaldeira@gmail.com. Bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq – Nível 2.

Marina Santos Carvalho. Licenciada em Ciências Biológicas. Doutoranda em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: marinasantosufes@gmail.com.

Micheli Sossai Spadeto. Bióloga licenciada. Mestre em Produção Vegetal. Doutoranda em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: michelisossai@hotmail.com.

Milene Miranda Praça-Fontes. Bióloga Bacharel e Licenciada. Doutora em Genética e Melhoramento. Professora Adjunta IV. Departamento de Biologia. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: milenemiranda@yahoo.com.br

Nayara Magagnin Borges. Bióloga. Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas. Universidade do Estado de Mato Grosso. E-mail: nayaramb_26@hotmail.com.

Otávio José Bernardes Brustolini. Biólogo. Doutor em Bioquímica Agrícola. Pós-doutorando na Universidade Federal de Viçosa. E-mail: tavinbio@yahoo.com.br.

Paola de Avelar Carpinetti-Oliveira. Bioquímica. Doutora em Ciência com ênfase em Bioquímica na Universidade de São Paulo. Pós-doutoranda na Universidade Federal de Viçosa. E-mail: paolacarpinetti@gmail.com.

Patrícia Moreira Valente. Mestranda em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: valente.moreira.patricia@gmail.com

Paulo Cezar Cavatte. Engenheiro Agrônomo. Doutor em Fisiologia Vegetal. Professor Adjunto I. Departamento de Ciências Biológicas. Centro de Ciências Exatas, Natureza e da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: cavattepc@hotmail.com

Pedro Henrique Dias dos Santos. Engenheiro Agrônomo. Doutor em Produção Vegetal/Fitossanidade. Laboratório de Entomologia e Fitopatologia. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro E-mail: pedroh_dias@hotmail.com.

Ramon Azevedo Braz. Bacharel em Ciências Biológicas. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: ramon_gdr@hotmail.com.

Taís Cristina Bastos Soares. Farmacêutica Bioquímica. Doutora em Bioquímica Agrícola. Professora Associado II. Departamento de Farmácia e Nutrição. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: tcbsoares@yahoo.com.br. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq – Nível 2.

Talles Eduardo Ferreira Maciel. Bioquímico. Mestre e Doutor em Bioquímica Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa. E-mail: tallesmaciel@gmail.com.

Thammyres de Assis Alves. Bióloga licenciada. Doutoranda em Genética e Melhoramento. Professora Voluntária de Biologia Celular. Departamento de Biologia. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: thammyresalves@gmail.com.

SUMÁRIO

- 1. Atividade biológica de óleos essenciais e extratos de *Psidium* 14**
Micheli Sossai Spadeto, Patrícia Moreira Valente, Thammyres de Assis
Alves & Milene Miranda Praça-Fontes
- 2. Estudos epigenéticos sobre metilação do DNA vegetal por CLAE 33**
Luziane Brandão Alves & Ana Beatriz Rocha de Jesus Passos
- 3. Filogeografia molecular e o melhoramento genético de plantas 53**
Pedro Henrique Dias dos Santos & Beatriz Murizini Carvalho
- 4. Fisionômica e a resistência de plantas a estresse bióticos 64**
Paulo Cezar Cavatte, Leonardo Humberto Silva e Castro & Lindomar de
Souza Machado
- 5. Fruto de *Euterpe edulis* e *Euterpe oleracea*: usos alimentícios,
medicinais e cosméticos..... 90**
Aléxia Gonçalves Pereira, Liana Hilda Golin Mengarda, Marina Santos
Carvalho, Ramon Azevedo Braz & Adésio Ferreira
- 6. Genes candidatos e mecanismos fisiológicos relacionados ao
estresse hídrico em plantas 115**
Carla Cristina Gonçalves Rosado, Franciele Barros Souza Sobreira,
Francisco Davi da Silva, Lucimara Cruz de Souza & Taís Cristina Bastos
Soares
- 7. Marcadores moleculares baseados em sequenciamento de nova
geração..... 144**
Luara Lopes Sousa, Marcia Flores da Silva Ferreira & Talles Eduardo
Ferreira Maciel

-
- 8. Mecanismos de ação de agroquímicos no ciclo celular 174**
Thammyres de Assis Alves, Carlos Eduardo de Oliveira Roberto, Micheli Sossai Spadeto & Milene Miranda Praça-Fontes
- 9. Melhoramento genético participativo..... 193**
Carla Cristina Gonçalves Rosado, Liliana Aparecida Ribeiro Martins, Lucimara Cruz de Souza & Taís Cristina Bastos Soares
- 10. Melhoramento visando qualidade nutricional do feijão comum 210**
Cíntia Machado de Oliveira Moulin Carias & Adésio Ferreira
- 11. O gênero *Mormodes* (Orchidaceae)..... 234**
Jaqueline Aparecida Gonçalves Soares, Nayara Magagnin Borges & Isane Vera Karsburg
- 12. Perspectivas de melhoramento genético de *Coffea* spp. voltado a ampliação da eficiência nutricional 251**
Cynthia Meiry da Silva Machado, Lindomar de Souza Machado, Fabio Luiz Partelli, Marcelo Curitiba Espíndula & Ivoney Gontijo
- 13. RNA-SEQ: principais conceitos e cuidados 274**
Drielli Canal, Paola de Avelar Carpinetti-Oliveira, Camila Miranda Lopes-Ramos, Otávio José Bernardes Brustolini & Marcia Flores da Silva Ferreira
- 14. Seleção de árvores matrizes nativas vs variabilidade genética 298**
Marcos Vinicius Winckler Caldeira, Adelson Lemes da Silva Júnior, Karla Daniele Araújo da Silva & Fábio Demolinari de Miranda

Capítulo 01

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS DE *Psidium*

Micheli Sossai Spadeto

Patrícia Moreira Valente

Thammyres de Assis Alves

Milene Miranda Praça-Fontes

1. INTRODUÇÃO

As plantas são reservatórios de compostos com diversas funções, dentre elas o tratamento de doenças (AKINBORO & BAKARE, 2007). Estudos mostram que muitas substâncias encontradas nas plantas são agentes antioxidantes, hipoglicêmicos e anticancerígenos (ABDEL-HAMEED et al., 2014; TLILI et al., 2014). Além disso, as substâncias químicas liberadas por uma planta podem apresentar potencial alelopático afetando o crescimento e o desenvolvimento de outras plantas que crescem nas imediações (RICE, 1984).

Dentre as diversas espécies vegetais em estudo, as do gênero *Psidium* (*Psidium* spp.) são de amplo interesse por apresentarem propriedades farmacológicas, sendo utilizadas como anti-inflamatórios, antimicrobianos, analgésicos e antialérgicos. O gênero *Psidium* apresenta aproximadamente 100 espécies (GOVAERTS et al. 2016) e sua distribuição nativa é Neotropical, ocorrendo do sul do México até a Argentina, incluindo as Ilhas do Caribe e dois arquipélagos no Pacífico (FRAZON et al. 2009). O Brasil é o centro de diversidade mais importante do gênero, apresentando aproximadamente 60 espécies de *Psidium* (SOBRAL et al., 2016), com espécies distribuídas desde o Amazonas até Rio Grande do Sul (LANDRUM, 2003).

A goiaba (*P. guajava*) produz frutos com elevado valor nutritivo e desde 1986 foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS) o que confirma sua potencialidade como planta medicinal devido à sua comprovação fitoterápica (AMARAL et al., 2006;

MINISTERIO DA SAÚDE, 2009). Considerada um eficiente agente terapêutico. *P. guajava* apresenta em sua composição mono e sesquiterpenos, além de flavonoides, álcoois sesquiterpenoides, ácidos triterpenoides e taninos (IHA et al., 2008). Suas folhas podem ser utilizadas de maneira mais comum na forma de extratos, infusões ou ainda o óleo essencial, que apresentam ação bactericida, antimicrobiana (VUUREN et al., 2015), antimutagênica e anticarcinogênica (TEIXEIRA et al., 2003). Além de *P. guajava*, outras espécies do gênero *Psidium* vem sendo estudadas por apresentarem potencial biológico e ação de interesse medicinal.

Nesse sentido, se destaca também *P. cattleianum* Sabine (araçá-doce, araçá-de-praia ou araçá-de-coroa), nativa do Rio Grande do Sul e que apresenta grande potencial para exploração econômica (LORENZI, 2014). Além do consumo dos frutos in natura, a espécie vem sendo utilizada com fins medicinais já que suas folhas apresentaram atividade antiproliferativa em células cancerígenas (MEDINA et al. 2011) e antimicrobiana (JUN et al. 2011, MEDINA et al. 2011).

Para monitorar a bioatividade de extratos, óleos essenciais e compostos isolados de plantas e a identificação de substâncias tóxicas, bioensaios utilizando espécies como organismos alvos são aplicados (NOLDIN et al. 2003). Os efeitos provocados por substâncias tóxicas são analisados em testes de fitotoxicidade e citotoxicidade, sendo o primeiro relacionado à germinação e ao crescimento radicular e aéreo de sementes cultivadas em contato com agentes tóxicos (BENASSI, 2004). Já a citotoxicidade é avaliada a partir da observação citológica da inibição celular, interrupção na metáfase, indução de aberrações cromossômicas (numéricas e estruturais) que vão desde a fragmentação cromossômica à desorganização do fuso mitótico, podendo levar a detecção da presença de agentes mutagênicos (TEDESCO & LAUGHINGHOUSE, 2012).

Além do potencial fitotóxico das espécies de *Psidium*, sua atividade larvicida em larvas do vetor *Aedes aegypti* L. também vem sendo estudada (LIMA et al., 2011; MENDES, 2017). A cada ano aumentam os problemas de saúde pública causados por doenças transmitidas por mosquitos, como a malária, dengue, chikungunya, leishmaniose e febre amarela, tornando-se importante o controle da propagação dessas espécies (WHO, 2014). Muitos fitoquímicos são testados quanto à sua ação larvicida e repelente contra mosquitos, substituindo o uso

convencional de produtos químicos (PEREIRA et al., 2014).

Ainda, estudos vêm avaliando a atividade biológica dos compostos químicos de espécies de *Psidium* no tratamento de doenças e sintomatologias relacionadas à ação de microorganismos oportunistas/patogênicos como protozoários, bactérias, fungos ou vírus. Tais estudos visam comparar a atividade dos extratos e óleos com a ação de antimicrobianos convencionais, demonstrando o potencial dessas plantas na farmacologia (MORAIS-BRAGA et al., 2016).

Diante da relevância econômica e medicinal das espécies de *Psidium* o presente capítulo tem por objetivo realizar uma revisão dos principais estudos envolvendo as espécies *P. guajava* e *P. cattleianum* compilando dados acerca de seus potenciais citotóxico, fitotóxico e mutagênico a fim de corroborar com futuros estudos com as referidas espécies.

2. ÓLEO ESSENCIAL DE *Psidium*: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os óleos essenciais são misturas naturais contendo de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações. São líquidos, voláteis, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos com densidade, geralmente mais baixa que a da água. São metabolizados por plantas aromáticas como metabólitos secundários e caracterizados por um forte odor. Podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Eles são caracterizados por dois ou três componentes principais em concentrações maiores (20–70%) em comparação com outros componentes presentes. Geralmente, esses componentes principais determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (CROTEAU et al., 2000; BETTS, 2001; PICHERSKY et al., 2006). Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também evitando a ação de herbívoros (BAKKALI et al., 2008).

O perfil químico dos derivados de óleos essenciais difere no número de moléculas extraídas e seus tipos estereoquímicos. O tipo de extração escolhida em conjunto com o propósito de utilização pode influenciar na composição química. O

produto de extração também pode variar em qualidade, quantidade e composição de acordo com o clima, composição do solo, órgão da planta, idade e estágio do ciclo vegetativo em que se encontra no momento da coleta (MASOTTI et al., 2003; ANGIONI et al., 2006).

Diferentes composições de óleo essencial podem ser encontradas quando frutos e folhas são estudadas. El-ahmady et al., (2013) identificou quarenta e cinco compostos representando 93,7% do óleo de frutas de goiaba e quarenta e dois compostos, representando 89,7% do óleo das folhas. Os compostos dominantes foram β -cariofileno (17,6%) e limoneno (11,0%) para o óleo da fruta e β -cariofileno (16,9%) e selin-7 (11) -en-4 α -ol (8,3%) para o óleo das folhas.

O óleo essencial de *P. guajava* apresenta variações de composição química de acordo com o local em que o material de análise foi obtido, o óleo de folhas colhidas em Monteverde-Costa Rica, por exemplo, foi isolado por hidrodestilação e analisado por Cromatografia Gasosa acoplado a Espectometria de Massas (CG-EM). Um total de 21 compostos foram identificados no óleo, representando 97% da composição total (COLE & SETZER, 2013). Já a composição do óleo das folhas de *P. guajava* cultivadas na Nigéria e analisado sob as mesmas circunstâncias apresentou quarenta e dois compostos, representando mais de 90% da mistura volátil (OGUNWANDE et al., 2003). A localização geográfica, bem como disponibilidade de água, temperatura e luminosidade representa um fator extrínseco às plantas de goiaba, podendo exercer influência individual ou em conjunto no metabolismo secundário responsável pela síntese dos compostos, ocasionando uma variação significativa em seu perfil químico (Tabela 1) (MORAIS, 2009).

Lima et al. (2010) buscou caracterizar e comparar os teores dos óleos essenciais das folhas das cultivares (cv.) domésticas de goiaba: Paluma, Pedro Sato, Século XXI e de uma variedade silvestre de *P. guajava* coletadas em Lavras-MG. O resultado mostrou que os três óleos essenciais analisados apresentaram inúmeras substâncias em comum com a predominância do 1,8-cineol (Gráfico 1). Fatores intrínsecos como a variabilidade genética e a ontogenia estão dentre os fatores que podem determinar alterações na composição química de óleos essenciais (MORAIS, 2009).

Lima et al. (2009) avaliaram os efeitos do óleo essencial das folhas de goiabeira cv. Pedro Sato, no comportamento das lagartas-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* em 1º instar. O resultado obtido demonstrou efeito repelente para a

lagarta na concentração de 0,01% (Tabela 2). Bernardes et al., 2017 também evidenciaram o efeito de repelência contra lagartas *S. frugiperda* nos óleos essenciais das cultivares Paluma e Cortibel VII, apesar de apresentarem diferenças em seus compostos majoritários (Gráfico 2).

O efeito antitumoral dos compostos isolados por Feng et al. (2015) foi avaliado através do Ensaio MTT17 *in vitro*, onde se investigou a capacidade das substâncias em promover apoptose e inibir a proliferação de linhas celulares tumorais SGC-7901 (câncer gástrico humano), A549 (carcinoma de pulmão humano) e HeLa (câncer cervical humano). Comparado com o controle positivo adriamicina (ADM), os compostos guavinosídeo C (1) e guavinosídeo F (10) apresentaram elevado efeito inibitório e o composto quercetina (4) inibição moderada.

Joseph et al. (2010) encontrou resultados inibitórios satisfatórios testando o óleo de *P. guajava* contra dez bactérias (Gram positivas e Gram negativas) e três fungos. Além disso, o óleo essencial foi testado contra células do HeLa e as alterações subcelulares foram avaliadas pelo ensaio de viabilidade da timidina. As células tratadas com óleo essencial apresentaram ação citotóxica com a degeneração das organelas citoplasmáticas, redução reflexiva, aumento do encolhimento das linhas celulares HeLa e características apoptóticas.

Com distribuição nativa Neotropical e grande diversidade do gênero *Psidium* reúne variados estudos de caracterização do perfil químico (Tabela 3).

O óleo essencial de *P. myrsinites* DC foi testado contra larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) e se mostrou efetivo. As larvas que foram submetidas ao tratamento ficaram agitadas durante os primeiros 30 minutos de exposição e em seguida apresentaram movimentos anormais, incluindo tremores e convulsões. Antes de morrerem, sofreram paralisia movendo-se para o fundo dos recipientes em que estavam contidas (DIAS et al., 2015).

Devido à complexidade do número de componentes encontrados nos óleos essenciais, pode não ser determinado com precisão qual (is) componente (s) é responsável pela atividade biológica evidenciada na literatura. Entretanto, estudos com alguns componentes isolados podem ser desenvolvidos para verificar a eficácia da atividade, ou ainda, pode ser sugerido que determinados componentes apresentem efeito biológico sinérgico (BERNARDES et al., 2017).

Tabela 1. Composição química percentual do óleo essencial de *Psidium guajava* coletadas em diferentes localidades

| Local | Perfil químico | Referência |
|----------------------|---|---|
| Monte Verde | (2E)-hexenal (28,4%), benzaldeído (8,2%), 1,8-cineol (15,9%), globulol (10,3%) e nerolidol (6,9%) | COLE & SETZER, (2013) |
| Nigéria | limoneno (42,1%) e β -cariofileno (21,3%) | OGUNWANDE, (2003). |
| Ceará Brasil (BR) | α -terpineol, <i>trans</i> -cariofileno, humuleno e α -partool | CRAVEIRO et al. (1891); SANTOS et al., 1998 |
| Lavras - BR | α -terpineol (0,9%), 1,8-cineol (7,0%), β -cariofileno (7,2%) e o óxido de cariofileno (13,8%) | LIMA et al. (2009) |
| Pará - BR | α -pineno (23,9%), 1,8 cineol (21,4%) e β -bisabolol (9,2%) | SILVA et al. (2003) |
| China | guavinosídeo C, guavinosídeo D, guavinosídeo E, quercetina, quercetina-3-O- α -l-arabinofuranosídeo, quercetina-3-O- α -l-arabinopyranosídeo, quercetina-3-O- β -d-galactopyranosídeo, guavinosídeo Um, guavinosídeo B, guavinosídeo F. | FENG et al. (2015) |
| Alegre-BR | β -cariofileno (12,1%), óxido de cariofileno (15,9%) e selin-11-en-4- α -ol (10,3%) | BERNARDES et al. (2017) |

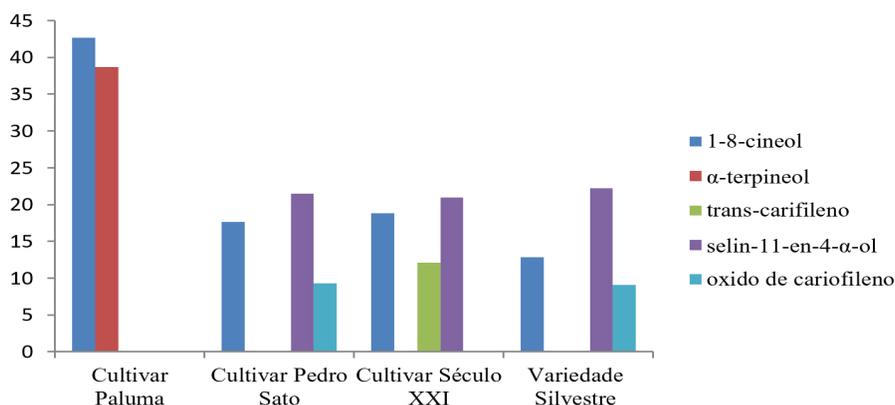


Gráfico 1. Composição química do óleo essencial de diferentes cultivares de *Psidium guajava* e de uma variedade silvestre. Valores em porcentagem (%). Fonte: Lima et al. (2010).

Tabela 2. Número médio (desvio padrão) de lagartas *Spodopterafrugiperda* sobre secções de folhas de milho tratadas com o óleo essencial de goiabeira

| Tratamento | Número de lagartas* | | |
|--------------------------|---------------------|------------|------------|
| | 24h | 48h | 72h |
| Óleo essencial a 0,01% | 1,5±0,5 b | 1,0±0,4 c | 1,1±0,3 c |
| Óleo essencial a 0,001% | 3,7±0,7 ab | 2,6±0,8 bc | 2,6±0,7 bc |
| Etanol/água (testemunha) | 3,8±0,6 ab | 5,9±0,1 ab | 6,0±0,6 a |
| Água (testemunha) | 5,8±0,4 a | 6,5±1,0 a | 4,7±0,7 ab |
| CV (%) | 56 | 74 | 60 |

Fonte: Lima et al. (2017).

Tabela 3. Composição química percentual do óleo essencial de diferentes espécies do gênero *Psidium*

| Espécie | Perfil químico | Referência |
|-----------------------------|--|---------------------|
| <i>P. cattleianum</i> | α -copaeno (22%), eucaliptol (15%), δ -cadineno (9,63%) e α -selineno (6,5%). | SCUR et al., 2016 |
| <i>P. cattleianum</i> | epi- α -muurolol (21,9%), α -cadinol (20%), epi- α -cadinol (16,7%) e óxido de cariofileno (13,6%). | PINO et al., 2011 |
| <i>P. parvifolium</i> | viridiflorol (31,9%). | PINO et al., 2011 |
| <i>P. myrsinites</i> | óxido de cariofileno (10,09%), β -cariofileno (26,05%) e α -humuleno (23,92%). | DIAS et al., 2015 |
| <i>P. caudatum</i> | terpinen-4-ol (47,72%), γ -terpineno (11,58%), α -terpineno (6,70%), limoneno (5,20%), α -pineno (4,49%), 1,8-cineole (eucaliptol) (3,95 %), α -terpineol (3,05%), β -terpineno (2,89%), β -pineno (2,66%), p-cimeno (2,22%) e α -terpinoleno (2,22%) | YÁÑEZ et al., 2002 |
| <i>P. friedrichsthalium</i> | β -cariofileno (36,82 ± 19,44%) e α -pineno (10,61 ± 13,70%). | TUCKER et al., 1995 |
| <i>P. guineense</i> | β -bisaboleno (13,18 ± 2,00%) e α -pineno (12,85 ± 5,42%). | TUCKER et al., 1995 |
| <i>P. sartorianum</i> | α -pinene (16,66 ± 1,05%), β -cariofileno (12,35 ± 2,82%) e α -fellandrene (9,81 ± 1,13%). | TUCKER et al., 1995 |

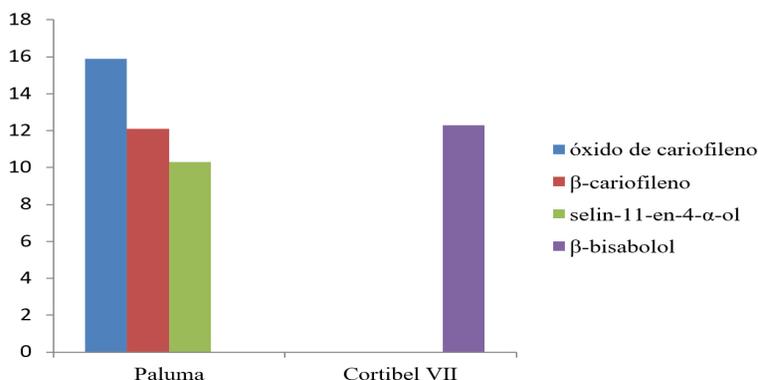


Gráfico 2. Compostos majoritários encontrados nos óleos essenciais de *Psidium guajava* cultivar Paluma e cultivar Cortibel VII. Valores em porcentagem (%). Fonte: Bernardes et al. (2017).

3. ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS AQUOSOS E ETANÓLICOS DE *Psidium* EM DIFERENTES ORGANISMOS

Estudos etnobiológicos com diferentes espécies de *Psidium* vem sendo desenvolvidos visando testar componentes que podem ser utilizados como alternativas naturais de remédios ou nutracêuticos contra vários tipos de doenças. Entretanto, a parte utilizada, a indicação e forma de uso podem variar de acordo com o contexto cultural.

As folhas são comumente usadas para preparar infusões ou decocções e estes chás medicinais são usados para controlar diabetes, distúrbios gastrointestinais e inflamatórios, dores de garganta, problemas vaginiais, reumatismo e dor, doenças respiratórias e doenças causadas por microorganismos (DAKAPPA-SHRUTHI et al., 2013; PICKING et al., 2015). Tanto o caule, como as folhas e as raízes são utilizadas na produção de pomadas e pastas para tratar feridas, úlceras e infecções de pele (DAKAPPA-SHRUTHI et al., 2013; KUKREJA e DODWAD, 2012).

3.1. Atividade biológica de infusões e extratos aquosos de *Psidium*

Os extratos aquosos de *Psidium* vem sendo utilizados em testes com diferentes organismos. Fenneret al. (2006) realizaram uma pesquisa com o objetivo de encontrar plantas utilizadas no tratamento de sintomas relacionados a infecções fúngicas no Nordeste do Brasil. Os autores indicaram que *P. guajava* é uma das plantas que apresentam potencial antifúngico, já que vem sendo utilizada no tratamento de sintomas como leucorreia, aftas, úlceras, irritação vaginal e problemas de pele, através da preparação de cataplasmas, decocções e infusões, utilizando diferentes partes da planta, como frutas, casca, flores e folhas (FENNER et al. ., 2006; GUTIÉRREZ et al., 2008).

Nesse sentido, Suwanmanee et al. (2014) testaram o efeito do extrato aquoso de *P. guajava* (folha) contra fungos que são clinicamente importantes para humanos e animais. Estes fungos foram categorizados em três grupos: leveduras (*C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*), dermatófitos (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *M. canis* e *M. gypseum*) e fungos filamentosos (*Aspergillus niger* e *Penicillium* spp). O extrato aquoso apresentou atividade contra todas as cepas, com concentração inibitória mínima (CIM) entre 2,67 e 16 mg/mL e zonas de inibição variando de 7 a 15 mm. O fluconazol (1 mg/mL) demonstrou uma CIM variando entre 2-> 128 µg/mL e zonas de inibição variando entre 2 e 17 mm. Contra *A. niger*, o extrato de *P. guajava* demonstrou melhor efeito que o fluconazol (com zonas de inibição variando entre 9 e 11 mm e entre 2 e 3 mm, respectivamente).

A citotoxicidade da infusão aquosa com 100 g de folhas de *P. guajava* foi testada também em macrófagos peritoneais de camundongos. Este ensaio utilizou células imunológicas, como macrófagos, para métodos de citotoxicidade *in vitro*. Três diferentes controles foram utilizados nos ensaios: um controle negativo sem tratamento; um controle usando o chá não armazenado e outro usando o chá sob armazenamento. A infusão preparada recentemente apresentou um índice de letalidade inicial de 10%, que aumentou para 31,82% (4°C, 48 h) e 76,18% após 48 h, dentro de 60 minutos de exposição, revelando que as infusões nestas condições de tempo apresentam um efeito imunotóxico. Segundo os autores, este efeito se dá pela presença de compostos oxidados no chá devido à produção de radicais livres

a partir de substâncias aromáticas (ALMEIDA et al., 2006).

Chanda e Kaneria (2011) investigaram o potencial de atividade microbiana de plantas nutracêuticas. *P. guajava* foi uma dessas plantas e foi avaliada contra 10 espécies de bactérias patogênicas, incluindo *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Diferentes tipos de extratos obtidos de folhas (éter de petróleo, tolueno, acetato de etila, acetona e água) foram avaliados e apresentaram efeito antibacteriano no ensaio in vitro. A atividade microbiana foi avaliada na concentração de 2 mg/L e *P. guajava* destacou-se como a espécie com melhor atividade antimicrobiana entre as plantas avaliadas com zonas de inibição entre 7 e 25 mm. O efeito antibacteriano de todos os extratos foi avaliado contra cepas Gram positivas e Gram negativas, sendo o melhor efeito observado quando o extrato aquoso foi testado contra bactérias Gram negativas.

Um dos principais usos de *P. guajava* na medicina popular está no tratamento da diarreia e distúrbios gastrointestinais (CECÍLIO et al., 2012). Birdiet al. (2011) demonstraram uma atividade anti-rotaviral utilizando a decocção de folhas secas de *P. guajava*. Células da linhagem MA-104 foram infectadas com o rotavírus símio SA-11, que causa a morte celular. O extrato aquoso reduziu a morte das linhagens celulares nas concentrações de 5% ($1,35 \pm 0,063$ mg / mL) e 10% ($2,7 \pm 0,125$ mg / mL), demonstrando que o chá das folhas de goiaba tem efeito contra esses vírus.

Rajendranet al. (2014) realizaram testes *in vivo* utilizando extratos aquosos de folhas de *P. guajava* frescas e frutos verdes contra a cepa de *Plasmodiumberghei* resistente a cloroquina NK65. Doses foram administradas por via oral em ratos infectados por 7 dias. Observou-se que a presença do parasita reduziu à medida que a concentração dos extratos aumentou, com percentual de supressão de 85,8% (folha) e 62,0% (frutos), quando ambos os extratos foram utilizados na concentração de 1000 mg/kg.

Já no que diz respeito a testes com bioensaios vegetais, Chapla e Campos (2010) testaram a ação do extrato aquoso preparado a partir de folhas de *P. guajava* nas concentrações de 20, 10 e 5% em bioensaios com *L. sativa* a fim de avaliar o potencial alelopático da espécie. Após os testes a análise estatística demonstrou que o extrato na concentração de 20% afetou a germinação e desenvolvimento de *L. sativa*.

De maneira semelhante, Luberet al. (2014) investigaram a ação fitotóxica, citotóxica e genotóxica de três variedades de *P. guajava* (Paluma, Pedro Sato e Roxa) no bioensaio *L. sativa*. Os extratos foliares foram testados em cinco concentrações (2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 g/L. Após as avaliações macroscópicas e microscópicas observou-se que a germinação de sementes e o crescimento das raízes diminuíram com o aumento da concentração das infusões em todas as cultivares e o mesmo ocorreu para as alterações no ciclo celular. Dessa forma, os autores concluíram que a goiabeira não deve ser usada na medicina popular de maneira indiscriminada.

No mesmo sentido, Histeret al. (2015) testaram a atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de dois acessos *P. cattleianum* (Tupanciretã-TU e Silveira Martins-SM), por meio de decocção nas concentrações de 15 e 75 g/L. Após os testes com *L. sativa*, os resultados mostraram que o extrato do acesso TU diminuiu significativamente a germinação das sementes nas duas concentrações e inibiu a divisão celular na concentração de 75 g/L.

Da mesma forma, extratos de folhas de *P. guajava* secos, verdes e marrons foram utilizados para investigar o potencial alelopático de *P. guajava* na germinação e crescimento de sementes de *Cassia occidentalis*. Os extratos foram feitos nas concentrações de 20%, 10% e 5%, sendo que a inibição da germinação e do crescimento foi maior nas concentrações mais elevadas (KAWAWA et al., 2016).

3.2. Atividade dos extratos etanólicos e metanólicos de *Psidium*

Gawadet al. (2015) investigaram o potencial *in vitro* de extratos de casca de *P. guajava* buscando avaliar se a planta exerce algum efeito sobre o protozoário *Leishmania donovani*. Os autores utilizaram o extrato etanólico de folhas de *P. guajava* (80 µg/mL) e verificaram que o extrato exerce 90,3% de inibição contra as formas promastigotas de *Leishmania donovani*, que parasita os hospedeiros mamíferos, incluindo os humanos. A anfotericina B foi utilizada como droga padrão, demonstrando uma inibição de 98,7%.

Um teste *in vivo* utilizando ratos Wistar albinos machos e fêmeas foi conduzido para investigar o potencial antiamoebico de *P. guajava*. Os resultados mostraram que o extrato metanólico (80%) das folhas frescas utilizadas na

concentração de 400 mg/kg de peso corporal é tão eficaz na redução do número de parasitas (*E. histolytica*) quanto o medicamento de referência (metronidazol) utilizado na concentração de 125 mg / kg (INYANG-ETOH & OHANU, 2015).

Já Madduluriet al. (2013) testou extratos etanólicos e metanólicos de *P. guajava* (100 µg/mL) em *E. coli*, *K. pneumoniae* *S. aureus* que podem ser os agentes causadores de gastroenterites e infecções urinárias, pneumonia e infecções de feridas, respectivamente. Os extratos etanólicos e metanólicos demonstraram zonas de inibição variando entre 11 e 15 mm e entre 9,2 e 10,2 mm. A zona de inibição observada com a ciprofloxacina (10 µg/mL) variou entre 17 e 23 mm. O melhor efeito dos extratos foi observado contra o *S. aureus*, com as CIMs do extrato maiores do que as observadas com a ciprofloxacina.

Um estudo preliminar foi realizado por Ifeanyichukwuet al. (2015), que utilizaram extratos etanólicos e metanólicos das folhas e casca de *P. guajava*. Seus resultados mostraram que esses extratos (100 mg/mL) inibiram o crescimento das bactérias *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *S. pneumoniae* com zonas de inibição evidenciadas por meio do teste de difusão em disco. Para os extratos metanólicos e etanólicos das folhas a zona de inibição variou de 13 a 22 mm, enquanto que para os extratos da casca a variação foi de 13 a 20 mm. O cloranfenicol (10 mg) foi o fármaco padrão utilizado neste trabalho com zona de inibição variando entre 18 e 28 mm. Os extratos foram mais eficazes que o cloranfenicol contra as linhagens de *E. coli* e *P. aeruginosa*.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

As plantas são fontes de grande parte dos compostos utilizados para a fabricação de fármacos. As espécies do gênero *Psidium* vem sendo amplamente estudadas e utilizadas na medicina popular e na farmacologia e os bioensaios com vegetais, insetos e microorganismos são ferramentas rápidas e eficazes na determinação do potencial fitotóxico, citogenotóxico e mutagênico, direcionando assim as pesquisas aplicadas. Como perspectivas futuras observamos a necessidade de isolar os compostos de interesse das espécies em estudo para que as pesquisas sejam direcionadas sobre a ação dos mesmos, tendo em vista que a maior parte dos estudos são voltados para a aplicação dos óleos, infusões e extratos.

Agradecimentos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMEED, E.S.S.; NAGATY, M.A.; SALMAN, M.S.; BAZAID, S.A. Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficusindica* Mill.) growing in Taif, KSA. **Food Chem** vol. 160, p. 31-38, 2014.

AKINBORO, A.; BAKARE, A.A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. **JEthnopharmacol**, v.112, p.470-474, 2007.

ALMEIDA, K.C., BARBOSA, T.R., SILVA, R.N.R., SILVA, J.D., FREIRE, R.B., 2006. Efeito citotóxico do infuso aquoso de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). **Rev. Bras. Farm.** 87, 60–62.

AMARAL, A. C. F. et al. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. 2. ed. Brasília: Editora MS, 2006. 148 p.

ANGIONI, A., BARRA, A., CORONEO, V., DESSI, S., CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandulastoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers, **J. Agric. Food Chem**, v.54, p. 4364-4370, 2006.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Efeitos biológicos de óleos essenciais - Uma revisão. **Toxicologia Alimentar e Química**. v.46:2, p. 446-475, 2008.

BENASSI, J. C. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana**. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

BERNARDES, C. O., ZAGO, H. B., SOUZA, T. S., SILVA, S. F., CANAL, D., FERREIRA, A., FERREIRA, M. F. S. Effects of two chemotypes of *Psidium*

guajava essential oils in *Spodoptera frugiperda*, CAPÍTULO III da Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, 2017.

BETTS, T.J. Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases, **J. Chromatogr**, v. 936, p. 33-46, 2001.

BIRDI, T.J., DASWANI, P.G., BRIJESH, S., TETALI, P., 2011. In vitro anti-giardial and antirotaviral activity of *Psidium guajava* L. leaves. **Indian. J. Pharmacol.** 43, 616–617..

CECÍLIO, A.B., FARIA, D.B., OLIVEIRA, P.C., CALDAS, S., OLIVEIRA, D.A., SOBRAL, M.E.G., DUARTE, M.G.R., MOREIRA, C.P.S., SILVA, C.G., ALMEIDA, V.L., 2012. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **J. Ethnopharmacol.** 141, 975–981.

CHANDA, S., KANERIA, M., 2011. **Indian nutraceutical plant leaves as a potential source of natural antimicrobial agents**. In: Mendez Vilas, A. (Ed.), Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances 2. FORMATEX RESEARCH CENTER - C/ Zurbaran 1, 2nd Floor, Office 1, 06002, Badajoz, Spain, 1251–1259.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M., LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R (Eds), **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1250-1318, 2000.

CRAVEIRO, A. A., FERNANDES, A. G., ANDRADE, C.H.S., MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W., MACHADO, M. I. L. *Óleos essenciais de plantas do nordeste*, Fortaleza: UFC, 209 p., 1981.

COLE, R. A., SETZER, W. N. Chemical Composition of the Leaf Essential Oil of *Psidium guajava* from Monteverde, Costa Rica, **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 10:5, p. 365-373, 2013.

DAKAPPA-SHRUTHI, S., ADHIKARI, R., TIMILSINA, S.S., SAJEKHAN, S.S., 2013. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). **J. Drug Deliv. Ther.** 3, 162–168.

DIAS, C. N., ALVES, L. P. L., RODRIGUES, K. A. F., BRITO, M. C. A.; ROSA,

C. S.; AMARAL, F. M. M.; MONTEIRO, O. S.; ANDRADE, E.H. A.; MAIA, J. G. S.; MORAES, D. F. C. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-8, 2015.

EL-AHMADY, S. H., ASHOUR, M. L., WINK, M. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oils of *Psidium guajava* fruits and leaves, **Journal of Essential Oil Research**, v. 25:6, p. 475-481, 2013.

FENNER, R., BETTI, A.H., MENTZ, L.A., RATES, S.M.K., 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Braz. J. Pharm. Sci.** 42, 369–394.

FRAZON, R. C.; CAMPOS, L. Z. DE O.; PROENÇA, C. E. B.; SOUSA-SILVA, J. C. **Araças do Gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos**. Documentos/ Embrapa Cerrados. Planaltina, DF, 2009.

GAWAD, S.M.A., HETTA, M.H., ROSS, S.A., BADRIA, F.A.E.R., 2015. Antiprotozoal and antimicrobial activity of selected medicinal plants growing in Upper Egypt, beni-suefregion. **World J. Pharm. Pharm. Sci.**, 1720–1724..

GUTIÉRREZ, R.M.P., MITCHELL, S., SOLIS, R.V., 2008. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **J. Ethnopharmacol.** 117, 1–27.

GOVAERTS, R. et al. World Checklist of selected plant families - Myrtaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. 2016. Disponível em: <<http://apps.kew.org/wcsp/>>. Acesso em: 12 março 2018.

HISTER, C.A.L.; TRAPP, K.C.; TEDESCO, S.B. Potencial alelopático e antiproliferativo de extratos aquosos das folhas de *Psidium cattleianum* Sabine sobre *Lactuca sativa* L. **R. bras. Bioci.**, Porto Alegre, v. 14, n.2, p. 124-129, 2016.

IFEANYICHUKWU, I., CHIKA, E., EMMANUEL, N., ANTHONIA, O., NGOZI, A., AGABUS, N., 2015. Preliminary investigation of the antibacterial activity of *Psidium guajava* extracts. **Eur. J. Med. Plants** 7, 26

IHA, S. M. et al. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 3, 2008.

INYANG-ETOH, P.C., OHANU, E.C., 2015. The efficacy of plant extracts on caecal amoebiasis in rats. **Veterinary. Sci. Dev.** 5, 41–46

JOSEPH, B., PRIYA, R.M., MARY HELEN, P. A., SUJATHA, S. **Compostos bioativos em óleo essencial e seus efeitos antimicrobianos, citotóxicos da folha de *Psidium Guajava* (L.).** 2010

JUN, N. J.; MOSADDIK, A.; MOON, J-Y.; JANG, K-C.; LEE, D-S.; AHN, K. S.; CHO, S. K. Cytotoxic activity of b-caryophyllene oxide isolated from Jeju guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf. *Records of Natural Products*, v. 5, n. 3, p. 242-246, 2011.

KUKREJA, B.J., DODWAD, V., 2012. Herbal mouthwashes—a gift of nature. *Int. J. Pharma. BioSci.* 3, 46–52.

LANDRUM, L. R. **A revision of the *Psidium salutare* complex (Myrtaceae).** *Sida*, v. 20, p. 1149-1469, 2003.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; SANTOS, C. D.; MORAES, J. C.; NÉRI, D. K. P.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização química do óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e seus efeitos no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1777-1781, 2009.

LIMA, R. K., CARDOSO, M. G., ANDRADE, M. A., NASCIMENTO, E. A., MORAIS, S. A. L., NELSON, D. L. Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae), **Rev. bras. farmacogn.** v.20:1, p. 41-44, 2010.

LIMA, M. et al. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 55, p. 11716-11720, 2011.

LORENZI, H. 2014. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Vol1. Nova Odessa: Plantarum. 384p.

LUBER, J., PALMIERI, M.J., BOTELHO, C.M.; RINALDO, D.; ANDRADE-VIEIRA, L.F. Investigation on the effects of guava (*Psidium guajava* L.) infusions on germination, root tips and meristematic cells of *Latuca sativa*. *An Acad Bras Cienc.*(2015) **87** (2).

MADDULURI, S., RAO, K.B., SITARAM, B., 2013. In vitro evaluation of antibacterial activity of five indigenous plants extracts against five bacteria pathogens of humans. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.** 5, 679–684.

MASOTTI, V., JUTEAU, F., BESSIÈRE, J.M., VIANO, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities, **J. Agric. Food Chem**, v. 51, p. 7115-7121, 2003.

MEDINA, A. L.; HAAS, L. I. R.; CHAVES, F. C.; SALVADOR, M.; ZAMBIAZI, R. C.; SILVA, W. P.; NORA, L.; ROMBALDI, C. V. Araca (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **FoodChemistry**, v. 128, n. 4,p. 916–922, 2011.

MENDES, L.A. **Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Psidium guajava* L. em análise sazonal e efeito larvicida em *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS). **Ministério da Saúde**, 2009. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>>. Acesso em: 16 março 2018.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais, **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

NOLDIN, V. F.; CECHINEL FILHO, V.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L., PEDROSA, R. C. & YUNES, R. A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynaras colymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Químicanova**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

OGUNWANDE, I. A., OLAWORE, N. O., ADELEKE, K. A., EKUNDAYO, O., KOENIG, W. A. Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria, **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18:2, p. 136-138, 2003.

PEREIRA, A. I. S. et al. Atividade antimicrobiana no combate as larvas do mosquito *Aedes aegypti*: Homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. **EducaciónQuímica**, v. 25, n. 4, p. 446-449, 2014.

PICKING, D., DELGODA, R., YOUNGER, N., GERMOSÉN-ROBINEAU,

BOULOGNE, I., MITCHELL, S.A., 2015. TRAMIL ethnomedicinal survey of Jamaica. **J. Ethnopharmacol.** 169, 314–327.

PICHERSKY, E., NOEL, J.P., DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity, **Science**, v. 311, p. 808-811, 2006.

PINO, J. A., BELLO, A., URQUIOLA, A., MARBOT, R., MARTÍ, M. P. Leaf Oils of *Psidium parvifolium* Griseb. and *Psidium cattleianum* Sabine from Cuba, **Journal of Essential Oil Research**, v. 16:4, p. 370-371, 2011.

RAJENDRAN, C., BEGAM, M., KUMAR, D., BARUAH, I., GOGOI, H.K., SRIVASTAVA, R.B., VEER, V., 2014. Antiplasmodial activity of certain medicinal plants against chloroquine resistant *Plasmodium berghei* infected white albino BALB/c mice. **J. Parasit Dis.** 38, 148–152.

RICE, E. L. Allelopathy. Academic Press, Orlando, FL. 1984.

SANTOS, F. A., RAO, V. S. N., SILVEIRA, E. R. Investigations on the antinociceptive effects *Psidium guajava* leaf essential oil and its major constituents, **Phytother Res**, v.12, p. 24-27, 1998.

SCUR, M. C., PINTO, F. G. S., PANDINI, J. A., COSTA, W. F., LEITE, C. W., TEMPONI, L. G. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine, **Braz. J. Biol.** v.76, p. 101-108, 2016.

SILVA, J. D., LUZ, A. I. R., SILVA, M. H. L., ANDRADE, E. H. A., ZOGHBI, M. G. B., MAIA, J. G. S. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp., **Flavor Frag J**, v. 18, p. 240-243, 2003.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae IN: lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016.

SUWANMANEE, S., KITISIN, T., LUPLERTLOP, N., 2014. In vitro screening of 10 edible thai plants for potential antifungal properties. **Evid. Based Complement. Altern. Med.** 2014.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. In: SRIVASTAVA, J.K. Environmental Contamination. **Rijeka: InTech.** p. 137-156, 2012.

TEIXEIRA, R. de O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L.

and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 26, n. 4, 2003.

TLILI, N.; MEJRI, H.; YAHIA, Y.; SAADOUI, E.; REJEB, S.; KHALDI, A.; NASRI N. Phytochemicals and antioxidant activities of *Rhustripartitum* (Ucria) fruits depending on locality and different stages of maturity. **Food Chem**, v. 160, p. 97-103, 2014.

TUCKER, O., MACIARELLO, M. J., LANDRUM, L. R. Volatile Leaf Oils of American Myrtaceae. III. *Psidium cattleianum* Sabine, *P. friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu, *P. guajava* L., *P. guineense* Sw., and *P. sartorianum* (Berg) Niedenzu, **Journal of Essential Oil Research**, v.7, p. 187-190, 1995.

VUUREN, S. F. V.; NKWANYANA, M. N.; WET, H. de. Antimicrobial evaluation of plants used for the treatment of diarrhoea in a rural community in northern Maputaland, KwaZulu-Natal, South Africa. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, África, v. 15, n. 53, 2015.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva, Switzerland, 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf>. Acesso em: 05março 2018.

ESTUDOS EPIGENÉTICOS SOBRE METILAÇÃO DO DNA VEGETAL POR CLAE

Luziane Brandão Alves
Ana Beatriz Rocha de Jesus Passos

1. INTRODUÇÃO

O curso de vida dos diferentes organismos é marcado por alterações que ocorrem por meio de fatores que podem interferir em aspectos positivos ou negativos considerando as características genótípicas e fenotípicas.

Fatores bióticos, compostos pelos seres vivos que participam das relações ecológicas no ecossistema, e os fatores abióticos, marcado pela ação de componentes físicos e químicos, apresentam importante papel durante o desenvolvimento dos organismos eucariotos. Estes resultam em possíveis mecanismos que propiciam manifestações características provenientes da expressão gênica, sem interferir na sequência de bases da molécula de DNA. Tal mecanismo é atribuído a chamada epigenética.

O termo epigenética proposto pela primeira vez em 1942 pelo pesquisador Conrad Hal Waddington caracteriza-se pelo chamado “acima do genoma”. São mudanças que se sobrepõem a molécula de DNA podendo ser herdadas através das atividades gênicas associadas. A sua ocorrência é resultado da ação de diferentes enzimas, e essas respostas epigenéticas possuem forte influência do meio ambiente e dessa forma podem desencadear diferentes formas fenotípicas para um mesmo genótipo (MASUELLI & MARFIL, 2011; VELASQUEZ, 2015). Considerando os organismos vegetais, as mudanças que ocorrem durante o desenvolvimento em plantas podem desencadear a expressão diferenciada de alelos em espécies que apresentam similaridades genéticas (BANERJEE & ROYCHOUDHURY, 2017).

Quando se remete a expressão de mecanismos epigenéticos, isso está relacionado ao processo transcricional do material genético podendo ocorrer ao longo da sua sequência ou nas regiões promotoras sem alterar em nenhum momento

as bases que compõem a estrutura da molécula de DNA. Diante do exposto, este capítulo visa discutir o conceito sobre epigenética e como caracteriza-se o evento de metilação do DNA, um dos mecanismos mais discutidos, e apresentar uma metodologia utilizando análise cromatográfica para o estudo de metilação em organismos vegetais.

2. A EPIGENÉTICA NOS ORGANISMOS EUCARIOTOS

As alterações decorrentes da epigenética resultam no controle de genes e conseqüentemente na sua expressão e da mudança na modelação da cromatina (SANTAMARIA et al., 2011). Os estudos sobre epigenética em vegetais, por exemplo, possibilitam saber como ocorre a regulação de determinado gene em sua disposição ao longo do genoma (HASBÚN et al., 2016), fornecendo subsídios para compreender a variação ocorrente no fenótipo de populações naturais ao longo de gerações e que não podem ser explicadas ou compreendidas simplesmente a nível da sequência de DNA. Além disso, permite a obtenção de informações sobre fatores que possibilitam respostas do organismo ao meio ambiente (BOSSDORF et al., 2008).

Estudos mais detalhados sobre os mecanismos epigenéticos existentes e como eles atuam na fisiologia da planta e em seu metabolismo permitem conhecer efeitos subentendidos, entre eles os efeitos associados a dinâmica da floração, reprodução e sobrevivência das mais variadas espécies vegetais existentes (CAMPOS-VIVERO et al., 2017).

As alterações epigenéticas podem agir de três formas, ativando, reduzindo ou impedindo a ação de determinados genes, podendo dessa forma levar a ativação daquele que se encontrava sem atividade ou propiciar a inativação de algum com grande relevância ou como consequência torná-lo menos expresso (RODRÍGUEZ et al., 2012).

Os estudos dessas características genéticas e fenotípicas associadas a esse evento têm sido fonte de intensas discussões para compreender como desencadeia tais efeitos e como os organismos podem se comportar diante deles. Para isso, nos últimos anos, diferentes eventos epigenéticos têm sido estudados e caracterizados em organismos tanto animais quanto vegetais a fim de entender ainda mais do que

se trata a epigenética, em qual momento ele pode se fazer presente nos organismos e quais as consequências estão sendo advindas.

Quando se remete a eventos epigenéticos eles podem atuar tanto à nível de DNA quanto à nível das histonas, resultando na descrição de diferentes mecanismos trazidos na literatura, como exposto na figura 1.

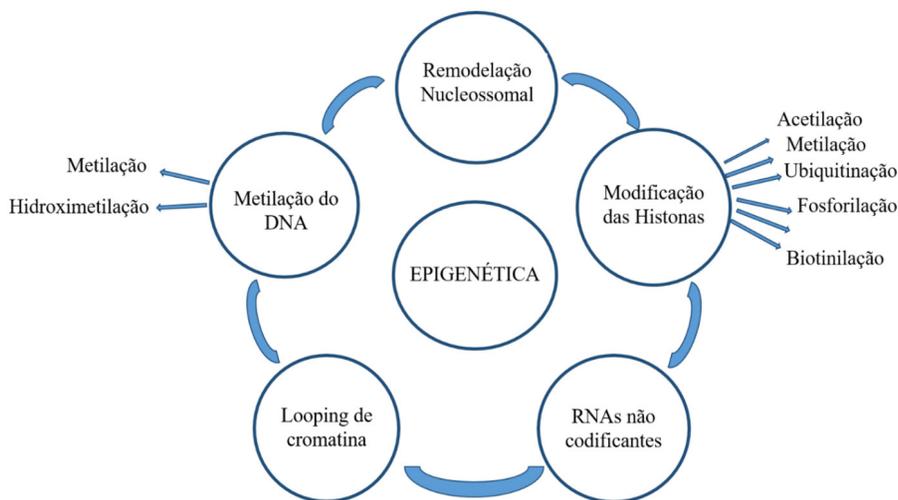


Figura 1. Mecanismos epigenéticos associados a regulação gênica, associado a molécula do DNA e as histonas. Adaptado de Vidaki et al., 2013.

A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos que tem apresentado uma atenção maior e está relacionado a uma gama de estudos. Este mecanismo consiste na adição de um grupamento metil na posição cinco da estrutura da base citosina (Figura 2). Diferentes bases podem sofrer metilação como, por exemplo, a N6-metiladenina, C5-metilcitosina e a N4-metilcitosina. Entretanto, a C5-metilcitosina é a forma de maior ocorrência nos organismos eucarióticos (ELHAMAMSY, 2016).

As enzimas responsáveis pela metilação do DNA são as chamadas DNA metiltransferases (DNMTs) que atuam de duas formas: metilases de manutenção e *de novo*. As DNMT1 estão envolvidas na metilação de fitas do DNA hemimetiladas – metilases de manutenção. A ocorrência da metilação *de novo* se dá pelas enzimas

DNMT2, DNMT3A e DNMT3B. As enzimas desmetilases são responsáveis pela desmetilação do DNA.

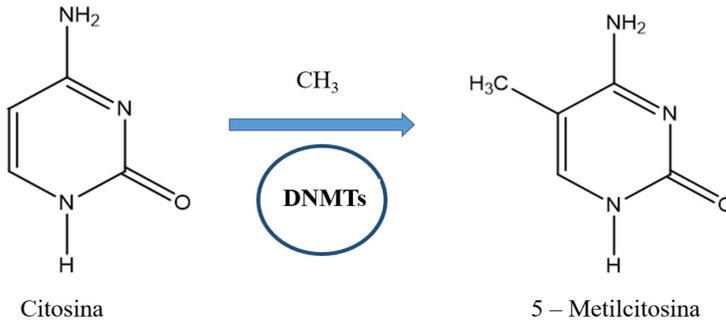


Figura 2. Estrutura da citosina após a ação de enzimas DNA metiltransferases.

O processo de metilação é considerado a principal modificação presente nos organismos eucariotos e as mudanças decorrentes envolvem a regulação gênica e os mecanismos de transcrição. A ocorrência da metilação atua sobre o silenciamento do gene durante o processo de transcrição da molécula de DNA (SHA et al., 2005), entretanto não é um processo estático e durante a vida do indivíduo sofre intensas alterações (RODRÍGUEZ et al., 2012).

A metilação do DNA ocorre principalmente nas regiões centroméricas e pericentroméricas dos cromossomos relacionadas à expressão gênica (ASENSI-FABADO et al., 2016), provocando uma mudança na conformação da cromatina no nível de compartimentalização, fazendo com que ela fique bloqueada.

As ilhas CpG são sequências de nucleotídeos com alta quantidade de citosina e guanina, com comprimento superior a 500 pb e conhecidas pela ocorrência do fenômeno de metilação nas regiões promotoras dos genes. As enzimas que atuam nos contextos CpG são as chamadas DNA metiltransferase-1 (MET 1). Já as enzimas atuantes nos locais CpHpG são denominadas de cromometilase-3 ou CMT 3 (PANDEY et al., 2016). A base H corresponde a três das quatro bases existentes: adenina, timina ou citosina. A metilação nos diferentes contextos costuma se manter durante a etapa de replicação do DNA e são utilizados para reestabelecer a metilação na fita de DNA recém sintetizada.

Em regiões de eucromatina e heterocromatina, a metilação atua na molécula

do DNA a sua forma de expressão, levando ao silenciamento ou ativação dos genes presentes naquela região (ELHAMAMSY, 2016). Portanto sequências de DNA que são marcadas por uma alta concentração de metilação não proporcionam a expressão de genes (VELASQUEZ, 2015) (Figura 3).

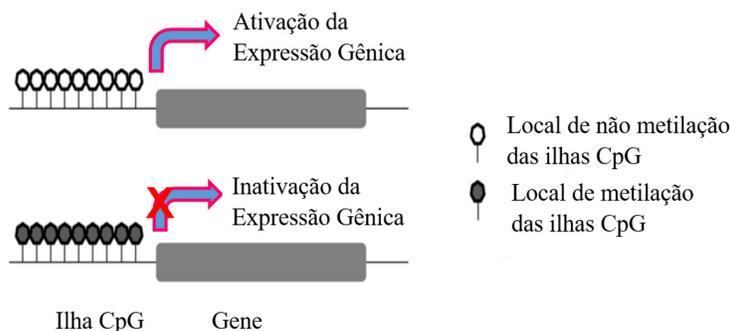


Figura 3. Fragmento de um gene contendo uma ilha CPG. Sem a adição do grupo metil a transcrição do gene ocorre naturalmente. Com a inserção da grupo metil, o gene que até o momento estava em grande atividade não consegue exercer a atividade devido a metilação do DNA. Modificado de Vidaski, et al., 2013.

A inserção do grupo metil no DNA resulta em modificações na expressão dos genes presentes em uma determinada região, podendo ser herdadas nas gerações futuras independente do alelo sofrer algum tipo de cruzamento (ASENSI-FABADO et al., 2016). Essas modificações nos alelos que são expressos ou que tiveram alterações decorrentes dos eventos epigenéticos são conhecidos por epialelos (VELASQUEZ, 2015). A característica passada às células filhas é denominada de epigenótipo (COSTA & PACHECO, 2012) a qual passa a fazer parte do epigenoma (BANERJEE & ROYCHOUDHURY, 2017).

Pesquisas tem apresentado que a ocorrência de metilação em vegetais está associada a fisiologia da planta e as mudanças são desencadeadas por fatores ambientais e bióticos (MASTAN ET AL., 2012; YUN-LEI ET AL., 2010; SANTOS, 2012; LÄMKE & BÄURLE, 2017; BAULCOMBE & DEAN, 2018). Por isso é importante o seu estudo em um conjunto de plantas inseridas sob diferentes condições experimentais (ELHAMAMSY, 2016).

A identificação e caracterização de mecanismos epigenéticos constituem um importante avanço no âmbito da biologia molecular, podendo contribuir para a compreensão de fatores que estão associados a regulação da expressão gênica, além de fornecer subsídios para que possa ser compreendido aspectos evolutivos e associar a enfoques, como a capacidade de adaptação, mudanças fenotípicas associado a aspectos morfológicos ou fisiológicos frente ao ambiente e apresentar indivíduos com grandes potenciais na seleção de caracteres de interesse (INGLIS et al., 2016).

3. METODOLOGIA DO ESTUDO DE METILAÇÃO NO DNA EM PLANTAS

A manifestação de caracteres podem desencadear alterações nos diferentes organismos. Durante muito tempo esse conjunto de caracteres apresentados foi incumbido apenas a fatores e/ou herança genética. Isso ainda é válido e muito importante no estudo de muitas patologias, por exemplo, entretanto um novo questionamento se fez presente: Será que apenas fatores genéticos são responsáveis por todas as mudanças nos seres vivos, considerando o curso evolutivo de variados fenômenos? Será que as mudanças ambientais podem estar associadas a esses caracteres?

Dessa forma, mediante muitos outros pontos levantados, foi feita uma abordagem inicial sobre epigenética e conseqüentemente sobre metodologias que pudessem aprimorar ainda mais o estudo. Pesquisas têm sido realizadas apresentando os níveis de metilação no contexto CG em diferentes tecidos vegetais (Tabela 01).

A epigenética constitui modificações moleculares que interferem no acesso dos eventos de transcrição da cromatina, e dessa forma induz desde a modelação à expressão gênica (INGLIS et al., 2016). Os estudos relacionados a epigenética tem propiciado o desenvolvimento de metodologias que identificam regiões que são metiladas ao longo de todo o desenvolvimento de vida do organismo. Nesse intuito, diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para análises de fatores epigenéticos presentes em indivíduos eucariotos, e tomando como ponto de análise o mecanismo de metilação do DNA pode-se destacar a Cromatografia Líquida em

Alta Eficiência (CLAE) (Figura. 4).

Tabela 1. Variação nas porcentagens de metilação em diferentes espécies e tecidos de plantas

| Espécie | Tecido | % aproximada de metilação no contexto CG | Autor, ano |
|-----------------------------------|------------------|--|--------------------------|
| <i>Gossypium hirsutum</i> L | Cotilédone | 12% | YUN-LEI et al. 2010 |
| <i>Acacia mangium</i> | Meristema apical | 21% | BAURENS et al, 2004 |
| <i>Zea mays</i> | Semente | 80% | LU et al, 2015 |
| <i>Manihot esculenta</i> Crantz | Folha | 58% | WANG et al. 2015 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Folha | 24% | COKUS et al, 2008 |
| <i>Triticosecale rimpau</i> Wittm | Folha | 24% | MACHCZYNSKA et al., 2014 |



Figura 4. Equipamento de Cromatografia Líquida em Alta Eficiência

A análise realizada por meio da CLAE possibilita um resultado rápido relacionado a ocorrência de metilação no conjunto gênico, ou seja, uma análise ampla e geral do grupo químico metil presente na base citosina no DNA. Com isso, a partir dos resultados apresentados ela propicia subsídios para a utilização

de outras metodologias que visam a análise quanto ao nível de metilação do DNA em sequências específicas dispostas no genoma.

Por ser um tipo de cromatografia, a CLAE consegue fazer a separação de compostos e determinar a quantidade de metilação, de citosina metilada presente na molécula de DNA, sendo esta detectada por luz ultravioleta (CHEN, 2013). O DNA a ser utilizado na CLAE deve sofrer uma hidrólise química inicial da cadeia para a formação de desoxinucleosídeos presentes no genoma do organismo para posterior quantificação do composto em análise.

A quantificação do DNA genômico ocorre relacionando a absorvância dos compostos – citosina e 5-metilcitosina com padrões externos de concentração conhecida (RODRIGUEZ et al., 2012; FRAGA & ESTELLER, 2002). Dessa forma é possível saber quanto de citosina metilada encontra-se no genoma de determinado indivíduo.

Uma das metodologias existentes de análise da citosina metilada e não metilada por CLAE consiste, primeiramente, na obtenção de cerca de 30 µg de DNA extraído das folhas no qual é adicionado água para perfazer um total de 100 µL de solução. A hidrólise ácida do DNA obtido é realizada adicionando 50 µL de ácido perclórico 70% (v/v) com aquecimento à 100 °C em banho-maria por 60 minutos. Posteriormente, o pH é ajustado (3 – 5) e o sistema centrifugado à 12000 rpm por 10 minutos (Chen et al., 2013). O sobrenadante é filtrado em membrana PTFE 0,22 µm para ser analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Figura 5).

A análise cromatográfica é realizada utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um detector de arranjo de fotodiodo, coluna de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm d. i., 5 µm de tamanho de partícula). A fase móvel opera em forma isocrática e é constituída de solução aquosa de KH_2PO_4 50 mmol L^{-1} com pH 5,8 e fluxo de 0,5 mL min^{-1} . O comprimento de onda utilizado é de 285 nm (Chen et al., 2013). Os tempos de retenção (tR) da Citosina e 5-metilcitosina, ou seja, os sinais referentes a estes compostos (picos) são detectados em torno de 5,5 minutos e 8,8 minutos de tempo de análise, respectivamente, e são apresentados em um cromatograma (Figura 6).

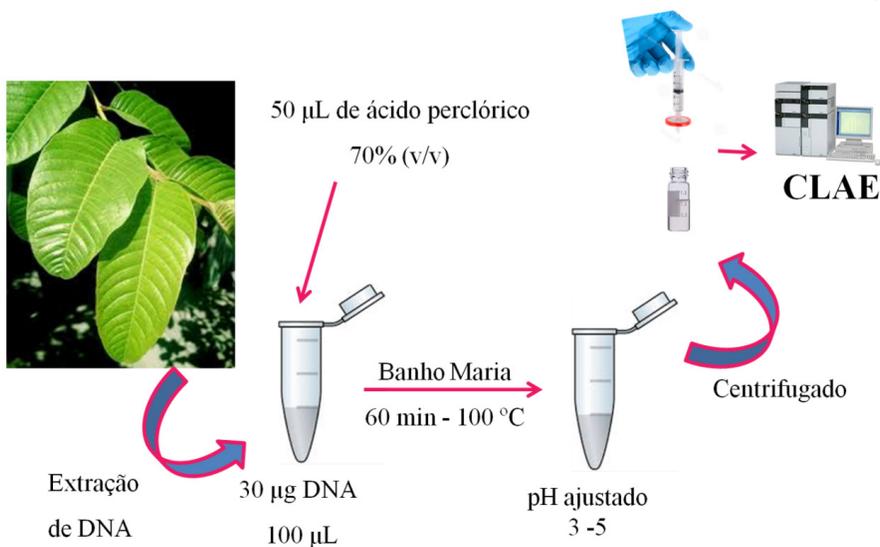


Figura 5. Esquema da metodologia para o estudo de metilação em plantas por CLAE

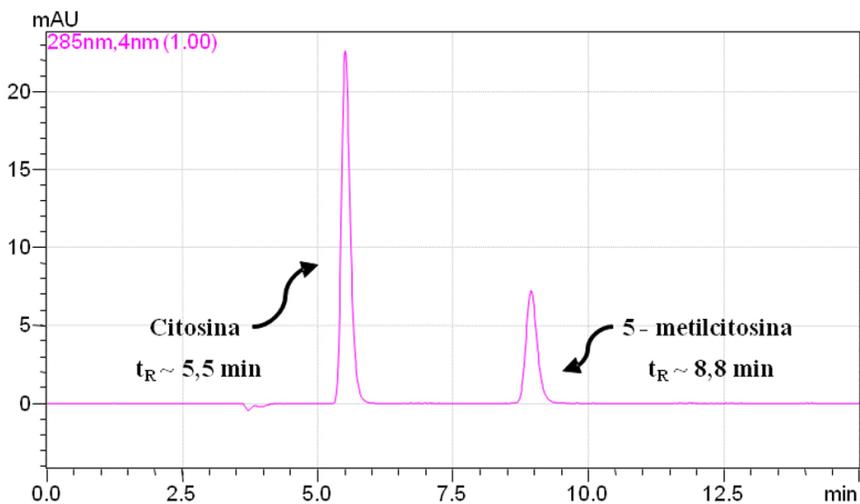


Figura 6. Cromatograma de CLAE para os padrões de Citosina e 5-metilcitosina.

A quantificação da citosina e da 5-metilcitosina ocorre relacionando a absorvância dos compostos com padrões externos de concentração conhecida (RODRIGUEZ et al., 2012; FRAGA & ESTELLER, 2002). Para isso são preparadas soluções padrão estoque de cada nucleosídeo e estas são diluídas para obter-se diferentes concentrações crescentes. Estas soluções diluídas são analisadas pelo sistema cromatográfico e é construída uma curva de calibração de resposta do equipamento (Área do pico) versus concentração (Figura 7). A partir da curva obtida pelos padrões diluídos, determinam-se as concentrações de cada composto em cada amostra.

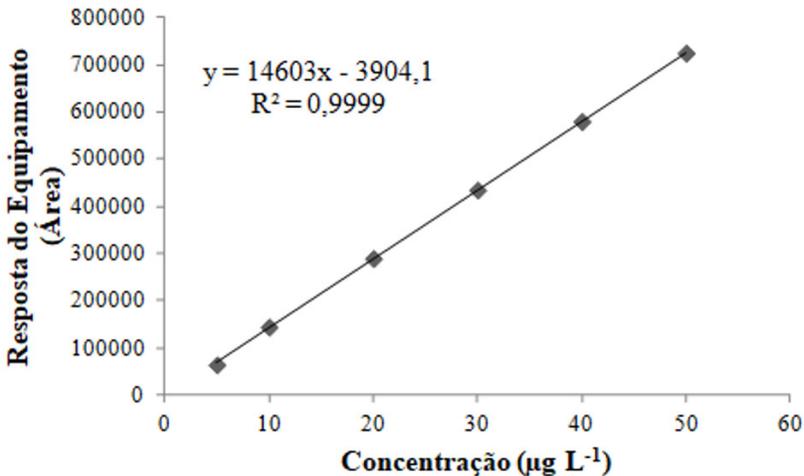


Figura 7. Curva de calibração – Área do pico x Concentração

Para saber quanto de citosina metilada encontra-se no genoma de determinado indivíduo é realizado o cálculo da porcentagem de 5-metilcitosina no DNA de acordo com a equação:

$$\% (5 - mC) = \frac{5 - mC}{C + 5 - mC} \times 100$$

onde 5 – mC é a concentração de 5-metilcitosina e C é a concentração de citosina.

O nível de metilação obtido após a análise reflete em especial nas mudanças ambientais que atuam diretamente no desenvolvimento das plantas e dessa forma incidem na produção, aparecimento de doenças e na qualidade. Tais mudanças, são marcadas por fatores abióticos como atuação de patógenos e plantas competidoras e por fatores bióticos associados as relações no meio ambiente, a exemplo da luz, temperatura, ocorrência de chuva e ação de gases que compõem o ecossistema. Ambos os fatores incidem na manifestação da metilação do DNA e por isso esse mecanismo é resultado de interferências ambientais que ocorrem em um determinado momento sob condições de estresses e resultam por intervir no processo de transcrição aumentando ou diminuindo a manifestação de genes essenciais as fases de desenvolvimento dos organismos vegetais.

4. ESTUDOS SOBRE A METILAÇÃO NO DNA A PARTIR DA ANÁLISE POR CLAE

Os estudos relacionados aos mecanismos epigenéticos, em especial a metilação do DNA, tem tido avanço significativo com o aprimoramento das metodologias. Os objetivos associados a esses estudos possibilitam entender como ocorre o desenvolvimento dos organismos e o seu comportamento a partir da interação dos fatores bióticos e abióticos.

Recentemente, diferentes estudos foram publicados visando uma investigação da ocorrência da metilação do DNA sob vários tecidos em organismos vegetais a partir da sua análise por meio da utilização da CLAE (Tabela 02).

Tabela 2. Estudos realizados sobre metilação do DNA em plantas a partir da metodologia por CLAE

| Espécie | Autores | Estudo | Objetivo | Ano e revista |
|-----------------------------|---|---|--|---|
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | B. Arıkan, S. Özden, N. Turgut-Kara | Expressão gênica relacionada à metilação do DNA e resposta orfisiológica à estresses abióticos em <i>Arabidopsis thaliana</i> | Analisar as alterações morfológicas e fisiológicas após a aplicação de NaCl e ABA em <i>Arabidopsis</i> e calos, e investigar as diferenças nos padrões de metilação do DNA sob esses estressores abióticos. | 2018, Environmental and Experimental Botany |
| <i>Cattleya tigrina</i> | V. Almeida, H. P. F. Fraga, B. B. Navarro, M. P. Guerra, R. Pescador | Dinâmica na metilação global do DNA e níveis de poliaminas endógenas durante a indução de corpos tipo protocormos de <i>Cattleya tigrina</i> A. Richard | Avaliar as características morfológicas, os níveis globais de metilação do DNA e as poliaminas livres durante a indução de corpos de protocormos de <i>C. tigrina</i> . | 2017, Acta Scientiarum. Biological Sciences |
| <i>Oryza sativa</i> | Q. Chen, S. Tao, X. Bi, X. Xu, L. Wang, X. Li | Níveis totais na metilação do DNA em plantas com base na análise por HPLC | Identificar componentes em análise por HPLC e oferecer uma referência para a análise precisa da metilação no DNA em plantas. | 2013, American Journal of Molecular Biology |

(Continua...)

Tabela 2. Estudos realizados sobre metilação do DNA em plantas a partir da metodologia por CLAE (Continuação)

| Espécie | Autores | Estudo | Objetivo | Ano e revista |
|------------------------------|-------------------|--|---|----------------------|
| <i>Helleborus foetidus</i> L | C. Alonso, | Marcadores MSAP e | Analisar a relação entre os resultados | 2016, Molecular |
| | R. Pérez, P. | metilação global da | por meio MSAP e a porcentagem de | Ecology Resources |
| | Bazaga, M. | citossina em plantas: | metilação global da citossina no DNA | |
| | Medrano e C. | um levantamento | genômico obtido por análise de HPLC | |
| | M. Herrera | bibliográfico e análise comparativa para uma espécie silvestre | para o estudo de ecologia e evolução das populações de plantas naturais. | |
| <i>Dianthus broteri</i> | C. Alonso, | Contribuição epigenética | Analisar a metilação da citossina em | 2016, New |
| | F. Balao, P. | para o sucesso das | <i>Dianthus broteri</i> para descobrir se | Phytologist |
| | Bazaga e R. Pérez | liploidizações: variação na metilação global da citossina ao longo de uma série de ploidias em <i>Dianthus broteri</i> (Caryophyllaceae) | populações naturais com um número maior de conjuntos cromossômicos podem diferir quantitativamente no nível de metilação. | |

(Continua...)

Tabela 2. Estudos realizados sobre metilação do DNA em plantas a partir da metodologia por CLAE (Continuação)

| Espécie | Autores | Estudo | Objetivo | Ano e revista |
|-----------------------------|--|--|--|--------------------------|
| <i>Zea mays</i> | C. Li, C. Zhang, T. Rong, Y. Lu, J. Wang, H. Lan, M. Cao | Conhecimento sobre a interação mitocondrial-nuclear associada ao milho CMS no nível de metilação do DNA | Compreender a interação mitocondrial-nuclear, detectando e comparando alteração da metilação de mtDNA e nDNA nas linhas isonucleares aloplasmáticas e isoplasmáticas alonucleares por meio do HPLC e relacionar entre as alterações de metilação do DNA resultaram da interação mitocondrial-nuclear e da característica CMS no milho. | 2017, NRC Research Press |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | L. Yong-Villalobos, S. I. González-Morales, K. Wrobel, D. Gutiérrez-Alanis, S. A. Cervantes-Peréz, C. Hayano-Kanashiro, A. Oropeza-Aburto, A. Cruz-Ramírez, Martínez, L. Herrera-Estrella. | Análise de metiloma revela um importante papel para alterações epigenéticas na regulação da resposta à inanição de fosfato em <i>Arabidopsis</i> | Como se dá a ocorrência da metilação do DNA expostas sob baixa concentração de fosfato | 2015, PNAS |

(Continua...)

Tabela 2. Estudos realizados sobre metilação do DNA em plantas a partir da metodologia por CLAE (Continuação)

| Espécie | Autores | Estudo | Objetivo | Ano e revista |
|-----------------------------|---|--|---|----------------------|
| <i>Erodium cicutarium</i> | C. Alonso, M. Medrano, R. Pérez, P. Bazaga C. M. Herrera | Resposta Específica de Tecido à Desmetilação Experimental na Germinação de Sementes de <i>Erodium cicutarium</i> | Análise do impacto do tratamento com 5azaC na germinação de sementes em tamanho inicial de plântulas e no nível de metilação do DNA em folhas e raízes. | 2017, Epigenomes |
| <i>Gossypium hirsutum</i> L | K. Osabe, J. D. Clement, F. Bedon, F. A. Pettolino, L. Ziolkowski, D. J. Llewellyn, E. J. Finnegan, I. W. Wilson. | Alterações genéticas e de metilação do DNA em genótipos e tecidos de algodão (Gossypium) | Compreender o potencial da regulação da metilação do DNA para a diversidade fenotípica e o desenvolvimento das plantas de algodão, e poder investigar a mudança na metilação do DNA entre genótipos e tecidos de algodão. | 2014, PLOS ONE |

5. CONCLUSÃO

A importância dos estudos sobre os mecanismos epigenéticos do DNA com uma consolidação maior nas últimas décadas tem possibilitado compreender diversas questões que eram atribuídas unicamente a fatores genéticos. A metilação do DNA como o mecanismo que tem tido um destaque maior, demonstra que as interferências ambientais podem desencadear mudanças e essas serem refletidas nos caracteres fenotípicos, passando ao longo das gerações.

A metodologia por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma das técnicas utilizadas nos estudos epigenéticos e possibilita uma análise a nível global do DNA permitindo saber quanto de citosina, umas das bases que compõe a molécula de DNA, apresenta-se metilada no genoma da espécie em estudo. Essa metilação pode desencadear a ativação ou supressão de genes importantes e afetar todo o curso de vida. Esses resultados associados aos objetivos elencados na pesquisa possibilitam pressupor o antes e o depois do indivíduo e como a sua geração posterior podem se manter frente a esses mecanismos.

6. REFERÊNCIAS

ARIKAN, B.; SIBEL ÖZDEN, S.; NESLIHAN TURGUT-KARA, N. T. DNA methylation related gene expression and morphophysiological response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, v. 149, p. 17 – 26, 2018

ALMEIDA, V.; FRAGA, H. P. F.; NAVARRO, B. B.; GUERRA, M. P.; PESCADOR, R. Dynamics in global DNA methylation and endogenous polyamine levels during protocorm-like bodies induction of *Cattleya tigrina* A. Richard. *Acta Scientiarum*, v. 39, n. 4, p. 497-505, 2017.

ALONSO, C.; BALAO, F.; BAZAGA, P.; PÉREZ, R. Epigenetic contribution to successful polyploidizations: variation in global cytosine methylation along an extensive ploidy series in *Dianthus broteri* (Caryophyllaceae). *New Phytologist*, v. 2012, p. 571 – 576, 2016.

ALONSO, C.; MEDRANO, M.; PÉREZ, R.; BAZAGA, P.; HERRERA, C. M. Tissue-Specific Response to Experimental Demethylation at Seed Germination in

the Non-Model Herb *Erodium cicutarium*. Epigenomes, v. 1, n. 16, p. 1 – 11, 2017.

ALONSO, C.; PÉREZ, R.; BAZAGA, P.; MEDRANO, M.; HERRERA, C. M. MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild-growing species. Molecular Ecology Resources, v. 16, p. 80 – 90, 2016.

ASENSI-FABADO, M. A, AMTMANN, A.; PERRELLA, G. Plant responses to abiotic stress: The chromatin context of transcriptional regulation. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1860, n. 1, p. 106 – 122, 2016.

BANERJEE, A.; ROYCHOUDHURY, A. The gymnastics of epigenomics in rice. Plant Cell Reports, v. 37, p. 25 – 49, 2017.

BOSSDORF, O.; RICHARDS, C. L.; PIGLIUCCI, M. Epigenetics for ecologists. Ecology Letters, v. 11, p. 106 – 115, 2008.

BAURENS, F. C.; NICOLLEAU, J.; LEGAVRE, T.; VERDEIL, J. L.; MONTEUUIS, O. Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated in vitro with reference to leaf morphology as a phase change marker. Tree Physiology, v. 24, n. 1, p. 401 – 407, 2004.

BAULCOMBE, D.C. DEAN, C. Epigenetic regulation in plant responses to the environment. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 6, p. 1 – 20, 2014.

CAMPOS-RIVERO, G.; OSORIO-MONTALVO, P.; SÁNCHEZ-BORGES, R.; US-CAMAS, R.; DUARTE-AKÉ, F.; DE-LA-PEÑA, C. Plant Hormone Signaling in Flowering: An Epigenetic Point of View. Journal of Plant Physiology, v. 214, p. 16 – 27, 2017.

CHEN, Q; TAO, S.; BI, X.; XU, X.; WANG, L.; LI, X. Research of total levels on DNA methylation in plant based on HPLC analysis. American Journal of Molecular Biology, 2013, 3, 98-101

CHEN, X.; HU, J.; ZHANG, H.; DING, Y. DNA methylation changes in photoperiod-thermo-sensitive male sterile rice PA64S under two different conditions. Gene, v. 537, n. 1, p. 143 – 148, 2014.

COKUS, S. J.; FENG, S.; ZHANG, X.; CHEN, Z.; MERRIMAN, B.; CHRISTIAN D. HAUDENSCHILD, C. D.; PRADHAN, S.; STANLEY F. NELSON S. F.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S. E. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. Nature, v. 452, p. 215

– 219, 2008.

COSTA, E. B. O.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 34, n. 2, p. 125-136, 2013.

ELHAMAMSY, A. R. DNA methylation dynamics in plants and mammals: overview of regulation and dysregulation. *Cell Biochemistry & Function*, v. 34, n. 5, p. 289 – 298, 2016.

FRAGA, M. F.; ESTELLER, M. DNA Methylation: A Profile of Methods and Applications. *BioTechniques*, v. 33, p. 632 – 649, 2002.

HASBÚN, R.; ITURRA, C.; BRAVO, S.; REBOLLEDO-JARAMILLO, B.; VALLEDOR, L. Differential Methylation of Genomic Regions Associated with Heteroblasty Detected by M&M Algorithm in the Nonmodel Species *Eucalyptus globulus* Labill. *International Journal of Genomics*, v. 2016, p. 1 – 7, 2016.

INGLIS, P. W.; SILVA, J. P.; PAPPAS, M. C. R.; GRATTAPAGLIA, D. Implantação de Metodologia MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) para Análise Global de Diversidade Epigenética. *Comunicado Técnico - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, v. 1, p. 1 – 9, 2016.

JÖRN LÄMKE, J.; BÄURLE, I. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biology*, v. 18, n. 124, p. 1 – 11, 2017.

LI, C.; ZHANG, C.; RONG, T.; LU, Y.; WANG, J.; LAN, H.; CAO, M. Insight into the maize CMS-associated mitochondrial–nuclear interaction at the DNA methylation level. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 97, p. 665–673, 2017.

LU, X; WANG, W.; REN, W.; CHAI, Z.; GUO, W.; CHEN, R.; WANG, L.; ZHAO, J.; LANG, Z.; FAN, Y.; ZHAO, J.; ZHANG, C. Genome-Wide Epigenetic Regulation of Gene Transcription in Maize Seeds. *PLOS ONE*, v. 10, p. 1 – 20, 2015.

MACHCZYNSKA, J.; ORŁOWSKA, R.; MANKOWSKI, D. R.; ZIMNY, J.; BEDNAREK, P. T. DNA methylation changes in triticale due to in vitro culture plant regeneration and consecutive reproduction. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 119, n. 2, p. 289 – 299, 2014.

MASUELLI, R. W.; MARFIL, C. F. Variabilidad epigenética en plantas y evolución. *Journal of Basic & Applied Genetics*, v. 22, n. 1, p. 1 – 8, 2011.

MASTAN, S. G.; RATHORE, M. S.; BHATT, V. D.; YADAV, P.; CHIKARA, J. Assessment of changes in DNA methylation by methylation-sensitive amplification polymorphism in *Jatropha curcas* L. subjected to salinity stress. *Gene*, v. 508, p. 125 - 129, 2012.

OSABE, K.; CLEMENT, J. D.; BEDON, F.; PETTOLINO, F. A.; ZIOLKOWSKI, L.; LLEWELLYN, D. J.; FINNEGAN, E. J.; WILSON, I. W.; Genetic and DNA methylation changes in cotton (*Gossypium*) genotypes and tissues. *PLOS ONE*, v. 9, n. 1, p. 1 – 11, 2014.

QIANG CHEN, Q.; TAO, S.; BI, X.; XIN XU, X.; WANG, L.; LI, X. Research of total levels on DNA methylation in plant based on HPLC analysis. *American Journal of Molecular Biology*, v.3, p. 98-101, 2013.

RODRÍGUEZ, J. L.; PASCUAL, J.; VIEJO, M.; VALLEDOR, L.; MEIJÓN, M.; HASBÚN, R.; YREI, N. Y.; SANTAMARÍA, M. E.; PÉREZ, M.; FRAGA, M. F.; BERDASCO, M.; FERNÁNDEZ, R. R.; CAÑAL, M.J. Basic Procedures for Epigenetic Analysis in Plant Cell and Tissue Culture. In: Loyola-Vargas, V.M.; Ochoa-Alejo, N. (eds.), *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*, v. 877, p. 325 – 341, 2012.

SANTAMARIA, M. E.; RODRÍGUEZ, R.; CAÑAL, M. J.; TOOROP, P. E. Transcriptome analysis of chestnut (*Castanea sativa*) tree buds suggests a putative role for epigenetic control of bud dormancy. *Annals of Botany*, v. 108, p. 485 – 498, 2011.

SANTOS, R. S. Regulação Transcricional e Epigenética de *ERFs* em Arroz Sob Estresse Abiótico. Pelotas, 2012. 98f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

VELÁZQUEZ, M. V. G. Metilación del ADN vegetal, principal mecanismo epigenético en plantas. *Vidsupra visión científica*, v. 7, n. 1, p. 1 – 5, 2015.

VIDAKI, A.; DANIEL, B.; COURT, D. S. Forensic DNA methylation profiling - Potential opportunities and challenges. *Forensic Science International: Genetic*, v, 7, n. 5, p. 499–507, 2013.

YUN-LEI, Z.; SHU-XUN, Y.; WU-WEI, Y.; HONG-MEI, W.; JUN-JUAN, W.; BAO-XING, F. Study on DNA cytosine methylation of cotton (*Gossypium*

hirsutum L.) genome and its implication for salt tolerance. *Agricultural Sciences in China*, v. 9, n. 6, p. 783 – 791, 2010.

YONG-VILLALOBOS, L. GONZÁLEZ-MORALES, S. I.; WROBEL, K.; GUTIÉRREZ-ALANIS, D.; CERVANTES-PERÉZ, S. A.; HAYANO-KANASHIRO, C.; OROPEZA-ABURTO, A.; CRUZ-RAMÍREZ, A.; MARTÍNEZ, O.; HERRERA-ESTRELLA, L. Methylome analysis reveals an important role for epigenetic changes in the regulation of the *Arabidopsis* response to phosphate starvation. *PNAS*, v. 14, p. 293–302, 2015.

FILOGEOGRAFIA MOLECULAR E O MELHORAENTO GENÉTICO DE PLANTAS

Pedro Henrique Dias dos Santos

Beatriz Murizini Carvalho

1. FILOGEOGRAFIA MOLECULAR

A filogeografia pode ser definida como uma ciência onde o objetivo é elucidar os princípios e processos que governam as distribuições geográficas de linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies muito próximas entre si (Awise, 2000). Esta ciência constitui a genealogia de população e genes, que revelam como o padrão da distribuição presente tem sido moldado por eventos geológicos ou outros fatores (Huang et al., 2004).

A filogeografia, é considerada uma ciência multidisciplinar, a qual integra a genética molecular, genética de populações, etologia, demografia, filogenia, paleontologia e geologia (Awise, 2000). O caráter multidisciplinar da filogeografia, em particular das áreas do conhecimento envolvidas, faz com que estes tipos de estudo criem um link entre processos micro e macro evolutivos. Apesar de historicamente os processos micro e macro evolutivos serem tratados pelos cientistas de forma separada, estes processos nunca estiveram e nem ocorreram de forma separada. Tanto a genética de populações quanto a filogenia (mais precisamente a sistemática), abordam as relações de ancestralidade uma vez que é justamente através das relações genealógicas que os genes são transmitidos aos descendentes, conferindo assim a hereditariedade (premissa da genética de populações) que, por sua vez, estarão embutidos na filogenia (sistemática). Os estudos filogeográficos unem micro e macro evolução justamente por utilizar ambas as abordagens e premissas em uma só análise (Martins & Domingues 2011).

Os estudos filogeográficos, assim como os filogenéticos envolvem, em sua maioria, eventos que ocorreram num passado distante e, portanto, é impossível checar se as conclusões obtidas são de fato verdadeiras, estas características

possuem sem sombra de dúvidas grande afinidade com as ciências históricas. A afinidade entre estas duas ciências é tão forte que é possível traçar um paralelo entre as duas.

Ao se contar uma história, pressupondo que não esteja num passado muito recente, o historiador encontrará barreiras como a ausência de testemunhas vivas e falta de documentos comprobatórios. Quanto mais distante no tempo a história (Evento) estiver, menor será o número de documentos disponíveis para a reconstrução dos fatos. Com isso, ao reconstruir uma história de um passado distante, o historiador só poderá contar com os documentos que restaram, podendo ser adquiridos em bibliotecas, pinacotecas, escavações arqueológicas, entre outras.

A partir dos documentos que encontra, o historiador pode tentar inferir a ocorrência dos fatos, ou reconstruir algum evento histórico. Esta inferência é baseada levando em conta todos os documentos disponíveis. Depois de reconstruído o evento, novos documentos podem surgir. A cada novo documento encontrado, a história poderá ser alterada pois é possível que um novo documento derrube a teoria inicial, e neste caso será necessário reconstruir novamente o evento, ou que apoie ainda mais o evento histórico inferido anteriormente. Em resumo é um trabalho dependente da inclusão de novas evidências.

Os estudos filogeográficos seguem a mesma linha raciocínio, pois tratam de eventos que ocorreram há milhares/milhões de anos, porém se utiliza de outras ferramentas (Figura 1). Com isso, não há testemunhas vivas, alguns documentos “antigos” escritos podem ser encontrados no caso de animais, plantas e fitopatógenos, muitos deles originados por mercenários e amantes das ciências naturais (Mussi-Dias, 2011), os quais podem contribuir para estudos pontuais, porém, em sua maioria o estudo filogeográfico molecular utiliza como documentos somente as macromoléculas para contar a história evolutiva.

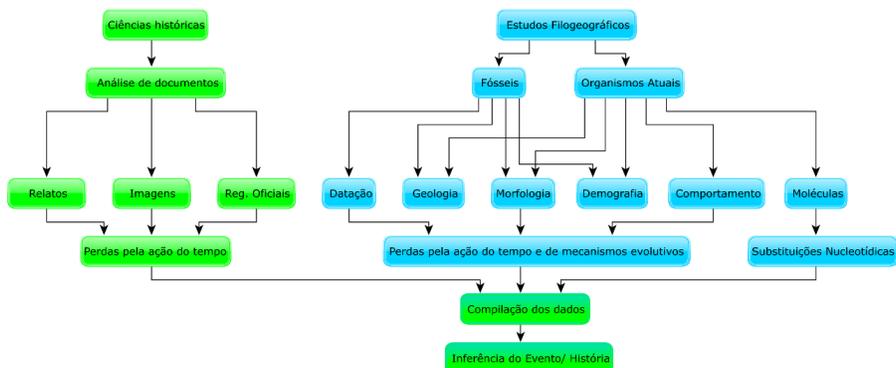


Figura 1. Representação da similaridade entre ciências históricas e estudos filogeográficos

Os documentos que um cientista que utiliza a abordagem da filogeografia molecular são as moléculas que em geral são seqüências de DNA ou proteínas. A utilização de moléculas no estudo filogeográfico apresenta algumas vantagens em relação a utilização de caracteres morfológicos:

- Moléculas não sofrem necessariamente a ação do ambiente (Variação molecular é neutra);
- Mecanismos envolvidos na modificação do DNA são bem conhecidos e estudados:
 - Replicação do DNA;
 - Mutações;
 - Mecanismos de reparo
- É possível utilizar análises estatísticas e probabilísticas mais robustas.

2. ABORDAGEM FILOGEOGRÁFICA

A abordagem filogeográfica é composta pela sobreposição de uma genealogia em um mapa de distribuição das amostras analisadas (Figura 2) com o intuito de encontrar (ou não) concordância entre as linhagens e sua distribuição nas localidades ao longo do tempo (Martins & Domingues 2011).

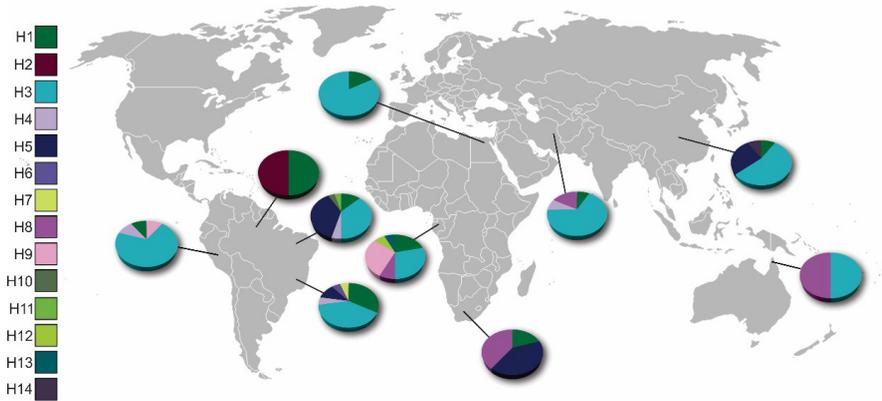


Figura 2. Abordagem filogeográfica representando distribuição ao longo do globo das amostras analisadas. As áreas dos gráficos de setores correspondem à frequência haplotípica nas localidades. *Adaptado de Santos et al. (2017).*

As espécies podem apresentar três formas distintas de distribuição geográfica, *endêmica*, *cosmopolita* e *disjunta*, de acordo com cada uma delas a abordagem filogenética assumirá uma linha de raciocínio diferente em relação à hipótese criada pelo pesquisador. As distribuições *endêmicas* podem ter uma abrangência territorial com amplitudes variadas (mais ou menos distribuídas). Em casos extremos onde espécies são encontradas em todo o globo, denomina-se estas distribuições de *cosmopolitas* (Ridley, 2006). Alguns fitopatógenos como por exemplo o famoso fungo *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary que infecta solanáceas é encontrado em todos os continentes, exceto em locais extremos como nas zonas polares; em uma definição estrita ele não seria considerado cosmopolita, mas em geral o termo se enquadra menos estritamente e considera-se *P. infestans* cosmopolita. Espécies que não se restringem a uma só área, mas apresentam-se distribuídas em mais de uma região, com vazios entre elas são conhecidas como *disjuntas*. Os estudos filogeográficos vão além da distribuição das espécies, e se estendem também às distribuições dos táxons mais elevados e, assim como ocorre com as diferentes formas de distribuição, ao se inferir sobre diferentes níveis na classificação, são apropriados diferentes processos explicativos. Os movimentos individuais de curta duração tendem a

exercer maior influência na distribuição das populações e espécies, enquanto processos geológicos, de ação lenta, exercem maior influência em táxons mais elevados (Ridley, 2006).

As premissas utilizadas por Avise et al., (1987) ainda são atuais e amplamente utilizadas desde estudos mais simples até estudos mais complexos envolvendo genômica. Os estudos filogeográficos se baseiam em três principais premissas, a primeira assume que a maior parte das espécies é formada de populações geograficamente estruturadas cujos membros ocupam ramos distintos em uma genealogia; a segunda sustenta a hipótese que espécies com pouca ou nenhuma estrutura filogeográfica possuem hábitos que incluem dispersão de indivíduos ou grupos e ocupam áreas onde não existem barreiras físicas que impeçam o fluxo gênico; e a terceira que propõe que grupos intraespecíficos monofiléticos separados por grandes distâncias genéticas surgem de persistentes barreiras ao fluxo gênico.

As genealogias utilizadas nas abordagens são formadas por redes de haplótipos. O termo haplótipo é definido como sendo um dos vários possíveis padrões de sequência de um segmento de DNA, que difere de outros padrões alternativos por meio de mutações na sua sequência. Em estudos de filogeografia, o haplótipo é a unidade básica de análise. Templeton et al. (1992) propuseram a construção de redes de haplótipos usando o método da parcimônia como um modelo local finito da evolução do DNA. Este método além de estimar a rede de haplótipos, permite também estimar o número máximo de conexões parcimoniosas entre pares de sequência.

É esperado que haplótipos ancestrais e haplótipos descendentes estejam presentes em uma mesma rede, visto que seria extremamente improvável que todos os indivíduos do haplótipo ancestral tenham sofrido a mesma mutação (Jorge et al., 2015; Santos et al., 2017). Na construção da rede, os haplótipos de origem mais recente se alocam nas extremidades, enquanto os haplótipos ancestrais serão encontrados no interior central da rede (Figura 3). Em relação à distribuição geográfica, é esperado que haplótipos ancestrais se encontrem geograficamente melhor distribuídos, enquanto haplótipos recentes tenham distribuição mais restrita, visto que não teriam tido tempo suficiente para maior dispersão.

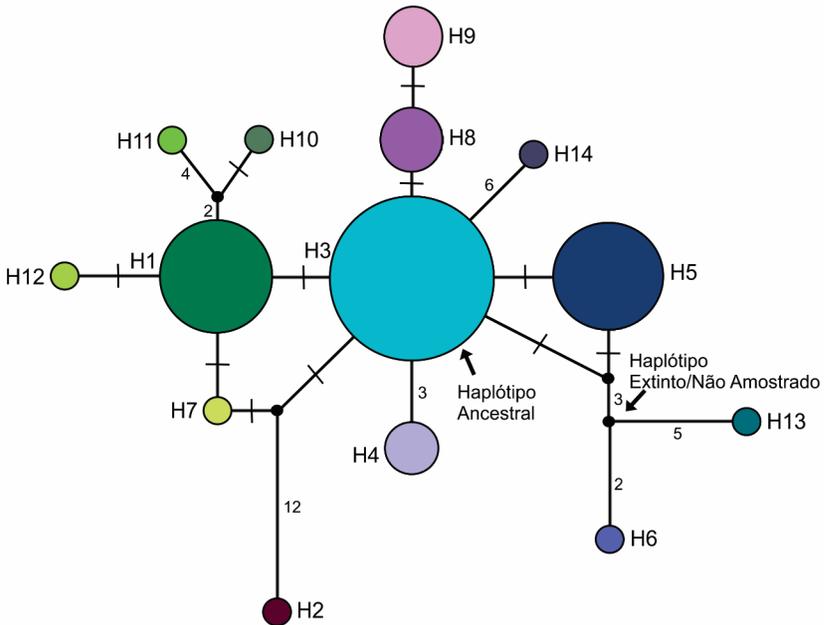


Figura 3. Exemplo de uma rede de haplótipos onde os haplótipos estão distinguidos por cores e o tamanho dos círculos estão relacionados com a frequência haplotípica. Círculos menores em preto representam haplótipos não amostrados ou extintos. Os números nos ramos indicam o número de eventos mutacionais e as barras individuais que cruzam os ramos representam um único evento mutacional. *Adaptado de Santos et al. (2017).*

A rede de haplótipos representa as conexões genealógicas entre os haplótipos. Em uma investigação que aborde este tipo de estudo, dificilmente se amostrará todos haplótipos, uma vez que isso vá depender de fatores como dificuldade na amostragem, escassez de espécies, condições das localidades entre outras. Na rede, os haplótipos não amostrados e haplótipos já extintos são representados por nós (Figura 3) e são deduzidos entre dois pares de sequências diferentes mais próximos da rede que diferem entre si por dois ou mais eventos de mutação (Templeton et al. 1992).

A Teoria da Coalescência (Templeton et al., 1992; Avise, 2000), é um método matemático oriundo da genética de populações que permite a inferência da história demográfica da espécie, baseando-se em um ponto no tempo onde linhagens ou alelos possuem um ancestral comum no passado. Esta teoria, muito utilizada nas análises filogeográficas, proporcionou o desenvolvimento de algoritmos estatísticos que se utilizam dados populacionais (Knowles, 2009), os quais geram resultados onde fatores históricos demográficos (médias e variâncias dos descendentes por família) podem exercer influência na genealogia dos genes de maneira estatisticamente previsível. Em outras palavras, em populações com tamanhos efetivos maiores, é esperado que os pontos de coalescência na genealogia dos genes sejam mais antigos. Assim, as topologias nas árvores de genes podem ser interpretadas sob esta teoria, auxiliando a revelar a história demográfica de uma população (Avise, 2000).

3. ESTUDOS FILOGEOGRÁFICOS

A filogeografia vem fazendo parte de alguns trabalhos, seja para fornecer suporte para decisões conservacionistas, seja para confirmar a divisão de gênero das espécies, verificar as relações filogenéticas e reconstruir a história dos possíveis eventos de dispersão, ou até mesmo para inferir rotas de colonização das espécies.

A região Neotropical, apesar de conter os maiores índices de biodiversidade do mundo, ainda é uma das regiões menos estudadas em relação aos estudos de diversidade e principalmente filogeográficos (Beheregaray, 2008). Apesar do número de estudos filogeográficos terem aumentado, ainda existem poucos estudos, principalmente nas ciências agrárias (plantas de cultivo e fitopatógenos por exemplo).

Uma análise filogeográfica bem estruturada (amostragem apropriada de indivíduos e genes) pode elucidar hipóteses biogeográficas, compreender a evolução de populações isoladas reprodutivamente, inferir processos a respeito da origem (entrada de patógenos em um país por exemplo), distribuição e manutenção da biodiversidade e fazer inferências sobre a influência de mudanças bióticas ocorridas em uma população e na estrutura e diversidade genética dessas populações (Beheregaray, 2008). Desta forma, estudos filogeográficos podem

contribuir para o entendimento sobre diversos campos da ciência como especiação e zonas híbridas (Singhal e Moritz, Swenson e Howard, 2005; Hewitt, 2011), ecologia (Rissler et al., 2007; Rubinoff, 2008), biogeografia histórica (Avice 2000; Arbogast & Kenagy 2001), paleoecologia (Baron et al., 2017), fitopatologia (Freire & Oliveira 2008; Lourenço et al. 2009; Santos et al. 2017), melhoramento genético (Carvalho & Renner, 2012) entre outros.

Dentre os diferentes trabalhos citados acima, o estudo de Carvalho e Renner (2012) merece destaque pois seus resultados obtidos com o uso de estudos filogeográficos contribuíram significativamente com o estudo e direcionamento do melhoramento genético do mamoeiro. Os autores utilizaram caracteres de DNA nuclear e plastidial para realizar um estudo sobre as relações genealógicas e a distribuição do mamoeiro ao redor do mundo. Em seus resultados, os autores relataram que a filogenia completa da família Caricaceae identificou que os parentes mais próximos do mamão são três ervas perenes (*Jarilla chocola*, *J. heterophylla* e *J. nana*) e uma pequena árvore que apresenta tronco fino e macio, *Horovitzia cnidoscoloides*, todas restritas à região do norte do México, a qual coincide com a distribuição da forma silvestre de *Carica papaya* e, portanto, foi apontado pelos autores como lugar de origem mais plausível. A história biogeográfica da família Caricaceae envolveu longa dispersão da África para a América Central (35 Milhões de anos) e expansão de faixa através de ilha pulando do México para a Colômbia antes do fechamento completo da ponte terrestre panamenha. O estudo mostra que a divergência ecológica nos tipos de habitats, mas também a especiação alopátrica clássica, foram fatores importantes na condução da diversificação de Caricaceae.

O estudo de Carvalho & Renner (2012) é um exemplo claro e que resume uma das grandes contribuições deste tipo de abordagem para as ciências agrícolas. Seus resultados evidenciaram a importância de avaliar as culturas em uma perspectiva filogeográfica, a qual além de inferências sobre a origem das culturas sem registros arqueológicos (como o mamão), há também implicações para o melhoramento de plantas. Durante décadas, melhoristas tentaram em vão cruzar o mamão com espécies de um grupo filogeneticamente distante (*Vasconcellea*), enquanto que a partir do estudo dos autores os programas de melhoramento podem incluir comparações genéticas com *Jarilla* e *Horovitzia*.

As contribuições de estudos filogeográficos em programas de melhoramento

podem trazer novas abordagens e contribuir os com estudos em fase de implementação e os em curso. O desenvolvimento de técnicas moleculares modernas e softwares cada vez mais eficientes que vão desde análises menos complexas como a median joining (Bandelt et al., 1999), até análises robustas de Agrupamento Filogeográfico e Ecológico baseados em inferências bayesianas (BPEC) (Manolopoulou et al., 2016) poderão contribuir com o aumento e interesse de estudos filogeográficos, contribuindo de maneira intensiva para formação de novos grupos de pesquisa e aprimoramento de grupos já consolidados.

4. REFERÊNCIAS

CARVALHO, F. A.; Renner, S. S. A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 65, n.1, p. 46–53, 2012.

ARBOGAST, B. S.; KENAGY, G. J. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, v. 28, p. 819–825, 2001.

AVISE, J. C. *Phylogeography : the history and formation of species*. Harvard University Press, 2000. 447p.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 18, p. 489–522, 1987.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, v. 16, n.1, p. 37–48, 1999.

BARON, M. G.; NORMAN, D. B.; BARRETT, P. M. A new hypothesis of dinosaur relationships and early dinosaur evolution. *Nature*, v. 543, p. 501–506, 2017.

BEHEREGARAY, L. B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, 17: p. 3754–3774 , 2008.

FREIRE, M.; OLIVEIRA, L. Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, p. 920–931, 2008.

HEWITT, G. M. Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica*, v. 139, p. 617–638, 2011.

HUANG, S. F.; HWANG, S. Y.; WANG, J. C.; LIN, T. P. Phylogeography of *Trochodendron aralioides* (Trochodendraceae) in Taiwan and its adjacent areas. *Journal of Biogeography*, v. 31, p. 1251–1259, 2004.

JORGE, V. R.; SILVA, M. R.; GUILLIN, E. A.; FREIRE, M. C. M.; SCHUSTER, I.; ALMEIDA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O. The origin and genetic diversity of the causal agent of Asian soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi*, in South America. *Plant Pathology*, v. 64, p. 729–737, 2015.

KNOWLES, L. L. Statistical Phylogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 40, p. 593–612, 2009.

LOURENÇO, V.; MOYA, A.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F.; CARBONE, I.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Molecular Diversity and Evolutionary Processes of *Alternaria solani* in Brazil Inferred Using Genealogical and Coalescent Approaches. *Phytopathology*, v. 99, p. 765–774, 2009.

MANOLOPOULOU, I.; HILLE, A.; EMERSON, B. BPEC: An R Package for Bayesian Phylogeographic and Ecological Clustering. *Journal of Statistical Software*, 2016

MARTINS, F. M.; DOMINGUES, M. V. Filogeografia. *Revista da Biologia*, v. 7, p. 26–30, 2011.

MUSSI-DIAS, V. Fitopatologia no Estado do Rio de Janeiro: histórico, índice de doenças de plantas e 15 anos de atividades da Clínica Fitossanitária da UENF. Campos dos Goytacazes, 2011. 283 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes 2011.

RIDLEY, M. *Evolução*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 752p

RISSLER, L. J.; APODACA, J. J.; WEINS, J. Adding More Ecology into Species Delimitation: Ecological Niche Models and Phylogeography Help Define Cryptic Species in the Black Salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic Biology*, v. 56, n. 6, p. 924–942, 2007.

RUBINOFF, D. Phylogeography and ecology of an endemic radiation of Hawaiian aquatic case-bearing moths (Hyposmocoma: Cosmopterigidae). *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 363, p. 3459–3465, 2008.

SANTOS, P. H. D.; CARVALHO, B. M.; AGUIAR, K. P.; AREDES, F. A. S.; POLTRONIERI, T. P. S.; VIVAS, J. M. S.; MUSSI-DIAS, V.; BEZERRA, G. A.; PINHO, D. B.; PEREIRA, M. G.; SILVEIRA, S. F. Phylogeography and population structure analysis reveals diversity by mutations in *Lasiodiplodia theobromae* with distinct sources of selection. *Genetics and Molecular Research*, v. 16, p. 1–14, 2017.

SINGHAL, S.; MORITZ, C. Reproductive isolation between phylogeographic lineages scales with divergence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 280, n. 1772, p. 20132246-20132246, 2013.

SWENSON, N. G.; HOWARD, D. J. Clustering of Contact Zones, Hybrid Zones, and Phylogeographic Breaks in North America. *The American Naturalist*, v. 166, n. 5, p. 581–591, 2005.

TEMPLETON, A. R.; CRANDALL, K. A.; SING, C.F. Cladistic Analysis of Phenotypic Associations With Haplotypes Inferred From Restriction Endonuclease Mapping and DNA Sequence Data. 111. Cladogram Estimation. *Genetics*, v. 132, p. 619–633, 1992.

Capítulo 04

FISIONÔMICA E A RESISTÊNCIA DE PLANTAS A ESTRESSE BIÓTICOS

Paulo Cezar Cavatte

Leonardo Humberto Silva e Castro

Lindomar de Souza Machado

1. INTRODUÇÃO

Estresse em cultivos agrícolas é todo fator que afeta negativamente o desempenho das plantas, o que diminui a eficiência biológica e o potencial produtivo (BORÉM & RAMALHO, 2011). Existem diversos tipos de estresses, os quais são em grande parte responsáveis pela diferença entre o potencial de produção e a produtividade observada na lavoura. Dentre eles, o objeto de estudo do presente capítulo é o estresse de origem biótica ocasionado pelo ataque de fitopatógenos.

O trabalho conjunto entre melhoristas e fitopatologistas já é amplamente conhecido, visto que as pesquisas relacionadas ao controle genético de fitopatógenos passaram por grandes avanços nos últimos anos, uma vez que a resistência a doenças é um dos principais objetivos do melhoramento de plantas. Porém, a Fisiologia Vegetal é uma ciência que vem se integrando ao trabalho multidisciplinar desta linha de pesquisa, com vistas ao conhecimento fisiológico da interação patógeno-hospedeiro e na seleção fenotípica de genótipos superiores.

Nesta perspectiva, as novas técnicas de fenotipagem vem proporcionando avanços em plataformas, metodologias, automação, controle de condições de realização de experimentos, volume de dados coletados, softwares, precisão e acurácia, reprodutibilidade, complexidade e, de forma mais ampla, a escalabilidade, quando comparada ao uso de escalas diagramáticas (GIGLIOTI et al., 2015). Em relação à fisionômica, que nada mais é que a abordagem feita pela Fisiologia Vegetal dentro do conceito de fenotipagem em larga escala, os programas de melhoramento genético de plantas buscam inserir em espécies

cultivadas características fisiológicas que melhorem a eficiência fotossintética, principalmente sob condições estressantes. Porém, a avaliação deste parâmetro fisiológico requer uma análise precoce, rápida e em larga escala (CAVATTE et al., 2015).

Com o intuito de elucidar tecnologias oferecidas pela Fisiologia Vegetal, dentro da abordagem de fenotipagem em larga escala, neste capítulo será realizada uma abordagem teórica sobre o estresse ocasionado pelo ataque de fitopatógenos em espécies vegetais, e irá discorrer sobre algumas tecnologias disponíveis para a fenotipagem [clorofilômetros, fluorômetros, IRGA (*Infra-red Gas Analyzes*) e imagens espectroscópicas]. A fisionômica também engloba em seus estudos ferramentas da genética molecular, as quais não serão abordadas neste capítulo.

2. VISÃO HOLÍSTICA DE FISIOLOGIA VEGETAL, FITOPATOLOGIA, MELHORAMENTO GENÉTICO E BIOTECNOLOGIA

No quadro agrícola mundial são observadas diferentes causas de insucesso no cultivo de espécies vegetais. Dentre esses fatores, as doenças são um grande problema, em que, direta ou indiretamente, os patógenos podem acarretar danos desde o início do sistema produtivo até a colheita, bem como na armazenagem e distribuição do produto colhido ao consumidor final. A agronomia reúne várias ciências especializadas e, com vistas ao manejo de doenças, se torna importante integrar a Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Melhoramento Genético e a Biotecnologia.

Dentro da botânica, a Fisiologia Vegetal é a área que estuda o funcionamento das plantas, integrando estudos anatômicos e morfológicos, bem como de mecanismos bioquímicos, para promover uma análise dos processos funcionais que acontecem desde a germinação até o florescimento e a frutificação. A Fitopatologia é a ciência que tem como objeto de estudo as doenças de plantas, abrangendo todos os seus aspectos, desde a diagnose, sintomatologia, etiologia, epidemiologia, até o seu controle (BERGAMIN FILHO & KITAJIMA, 2011). A doença é resultante da interação entre os fatores hospedeiro-patógeno-ambiente, que tem como base o ciclo de vida do patógeno (AMORIM & PASCHOLATI, 2011).

Existem diversas definições para o termo doença, as quais foram se evoluindo

ao longo do tempo e dos avanços dos estudos fitopatológicos. A definição feita por Agrios (2005) conceitua doença como sendo o mau funcionamento de células e tecidos da espécie vegetal hospedeira, resultante da sua contínua irritação por um organismo fitopatogênico ou um fator ambiental que conduz ao desenvolvimento de sintomas. Esta é uma condição que envolve mudanças anormais na forma, fisiologia, integridade ou comportamento da planta, a qual poderá resultar em dano parcial ou a morte da planta ou de suas partes. Os fitopatógenos tem como principais alvos o metabolismo do carbono e os aparatos e produtos fotossintéticos das plantas, o que promove a diminuição da clorofila em tecidos doentes (GIGLIOTTI et al., 2015). Tal processo ocasiona um desbalanço na formação e no metabolismo das espécies reativas de oxigênio (EROs) (NEILL et al., 2002).

Tendo como base os processos fisiológicos vitais das plantas que podem sofrer interferências pelo ataque de fitopatógenos, McNew (1960) propôs uma classificação sistemática para as doenças de plantas por processos fisiológicos como acúmulo de nutrientes em órgãos de armazenamento para o desenvolvimento de tecidos embrionários; desenvolvimento de tecidos jovens às custas dos nutrientes armazenados; absorção de água e elementos minerais a partir de um substrato; transporte de água e elementos minerais através do sistema vascular; fotossíntese; e utilização, pela planta, das substâncias elaboradas através da fotossíntese. McNew (1960) também propôs as classificações das doenças como grupo I - Doenças que destroem os órgãos de armazenamento; grupo II - Doenças que causam danos em plântulas; grupo III - Doenças que danificam as raízes; grupo IV - Doenças que atacam o sistema vascular; grupo V - Doenças que interferem com a fotossíntese; e grupo VI - Doenças que alteram o aproveitamento das substâncias fotossintetizadas.

O objetivo prático mais importante da Fitopatologia é o controle das doenças de plantas, que é, sob uma ótica biológica, a diminuição na incidência ou severidade da doença (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1968). Dentre os métodos de controle de fitopatógenos, o controle genético empregando cultivares resistentes representa, de acordo com Camargo (2011), um pilar para o manejo de doenças de plantas, uma vez que se aplica aos cultivos em grandes áreas e por apresentar baixo impacto ao meio ambiente. Então, a Fitopatologia se integra ao Melhoramento Genético para desenvolver estudos relacionados à resistência a fitopatógenos, com

vistas ao desenvolvimento de cultivares resistentes. Nos últimos anos, com os avanços na ciência e tecnologia, uma nova ciência se integrou ao melhoramento genético, que possibilitou conhecer mais a fundo as alterações promovidas pelo ataque dos fitopatógenos nas plantas e os aspectos relacionados à resistência genética e a biotecnologia. Como citado anteriormente, o ataque de fitopatógenos ocasiona danos ao funcionamento de processos fisiológicos vitais das plantas. Então, a Fisiologia Vegetal se integra aos estudos da fitopatologia, Melhoramento Genético e Biotecnologia, de maneira holística, visando maximizar a eficiência e praticidade (Figura 1).



Figura 1. Visão holística para integrar a Fitopatologia, Melhoramento Genético, Biotecnologia e Fisiologia Vegetal no estudo do controle genético de doenças de plantas. Fonte: Os autores.

Os métodos fitopatológicos são empregados para gerar fenótipos a serem observados em condições naturais de epidemia ou por meio da inoculação artificial de patógenos em partes específicas das plantas. Durante a condução das populações segregantes pelos métodos de melhoramento genético, os mesmos são aplicados para identificar níveis de resistência dos genótipos. De acordo com

Jesus & Peres (2013), a Fisiologia Vegetal não é uma técnica, mas sim um corpo de conhecimentos, em que a “fisionômica” disponibiliza diversas técnicas *high-throughput* possibilitando aumentar e automatizar a visualização de fenótipos, e, em determinados casos, diminuir determinantes a genes, transcritos, proteínas e metabólitos. Essa abordagem da fenômica, ou fenotipagem de próxima geração, possibilita melhorar a análise de fenótipos, gerar ganhos conceituais e dar um novo direcionamento para a tomada de decisões em programas de melhoramento de plantas. Bock et al. (2010) acrescentam que algumas técnicas possibilitam também quantificar danos antes mesmo do aparecimento de sintomas visíveis.

3. ESTRESSE OCACIONADO PELO ATAQUE DE FITOPATÓGENOS

O ataque de fitopatógenos ocasiona uma série de alterações nas plantas, chamada de doença, o que leva a respostas genético-moleculares, fisiológicas e morfológicas. As plantas apresentam mecanismos de resposta aos diversos tipos de estresses, podendo eles serem bióticos, por meio do ataque de fitopatógenos, por exemplo, ou abióticos como os estresses ambientais. Esse conjunto de respostas são de interesse dos programas de melhoramento genético vegetal, devido a plasticidade presente, permitindo a planta contornar situações desfavoráveis. No caso da resistência a fitopatógenos, Parlevliet (1997) cita que a mesma é a habilidade da espécie hospedeira em causar dificuldades para o processo infeccioso desses organismos fitopatogênicos, em que esse conjunto de respostas estão diretamente envolvidos.

Portanto, respostas ao ataque de fitopatógenos promovem alterações no metabolismo da planta, como a síntese de proteínas de defesa (JONES & DANGL, 2006). O processo de resistência ao patógeno é iniciado nas proximidades da área infectada, dificultando a colonização do patógeno. Plantas com alta capacidade de reconhecimento ao patógeno respondem de forma mais rápida à invasão, desencadeando uma ou mais reações de defesa (RYAN, 2000).

As respostas de defesa da planta começam quando ocorre a percepção do estresse causado pelo fitopatógeno, sendo ativado por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*) localizados nas membranas celulares. Com o reconhecimento dos padrões moleculares associados aos

fitopatógenos (PAMPs, *Pathogen-associated molecular patterns*), inicia-se o tipo de resistência basal denominada imunidade desencadeada por padrão ou PAMP (PTI, *Pattern- ou PAMP-Triggered Immunity*), este mecanismo é considerado a primeira linha de imunidade inata em plantas (BOLLER & FELIX, 2009).

Alguns patógenos produzem moléculas efetoras capazes de eliminar a resistência basal do hospedeiro, tornando a planta suscetível ao ataque. Em algumas plantas consideradas resistentes, foi apresentada uma segunda linha de defesa ao patógeno com receptores citoplasmáticos (proteínas R) designada ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (DODDS & RATHJEN, 2010). A resposta de hipersensibilidade (RH), embora possa ser observada em PTI, ocorre principalmente em ETI o componente de resposta associado com a resistência de plantas hospedeiras.

Na resposta de hipersensibilidade, são verificados sintomas visuais nas folhas da planta devido à morte celular, formando-se lesões necróticas limitando a infecção do patógeno (MUR et al., 2008). Durante o processo de RH, ocorre o desencadeamento das vias de defesa por genes R como a geração de fluxo de íons cálcio nas células, ativação de cascata de sinalização por MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) que resultam em uma reprogramação transcricional, assim como a síntese de compostos antimicrobianos, formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (ON), acúmulo de superóxidos e peróxido de hidrogênio (DANGL & JONES, 2001).

Durante o processo da resposta de hipersensibilidade, alguns estudos verificaram que as sequências dos genes que conferem a resistência a alguns patógenos (vírus, bactérias e fungos), são sequências parecidas e com peptídeos com estruturas similares (KANAZIN et al., 1996), outro fato sugerido é que certas vias metabólicas são intensificadas com a detecção do patógeno. Rotas metabólicas promotoras do ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e do etileno (ET) passam a ativar fatores de transcrição de genes de defesa (AN & MOU, 2012).

Alguns estudos evidenciaram a interação do AS com as enzimas catalase (CAT) e peroxidase (POD), e em maiores concentrações de AS foram verificadas maior atividade das enzimas, assim como maiores concentrações de H₂O₂. Sendo apoiado por alguns pesquisadores que AS intensifica a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a resposta de hipersensibilidade (DURRANT &

DONG, 2004). Entretanto, alguns estudos atribuem ao H_2O_2 indução do acúmulo de AS por meio da elevação da atividade da enzima ácido benzóico-2 hidroxilase, conhecida como citocromo P450 monooxigenase, atuando na conversão do ácido benzóico em AS (RYALS et al., 1996; DURRANT & DONG, 2004).

O ácido salicílico (AS) apresenta função no processo de sinalização e indução na resistência sistêmica adquirida (SAR), estudos confirmaram a presença do AS no floema posteriormente a infecção do patógeno (DURRANT & DONG, 2004). A SAR permite aos demais tecidos não contaminados, resistência ao patógeno invasor devido as sinalizações emitidas da primeira infecção (DURRANT & DONG, 2004), durante o processo da SAR ocorre a expressão de certos genes, sendo chamados SAR genes (RYALS et al., 1996). Esse grupo de genes SAR ativado com tratamentos com AS e pela ação de genes na conversão do corismato em AS (VERBERNE et al., 2000), o AS foi relatado como indutor da SAR. Já são relatadas nove famílias gênicas nos genes SAR, incluindo as proteínas PR (*Pathogenesis-Related*) PR-1, PR-2 (β -1,3-glucanase), PR-3 (quitinase classe II, também denominada PR-Q), PR-4 (*hevein-like protein*), PR-5 (*thaumatin-like protein*), assim com as formas básicas e ácidas da quitinase classe III, a forma básica da PR-1 e PR-Q extracelular (RYALS et al., 1996).

Plantas que apresentam sistemas de defesa sem a infecção de patógenos apresentam incompatibilidades genéticas (MIZUNO et al., 2010), sendo mais observado em progênies com fenótipo similar ao de plantas acometidas por estresse bióticos ou abióticos, as quais são plantas geralmente oriundas de cruzamentos inter ou intraespecíficos (BOMBLIES & WEIGEL, 2007).

Entretanto, deve-se ressaltar que de acordo com o hábito de colonização do patógeno a resposta de defesa da planta será diferenciada. Portanto, é necessário compreender os diferentes tipos de patógenos que atuam na infecção da planta. Os patógenos são classificados de acordo com processo infeccioso, sendo chamados de biotróficos, necrotróficos e hemibiotróficos, cada tipo pode ativar vias diferentes na sinalização e de respostas de defesa na planta infectada.

Os patógenos biotróficos obrigatórios colonizam células vivas, geralmente levando a planta a indução da resposta de hipersensibilidade, tendo como consequência a morte da célula. Nesse processo ocorre a sinalização a via do AS levando à SAR. Os patógenos necrotróficos obrigatórios tem como características

se desenvolverem em células mortas, a planta ao identificar esse patógeno ativa a via de sinalização com o JA e etileno como mensageiros, levando à resistência sistêmica induzida (OLIVER & IPCHO, 2004). Já os patógenos que podem ser tanto biotróficos facultativos como necrotróficos facultativos são chamados de hemobiotróficos, para esse grupo de patógenos as respostas ainda não estão totalmente esclarecidas.

De acordo com Herrera-Vásquez et al. (2015), a sinalização é fundamental para rápida e adequada resposta de defesa da planta, para tal, é verificado sinergismo entre EROs, ON, fluxos de íons e AS. Durante a resposta de hipersensibilidade ocorre a formação de EROs influenciada pelo Ca^{2+} e ON, altas concentrações de EROs promove a biossíntese de AS, o Ca^{2+} apresenta fundamental regulação na produção de AS, possivelmente altas concentrações de EROs ativam a via de AS por meio da sinalização de cálcio.

A produção de EROs poderá ser aumentada com elevadas concentrações de AS, com a formação de ânions superóxidos (O_2^-), oxigênio *singlet* (O_2), radical hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em condições basais, os níveis intracelulares de EROs são mantidos a um mínimo por mecanismos de proteção celular baseados em enzimas catalases, superóxido desmutases ou peroxidases (O'BRIEN et al., 2012).

As enzimas NADPH oxidases presentes na membrana plasmática são consideradas as principais formadoras de EROs na célula durante a RH. A produção em excesso de EROs prejudicam a homeostase metabólica através de danos oxidativos a lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Entretanto, dentro da célula vegetal existem outros sítios de produção de EROs, principalmente nas organelas do cloroplasto, mitocôndria e peroxissomos (CAMEJO et al., 2016).

O cloroplasto proporciona elevada funcionalidade ao processo de HR por dispor de moléculas sinalizadoras como EROs, ON e AS após a infecção e reconhecimento do patógeno. E diferentes quantidades e qualidades de iluminação levam ao desenvolvimento e a severidade da RH (STAEL et al. (2015).

4. TECNOLOGIAS DA FISIONÔMICA

A agricultura moderna, por meio do conhecimento científico, promoveu grandes mudanças na forma do homem produzir e lidar com os desafios para alimentar o mundo. A tecnologia agrícola e o melhoramento genético, associado a todas às ciências agrárias, possibilitaram o melhor uso do solo, proteção dos cultivos, adaptabilidade e estabilidade produtiva, dentre outros, para aumentar o rendimento das espécies cultivadas.

No melhoramento genético de plantas para resistência a fitopatógenos, tomando a fisionômica como uma linha da agricultura de precisão, a busca pela elevada eficiência em gerar fenótipos requer acurácia, objetividade, agilidade e metodologias *high-throughput screening*.

Com a adequada fenotipagem dos bancos de germoplasma, os diversos programas de melhoramento genético de plantas poderão ganhar tempo para o lançamento de novas cultivares, bem como terão os adequados levantamentos da diversidade genética entre os acessos, maximizando a variabilidade nos ensaios. Estudos relatam que devido à falta de informação, apenas cerca de 4% dos acessos armazenados em todo o mundo vêm sendo utilizados (VASCONCELOS et al., 2007).

Na busca por cultivares resistentes a fitopatógenos, a fisiologia vegetal pode disponibilizar algumas técnicas para a quantificação de danos fisiológicos ocasionados por esses organismos fitopatogênicos (ROUSSEAU et al., 2013). Essas técnicas permitem a quantificação de danos antes mesmo da manifestação de sintomas aparentes (BOCK et al., 2010). A fisionômica, dentro da abordagem da fenômica para parâmetros fotossintéticos, pode se apresentar como refinada estratégia na identificação e seleção de genótipos, entre os parâmetros não destrutivos, tais como a análise de gases por radiação por infravermelha, o rendimento quântico do fotossistema II e também quantificação dos teores clorofilas nos tecidos vegetais podem apresentar bons resultados (CAVATTE et al., 2015). Portanto, a fenotipagem atrelada à genotipagem podem ser utilizados na caracterização de germoplasma, identificação de QTLs, até a seleção de genômica (FRITSCHÉ-NETO & BORÉM, 2013).

4.1. Clorofilômetros

A identificação de plantas resistentes a patógenos via avaliações fisiológicas não destrutivas poderá auxiliar programas de melhoramento genético de plantas. Para tal é necessário obter avaliações de forma precoce, rápidas, de baixo custo e que possam ser feitas em larga escala, esses requisitos são fundamentais no processo de seleção.

O uso de aparelho clorofilômetro surge como uma alternativa na estimação dos teores de clorofila *a* e *b*. Há estudos que correlacionam positivamente os teores de clorofila com a fotossíntese, permitindo inferir de forma indireta como está o desempenho fotossintético e analogamente a maquinaria celular, em condições normais a célula vegetal produz baixos níveis de EROs, não chegando a inibir ou alterar em larga escala a fotossíntese. Como relatado anteriormente, plantas infectadas por patógenos apresentam elevados níveis de EROs, levando em última análise a degradação das membranas dos tilacóides, propiciando em menores teores de clorofila e consequentemente menor fotossíntese.

A manutenção dos teores de clorofila em um genótipo mesmo estando infectado, sugerem de certa forma ser um genótipo resistente, possivelmente os mecanismos antioxidativos são mais eficientes. Algumas pesquisas evidenciaram a importância da relação da clorofila com as doenças de plantas. Avaliando cultivares de soja quanto a resistência parcial a *Phakopsora pachyrhizi* (ferrugem asiática da soja), o teor de clorofila foi quantificado com o auxílio de um clorofilômetro. Polizel et al. (2011) ressaltaram que o teor de clorofila foi inversamente proporcional à severidade da ferrugem asiática.

Há a necessidade da ampliação e adequação de pesquisas com o uso do clorofilômetro, formando ampla base de dados para novos trabalhos de fenotipagem visando a seleção de genótipos resistentes a estresses bióticos.

4.2. Fluorômetros

Estimativas de características fisiológicas foliares tem se mostrado relevantes na identificação de genótipos com resistência a estresses (SILVA et al., 2013). Simultaneamente, pode-se integrar a genotipagem em análise funcional e

estratégias moleculares de melhoramento (MARRACCINI et al., 2012).

Pesquisas direcionadas às curvas das características da fluorescência da clorofila *a*, são obtidas em resposta ao fluxo de fótons fotossintéticos, podendo dispor de dados importantes do padrão de resposta da fotossíntese e do desempenho do fotossistema II (PSII) dos genótipos analisados. Essa técnica apresenta grande potencialidade utilização em larga escala e com baixo custo. A fluorescência da clorofila *a* vem sendo utilizada em trabalhos de fenotipagem como parâmetro não destrutivo de avaliação dos danos causados por alguns estresses abióticos ou bióticos. Distintos componentes do processo fotossintético são afetados sob condições de adversas, a fluorescência clorofila *a* é um deles (MURCHIE & LAWSON, 2013).

A energia absorvida pelas plantas é destinada a três processos concorrentes: fotossíntese, dissipação térmica e emissão de fluorescência da clorofila (BUSCHMANN, 1999). Na presença de infecções patogênicas, o rendimento quântico do PSII pode ocorrer decréscimo, devido ao elevado custo energético no combate a infecção ao fitopatógeno, provocando o aumento do metabolismo respiratório (BERGER et al., 2007). As plantas consideradas resistentes aos patossistemas apresentam menor fluorescência da clorofila quando comparadas com plantas sensíveis.

O aparelho fluorômetro não-modulado, quantifica a fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m) e fluorescência variável (F_v). Com base dos dados de F_v e F_m , obtêm-se a relação F_v/F_m , chamada de rendimento quântico máximo do fotossistema II (BOLHÀR-NORDENKAMPF et al., 1989). A inferência da fluorescência é feita por meio de um pulso de luz vermelha (650 nm) com duração de 2 s, com intensidade de $600 \text{ W m}^{-2} \text{ n}$ (100% de intensidade), obtido por meio de seis LEDs (*Light Emitting Diodes*), localizado na sonda do equipamento.

Em pesquisa desenvolvida por Tatagiba et al. (2015), foi relatado que existe diferença na emissão da fluorescência da clorofila *a* entre genótipos de arroz infectadas com *Monographella albescens*, sendo que os genótipos tolerantes apresentaram maior fluorescência da clorofila *a* em relação aos susceptíveis. Os mesmos autores ressaltaram que a fluorescência da clorofila *a* é uma ferramenta excelente para descrever a perda de funcionalidade do aparelho fotossintético em folhas de arroz durante a infecção por *M. albescens*.

Em trabalho desenvolvido na cultura do milho, foi analisado a fluorescência da clorofila *a* em folhas infectadas com *Stenocarpella macrospora*, os pesquisadores evidenciaram diminuições na fluorescência máxima, na eficiência quântica máxima do PSII, no rendimento efetivo quântico do PSII e no rendimento quântico da dissipação de energia regulada, e foram verificados aumentos na fluorescência inicial, assim como rendimento quântico de dissipação de energia não-regulada. Estes dados estão diretamente relacionados com a perda progressiva da atividade fotossintética e com desenvolvimento do estresse oxidativo (BERMÚDEZ-CARDONA et al., 2015). Em estudos com cultura do Trigo, foi verificado aumento na fluorescência da clorofila *a* em plantas infectadas com *Pyricularia oryzae* que receberam adubação com silício, mostrando que o silício apresenta potencialidade de ser utilizado como indutor de resistência na cultura (PEREZ et al., 2014).

Diante do exposto, ficou evidenciado a elevada potencialidade de amplo uso do Fluorômetro na fenotipagem visando identificar genótipos resistentes e susceptíveis a patossistemas, entretanto é necessário salientar que a presente técnica poderá ser uma das etapas do processo de identificação e possível seleção de genótipos tolerantes, mas é fundamental associar mais técnica para ratificar os resultados encontrados.

4.3. IRGA

O IRGA (*Infra-red Gas Analyser*) foi um dos primeiros aparelhos utilizados na fenotipagem em larga escala, este aparelho consegue quantificar o desempenho fotossintético das plantas, as leituras são relativamente rápidas e com custo relativamente baixo, os dados obtidos muitas vezes podem evidenciar diferenças entre plantas em condições normais e sob estresses bióticos e abióticos (FRITSCHÉ-NETO & BORÉM, 2013).

As principais variáveis analisadas são a taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), transpiração (*E*), condutância estomática (*g_s*), concentração interna de CO₂ na câmara subestomática (*C_i*), fluorescência da clorofila *a*, eficiência química do fotossistema II (F_v/F_m), eficiência intrínseca do uso da água (*A/g_s*), razão da concentração interna e externa de CO₂ (*C_i/C_a*), entre outros (CAVATTE et al., 2015).

Essa técnica tem sido mais utilizada diferenciando o desempenho fotossintético entre plantas sob condições normais e de estresses ambientais, discriminado muitas vezes genótipos tolerantes ao estresse submetido. Contudo, essa técnica apresenta grande potencialidade para discriminação de plantas com resistência a estresses bióticos, pois como relatado anteriormente, plantas infectadas por patógenos podem apresentar elevados danos na maquinaria fotossintética, promovendo decréscimos acentuados na fotossíntese.

A utilização do aparelho possui algumas ressalvas, as leituras devem ser realizadas em folhas representativas, contudo, os dados obtidos não podem ser extrapolados para a planta inteira, alguns pesquisadores estão buscando desenvolver novas metodologias que representem a planta como um todo. Os horários de leitura devem ser durante o período da manhã entre 9-11 horas, é necessário pelo menos 2 cm² ou 6 cm² (dependendo do protocolo) de folha.

Foi realizado um estudo objetivando verificar mudanças na fotossíntese e o papel desempenhado pelo metabolismo do carbono na resposta de duas cultivares de mangueira contrastantes, Ubá (resistente) e Palmer (suscetível), à infecção com *Ceratocystis fimbriata*, agente etiológico da doença seca-da-mangueira. Após sete dias da inoculação com o patógeno, os parâmetros fotossintéticos foram superiores nas plantas da cultivar resistente em relação à suscetível, *A* (32%), *g_s* (56%), *E* (48%) e *C_i/C_a* (19%) respectivamente (BISPO et al., 2016). E 21 dias após a inoculação (DAI) tiveram diferenças ainda maiores para esses parâmetros em relação o cultivar resistente e a suscetível, *A* (67%), *g_s* (66%), *E* (64%) e para *C_i/C_a* não foram significantes. Os autores discorrem citando que nas fases mais avançadas de infecção (21 DAI), devido ao elevado decréscimo na taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), ocorreram uma diminuição na produção de trioses-fosfato no ciclo de Calvin. Este fato compromete a síntese de sacarose e/ou amido, visto que o suporte de esqueletos de carbono nas folhas fontes foi aparentemente mínimo.

4.4. Imagens espectroscópicas

A magnitude do impacto que uma imagem gera em um observador, associada ou não a um dado científico, aplica-se estreitamente ao ditado popular “a imagem fala por si só” (SOUSA, 2014). Recentemente, o uso de imagens espectroscópicas

na agricultura, ou fenotipagem baseada em imagens, tem permitido avaliar aspectos relacionados a estresses, por exemplo o ataque de fitopatógenos nas culturas, gerando avanços em escala, precisão, reprodutibilidade e complexidade, além de serem não destrutivas ou invasivas, quando comparada às técnicas tradicionais. Essas imagens são geradas em diferentes regiões do espectro eletromagnético, por meio de técnicas espectroscópicas. A automação do processo de obtenção das imagens, dependendo da espécie, condições de cultivo e variáveis, possibilita a condução de estudos comparativos e seleção fenotípica em larga escala (MUTKA & BART, 2015).

As imagens espectroscópicas, além de fornecerem uma maneira de digitalização e quantificar os danos visuais, também podem revelar respostas estressantes precoces, evidenciando mudanças pré-sintomáticas relacionadas a alterações na fotossíntese e condutância estomática (CHAERLE et al., 2007a).

Uma vez que em programas de melhoramento genético de plantas existe um grande volume de genótipos a serem fenotipados e a existência de diversas metodologias, sensores, softwares e algoritmos para a quantificação dos danos ocasionados pelo ataque dos fitopatógenos, deve-se avaliar os objetivos a serem atingidos e verificar qual seria a melhor escolha. Então, vem sendo desenvolvidas plataformas de fenotipagem comerciais para se realizar o *screening* e a seleção em larga escala, tais como as Scanalyser^{3DHT} (LemnaTec) e PlantScreenTM Conveyor Systems (Qubti Systems), desenvolvidas para casas de vegetação, e as Scanalyser FIELD (LemnaTec) e PlantScreenTM Field Systems (Qubti Systems), para condições de campo (GIGLIOTI et al., 2015).

A seguir, serão apresentadas técnicas de imagens espectroscópicas que vem sendo amplamente difundidas em estudos relacionados às doenças de plantas e estresses em geral, as quais podem ser aplicadas em plataformas de fenotipagem em larga escala em programas de melhoramento genético de plantas.

4.4.1. IMAGENS RGB

As imagens são compostas pelas cores primárias: vermelho (*RED*), verde (*GREEN*) e azul (*BLUE*). Cada pixel das imagens tem um valor para cada cor, com base no modelo de cor RGB, que é o espaço de cor tridimensional para descrever

a cor (RUSS, 2002). A cor do pixel é definida pelo matriz, saturação e intensidade (*hue, saturation and intensity* – HSI), os quais são mais frequentemente usados para áreas separadas de interesse que compartilham traços comuns na imagem, em que esse processo é denominado segmentação (Figura 2).

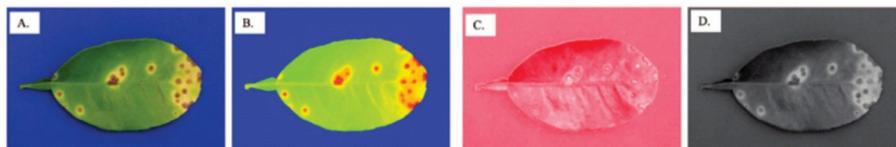


Figura 2. Imagens de folhas de Toranja (*Citrus × paradisi*) com sintomas de cancro cítrico, doença ocasionada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*; (A) imagem da folha original, e evidenciando os planos matriz (B), saturação (C) e intensidade(D). Fonte: Bock et al. (2010).

A matriz é a cor pura do pixel, a saturação é a quantidade de cor e a intensidade é o brilho. Durante o processamento da imagem, deve ser feita a eliminação do primeiro fundo da imagem. Após a remoção do fundo, a matriz pode ser encontrada para ser um critério mais eficiente para delinear áreas saudáveis de áreas doentes a partir da imagem colorida, e o plano de intensidade é mais comumente utilizado para imagens em preto e branco (LAMARI, 2002). O limiar é o processo para delinear áreas específicas de interesse, como por exemplo, área doente a partir de uma folha saudável. Esse processo se baseia na distribuição de cor nos pixels dentro da área selecionada da imagem, o qual possibilita realizar uma configuração para a distinção “correta” de áreas saudáveis de doentes. Para se calcular a porcentagem de área doente e/ou contagem das lesões, é utilizado o número de pixels na área doente x saudável (BOCK & NUTTER, 2011).

Na Figura 3 é verificado, por meio do uso de imagens RGB, o progresso da infecção por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary em batateira no campo. A coloração vermelha foi utilizada para ilustrar partes danificadas. Verifica-se que em algumas parcelas mantiveram-se folhas saudáveis, evidenciando os diferentes níveis de resistência à doença dos genótipos avaliados (SUGIURA et al., 2016).

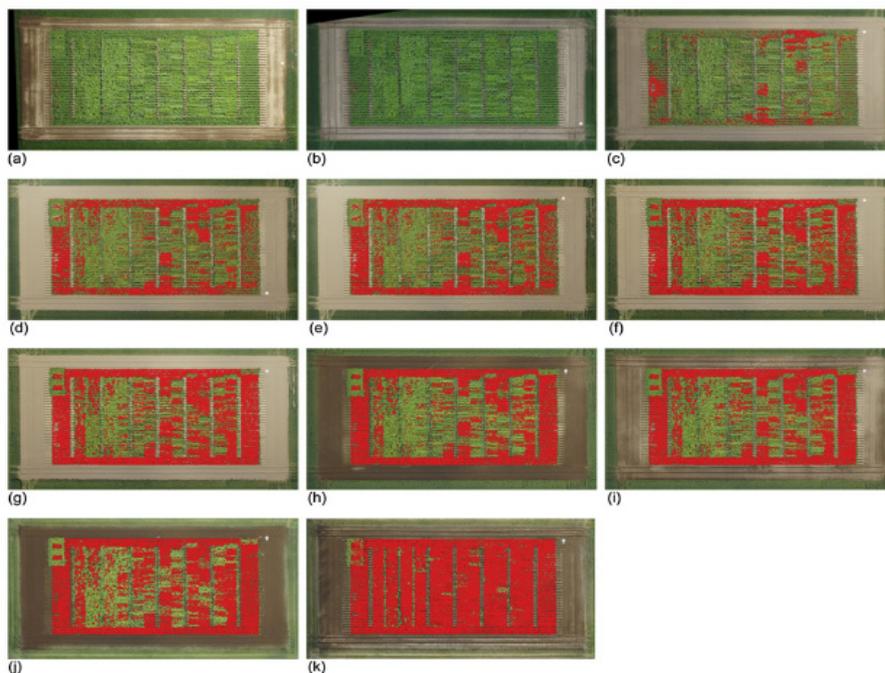


Figura 3. Progresso da infecção de *P. infestans* em batateira por meio da captura de imagens RGB. Observação: o plantio dos tubérculos foi realizado em 3 de maio de 2012 e captura das imagens em 17 (a), 18 (b), 23 (c), 25 (d), 26 (e), 27 (f) e 30 (g) de julho, e 2 (h), 3 (i), 7 (j), e 15 (k) de agosto de 2012. Fonte: Sugiura et al. (2016).

4.4.2. FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA a E IMAGENS TERMOGRÁFICAS

A fluorescência da clorofila é constituída da reemissão do excesso de energia como luz de comprimento de onda mais longo, normalmente na região do vermelho distante (MAXWELL & JOHNSON, 2000). A dissipação termográfica também varia dependendo das condições ambientais e do tipo de estresse (BUSCHMANN, 1999). O uso de imagens de fluorescência da clorofila tem sido amplamente usado em estudos das respostas fotossintéticas ao ambiente, promovendo um monitoramento nas alterações da emissão da fluorescência da clorofila, antes mesmo do aparecimento de sintomas visíveis, acerca de estresses abióticos e bióticos (CHAERLE & VAN DER STRAETEN, 2001), a exemplo das doenças

de plantas.

Um fator que contribui para a limitação da fotossíntese é o fechamento estomático, diminuindo o nível interno de CO_2 , bem como a diminuição da transpiração, o que aumenta a temperatura foliar. As imagens termográficas revelam a temperatura foliar instantânea e permite o monitoramento da condutância estomática, sendo um método não invasivo, e sim, remoto (CHAERLE & VAN DER STRAETEN, 2000). Ambas tecnologias citadas anteriormente podem revelar o progresso das doenças de plantas precocemente e com alto contraste (OERKE et al., 2006;), o que contribui para o decréscimo no tempo requerido para verificar a resistência ao estresse, aumentando o poder de discriminar.

Os sinais da fluorescência dependem diretamente das taxas de fluência de fótons fotossintéticos, devido à sua natureza fisiológica complexa (MAXWELL & JOHNSON, 2000). Existe então, uma diferença no seu sinal, de acordo com a adaptação ao escuro (F_0 , F_m) ou sob iluminação (F_0' , F_m'), sendo que sob adaptação ao escuro superior, o que pode impactar em variações na detecção de medidas de doenças fúngicas, por exemplo (BAURIEGEL & HERPPICH, 2014).

As técnicas de imagens de fluorescência da clorofila atuais usam condições para a detecção de giberela, medindo o parâmetro F_v/F_m , o que requer adaptações (BAURIEGEL et al., 2011). Portanto, como podem haver diferenças nas taxas de fluência de fótons à exposição direta à luz do sol, é requerida uma adaptação das plantas ao escuro de aproximadamente dez minutos (HERPPICH et al., 2012). A aplicação desta tecnologia pode ser verificada na Figura 4, a qual mostra dois níveis de infecção de *Fusarium* em trigo, obtida por imagens da fluorescência da clorofila (parâmetro F_v/F_m), após adaptação ao escuro.

Na Figura 5, está ilustrando o uso da tecnologia de imagens termográficas, em que é verificado o dano ocasionado pelo *tobacco mosaic virus* TMV (CHAERLE et al., 2007b). Já na Figura 6 é claramente verificado que as imagens de fluorescência da clorofila promoveram a detecção de sinais pré-visuais após a infecção por pulverização com *Cercospora beticola* em beterraba sacarina. Além de distinguir precocemente a diferença entre o genótipo suscetível do resistente, o que fora verificado sete dias após a inoculação (CHAERLE et al., 2007a).

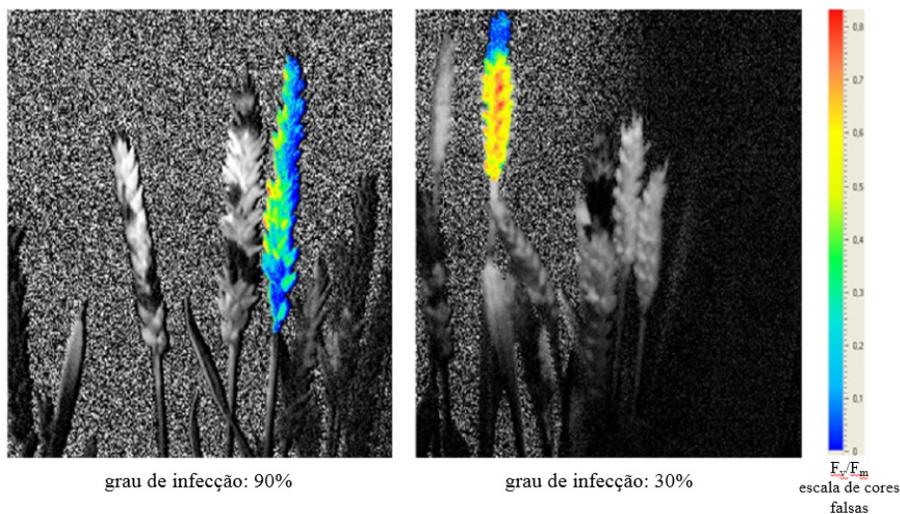


Figura 4. Imagens de fluorescência da clorofila mostrando níveis de infecção de *Fusarium* em trigo obtidas através do parâmetro F_v/F_m . Fonte: adaptado de Bauriegel & Herpich (2014).

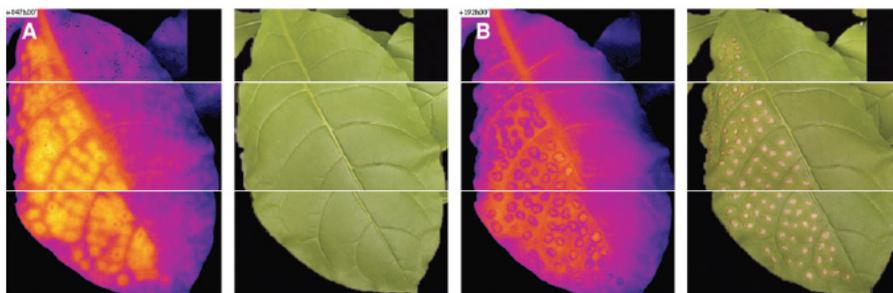


Figura 5. Resposta hipersensitiva de tabaco ao TMV (*Tobacco Mosaic Virus*); à esquerda, imagens termográficas; 2 dias após à inoculação (A) e 8 dias após à inoculação (B). Fonte: Chaerle et al. (2007b).

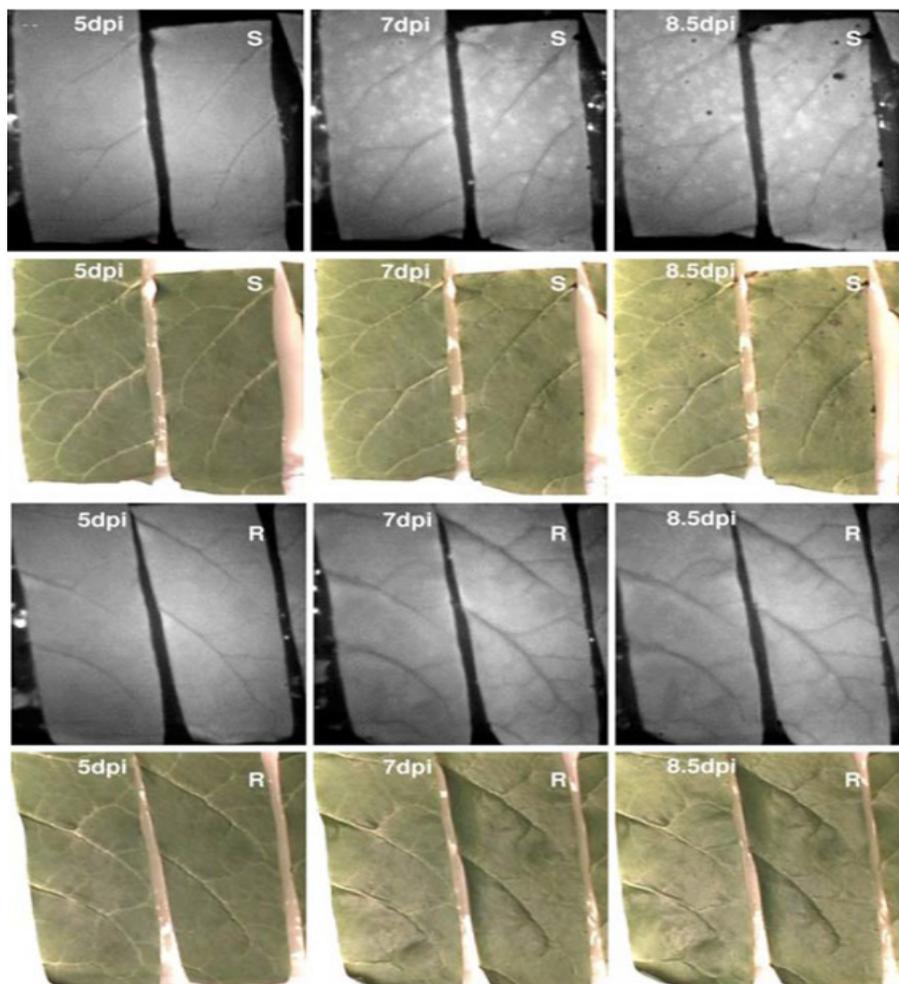


Figura 6. Diferenças na intensidade de fluorescência na folha de genótipo suscetível (S) e resistente (R) de beterraba sacarina após a infecção com *C. beticola*. “dpi: dias após a inoculação”. Fonte: Chaerle et al. (2007a).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Fisionômica voltada a resistência de plantas a fitopatógenos, caracteriza-se pela utilização de um conjunto de técnicas “*high-throughput*” visando maximizar e automatizar a capacidade de obtenção de fenótipos resistentes, possibilitando

programas de melhoramento genético obter genótipos superiores de interesse com resistência basal a fitopatógenos, de forma mais eficiente e precoce. Além disso, potencializando análise combinada mais sofisticada de estudos de genoma, transcriptoma, epigenoma, proteoma e metaboloma. Para tal, é necessário reunir esforços de diferentes profissionais de diversas áreas do conhecimento, especialmente bioinformatas, fitopatologistas, fisiologistas e melhoristas de plantas, para sistematização dos dados obtidos com os reais sentidos biológicos e agronômicos.

6. REFERÊNCIAS

AGRIOS, G.N. Plant pathology. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005. 922p.

AMORIM, L.; PASCHOLATI, S.F. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.) Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. v.1 4ed. Piracicaba, SP: Agronômica Ceres, 2011. p.59-99.

AN, C.; MOU, Z. Host defense response in a novel (*Arabidopsis Xanthomonas citri*) subsp. *Citri* pathosystem. Plos One, v. 7, p.31130, 2012.

BAURIEGEL, E.; GIEBEL, A.; HERPPICH, W. B. Hyperspectral and chlorophyll fluorescent imaging to analyze the impact of *Fusarium culmorum* on the photosynthetic integrity of infected wheat ears. Sensors, v.11, p.65-79, 2011.

BAURIEGEL, E.; HERPPICH, W.B. Hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging for early detection of plant diseases, with special reference to *Fusarium* spec. infections on wheat. Agriculture, v.4, p.32-57, 2014.

BERGAMIN FILHO, A.; KITAJIMA, E.W. História da fitopatologia. In: AMORIM, L. et al. Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. v.1 4ed. Piracicaba, SP: Agronômica Ceres, 2011. p.3-17.

BERGER, S.; SINHA, A. K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. Journal of Experimental Botany, v. 58, p. 4019-4026, 2007.

BERMÚDEZ-CARDONA, M. B.; FILHO, J. A. W.; RODRIGUES, F. Á. Leaf Gas Exchange and Chlorophyll a Fluorescence in Maize Leaves Infected with

Stenocarpella macrospora. *Phytopathology*, v.105, n. 1, p. 26-34, 2015.

BISPO, W. M. S.; ARAUJO, L.; ÁVILA, R. T.; DAMATTA, F. M.; RODRIGUES, F. Á. Mango resistance against *Ceratocystis fimbriata* is impaired by local starch mobilization. *Tropical Plant Pathology*, v.41, n.4, p.225-236, 2016.

BOCK, C. H.; POOLE, G. H.; PARKER, P. E.; GOTTWALD, T. R. Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.29, n.1-3, p.59-107, 2010.

BOCK, C.H.; NUTTER, F.W. Detection and measurement of plant disease symptoms using visible-wavelength photography and image analysis. *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, v.6, n.27, 15p., 2011.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R. et al. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*, n. 3, p. 497–514, 1989.

BOLLER, T; FELIX, G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, v. 60, n. 1, p.379-406, 2009.

BOMBLIES, K.; WEIGEL, D. Hybrid necrosis: Autoimmunity as a common barrier to gene flow in plants. *Natural Reviews Genetics*, n.8, p. 382–393, 2007.

BORÉM, A.; RAMALHO, M.A.P. Estresses abióticos: desafios do melhoramento de plantas nas próximas décadas. In: FRITSCH-NETO, R.; BORÉM, A. *Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos*. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011. p.9-28.

BUSCHMANN, C. Thermal dissipation during photosynthetic induction and subsequent dark recovery as measured by photoacoustic signals. *Photosynthetica*, v.36, p. 149–161, 1999.

CAMARGO, L. E. A. Controle genético. In: AMORIM, L. et al. *Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos*. v.1 4ed. Piracicaba, SP: Agronômica Ceres, 2011. p.325-341.

CAMEJO, D.; GUZMÁN-CEDEÑO, Á.; MORENO, A. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant–pathogen interactions. **Plant Physiology and**

Biochemistry, v. 103, p.10-23, 2016.

CAVATTE, P. C.; COLA, G. P. A.; GRANCIERI, N.; PEREIRA, J. P.; MOREIRA, V. F. Fenômica de parâmetros fotossintéticos. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. Fenômica: como a fenotipagem de próxima geração está revolucionando o melhoramento de plantas. Viçosa, MG: Editora UFV, 2015. p.179-195.

CHAERLE, L.; HAGENBEEK, D.; DE BRUYNE, E.; VAN DER STRAETEN, D. Chlorophyll fluorescence imaging for disease-resistance screening of sugar beet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.91, p.97–106, 2007a.

CHAERLE, L.; LEINONEN, I.; JONES, H. G.; VAN DER STRAETEN, D. Monitoring and screening plant populations with combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging. *Journal of Experimental Botany*, v.58, n.4, p.773-784, 2007b.

CHAERLE, L.; VAN DER STRAETEN, D. Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends in Plant Science*, v.5, p.495–501, 2000.

CHAERLE, L.; VAN DER STRAETEN, D. Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, v.1519, p.153–166, 2001.

DANGL, J.L.; JONES, J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, v. 411, p. 826:833, 2001.

DODDS, P.N.; RATHJEN, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genet*, n.11, p. 539–548, 2010.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v.42, p.185-209, 2004.

FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. Melhoramento de plantas para condições de estresses bióticos. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. *Ômicas 360º: aplicações e estratégias para o melhoramento de plantas*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2013 289 p.

GIGLIOTI, E.A. et al. Fenômica de resistência a doenças. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. Fenômica: como a fenotipagem de próxima geração está revolucionando o melhoramento de plantas. Viçosa, MG: Editora UFV, 2015. p.148-178.

HERPPICH, W.B.; FOERTER, J.; ZEYMER, J.; GEYER, M.; SCHLÜTER, O.; Chlorophyll fluorescence image analysis for non-destructive monitoring of physiological changes in fresh and fresh-cut produce. In: NUNES, C. Environmentally friendly and safe technologies for quality of fruit and vegetables. Faro, Portugal, 2012. P.45-51.

HERRERA-VÁSQUEZ, A.; SALINAS, P.; HOLUIGUE, L. Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. **Frontiers In Plant Science**, v. 6, p.1-19, 2015.

JESUS, F.A.; PERES, L.E.P. Fisionômica. In: BORÉM, A.; FRITCHE-NETO, R. *ÔmicaS 360°: aplicações e estratégias para o melhoramento de plantas*. Viçosa, MG: Editora UFV, 2013. p.209-242.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, n. 7117, p.323-329, 2006.

KANAZIN, V.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 93, p. 11746–11750, 1996.

LAMARI, L. *ASSESS: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification*. APS Press, St. Paul, MN; 2002.

MARRACCINI, P.; VINECKY, F.; ALVES, G. S.; RAMOS, H. J.; ELBELT, S.; VIEIRA, N. G.; CARNEIRO, F.A.; SUJII, P.S.; ALEKCEVETCH, J.C.; SILVA, V.A.; DAMATTA, F. M.; FERRÃO, M.A.G.; LERROY, T.; POT, D.; VIEIRA, L.G.E.; DA SILVA, F.R.; ANDRADE, A.C. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. *Journal of Experimental Botany*, v. 63. p. 4191-4212, 2012.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescent – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, v.51, p.659-668, 2000.

McNEW, G.L. The nature, origin and evolution of parasitism. In: HORSFALL, J.G., DIMOND, A.E. *Plant Pathology*. v.2. New York: Academic Press, 1960. p.20-69.

MIZUNO, N.; HOSOGI, N.; PARK, P.; TAKUMI, S. Hypersensitive response-like reaction is associated with hybrid necrosis in interspecific crosses between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii* Coss. *PLoS One*, n.5, p.13-26, 2010.

MUR, L. A.; KENTON, P.; LLOYD, A. J.; OUGHAM, H.; PRATS, E. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 3, p.501-520, 2008.

MURCHIE, E.H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, p. 3983–3998, 2013.

MUTKA, A.M.; BART, R.S. Image-based phenotyping of plant disease symptoms. *Frontiers in Plant Science*, v.6, p.734-742, 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (Agricultural Board – Committee on Plant and Animal Pests). *Plant Disease Development and Control*. Washington, NAS, 1968. 205p.

NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *Journal Experimental Botany*, v.53, n.372, p.1237-1247, 2002.

O'BRIEN, J. A.; DAUDI, A.; FINCH, P.; BUTT, V.S.; WHITELEGGE, J.P.; SOUDA, P.; AUSSUBEL, F. M.; BOLWELL, G.P. Peroxidase-Dependent Apoplastic Oxidative Burst in Cultured Arabidopsis Cells Functions in MAMP-Elicited Defense. **Plant Physiology**, v. 158, n. 4, p.2013-2027, 2012.

OERKE, E. C.; STEINER, U.; DEHNE, H. W.; LINDENTHAL, M. Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. *Journal of Experimental Botany*, v.57, p.2121–2132, 2006.

OLIVER, R.P.; IPCHO, S.V.S. Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs. biotrophs classification of fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology*, v.5, n.4, p.347-352, 2004.

PARLEVLIET, J.E. Present concepts in breeding for disease resistance. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, p.7-15, 1997. Suplemento.

PEREZ, C. E. A.; RODRIGUES, F. Á.; MOREIRA, W. R.; DAMATTA, F. M. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence in wheat plants supplied with silicon and infected with *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, v. 104, n. 2, p. 143-149, 2014.

POLIZEL, A.C.; SILVA, M.A.P.; TOSHIYUKI, H.O.; SILVA, E.M.B.; DE MENEZES, P.C.; Desenvolvimento de linhagens de soja de ciclo semiprecoce/

médio para resistência à ferrugem asiática em Rondonópolis/MT. Enciclopédia Biosfera, v.7, p.1- 9, 2011.

ROUSSEAU, C.; BELIN, E.; BOVE, E.; ROUSSEAU, D.; FABRE, F.; BERRUYER, R.; GUILLAUMÈS, J.; MANCEAU, C.; JACQUES, MA.; BOUREAU, T. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant methods*, v.9, n.17, p.1-13, 2013.

RUSS, JC. *The Image Processing Handbook*. 4th ed. CRC Press, New York; 2002.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, n. 8, p.1809-1819, 1996.

RYAN, C.A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica Biophysica Acta*, n. 1477, p.112-121, 2000.

SILVA, P. E.; CAVATTE, P. C.; MORAIS, L. E.; MEDINA, E. F.; DAMATTA, F. M. The functional divergence of biomass partitioning, carbon gain and water use in *Coffea canephora* in response to the water supply: implications for breeding aimed at improving drought tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, v. 87, p. 49-57, 2013.

SOUSA, C.A.F. Fenotipagem de plantas: uma nova abordagem para um velho problema. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2014. 9p. (Embrapa Agroenergia. Comunicado Técnico, 6).

STAEL, S.; KMIĘCIK, P.; WILLEMS, P.; VAN DER KELEN, K.; COLL, N. S.; TEIGE, M.; VAN BREUSEGEM, F. Plant innate immunity – sunny side up? **Trends In Plant Science**, v. 20, n. 1, p.3-11, 2015.

SUGIURA, R.; TSUDA, S.; TAMIYA, S.; ITOH, A.; NISHIWAKI, K.; MURAKAMI, N.; SHIBUYA, Y.; HIRAFUJI, M.; NUSKE, S. Field phenotyping system for the assessment of potato late blight resistance using RGB imagery from an unmanned aerial vehicle. *Biosystems Engineering*, v.148, p.1-10, 2016.

TATAGIBA, S. D.; DAMATTA, F. M.; RODRIGUES, F. Á. Leaf Gas Exchange and Chlorophyll *a* Fluorescence Imaging of Rice Leaves Infected with *Monographella albescens*. *Phytopathology*, v. 105, n. 2, p. 180-188, 2015.

VASCONCELOS, E. S.; CRUZ, C. D.; BHERING, L. L.; FERREIRA, A. Estratégias de amostragem e estabelecimento de coleções nucleares. *Pesquisa*

Agropecuária Brasileira. v.42, n.4, p.507-514, 2007.

VERBERNE, M. C.; VERPOORTE, R.; BOL, J. F.; MERCADO-BLANCO, J.; LINTHORST, H. J. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology*, v. 18, p. 779-783, 2000.

Capítulo 05

FRUTO DE *Euterpe edulis* E *Euterpe oleracea*: USOS ALIMENTÍCIOS, MEDICINAIS E COSMÉTICOS

Aléxia Gonçalves Pereira
Liana Hilda Golin Mengarda
Marina Santos Carvalho
Ramon Azevedo Braz
Adésio Ferreira

1. INTRODUÇÃO

As palmeiras são plantas pertencentes família Arecaceae, cuja abrangência envolve as florestas tropicais. São listadas para a família cerca de 2.400 espécies, distribuídas em 183 gêneros, sendo 39 gêneros encontrados no Brasil (MARTINELLI & MORAES, 2013). O gênero *Euterpe* é catalogado em todas as regiões brasileiras, sendo encontrado na Amazônia, no Cerrado e na Floresta Atlântica (LEITMAN et al., 2013).

No Brasil as espécies *Euterpe precatoria*, *Euterpe oleracea* e *Euterpe edulis* têm sido exploradas para a alimentação humana seja para a extração de palmito ou para produção de açaí a partir dos frutos. A espécie *Euterpe oleracea* é uma palmeira conhecida como açaizero, nativa da região amazônica e característica dos estados do Amapá, Maranhão, Pará, Tocantins e Goiás (Figura 1). O açaizero é uma planta estolonífera, ou seja, um indivíduo adulto pode apresentar até 25 estipes em diferente estágio de desenvolvimento. A espécie *Euterpe edulis* é uma palmeira de estipe único, conhecida como Juçara ou palmito. É nativa da Floresta Atlântica, encontrada continuamente desde os estados da região Sul até o os do Nordeste (Figura 1). Existem relatos de ocorrência de populações naturais também nos estados do Maranhão e em Goiás, cujo os biomas são Amazônia e Cerrado respectivamente (LEITMAN et al., 2013).

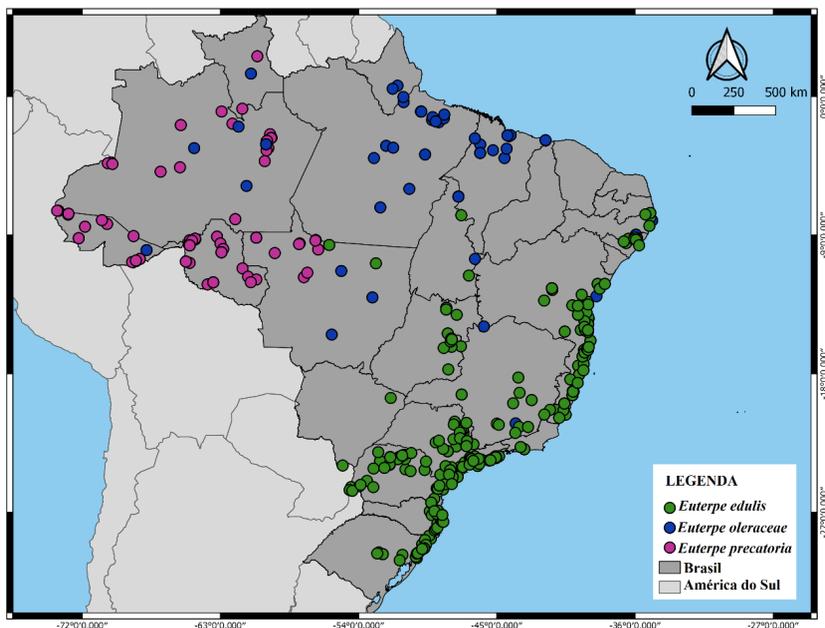


Figura 1. Mapa da Distribuição geográfica das espécies *Euterpe edulis* (verde), *Euterpe oleracea* (azul) e *Euterpe precatoria* (rosa) no Brasil. As ocorrências foram obtidas do site Species Link (<http://www.splink.org.br>).

Por muitos anos essas palmeiras foram utilizadas para a obtenção do palmito, um produto retirado do meristema apical, próximo a base das folhas. Por ser pouco fibroso e macio, o seu consumo ocorre *in natura*, cozido ou em conserva. Devido ao sabor, qualidade e valor elevado, o palmito extraído da *Euterpe edulis* é procurado para culinária e conseqüentemente passou por um processo de exploração ao longo dos anos. Por ser uma espécie com incapacidade de rebrotar e que possui apenas um estipe, a extração acarreta a morte da planta, pois é necessário a derrubada e a retirada de todas as folhas para a obtenção do palmito (Figura 2). Além disso, essa espécie possui crescimento lento, sendo necessário, em média seis a dez anos para que o palmito atinja o tamanho ideal para corte (TROIAN, 2014). Com o extrativismo sem controle, detectou-se a diminuição da densidade populacional e o comprometimento das populações naturais de *E. edulis* (FATINI et al., 2000). O palmito obtido a partir da *E. oleracea* também possui valor de mercado, sendo

aceito pelos consumidores. Esta, por ser uma planta estolonífera, o manejo possibilita a extração do palmito sem prejudicar a planta, garantindo colheitas constantes (OLIVEIRA, 2016).



Figura 2. Cachos de frutos verdes e maduros da espécie *Euterpe edulis* (A). Fruto maduro de *Euterpe edulis* com destaque para a proporção entre a polpa e a semente (B). Sementes de juçara após o processo de despolpa (C) para produção de suco. Fotos extraídas do site Systematik.

As espécies *E. precatoria*, *E. oleracea* e *E. edulis* produzem cachos com frutos redondos e pequenos que quando maduros apresentam cor roxa quase preta, com a semente correspondendo a maior porção do fruto, e com a polpa correspondendo cerca de 15% (Figura 3). Da polpa é extraído, uma emulsão com elevado valor energético e rico em antioxidantes, conhecidos como açai (*E. oleracea* e *E. precatória*) e Juçai ou açai da juçara. O consumo do açai da *E. oleracea* é herdado do hábito de alimentação indígena e que foi implementado nas cidades, principalmente no norte do país (SCHIRMANN et al., 2011).

A crescente preocupação com a saúde e com a boa forma tem elevado o interesse da população em consumir alimentos saudáveis e nutritivos. Nesse contexto, o açai tem se destacado por ser considerado uma superfruta devido ao elevado valor nutricional e ser rico em nutrientes e antioxidantes (FELZENSZWALB et al., 2013). O açai é um alimento energético de baixo valor glicêmico, com grandes proporções de ácidos graxos insaturados como ômega 3, 6 e 9. Pode-se considerá-lo um completo nutricionalmente, pois possui também proteínas, fibras alimentares, vitaminas A, C e E, e micronutrientes como cálcio, cobre, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio, sódio e zinco (DEL POZO-

INSFRAN et al., 2004; LICHTENTHÄLER et al., 2005; SCHAUSS, 2006; BRITO, 2007; ROSSO, 2008; BICUDO, 2014; ROCHA, 2017; CARDOSO et al., 2018). O açaí é apreciado pelos consumidores e pode ser consumido em forma de suco, *sorbet*, bolos, pães, farinha, iogurte e em molhos para carnes (DI PIETRO et al., 2017; GERALDI et al., 2018; SANTANA et al, 2018).



Figura 3. Extração do palmito da espécie *Euterpe edulis*. Esse processo promove a morte da palmeira, devido a derrubada do indivíduo. Figura extraída da cartilha da Rede Juçara (TROIAN, 2014).

A popularização do consumo de açaí se espalhou todo o país e também no exterior, promovendo o aumento da demanda de frutos. A semelhança físico-químicas e de sabor entre os frutos provenientes do açaí de *E. oleracea* e os da palmeira juçara, possibilitou a sua utilização para suprir um crescente o nicho do mercado, possibilitando uma fonte de renda através da exploração sustentável e a manutenção da espécie no ambiente natural (CORADIN et al., 2011).

Os frutos do açaí e da juçara além de constituírem alimentos funcionais, tem sido utilizado para outras finalidades, principalmente devido a ação antioxidante das antocianina (FELZENSZWALB et al., 2013). Na medicina, tem-se demonstrado que o consumo desses alimentos auxilia na prevenção de doenças crônicas desencadeadas pelo estresse oxidativo como câncer e doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (OLIVEIRA et al., 2015), além da ação antiinflamatória, de melhora imunológica, no diabetes tipo 2 e no envelhecimento (PORTINHO et al., 2012). Os frutos também têm sido visados para a produção de cosméticos para pele e cabelos como fotoprotetor, minimizando os efeitos da radiação ultravioleta, como fonte de hidratação e para o combate ao envelhecimento precoce por ação

dos antioxidantes (MONTEIRO et al., 2017).

Como *E. edulis* se trata de uma espécie pouco domesticada, a intervenção da pesquisa se torna necessária a fim de direcionar a produção, ampliar a oferta, obter um produto de melhor qualidade a preços menores. Neste sentido, o conhecimento científico e tecnológico acumulado sobre o açaí da Amazônia (obtido da palmeira *Euterpe oleracea*) pode servir de referencial teórico e ser adaptado para a produção de açaí da Mata Atlântica (MIRÓ; CHIQUETTO, 2016).

2. O QUE TÊM NOS FRUTOS DE *Euterpe oleracea* E *Euterpe edulis*?

Historicamente os frutos de *Euterpe oleraceae*, o açaí, tem sido utilizado na alimentação humana. Com o aumento da procura por alimentos saudáveis, o açaí tem se destacado por ser considerado uma superfruta. Apesar de não existir na literatura valores concretos, por definição uma superfruta é aquela que com elevado valor nutricional, rica em nutrientes e antioxidantes, que proporciona benefícios a saúde e que tenha sabor apreciado pelos consumidores (FELZENSZWALB et al., 2013).

Os frutos de açaí e de juçara são ricos em antocianinas, um composto da família dos flavonoides responsável pela coloração roxa escura da polpa e da bebida, que atribui a propriedades antioxidantes a esses frutos. As principais antocianinas descritas para ambas as espécies são cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo (BICUDO, 2014; ROCHA, 2017). Tanto no açaí quanto na juçara são relatadas a presença de outras antocianinas (quadro 1).

Na literatura os valores totais de antocianina variam devidos a diversos fatores. As avaliações são influenciadas pela estação e pelo o estágio de maturação do fruto no momento da colheita. Sabe-se que o clima frio dos meses de maio a junho, a diminuição da intensidade da luz e o maior grau de maturidade dos frutos favorece o acúmulo de antocianinas e a maior quantificação (ROGEZ, 2000; BICUDO, 2014). Em contrapartida, a presença de chuvas no período de maturação tende a diminuir os teores de antocianinas nos frutos (FALCÃO et al., 2008).

Quadro 1. Antocianinas detectadas em polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) e juçara (*Euterpe edulis*) e referências.

| <i>Euterpe oleracea</i> | <i>Euterpe edulis</i> | Referências |
|--|--|--|
| Cianidina 3-glicosídeo Cianidina 3-rutinosídeo | Cianidina 3-glicosídeo Cianidina 3-rutinosídeo | Iaderoza, (1992) Strack, Wray (1994) |
| Cianidina 3- arabinosídeo Cianidina 3- arabinosil- arabinosídeo | - | Bobbio (2000) |
| Pelargonidina 3-glucosídeo | - | Del Pozo-Insfran et al. (2004) |
| Peonidin-rutinosídeo | - | Lichtenthäler <i>et al.</i> (2005) |
| Cianidina 3- sambudiosídeo, Peonidina 3-rutinosídeo Peonidina 3-glucosídeo | - | Schauss <i>et al.</i> (2006b) |
| - | Pelargonidina 3-glicosídeo, Pelargonidina 3-rutinosídeo Cianidina 3-ramnosídeo | Brito (2007) |
| Cianidina-3-ramnosídeo Pelargonidina-3- rutinosídeo | - | Rosso <i>et al.</i> (2008) |
| | Cianidina 3-O-diglicosídeo Peonidina 3-O- glicosídeo Peonidina 3-O- rutinosídeo | Bicudo (2014) |
| | Cianidina -3,5- diglucosídeo Cianidina -3- galactosídeo Cianidina -3- glucosídeo Cianidina -3- sofrósídeo Cianidina -3- pentosídeo Cianidina -3 – ramnosídeo-galactosídeo | Rocha (2017) |
| | Cianidina – 3 – pentosídeo- galactosídeo Cianidina – 3 – ramnosídeo- galactosídeo Pelargonidina – 3 – glucosídeo Pelargonidina – 3 – ramnosídeo- galactosídeo Cianidina – 3 – <i>cis</i> – ramnosídeo Peonidina – 3 – galactosídeo Cianidina -3 – pentosídeo Peonidina – 3 – ramnosídeo – galactosídeo Cianidina – 3- <i>trans</i> – ramnosídeo 385- galactosídeo 385- ramnosídeo | Rocha (2017) |

*Por questão de organização, foram apresentados unicamente os novos compostos descritos para cada espécie pelos autores nos anos de 1992 a 2017.

A metodologia utilizada para a análise e o tipo de tratamento do material, se liofilizado, congelado ou fresco também proporciona alterações nas medições de antocianina (LICHTENTHÄLER et al., 2005; SCHAUSS, 2006; ROSSO, 2008). Esses teores também variam entre as espécies *E. oleraceae* e *Euterpe edulis*. Iaderoza em 1992, ao trabalhar com ambas as espécies, em uma análise qualitativa, conseguiu determinar que os frutos de juçara apresentavam cerca de quatro vezes mais antioxidante que os do açaí. As quantificações para o açaí relatada na literatura variam entre 263 mg/100g na polpa fresca (BOBBIO, 2000), 282,5 mg/100g na polpa congelada (SCHAUSS et al. 2006) a 319 mg/100g polpa liofilizada (ROSSO et al., 2008). Para Juçara os valores encontrados para polpa liofilizada variaram de 236,19 mg/100g (BICUDO, 2014) a 2.956 mg/100g (BRITO, 2017).

A polpa do açaí constitui um alimento energético, em 100g de polpa liofilizada encontra-se de 65,7 Kcal, açaí textura média com 12,5% de matéria seca (ROGEZ, 2000), a 489,39 Kcal (MENEZES et al., 2008). Para juçara os valores de variam de 83 Kcal (INADA, 2015) a 403 Kcal (GUERGOLETTTO, 2016) em 100g de matéria seca. Os lipídios são responsáveis pela maior proporção das calorias podendo corresponder de aproximadamente 40% (MENEZES et al., 2008) a 50% da matéria seca e até 90% da bebida (ROGEZ, 2000; CARDOSO et al., 2018).

O óleo de açaí é um subproduto obtido do processo de clarificação da polpa. Nesse processo ocorre uma centrifugação e uma filtração por micromembranas da polpa do açaí. O resultado são dois produtos, o suco do açaí mais límpido e translúcido, e o óleo do açaí um fluido viscoso de cor verde escuro (MATTA et al., 2010). Esse óleo vegetal pode ser comparado com outros óleos mais utilizados no mercado como o de amêndoas e o azeite de oliva (PACHECO-PALENCIA et al. 2008).

A fração lipídica do açaí é composta em sua maioria (74%) por ácidos graxos insaturados, como o ácido oléico (ômega 9), ácido linoléico (ômega-6) e linolênico (ômega 3). Dentre os ácidos graxos saturados destaca-se o ácido palmítico (cerca de 24%) e o ácido esteárico (ROGEZ, 2000; NASCIMENTO et al., 2008; PACHECO-PALENCIA, 2008b; SCHIRMANN, 2009). Em *E. edulis* é o ácido palmítico é o principal ácido graxo saturado. Dentre os ácidos graxos insaturados dessa espécie destacam-se o oléico e o linoleico. Autores como Schirmann (2009)

ao comparar *E. edulis* e *E. oleracea* encontraram valores médios de ácido graxo muito próximos (cerca de 72% dos lipídios da polpa seca). Entretanto ao contrastar os valores obtidos para juçara (SCHIRMANN, 2009) com os publicados para *E. oleracea* por Nascimento et al., em 2008 (68,16%) e Rogez em 2000 (67,5%), percebemos que *E. edulis* apresentou valor superiores.

O açaí é um alimento de baixo valor glicêmico, podendo *a priori* ser oferecida aos diabéticos, pois não é uma fonte de rápida disponibilidade energética. Estudos mostram que os principais açúcares disponíveis são glicose, frutose e maltose (ROGEZ, 2000; ALEXANDRE et al., 2004). Os teores de açúcares totais em 100g de massa seca de açaí variam de 2,96% (ALEXANDRE et al., 2004) a 3,55% (ROGEZ, 2000). Em juçara os valores de açúcares variaram de 1,2% (SILVA et al, 2004) a 3,8% (GUERGOLETO, 2016) em 100g de polpa liofilizada. Dessa forma, a polpa da juçara apresenta teores de açúcares totais superiores ao da polpa de açaí. Ao juntarmos os dados de teores de açúcares totais e lipídios é possível atribuir que *E. edulis* possui valor energético maior ou equiparado a *E. oleracea*.

O conteúdo proteico da polpa do açaí é em média 10% de 100g de massa seca (ROGEZ, 2000; BICUDO 2014), podendo ser encontrado cerca de 7% nos estudos de Schauss (2006) e Silva *et al.* (2004). Para Juçara os valores variam de 0,09% (RIBEIRO et al., 2011; PAIM et al.,2016) a 8,21% (BORGES, 2013). No fruto encontra-se também uma porção de fibras totais de cerca de 25% (ROGEZ, 2000; BICUDO, 2014) da polpa liofilizada. Para juçara esse valor se situa na faixa de 34,2% a 44,4% da polpa liofilizada (SCHAUSS, 2006; RUFINO, 2016).

A composição do açaí permite considerá-lo um alimento completo nutricionalmente, pois além dos teores de lipídicos, de compostos fenólicos, proteínas, fibras alimentares, da presença de vitaminas A, C e E, existe os teores de macro e micronutrientes. Diversos autores analisaram os componentes minerais de polpas de açaí e juçara (Quadro 2). Pelos dados pode-se concluir que ambas as espécies apresentam quantidades próximas desses elementos, com exceção do ferro, zinco e potássio, maiores em *E. edulis* (SILVA et al., 2004; BICUDO, 2014).

Apesar da grande quantidade ferro nos frutos de açaí e de juçara, esse é o micronutriente com menor biodisponibilidade no organismo (MENEZES et al., 2008). Schulz et al. (2017) em um teste *in vitro* com polpa de juçara obteve uma taxa de 0 a 29,5% de assimilação de ferro pelas células. Esse resultado é

influenciado pelas concentrações de proteínas, pois são elas que aumentaram a bioacessibilidade pela redução e quelação de ferro. Quanto maior a maturação dos frutos, maior os teores de proteínas e maior a absorção de ferro pelas células. O consumo de vitamina C junto com a polpa de açaí e juçara aumenta a absorção do ferro pelo organismo. Podendo ser uma alternativa de consumo e maximização dos nutrientes existentes nesse alimento (SOUZA; RODRIGUES, 2016).

De acordo com Brito et al. (2007), no Brasil, a juçara é menos consumida que o açaí. Tal afirmação não é justificada perante os valores nutricionais das duas espécies e nem pelo sabor, até porque ambas possuem o sabor semelhante, sendo a juçara inclusive mais doce que o açaí. A explicação fica por conta da pouca procura por esses frutos pelo mercado e devido a disponibilidade do produto para venda. A produção de polpa para atender a demanda do comércio, ainda cabe aos pequenos agricultores e as cooperativas, que utilizam o manejo sustentável como forma de obtenção dos frutos de juçara (SOUZA; LORENZI, 2008).

Quadro 2. Elementos minerais em mg/100g de massa seca de polpa de açaí e juçara. Quadro adaptado de Cardoso et al. (2018).

| Elementos Minerais | <i>E. edulis</i> | Referência | <i>E. oleracea</i> | Referência |
|--------------------|------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|
| Cálcio (Ca) | 1040,6 | Silva et al., 2013 | 100 | Novello, 2011 |
| | 596,7 | Schuluz et al., 2015 | 330 | Menezes et al., 2008 |
| | 76,4 | Novello et al., 2015 | 260 | Schauss, et al., 2006 |
| | 100 | Ianada et al., 2015 | - | - |
| Cobre (Cu) | 9,93 | Silva et al., 2013 | 1,11 | Novello, 2011 |
| | 1,11 | Novello et al., 2015 | - | - |
| | 0,5 | Ianada et al., 2015 | - | - |
| Ferro (Fe) | 65,3 | Silva et al., 2013 | 5,2 | Novello, 2011 |
| | 7,2 | Schuluz et al., 2015 | 4,4 | Menezes et al., 2008 |
| | 5,2 | Novello et al., 2015 | 4,5 | Schauss, et al., 2006 |
| | 4,3 | Ianada et al., 2015 | - | - |
| Fósforo (P) | 1324,5 | Silva et al., 2013 | 26,7 | Novello, 2011 |
| | 26,7 | Novello et al., 2015 | 54,5 | Menezes et al., 2008 |
| | 41,2 | Ianada et al., 2015 | - | - |
| Magnésio (Mg) | 974,4 | Silva et al., 2013 | 98 | Novello, 2011 |
| | 183 | Schuluz et al., 2015 | 142,4 | Menezes et al., 2008 |
| | 98 | Novello et al., 2015 | - | - |
| | 47,4 | Ianada et al., 2015 | - | - |
| Manganês (Mn) | 33,6 | Silva et al., 2013 | 23,9 | Novello, 2011 |
| | 8,4 | Schuluz et al., 2015 | 10,7 | Menezes et al., 2008 |
| | 23,9 | Novello et al., 2015 | - | - |
| | 3,0 | Ianada et al., 2015 | - | - |
| Potássio (K) | 1090,8 | Silva et al., 2013 | 892,2 | Novello, 2011 |
| | 1291,5 | Schuluz et al., 2015 | 900 | Menezes et al., 2008 |
| | 892,2 | Novello et al., 2015 | - | - |
| | 419,1 | Ianada et al., 2015 | - | - |
| Sódio (Na) | 14,2 | Schuluz et al., 2015 | 149,3 | Novello, 2011 |
| | 149,3 | Novello et al., 2015 | - | - |
| | 17,3 | Ianada et al., 2015 | - | - |
| Zinco (Zn) | 27,1 | Silva et al., 2013 | 2,07 | |
| | 2,8 | Schuluz et al., 2015 | - | - |
| | 2 | Novello et al., 2015 | - | - |
| | 0,9 | Ianada et al., 2015 | - | - |

3. USO DA POLPA DE PALMEIRA JUÇARA NA ALIMENTAÇÃO

Embora o uso tradicional mais conhecido do *E. edulis* como alimento ainda seja o palmito, este uso é restrito e precisa atender a legislação de manejo, uma vez que se trata de uma espécie nativa e ameaçada. (NODARI et al., 1987; CONTE et al., 2000). Logo, em detrimento da necessidade de direcionar ao uso sustentável e a urgente questão da conservação da espécie, serão listados os usos da polpa dos frutos da palmeira juçara na alimentação humana.

Os frutos de juçara possuem propriedades sensoriais e nutricionais semelhantes ao açaí (DI PIETRO et al., 2017). O “açaí do Pará” ou “açaí da Amazônia” que provém do açazeiro (*E. oleracea*) é considerado um dos frutos mais nutritivos cultivados na Amazônia; da mesma forma *E. edulis* produz frutos dos quais pode ser extraída a polpa, chamada de “juçaí”. Contudo, como o termo açaí é amplamente difundido nacional e internacionalmente, a polpa de juçaí, é comumente comercializada como açaí, uma vez que isto facilita o comércio e valoriza monetariamente o produto.

Inicialmente o consumo de polpa de açaí era mais visada por atletas de alto rendimento, devido ao alto teor energético. Contudo, as crescentes informações sobre os benefícios do consumo do açaí à saúde humana e o sabor muito agradável quando processado, tem favorecido a aceitação do produto pela população em geral. As principais formas de consumo da polpa de juçara e açaí são *sorbet*, sucos, vitaminas, iogurte e farinha (polpa liofilizada) como demonstrada na figura 4.

Sorbet de juçaí - O *sorbet*, diferente do sorvete, feito com produtos lácteos e gorduras, é feito com água e frutas, e sem a adição de gorduras. É a forma mais difundida de consumo da polpa de juçaí. Há grande incentivo para que os produtores de polpa beneficiem o produto em *sorbet*, agregando valor ao produto, aumentando o retorno financeiro e ampliando a cadeia produtiva. Para tanto, aproveitando a tendência dos ditos “alimentos funcionais”, o *sorbet* de juçaí pode ser fabricado usando ingredientes orgânicos e com menor incremento calórico: adicionando açúcar demerara orgânico como substituto ao açúcar refinado, calda de agave orgânico em substituição ao xarope de glucose, guaraná, goma guar, goma xantana e acidulante ácido ascórbico (JUÇAÍ®, 2018).



Figura 4. Principais formas de consumo da polpa da juçara (*E. edulis*) e do açai (*E. oleracea*), (A) sorbet, (B) sorvete, (C) sucos e vitaminas, (D) salgado com farinha de tapioca e camarão e (E) farinha.

Em geral, o *sorbet* não contém corantes, aromatizantes e conservantes artificiais, nem glúten, lactose ou gorduras trans. Dependendo da base e da fruta que pode ser incluída no processamento (banana, goiaba, maracujá, morando, entre outras), para cada 100 ml do produto são disponibilizadas de 80 a 90 calorias, e cerca de 60 mg de antocianinas (JUÇAI®, 2018).

Em estudo comparativo entre *sorbets* elaborados com polpa de açai e de juçara, foram avaliados a atividade antioxidante, os polifenóis, as antocianinas, o pH, a acidez, os sólidos solúveis e a coloração. Verificou-se que as polpas são físico-quimicamente semelhantes e que os *sorbets* preservaram grande parte dos nutrientes. Contudo, o *sorbet* de juçara mostrou melhores resultados quanto aos parâmetros bioativos (antioxidantes e antocianinas) e coloração mais intensa (SIQUEIRA et al., 2018).

Iogurte de juçai - Iogurtes são produtos lácteos consumidos em todo o mundo e podem ser suplementados com substâncias que proporcionam benefícios

adicionais à saúde. O processamento da polpa de juçara e a sua adição em iogurte natural é comprovadamente favorável ao aumento da resistência probiótica (*Lactobacillus acidophilus*) as condições gástricas e entéricas e, assim, indicam que a polpa juçara é um ingrediente potencial para a produção de iogurtes probióticos (GERALDI et al., 2018).

Suco de juçará - Após a extração e sua diluição, a polpa de juçará pode ser destinada a fabricação de sucos. Um estudo avaliou o efeito da ingestão de sucos de juçara e açaí em biomarcadores de estresse oxidativo em voluntários saudáveis. Os biomarcadores do estresse oxidativo analisados foram a glutathione peroxidase, a superóxido dismutase, a catalase, a capacidade antioxidante total e o estado oxidante total. Os sucos de juçara e açaí diminuíram significativamente o estado oxidante total após 1h e 2h da ingestão. A atividade da catalase aumentou após 1 hora de ingestão do suco de juçara e após 2 horas do consumo do açaí, o que demonstra um efeito positivo do consumo de juçara e açaí em forma de suco sobre a capacidade antioxidante e na atenuação de danos oxidativos em indivíduos saudáveis (DI PIETRO et al., 2017).

Farinha de juçará - Após a extração da polpa de juçará, esta pode ser transformada em farinha através do processo de moagem e desidratação (secagem). A desidratação pode ser realizada por secagem ou liofilização. A farinha de juçará pode ser beneficiada pelo processo de secagem por atomização utilizando-se misturas de amido modificado (AM), concentrado proteico de soro de leite (CPL) ou isolado proteico de soja (IPS), como agentes carreadores (SANTANA et al, 2018).

A liofilização da polpa é a forma mais seguras de se manter a composição bromatológica e as propriedades nutricionais, além de facilitar a logística de transporte, armazenamento e comercialização. A polpa de juçará liofilizada é comercializada sob preços que chegam a R\$ 100 Kg⁻¹ (SANTANA et al, 2018).

Todas essas formas de consumo da polpa de açaí e juçara, fomenta o comércio dos frutos. Essa demanda possibilita a criação de fonte de renda na zona rural, permite aos agricultores trabalharem em conjunto formando redes de cooperados, gerando empregos desde a coleta, ao beneficiamento e distribuição. O apelo ecológico da juçara, acrescenta valor aos produtos comercializados e impulsiona o agroturismo. Esse podendo ser um nicho a ser explorado pelas famílias rurais,

através de passeio com roteiro que incluam todo o processo de obtenção da polpa da mata a mesa, incluindo a parte gastronômica dos cafês coloniais com comidas desenvolvidas com a polpa dos frutos.

4. USO DA POLPA DE PALMEIRA JUÇARA NA MEDICINA

O fruto da *Euterpe edulis*, assim como o açaí possuem grande quantidade de antocioninas, flavonoides e ácidos fenólicos, compostos como potencial atividade antioxidante (BICUDO, 2014). Quando ingeridos, esses compostos ajudam a proteger as células contra danos do estresse oxidativo, estabilizando ou desativando os radicais livres, antes que ataquem as células (PISOSCHI & POP, 2015), e tornando-se importantes aliados na prevenção de doenças crônicas, principalmente as cardiovasculares (SZAJDEK & BOROWSKA, 2008; REIS et al., 2016). Esse composto tem sido testados *in vitro* e *in vivo* tanto em humanos quanto em animais (BORGES et al., 2013; BICUDO et al., 2014; SCHULZ et al., 2015; CARDOSO et al., 2015; OYAMA et al., 2016), e estão sendo relacionados a melhora da atividade antioxidante, dos perfis lipídicos, glicêmico e modulação do estado inflamatório (CARDOSO et al., 2015; OYAMA et al., 2016).

A composição nutricional do fruto de juçara também é interessante como fontes de ácidos graxos insaturados (BORGES et al., 2011; SCHULZ et al., 2015). No geral, esses ácidos são os dominantes na fração lipídica e estão associados a benefícios à saúde por diminuírem os níveis de colesterol LDL e triacilgliceróis no sangue, serem associados à redução do risco de doenças cardiovasculares (DAMODARAN et al., 2010), bem como a lipogênese hepática (HARRIS et al., 2006).

A atividade biológica do extrato hidroalcoólico de sementes de açaí também tem sido testado *in vivo* em diferentes modelos, tendo com resposta o efeito anti-hipertensivo, anti-inflamatórias e na redução do dano oxidativo (COSTA et al., 2012; MOURA et al., 2012; BEM et al., 2014). Esses achados sugerem propriedades terapêuticas dos extratos das sementes de açaí, podendo ser promissor no uso medicinal.

Os benefícios para a saúde proporcionada pelos antioxidantes e pela fração lipídica (óleos) não se restringe somente a prevenção de doenças. Muitos

compostos que estão sendo estudados devido a ação medicamentosa, também têm atraído a indústria farmacêutica para integrar a composição de cosméticos.

5. USO DA POLPA DE PALMEIRA JUÇARA EM COSMÉTICOS

É indiscutível que se possa cuidar da saúde e da beleza sendo ecologicamente consciente. O uso de fito cosméticos está crescendo exponencialmente no Brasil e no mundo, por ser mais natural e por permitir o cuidado mais do que especial ao corpo (DUAILIBI, 2007). O açaí (*Euterpe oleracea*) e o juçara (*Euterpe edulis*) são concorrentes diretos neste mercado, por serem consideradas como “super” plantas e produzirem frutos repletos de compostos de interesse farmacêutico e cosmético (SCHAUSS et al., 2006; PACHECO-PALENCIA et al., 2008).

Consideradas por muitos pesquisadores como plantas medicinais, estas duas espécies apresentam em sua composição altos teores de antocianinas, compostos fenólicos e características emolientes em sua composição química, algo relevante para a composição dos cosméticos (MANTOVANI, 1998; MANTOVANI 2003). Bobbio et al., (2002), Del Pozo et al., (2004), Gallori et al., (2004), Schauss et al., (2006) e Rosso et al., (2008) também identificaram antocianinas em polpa de *E. oleracea*, em teores que se assemelham a outros frutos já conhecidos e comercializados, alguns já consagrados pela indústria de produtos de beleza e bem-estar.

Os radicais livres desempenham alguns papéis no organismo, dentre eles a produção de energia, a sinalização intercelular e a fagocitose. Porém, a desarmonia entre os radicais livres e os antioxidantes ocasionam danos ao organismo, o chamado estresse oxidativo. Dentre algumas consequências, o estresse oxidativo acarreta o envelhecimento precoce e algumas dermatites (SIES et. al., 2005; ALVES et. al., 2010). Diante da ação dos antioxidantes como protetores das células, e a presença desse composto nos frutos do açaí e do juçara, a indústria de cosméticos tem investido e fortalecido o uso dos mesmos na composição dos produtos voltados para o combate aos radicais livres (BOBBIO et al., 2002; DEL POZO et al., 2004; GALLORI et al., 2004; ROSSO et al., 2008 e KANG et al., 2011).

Como já relatado, as espécies *E.edulis* e *E. oleracea* são ricas em óleos vegetais compostos por ácidos oleico, linolênico, esteárico, linoleico, palmitoleico,

palmítico e gálico, óleos estes utilizados como fito cosméticos pela indústria devido as propriedades emolientes, hidratantes e foto protetora. Pereira (2008) afirma que estes óleos apresentam semelhanças aos lipídeos encontrados na pele humana, formadores de barreiras responsáveis pela impermeabilização da pele. Dessa forma, esses óleos e seus extratos tem sido utilizado em produtos para o cabelo e pele, como xampus, creme de pentear e hidratantes corporais, por promover a máxima hidratação e reestruturação da pele e dos fios capilares (BOTTARO et al., 2010; PORTINHO et al., 2012).

Na cosmetologia, a vitamina F encontrada nos frutos dessas palmeiras, contribui para a saúde da pele e dos cabelos, sendo composta por ácidos como o linoleico e o linolênico, com grande aplicabilidade no setor cosmético por contribuir para o equilíbrio hidrolipídico celular agindo na prevenção do tecido cutâneo (CUNHA et al., 2008). O ácido oleico por se tratar de um produto emoliente é comumente utilizado como aditivo em sabonetes, cremes, emulsões, protetores solares e bronzeadores impedindo o aparecimento de rugas, flacidez e manchas na pele ocasionados pela radiação UV (MAMEDE et al., 2004; CAMPESTRE IND. E COM. DE ÓLEOS VEGETAIS LTDA, 2017).

Euterpe edulis e *E. oleracea* também apresentam em sua composição a vitamina E (α -tocoferol), outra responsável pelo efeito foto protetor. A vitamina E reduz a radiação UV-B, protegendo a pele através do sequestro dos radicais livres, agindo como inibidor do câncer de pele. Estudos avançados também associam o uso da vitamina E com ação cicatrizante (CUNHA et al., 2008; MANELA-AZULAY e BAGATIN, 2009; HAFIDH et al., 2009; GUARANTINI et al., 2009).

Por fim, empresas como a Natura e O Boticário (Figura 5) já possuem segmentos específicos de fito cosméticos, como é o caso da NativaSpa do Boticário e da Natura Ekos, que emprega o slogan: «vitalidade e energia para a sua pele», que garantem revitalização da pele. Essas ações vêm ganhando cada vez mais o mercado nacional e o mundial, contribuindo para o uso sustentável do açaí e da juçara (REDAÇÃO NATURA, 2015).



Figura 5. Produtos desenvolvidos com açaí das marcas da Nativ Spa do Boticário e da Natura Ekos.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Fica claro que aos poucos o açaí da *E. oleracea* foi conquistando o seu espaço, o gosto dos consumidores e as pesquisas. Existem muitas informações na literatura sobre açaí quanto a forma de manejo, a sua utilização da alimentação, a composições físico-química dos frutos e sua utilização em cosméticos. Entretanto, ainda estamos no começo de uma longa caminhada sobre os benefícios que o fruto e seus compostos, podem efetivamente oferecer a saúde e ao combate a doenças.

É perceptível que o mundo acadêmico aos poucos desperta para as grandes possibilidades oferecidas pela *E. edulis*, e para a importância de fomentar utilizações alternativas sustentáveis dos frutos dessa espécie na comunidade. Visto que quanto a composição, os frutos da juçara e do açaí são semelhantes em diversos quesitos, mas deve-se ressaltar que os maiores teores de antocianina são encontrados nos frutos da juçara, e que este pode ser considerado mais energético.

Como *E. edulis* se trata de uma espécie pouco domesticada, se torna necessária o aumento da intervenção da pesquisa a fim de direcionar a produção, ampliar a oferta, obter um produto de melhor qualidade e a preços menores. Isso porque, a extração dos frutos de juçara ainda acontece em sua maioria por exploração sustentável. Existem recomendações de como deve ser a extração dos frutos, mas plano de manejo ainda precisa ser formulado e disponibilizado para os produtores e coletores (JUÇAÍ®, 2018).

Para os avanços maiores é necessário, que as análises da composição da

polpa estejam associadas aos dados de produção a campo, caracterizando o potencial individual das plantas, que possam servir de matrizes em programas de melhoramento. Variações entre os locais de produção devem continuar sendo investigadas a fim de esclarecer a influência das características do solo, da disponibilidade de luz, água e outros fatores bióticos e abióticos na qualidade da polpa. Além disso, é importante que o processamento dos frutos seja padronizado e as análises bromatológicas sejam realizadas com maior cautela, minimizando a variação dos resultados, a qual é muito evidente na literatura (MIRÓ; CHIQUETTO, 2016). Com relação a produção, o beneficiamento e o consumo, as informações disponíveis para a juçara são contraditórias, uma vez que boa parte deste produto é comercializado com a denominação errônea de açaí, tendo em vista as similaridades.

7. AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos órgãos de fomento CAPES, FAPES e CNPq pelo apoio, a UFES e ao Programa de Pós-Graduação pela estrutura e pelos ensinamentos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCORSI, W. R.; de BARROS, M. A. A. Morfologia do fruto e da semente de *Euterpe edulis*, Mart. An. Esc. Super. Agric. Luiz de Queiroz, Piracicaba, v. 31, p. 701-711, 1974.

ALEXANDRE, D.; CUNHA, R.L.; HUBINGER, M.D. Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.24, n.1, p.114-119, 2004.

ALVES C, Q; DAVID J. M.; DAVID J. P.; BAHIA M. V.; AGUIAR R. M. Métodos para a determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. Química Nova. v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

de BEM, G. F.; da COSTA, C. A.; de OLIVEIRA, P. R.; CORDEIRO, V. S.; SANTOS, I. B.; de CARVALHO, L. C.; SOUZA, M.A.; OGNIBENE, D.T.; DALEPRANE, J.B.; SOUSA, P. J.; RESENDE, A. C.; de MOURA, R. S. Protective effect of *Euterpe oleracea* Mart (açaí) extract on programmed changes in the adult

rat offspring caused by maternal protein restriction during pregnancy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 66, n. 9, p. 1328-1338, 2014.

BICUDO, M. O. P. Composição fenólica, atividade antioxidante e microencapsulação de frutos de juçara (*Euterpe edulis*): aspectos de interesse para a indústria de alimentos. 2014. 143 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

BOBBIO F. O; BOBBIO P. A; OLIVEIRA P. A; FADELLI S. Stability and stabilization of the anthocyanins from *Euterpe oleracea* Martius *Acta Alimentaria*. v. 31, n.4, p. 371-377, 2002.

BOBBIO F. O; DRUZIAN J. I.; ABRÃO P. A.; BOBBIO P. A.; FADELLI S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açazeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v. 20, n. 3, p. 388-390, 2000.

BORGES G. S. C; VIEIRA F. G. K; GONZAGA L. V; ZAMBIAZI R. C; FILHO J. M; FETTA R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 2128-2133, 2011.

BORGES G. S. C; GONZAGA L. V; JARDINI F. A; FILHO J. M; MICKE M. H. G; COSTA A. C. O; FETTA R. Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC-ESI-MS/MS. *Food Research International*, v. 51, n. 1, p. 363-369, 2013.

BOTTARO, M.; GONÇALVES, G. M. S. Obtenção de extrato de açaí, avaliação do efeito antioxidante *in vitro* e desenvolvimento de formulações dermocosméticas para a sua veiculação. *Anais do XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas- 2009*.

BOVI, M. L. A.; CARDOSO, M. Conservação de palmitero (*Euterpe edulis* Mart). *Bragantia*, v. 37, n. 1, p. 65-71, 1978.

BOVI, M. L. A.; CARDOSO, M. Germinação de sementes de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.). *Bragantia*, v. 34, n. único, p. 29-34, 1975.

BOVI, M. L. A.; GODOY JÚNIOR, G.; SÁES, L. A. Correlações Fenotípicas Entre Caracteres da Palmeira *Euterpe edulis* Mart. e Produção de Palmito. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 14, n.01, p. 105-121, 1991.

de BRITO, E. S.; de ARAÚJO, M. C.; ALVES, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolão, Jussara e guarabiju. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 23, n. 55, p. 9389-9394, 2007.

CAMPESTRE IND. E COM. DE ÓLEOS VEGETAIS LTDA. Ácido Oleico: Oleína. São Bernardo do Campo – SP. 2017. Disponível em: <<http://www.acidooleico.com.br/home/#>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

CARDOSO, A. L.; DI PIETRO, P. F.; VIEIRA, F. G.; KUNRADI, G.; BOAVENTURA, B. C. B.; LIZ, S.; BORGES, G. S. C.; FETT, R.; ANDRADE, D. F.; SILVA, E.L. Acute consumption of juçara juice (*Euterpe edulis*) and antioxidant activity in healthy individuals. *Journal of Functional Foods*, v. 17, p. 152-162, 2015.

CARDOSO, A. L.; LIZ, S. RIEGER, D. K; CAROLINA, A; FARAH, A; KUNRADI, F. G; ALICE, M; ASSIS, A; FARIA, P; PIETRO, D. I. An update on the biological activities of *Euterpe edulis* (Juçara). *Planta Med*, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0044-101624>

CARDOZO, L., PEDRUZZI, L. M, STENVINKEL, P., STOCKLER-PINTO, M. B, DALEPRANE, J. B.; LEITE, M. J. R; MAFRA, D. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie*, v. 95, n. 8, p. 1525-1533, 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Conjuntura mensal: juçara (fruto), Período: 01 a 30/04/2016 três. Brasília: Conab, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_10_17_42_06_jucara_abril_2016.pdf>. Acesso em: 26 de março de 2018.

CONTE, R.; REIS, M. S. dos; REIS, A.; MANTOVANI, A.; MARIOT, A.; FANTINI, A. C.; NODARI, R. O. Dinâmica da regeneração natural de *Euterpe edulis*. *Sellowia*, v. 49-52, p. 106-130, 2000.

CONTE R.; NODARI R. O.; VENCOSKY R.; DOS REIS M. S. Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, v. 91, n. 4, p. 401-406, 2003.

da COSTA, C. A; DE OLIVEIRA, P. R; de BEM, G. F; de CAVALHO, L. C; OGNIBENE, D. T; da SILVA, A. F; VALENÇA, S. S.; PIRES, K. M; SOUSA, P. J. C; de MOURA, R. S; RESENDE, A. C.; *Euterpe oleracea* Mart.-derived

polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, v. 385, n. 12, p. 1199-1209, 2012.

DEL POZO-INSFRAN, D; BRENES C. H.; STEPHEN T.T; Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Martius). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 52, n. 6, p. 1539-45, 2004.

DI PIETRO, P. F.; CARDOSO, A. L.; LIZ, S.; FARAH A. C. A.; VIEIRA, F. G. K.; VENSKE, D. K. R.; DA SILVA, E. L; de ASSIS, M. A. A. Antioxidant effect of açai and juçara juice on healthy subjects. *FASEB Journal*, v. 31, n. 1, 2017.

DUAILIBI, J. O açai na trilha do kiwi. *VEJA*, n. 14, ano 40, 11 de abril de 2007.

EMBRAPA. Juçara - Embrapa documentos. 2018. Disponível em: https://www.embrapa.br/documents/1355054/26025431/SITE+ARVORES_FICHA_32_Euterpe+edulis.pdf/2710e1cc-3089-257e-debf-18feac4b5d91. Acesso em 26 de março de 2018.

FALCÃO, L. D.; CHAVES, E. S.; BURIN, V. M.; FALCÃO, A. P.; GRIS, E. F.; BONIN, V.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Maturity of cabernet sauvignon berries from grapevines grown with two different training systems in a new grape growing region in Brazil. *Ciência e Investigación Agraria*, v.35, n.3, p.271–282, 2008.

FARIAS NETO, J. T. de; RESENDE, M. D. V. de; OLIVEIRA, M. do S. P. de; SANTOS, N. S. A. dos; CANUTO E. L.; NOGUEIRA, O. L.; MULLER, A. A. Avaliação genética de progênies de polinização aberta de açai (*Euterpe oleracea*) e estimativas de parâmetros genéticos. *Revista Cerne*, Lavras, v. 13, n.4, p.376-383, 2007.

GAIOTTO, F. A; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOVSKY, R. Genetic Structure, Mating System, and Long-Distance Gene Flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mart.). *Journal of Heredity*, v. 94, n. 5, p. 399–406, 2003.

GALLORI, S., BILIA, A. R., BERGONZI, M. C., BARBOSA, W. L. R., & VINCIERI, F. F. Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). *Cromatographia*, v.59, n.11-12, p.739–743, 2004.

GERALDI, M.V; TULINI, F.L.; SOUZA, V, M,; DE MARTINIS, E.C.P. Development of Yoghurt with Juçara Pulp (*Euterpe edulis* M.) and the Probiotic *Lactobacillus acidophilus* La5. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, n. 10, n. 1, p. 71-76, 2018.

K. B. GUERGOLETTTO, K. B.; COSTAILE, A.; FLORES, G.; GARCIA, S.; GIBSONA, G.R. In vitro fermentation of jucara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. *Food Chemistry*, v. 196, p. 251–258. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.048>>.

R. R. HAFIDH, A. S. ABDULAMIR, F. ABU BAKAR, F. ABAS, F. JAHANSHIRI AND Z. SEKAWI. Antioxidant Research in Asia in the Period from 2000-2008. *American Journal Pharmaceutical & Toxicology*. v. 4, n.3, p. 48-66, 2009.

HARRIS, W. S.; BULCHANDANI, D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides?. *Current opinion in lipidology*, v. 17, n. 4, p. 387-393, 2006.

IADEROZA, M. BALDINI, V.L.S. DRAETTA, I.S. BOVI, M.L.A. Anthocyanins from fruits of açai (*Euterpe oleracea* Mart) and juçara (*Euterpe edulis* Mart). *Tropical Science*, v.32, p.41–46, 1992.

IBGE. Açai. 2016. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/2012-agencia-de-noticias/noticias/16821-safra-de-acai-foi-de-1-1-milhao-de-toneladas-em-2016.html>. Acesso em 26 de março de 2018.

INADA, K. O. P.; OLIVEIRA, A. A.; REVORÊDO, T. B.; MARTINS, A. B. N.; LACERDA, E. C. Q.; FREIRE, A. S.; BRAZ, B. F.; SANTELLI, R. E.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M.C. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. *Journal of Functional Foods*, v. 17, p. 422–433. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.002>>.

JUÇAI®. Juçai - uso polpa juçai alimentação humana. 2018. Fonte: <https://www.jucaicom.br/sabores>. Acesso em 26 de março de 2018.

KABIR, F.; TOW, W. W.; HAMAUZU, Y.; KATAYAMA, S.; TANAKA, S.; NAKAMURA, S. Antioxidant and cytoprotective activities of extracts prepared from fruit and vegetable wastes and by-products. *Food Chemistry*, v. 167, p. 358-362, 2015.

KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A.G.; WU, T.; WU, X. Flavonoids from açai (*Euterpe oleracea* Martius) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chemistry*. v. 128, p. 152–157, 2011.

LEITMAN, P.; SOARES, K.; HENDERSON, A.; NOBLICK, L.; MARTINS, R.C. *Arecaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/>>

FB15711>.

LICHTENTHÄLER, R.; RODRIGUES, R. B.; MAIA, J. G.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleraceae* Mart. (açai) fruits. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v.56, n.1, p.53–64, 2005.

MAMEDE, MEOP; GLÁUCIA M. Compostos Fenólicos do Vinho: Estrutura e Ação Antioxidante. *B.CEPPA*, Curitiba, v.22, n.2, p.233-252. 2004.

MANTOVANI, A. Fenologia e aspectos da biologia floral de uma população de *Euterpe edulis* Martius na Floresta Atlântica no Sul do Brasil. Rio Claro –SP,1998. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

MANTOVANI, W. A degradação dos biomas brasileiros. In: W.C. Ribeiro (ed.). *Patrimônio ambiental brasileiro*. Editora Universidade de São Paulo, São Paulo. pp. 367- 439.. 2003.

MARTINELLI, GUSTAVO; MORAES, M. A. Livro Vermelho da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: [s.n.]. 2013.

MATTA, V. M. DA et al. Açai Clarificado por Microfiltração. p. 4, 2010.

MENEZES, E. M. S.; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S.MENEZES, E. M. S. et al. Valor nutricional da polpa de açai (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. *Acta Amazonia*, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p.311-316. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v38n2/v38n2a14>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

MERCADANTE, A. Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC– PDA–MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.21, n.4, p.291–299. 2008.

MIRÓ, F. L.; CHIQUETTO, N. C. Avaliação físico-química da polpa da juçara, como ferramenta no processo de conservação da palmeira juçara (*Euterpe edulis*). In: *Anais da 14ª CONEX – Conversando sobre Extensão. Apresentação Oral – Resumo Expandido*. Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, 2016. ISSN 2238-9113.

MOURA, R. S.; FERREIRA, T. S.; LOPES, A. A.; PIRES, K. M.; NESI, R. T.; RESENDE, A. C.; SOUZA, P. J.; SILVA, A. J.; BORGES, R. M.; PORTO, L. C.; VALENCA, S. S. Effects of *Euterpe oleracea* Mart.(AÇAÍ) extract in acute lung

inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine*, v. 19, n. 3-4, p. 262-269, 2012.

NASCIMENTO, R. J. S.; COUR, S.; ANTONIASS, R.; FREITAS, S. P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.30, n.2, p. 498-502, 2008.

NODARI, R. O.; REIS, A. GUERRA, M. P.; REIS, M. S.; FLORIANO, E. P. Análise preliminar do inventário do palmito em Floresta Ombrófila Densa Montana. In: Encontro Nacional De Pesquisadores em Palmito, Curitiba, 1987. Anais. Curitiba: Embrapa, 1987. p.159-65.

NOVELLO, Alexandre Azevedo. Extração de antocianinas dos frutos do açaí da Mata Atlântica (*Euterpe edulis Martius*) e sua atuação na atividade antioxidante e antiatogênica em camundongos APOE $-/-$. Viçosa, 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal de Viçosa.

OLIVEIRA, Andréa. Produção de palmito de açaí - clima, solo, colheita e produtividade. 2016. Disponível em: <<https://www.cpt.com.br/cursos-agroindustria/artigos/producao-de-palmito-de-acai-clima-solo-colheita-e-produtividade>>. Acesso em: 24 mar. 2018.

OLIVEIRA, M. S. P.; MOCHIUTTI, S.; NETO, J. T. F. Domesticação e melhoramento do Açaizeiro. In: BORÉM, A.; LOPES, M.T.; CLEMENT, C.R. Domesticação e Melhoramento-Espécies Amazônicas. Ed. Viçosa, p. 207-235, 2009.

OYAMA, L. M.; SILVA, F. P.; CARNIER, J.; de MIRANDA, D. A.; SANTAMARINA, A. B.; RIBEIRO, E. B.; OLLER DO NASCIMENTO, C. M.; de ROSSO, V. V. Juçara pulp supplementation improves glucose tolerance in mice. *Diabetology & metabolic syndrome*, v. 8, n. 1, p. 8, 2016.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S. T.; SAFE, S.; MERTENS-TALCOTT, S. Absorption and biological activity of phytochemical rich extracts from açaí (*Euterpe oleracea*) pulp and oil in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, n.10, p.3593-3600, 2008.

PAIMA, D. R. S. F.; COSTA, S. D. O.; WALTER, E. H. M.; TONON, R. V. Food Science and Technology Microencapsulation of probiotic jussara (*Euterpe edulis* M.) juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, v. 74, p. 21-25,

2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.022>.

PEREIRA, B. F.; SBRISSIA, A. F.; SERRAT, B. M. Alelopatia intra-específica de extratos aquosos de folhas e raízes de alfafa na germinação e no crescimento inicial de plântulas de dois materiais de alfafa: crioulo e melhorado. *Ciência Rural*, v. 38, p. 561- 564, 2008.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, v. 97, p. 55-74, 2015.

José Alexandre Portinho, J.A; Zimmermann, L.M; Bruck, M.R. Efeitos benéficos do Açaí. *International Journal of Nutrology*, v.5, n. 1, p. 15-20. 2012

SANTOS, L.P.V.S.; NETO, J.P.S.; FUSCO, D.O.; TEIXEIRA, G.H.A. Is the bioaccessibility of minerals affected by the processing steps of juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.)? *LWT*, v. 91, p. 14-25, 2018.

REIS, J. F.; MONTEIRO, V. V.; de SOUZA GOMES, R.; de CARMO, M. M.; da COSTA, G. V.; RIBERA, P. C.; MONTEIRO, M. C. Action mechanism and cardiovascular effect of anthocyanins: a systematic review of animal and human studies. *Journal of translational medicine*, v. 14, n. 1, p. 315, 2016.

SCHULZ, M.; BORGES, G. S. C.; GONZAGA, L. V.; SERAGLIO, S. K. T; OLIVO, I. S.; AZEVEDO, M. S; NEHRING,P; GOIS, J. S; ALMEIDA,T. S; VITALI, L.; SPUDEIT, D. A.; MICKE, G. A; BORGES, D. L. G; FETT,R. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. *Food Research International*, v. 77, p. 125-131, 2015.

SZAJDEK, A.; BOROWSKA, E. J. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 63, n. 4, p. 147-156, 2008.

TROIAN, L. C.; CORBELLINI, L. M.; PRINTES, R. C.; STOFFEL, A. S. Cartilha da Juçara (*Euterpe edulis*): Informações sobre Boas Práticas e Manejo. Rio de Janeiro: Ministério do Meio Ambiente, 2014. 36 p.

GENES CANDIDATOS E MECANISMOS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS AO ESTRESSE HÍDRICO EM PLANTAS

Carla Cristina Gonçalves Rosado

Franciele Barros Souza Sobreira

Francisco Davi da Silva

Lucimara Cruz de Souza

Taís Cristina Bastos Soares

1. INTRODUÇÃO

As plantas estão constantemente sujeitas a vários tipos de estresse, tais como ataque de patógenos, estresse hídrico, estresse luminoso, dentre outros. Estresses são quaisquer condições externas que causam algum tipo de desvantagem e/ou prejuízo aos vegetais. Considerando as mudanças edafoclimáticas que vêm ocorrendo nos últimos anos com o aquecimento da temperatura global, as plantas têm que desenvolver diferentes estratégias e mecanismos que permitam sua adaptação fisiológica nos diversos ambientes e condições de cultivo (TAIZ & ZIEGER, 2013). O impacto das adversas condições ambientais para os vegetais é ecologicamente e economicamente relevante (FELLER & VASEVA, 2014).

A camada epidérmica das plantas serve como uma interface direta entre o ambiente biótico e abiótico. A cutícula, que reveste a epiderme, proporciona uma barreira física e controla a perda de água, a entrada de patógenos e a absorção de compostos lipofílicos. A epiderme pode, ainda, possuir uma camada de tricomas glandulares ou não glandulares, que conferem defesa química e mecânica adicional a estas células. O padrão de expressão dos genes epidérmicos conferem respostas rápidas na superfície das células. Suh et al (2005) identificaram cerca de 1.900 genes supra-regulados na epiderme do caule de *Arabidopsis thaliana* e observaram que aproximadamente 15% dos genes detectados no caule são expressos preferencialmente na epiderme, quando comparados com outras

camadas de células.

Entretanto alguns estresses, como o estresse à seca ou a condições de déficit hídrico, provocam uma resposta sistêmica no vegetal. Esta resposta envolve genes de diferentes órgãos e tecidos, uma vez que o mecanismo de tolerância a estes estresses requer muitas interações fisiológicas (BARTLETT, et al, 2016). Contudo, ainda precisamos desvendar como estes mecanismos de tolerância e adaptação da planta às diferentes alterações climáticas funcionam e interagem entre si.

A adaptação genética das plantas a flutuações de fatores ambientais, fora dos limites normais, é caracterizada por mudanças genéticas na população que foram fixadas por seleção natural. Por outro lado, as plantas podem responder individualmente a estas mudanças ambientais, alterando diretamente sua fisiologia ou morfologia, se aclimatando de acordo com a sua plasticidade fenotípica (TAIZ & ZIEGER, 2013).

Abordaremos neste capítulo alguns mecanismos de adaptação fisiológica da planta em reposta à seca, envolvendo especificamente o controle do crescimento vegetal, o restabelecimento da homeostase iônica e osmótica e a sinalização para controlar a formação de compostos tóxicos.

2. CONTROLE DO CRESCIMENTO

2.1. Sistema radicular

O sistema radicular desempenha um papel crucial em resposta ao estresse pelo déficit hídrico, pois é através dele que as plantas obtêm água e nutrientes do solo. O estresse hídrico é percebido primeiro pelo sistema radicular, que continua a crescer sob o solo, mesmo que o crescimento da parte aérea seja inibido nessas condições. O entendimento da percepção pelas raízes dos sinais físicos do déficit hídrico e a conversão desses sinais físicos em sinais bioquímicos, é objetivo de vários estudos e ainda permanece indefinido (YU et al., 2008).

Uma vez iniciado a fase do estresse hídrico, algumas plantas têm a capacidade de aumentar o crescimento das raízes para absorver a água em solos profundos. As plantas adaptam e modificam dinamicamente a arquitetura do sistema radicular, alterando o crescimento das raízes de diversas maneiras, dependendo da espécie.

Características relacionadas à capacidade de penetração no solo, o comprimento, peso, volume e densidade das raízes das plantas são associados à resistência à seca nas culturas (HU & XIONG, 2014).

Embora o crescimento da raiz primária não seja afetado pelo estresse hídrico, o crescimento das raízes laterais é significativamente reduzido, principalmente pela supressão da ativação dos meristemas radiculares laterais (BASU et al., 2016). A presença de raízes pequenas também é considerada uma estratégia adaptativa para aumentar a absorção de água, proporcionando uma superfície mais absorvente. A presença de tecidos especializados, como a rizoderme, com espessamento da parede celular externa ou exoderme suberizada, ou redução do número de camadas corticais, é considerada uma vantagem adaptativa para a sobrevivência ao estresse hídrico (HU & XIONG, 2014; BASU et al., 2016).

Uma vez definido a importância do sistema radicular para a resistência ao estresse hídrico, a promoção do crescimento e desenvolvimento das raízes se torna uma característica interessante a ser estudada e entendida. Li et al. (2009) observaram um aumento significativo do crescimento radicular em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) quando comparadas às plantas controle. As plantas transgênicas apresentavam superexpressão do gene PpAPX - *Populus peroxisomal ascorbate*. A ascorbato peroxidase (APx) é uma das principais enzimas do sistema de detoxificação de espécies reativas de oxigênio nas plantas, catalisando a conversão do peróxido de hidrogênio em água, usando o ascorbato como doador de elétrons. Os autores concluíram que o gene PpAPX não desempenha papel significativo em condições normais de crescimento da planta, mas em condições de estresse melhoraram a lesão oxidativa e promovem o desenvolvimento e crescimento das raízes.

O estudo de fatores de transcrição sensíveis ao estresse tem sido um dos focos nos estudos sobre a tolerância ao estresse hídrico. Os principais fatores de transcrição sensíveis ao estresse foram extensivamente analisados em *Arabidopsis thaliana*. Yu et al. (2008) identificaram um novo gene de tolerância à seca em *Arabidopsis*, HDG11 - HOMEODOMAIN GLABROUS11, que codifica uma proteína na família do fator de transcrição homeodomínio (HD) - START, também conhecida como família do fator de transcrição Homeodomain Leucine Zipper Classe IV. A ativação da expressão do gene HDG11 aumenta as múltiplas

características relacionadas à tolerância à seca, incluindo o aumento do crescimento das raízes e a redução da densidade estomática.

Outro adaptação fisiológica interessante de ser abordada com relação ao desenvolvimento de raízes para a promoção de tolerância à seca é o acúmulo de soluto vacuolar. Este acúmulo tem demonstrado ser um mecanismo pelo qual as plantas são capazes de aumentar a tolerância à seca e ao sal. Gamboa et al. (2013) realizaram um estudo em *Eucalyptus globulus*, que é uma das espécies florestais mais importantes do mundo para produção de bioenergia e sequestro de carbono, e isolaram a primeira sequência completa de cDNA da H⁺- pirofosfatase vacuolar (EVP1 - *vacuolar pyrophosphatase type I*). Com a PCR em tempo real foi possível confirmar que EVP1 participa da resposta das plantas de eucalipto à seca e ao estresse salino por meio de uma via independente de ABA. Observaram também que a superexpressão de EVP1 em plantas transgênicas de *Arabidopsis* resultou em um aumento da tolerância à seca e ao sal, por desenvolverem uma maior quantidade de pêlos radiculares.

2.2. Folhas

As respostas morfológicas e fisiológicas das folhas ao estresse hídrico são importantes para reduzir a perda e promover a eficiência do uso da água. Quando as plantas sentem uma deficiência severa de água, suas folhas caem ou murcham por causa da perda da pressão do turgor celular. O murchamento é um movimento passivo das folhas para evitar o consumo excessivo de água, com a folha murcha ocorre a redução da radiação solar incidente e, portanto, reduz a temperatura da superfície foliar, protegendo as plantas da perda excessiva de água (POORTER & MARKESTEIJN, 2008; FANG & XIONG, 2015).

Plantas resistentes à seca possuem características xeromórficas para reduzir a transpiração sob estresse hídrico. Essas plantas possuem folhas menores e mais grossas, mais tricomas epidérmicos, estômatos menores e mais densos, cutícula mais espessa, parênquima paliçádico mais espesso e bainha de feixe vascular mais desenvolvida. Estes recursos efetivamente reduzem a perda de água e a aumentam a capacidade de retenção de água para evitar danos causados pelas condições de estresse hídrico (XU & ZHOU, 2008; FANG & XIONG, 2015; BASU et al., 2016).

A redução na transpiração sob condições de stress hídrico também pode ser conseguida através da queda de folhas (espécies decíduas na seca) bem como diminuição no número e tamanho de folhas e ramificações. Outra adaptação para combater o estresse hídrico é esclerofilia, onde as plantas formam folhas duras que não sofrerão danos permanentes devido à murcha e podem ser restauradas para a funcionalidade completa quando as condições normais forem retomadas (XU & ZHOU, 2008).

Os estômatos são poros que se formaram nas folhas das plantas terrestres durante um processo evolutivo de longo prazo, são essenciais para a troca de gás e água entre a planta e o ambiente externo. Os estômatos desempenham papéis cruciais nas atividades da vida vegetal, garantindo a absorção máxima de CO₂ para a fotossíntese e controlando a transpiração ideal (HETHERINGTON & WOODWARD, 2003). A densidade e a abertura estomáticas estão intimamente relacionadas com a resistência à seca, pois a resposta imediata das plantas ao estresse hídrico é o fechamento estomático. No entanto, o fechamento estomático não apenas diminui a perda de água pela transpiração, mas também reduz a absorção de CO₂ e nutrientes e, portanto, altera as vias metabólicas, como a fotossíntese (XIONG & ZHU, 2002). Detalhes com relação à abertura e fechamento estomático e como essa estratégia promove a resistência das plantas à seca serão abordados no próximo item deste capítulo.

Assim, todas essas adaptações nas plantas reduzem os impactos negativos do estresse hídrico, ou seja, têm um efeito positivo sobre a eficiência no uso da água e na fotossíntese, que por sua vez resultará em aumento do rendimento da planta. As características relatadas acima, portanto, exemplificam mecanismos adaptativos em plantas para sobreviver sob estresse hídrico, sem perda de produtividade ou rendimento.

3. RESTABELECIMENTO DA HOMEOSTASE IÔNICA E OSMÓTICA

O estresse osmótico é um dos efeitos iniciais provocados pela seca, e resulta em desequilíbrios na homeostase osmótica e iônica nas células (SERRANO et al., 1999; ZHU, 2001). Em algumas espécies, o aumento no acúmulo de solutos osmoticamente ativos não-tóxicos na célula, foi considerado como uma estratégia

adaptativa, em resposta ao estresse (DAMATTA & RAMALHO, 2006).

Essa estratégia, denominada como ajuste osmótico, é associada à manutenção da turgescência celular, em especial nas células-guarda, e ao restabelecimento do equilíbrio osmótico (HARE et al., 1998). O ajuste osmótico permite a abertura parcial dos estômatos e, conseqüentemente, a assimilação de CO₂, a absorção de água e o crescimento das plantas em baixos potenciais de água, que de outra forma é inibida (ALVES & SETTER, 2004). Consiste no transporte controlado de íons osmoticamente ativos e metabólitos orgânicos através das membranas (KUSAKA et al., 2005), provocando uma redução no potencial osmótico das células, assim, estimulando a difusão de água para o interior celular e a turgescência celular, o que contribui para a manutenção dos processos fisiológicos de abertura estomática, fotossíntese, e crescimento de expansão. Genes relacionados à biossíntese de moléculas osmoprotetoras, assim como genes envolvidos no movimento estomático foram estudados afim de se conhecer seus efeitos sob o ajuste osmótico e à seca.

Embora exista controvérsia sobre o papel efetivo de solutos, como prolina e glicina betaína, sobre o ajuste osmótico, podendo sua acumulação estar relacionada à distúrbios no metabolismo de aminoácidos e proteínas (LUTTS et al., 1999; SILVEIRA et al., 2003), diversos estudos apontam que o aumento da concentração desses solutos aumenta a resistência de plantas a vários estresses (ASHRAF & HARRIS, 2004). Genes de enzimas como colina desidrogenase e colina oxidase; manitol-1-fosfato desidrogenase; trehalose-6-fosfato desidrogenase; e D1-pirrolina-5-carboxilato sintetase envolvidas na biossíntese de moléculas osmoprotetoras já foram isoladas. Genes das enzimas P5CS (D1-pirrolina-5-carboxilato sintetase) e P5CR (D1-pirrolina-5-carboxilato redutase), envolvidas na biossíntese de prolina, foram alvos para obtenção de plantas tolerantes (SZEKELY et al., 2008). Os genes BADH (OsBADH1 e OsBADH2), que possuem atividade para catalisar betaína aldeído a glicina betaína, também mostraram ser responsivos à seca. Hasthanasombut et al. (2011) ao transferir o gene OsBADH1 para o tabaco, observou que a quantidade de glicina betaína nas linhagens transgênicas foi maior que o controle, e a planta transformada apresentou maior tolerância ao estresse abiótico. No item 4.2 deste capítulo serão abordados mais exemplos envolvendo essas pequenas moléculas orgânicas e como o acúmulo desses solutos aumenta a resistência de plantas.

A abertura estomática é modificada por alterações reversíveis no volume da célula-guarda, devido à alterações no potencial hídrico das células, que assim, fornecem o principal mecanismo regulador para o controle das trocas gasosas entre a planta e o ambiente. A abertura estomática é facilitada pela atividade de canais e transportadores iônicos encontrados na membrana plasmática e na membrana vacuolar (tonoplasto) das células-guarda (PANDEY et al., 2007).

A abertura estomática ocorre pela queda no potencial osmótico das células-guarda, causado pela entrada de K^+ pelos canais internos de K^+ , pela absorção de Cl^- e pela produção de solutos orgânicos (HETHERINGTON & WOODWARD, 2003). O fechamento estomático resulta da liberação de ânions e K^+ das células-guarda e conversão de malato em amido. A elevação do Ca^{2+} citosólico e do ácido abscísico (ABA) ativam os canais aniônicos do tipo S na membrana plasmática das células-guarda (MORI et al., 2006). O efluxo de ânions, o influxo de Ca^{2+} e a inibição da H^+ -ATPase despolarizam o potencial de membrana das células-guarda, fornecendo assim a força motriz do efluxo de K^+ através dos canais de efluxo K^+ , levando ao fechamento estomático (HOSY et al., 2003). Pandey et al. (2007) discutiu o papel de proteínas de transporte da membrana plasmática e vacúolo sob a fisiologia das células-guarda, e relacionou estas com mais de 256 genes.

Durante a abertura estomática, o efluxo de H^+ do citosol, mediado pela H^+ -ATPase, hiperpolariza o potencial da membrana além do potencial de equilíbrio para K^+ . Isso ativa os canais de K^+ , levando ao influxo de K^+ . Foram identificados 11 genes que codificam H^+ -ATPases presentes em *Arabidopsis* (*AHA1-AHA11*) (UENO et al., 2005). Para os canais de K^+ já foram identificados nove genes: *KAT1*, *KAT2*, *AKT1*, *AKT5*, *SPIK*, *AKT2/3*, *AtKCI*, *SKOR* e *GORK* (PILOT et al., 2003). A absorção de Cl^- e NO_3^- mediada por transportadores também pode contribuir para o acúmulo intracelular de solutos, assim como a importação ou a síntese de açúcares. A produção de malato²⁻ a partir da decomposição do amido fornece as principais espécies aniônicas que se acumulam durante a abertura estomática.

Durante o fechamento dos estômatos, ocorre a despolarização da membrana devido à inibição da atividade da enzima H^+ -ATPase e ativação dos canais aniônicos que medeiam o efluxo passivo de Cl^- , malato²⁻ e NO_3^- . A despolarização da membrana cria a força motriz para o efluxo de K^+ , via canais de K^+ . O grupo de genes relacionados aos canais aniônicos, ainda não foi totalmente caracterizado.

No entanto, acredita-se que a família de genes *CLC* (*AtCLC*) e a superfamília de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC), são os que codificam as proteínas de transporte que medeiam o fluxo de Cl^- , malato²⁻ e NO_3^- (ANGELI et al., 2006). NO_3^- também pode ser transportado através de proteínas codificadas pelos genes *AtNRT1.1* (*CHLI*), *NRT1.2*, e pela família de genes *NRT2* (PANDEY et al., 2007). Suh et al. (2006) observou que a mutação no gene *AtMRP5* (transportador *ATP-binding cassette*) desestabiliza o funcionamento dos canais de ânions da membrana plasmática em células-guarda de *Arabidopsis*, prejudicando a ativação por parte do ABA e Ca^{2+} citosólico.

O aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico livre através de canais Ca^{2+} permeáveis na membrana plasmática, bem como canais de Ca^{2+} situados nas endomembranas precedem ou acompanham o fechamento estomático. Prevê-se que 41 genes em *Arabidopsis* possam potencialmente codificar canais não seletivos de cátions com permeabilidade ao Ca^{2+} . Esses genes são divididos em três famílias, das quais uma, a TPC1, possui um único membro da família que aparece localizado no tonoplasto (membrana do vacúolo) (PEITER et al., 2005). As outras duas famílias são: a família de canais controlados por nucleotídeos cíclicos de 20 membros (CNGC) (FINN et al., 1996) e a família de receptores de glutamato, também de 20 membros (GLR) (LACOMBE et al., 2001). Do modo inverso, no fechamento estomático ocorre à inibição da atividade da H^+ -ATPase, provocando a despolarização da membrana e ativação dos canais aniônicos que medeiam o efluxo passivo de Cl^- , NO_3^- e malato²⁻.

A regulação coordenada dos fluxos de solutos na membrana plasmática e no tonoplasto é especialmente central para o controle da turgescência em células-guarda, já que grandes quantidades de solutos celulares são armazenados no vacúolo. V-ATPases (26 genes *VHA*); V-PPases (genes *AVP1*, *AVP2*, *AVPL1*); antiporte $2\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ (7 genes *AtCLC*); canais de cátions FV; canais de K^+ VK (6 genes *KCO/TPK*); canais K^+ Ca^{2+} SV (gene TPC1); canais de liberação de Ca^{2+} ativado por InsP_3 -, InsP_6 e cADPR; e canais de ânions ativado por CDPK fazem parte do conjunto de transportadores e canais iônicos vacuolares (PANDEY et al., 2007).

As aquaporinas (AQPs) são os principais canais para o transporte de água através da membrana celular vegetal (UEHLEIN et al., 2003), participando assim

do fluxo de água nas células-guarda. A expressão de genes AQP em plantas é diferencialmente regulada não apenas em vários tecidos, mas também sob diferentes estados fisiológicos e diferentes condições ambientais (ALEXANDERSSON et al., 2005; BOURSIAC et al., 2005). As AQPs vegetais são divididas em quatro subfamílias: proteínas intrínsecas da membrana plasmática (PIP), proteínas intrínsecas de tonoplastos (TIP), proteínas intrínsecas semelhantes à nodulina 26 (*nodulin 26-like intrinsic proteins*) (NIP) e pequenas proteínas intrínsecas (SIP) (KALDENHOFF & FISCHER, 2006). O padrão de função e expressão de genes da família de proteínas PIP (*OsPIP1*, *OsPIP2*, *PIP1;4*, *PIP2;5*, *HvPIP2;1*, *BnPIP1*, *NtAQP1*) foram estudados em *Arabidopsis*, *Brassicca*, arroz e tabaco, especialmente em resposta ao estresse à seca e a salinidade (JANG et al., 2007; YU et al., 2005; HANBA et al., 2004; GUO et al., 2006, SIEFRITZ et al., 2004). Zhou et al. (2012) observaram que a superexpressão de TaAQP7, um gene do subgrupo PIP2, aumentou a tolerância à seca no tabaco.

O aumento na concentração de ABA nas células vegetais sob estresse hídrico estimula o fechamento estomático e regula a expressão de vários genes, afim de adaptar as plantas às condições ambientais de estresse (CUTLER et al., 2010; DING, 2013). A regulação do nível de ABA endógeno tem papel essencial nas respostas adaptativas à diversos estresses ambientais (ZHANG et al., 2008). Sob o estresse da seca, mutantes deficientes em ABA em *Arabidopsis* (*aba1*, *aba2* e *aba3*) (KOORNNEEF et al., 1998) morrem facilmente com o estresse prolongado, pela excessiva perda de água devido o não fechamento estomático. O mesmo ocorre em mutantes deficientes em ABA para tabaco, tomate e milho (LIOTENBERG et al., 1999).

O acúmulo de ABA induzido por estresse osmótico é resultado tanto da ativação da síntese quanto da inibição da degradação. Três genes que participam da biossíntese de ABA foram isolados. Eles codificam a Zeathanxin epoxidase (ZEP), ABA2 em tabaco e ABA1 em *Arabidopsis* (MARIN et al., 1996); 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) (TAN et al., 1997); e ABA aldehyde oxidase (AAO) (SEO et al., 2000). O ABA3, também conhecido como LOS5, codifica uma sulfúrilase que gera a forma ativa do cofator de molibdênio exigido pelo AAO (XIONG et al. 2001). Estudos de expressão com ZEP, NCED, AAO3 indicaram que todos esses genes são regulados pela seca e pelo estresse salino (AUDRAN et

al., 1998; SEO et al., 2000; IUCHI et al., 2001; XIONG et al., 2001). Os genes que codificam ABA 8'-hidroxilase, participante da principal via catabólica do ABA, foram identificados como membros da subfamília do CYP707A. Em *Arabidopsis* foi demonstrado que os genes (CYP707A1 e CYP707A3) também participam da ação sistêmica do ABA no controle do movimento estomático (OKAMOTO et al., 2009).

4. SINALIZAÇÃO DE DESINTOXICAÇÃO

4.1. Fator de proteção

Sob déficit hídrico ocorre um acúmulo de proteínas funcionalmente relacionadas à proteção das macromoléculas (MAYOR et al., 2012). Tais proteínas são classificadas em proteínas reguladoras (proteínas quinases, fosfatases e fatores de transcrição) e funcionais (aquaporinas, proteínas do tipo LEA e proteínas de choque térmico (HSPs)). A identificação e avaliação de genes que codificam essas proteínas, representam uma das estratégias para obtenção de tolerância à seca nos vegetais (FEKI & BRINI, 2016).

A síntese dessas proteínas ocorre em função de uma cascata de sinalização promovida por receptores de membrana, que transmitem sinais para a expressão de genes específicos. Quando a água se torna restrita, as proteínas quinases e fosfatases presentes na membrana são estimuladas, promovendo uma cascata de sinalização que ativam os fatores de transcrição. Essas proteínas atuam na regulação da expressão gênica e na transdução de sinais, por isso são nomeadas como proteínas reguladoras (BECK et al., 2007).

Estudos em *A. thaliana* permitiram a identificação de uma família de fatores de transcrição conhecidos como DREBs (Proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação). O gene DREB codifica a proteína DREB, que por sua vez, atua na ativação de eventos moleculares ligados à defesa contra a desidratação. As plantas transgênicas que apresentaram a superexpressão desse gene exibiram maior sobrevivência em ambientes secos (MARUYAMA et al., 2009).

Os fatores de transcrição DREB também desempenharam papel importante para a tolerância à seca em arroz (CHEN et al., 2008). Nesse estudo foram

identificados três novos genes (OsDREB1E, OsDREB1G e OsDREB2B), homólogos aos genes DREBs em *Arabidopsis*. Os autores concluíram que tais genes tinham diferentes resposta ao estresse hídrico, de forma que a superexpressão de OsDREB1G e OsDREB2B aumentava significativamente a tolerância das plantas modificadas, enquanto que, a superexpressão de OsDREB1E tinham uma influência menor para a sobrevivência das plantas no ambiente estressante. Genes homólogos também já foram identificados em canola, cevada, trigo e milho (MARUYAMA et al., 2009).

As proteínas funcionais, por sua vez, atuam na proteção das membranas, no transporte e absorção de água e íons. Essas proteínas são as que efetivamente geram o efeito de tolerância ao estresse (FANG & XIONG, 2015).

As Aquaporinas (AQPs) são proteínas intrínsecas às membranas e, permitem o transporte de água e íons (TYERMAN et al., 2002). As AQPs têm seu funcionamento regulado pelo seu estado de fosforilação, o que regula a sua permeabilidade à água. Zhou et al. (2012) observaram que a superexpressão do gene da aquaporina de trigo, TaAQP7, favorece a tolerância à seca em tabaco. Esse gene aumenta a retenção de água e melhora a atuação do sistema antioxidante, evitando danos celulares.

As proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), detectadas primeiramente em algodão, são altamente hidrofílicas e foram descritas como sendo associadas na tolerância à seca. Elas são expressas nos estádios finais do desenvolvimento embrionário de sementes e, atuam na proteção de proteínas, membranas e na capturação de água, protegendo as células dos danos provocados pelo déficit hídrico (CLOSE, 1996). As proteínas LEA são expressas principalmente sob condições limitantes de água e já foram encontradas em diferentes tecidos de vegetais submetidos a estresses abióticos e em indivíduos conhecidos por serem tolerantes à seca (HUNDERTMARK & HINCHA, 2008; MOUILLON et al., 2006).

A superexpressão dos genes que codificam as proteínas LEA está associada a melhor sobrevivência em plantas transgênicas sob estresse. No trigo, a expressão do gene HVA1 da cevada conferiu maior tolerância à seca e os genes PMA80 e PMA1959 do trigo aumentaram a tolerância em arroz (SIVAMANI et al., 2000; CHENG et al., 1959). Estudos realizados por Xiao et al. (2009) também identificaram

genes candidatos para tolerância à seca em arroz. Os autores identificaram que as plantas com a expressão do gene OsLEA3-1, apresentaram maiores rendimentos de grãos sob déficit hídrico. Magwanga et al. (2018) caracterizaram o papel das proteínas LEA na tolerância ao estresse hídrico em algodão de sequeiro. O estudo envolveu três espécies de algodão, *Gossypium hirsutum*, *G. arboreum* e *G. raimondii*, onde foram identificados 242, 136 e 142 genes LEA, respectivamente. A superexpressão desses genes conferiam maior capacidade de sobrevivência na condição estressante.

Sob condições de estresse hídrico, as plantas também acumulam proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins* - HSP). As HSP são resistentes ao calor e garantem a integridade celular durante o déficit hídrico, evitando a desnaturação de outras proteínas ou facilitando o redobramento daquelas que foram danificadas (MEYER & BUKAU, 2005). Sato & Yokoya (2008) demonstraram em suas pesquisas que plantas transgênicas de arroz, quando superexpressaram a proteína de choque térmico sHSP17.7, apresentaram melhor tolerância ao estresse hídrico. Estudos realizados por Balfagón et al. (2018) com espécies de citros, demonstraram que as plantas com maior expressão dos genes que codificam as proteínas de choque térmico HSP101 e HSP17.6, apresentaram maior tendência de tolerância à seca, com maior integridade das folhas e, menores alterações na maquinaria fotossintética.

4.2. Produção de osmólitos

Em condições de seca, vários metabólitos são acumulados e atuam como osmólitos, que são pequenas moléculas orgânicas que foram selecionadas para contrabalançar estresses ambientais em organismos vivos. Atua na manutenção do turgor celular, na destoxicação de espécies reativas de oxigênio, estabilização de proteínas e estruturas da célula, desencadeando, muitas vezes, tolerância à seca. Entre eles estão os açúcares (oligossacarídeos da família da rafinose, sacarose, trealose e sorbitol), açúcares-álcool (manitol), aminácidos (prolina), e aminas (glicina betaína e poliaminas) (SEKI et al., 2007). Alguns destes, como prolina, alguns carboidratos (manitol, sacarose rafinose) e glicina betaína, são chamados de solutos compatíveis e podem ser acumulados no citoplasma de forma a manter

o equilíbrio hídrico entre o vacúolo e o citoplasma (TAIZ & ZEIGER, 2013).

As plantas respondem e se adaptam ao estresse abiótico através de várias mudanças fisiológicas e bioquímicas, incluindo a expressão de genes específicos ao estresse. Abordagens transgênicas para melhorar a tolerância ao estresse têm sido propostas e são frequentemente consideradas menos demoradas e trabalhosas do que o melhoramento clássico (BAJAJ et al., 1999). Em relação à tolerância ao estresse osmótico, várias abordagens de engenharia genética têm sido aplicadas para o aumento de compostos osmoprotetores (NUCCIO et al., 1999).

Prolina é o osmólito compatível mais comum em plantas e desempenha importante função no aumento da adaptação destas à seca (HASEGAWA et al., 2000). Além de ajuste osmótico, essa molécula possui outras funções propostas em tecidos de plantas osmoticamente estressadas: mantenedor e protetor da integridade da membrana plasmática (HINCHA & HAGEMANN, 2004). Kishor et al. (1995) superexpressaram a enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase de feijão, em tabaco, uma enzima bifuncional capaz de catalisar a conversão de glutamato em Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato, que é então reduzida a prolina. As plantas transgênicas produziram um alto nível da enzima e sintetizaram 10 a 18 vezes mais prolina do que as plantas controle. Verificaram também que uma maior oferta de nitrogênio melhora ainda mais a produção prolina, os potenciais osmóticos da seiva foliar foram menores em condições de estresse hídrico quando comparados aos de plantas controle e que a superprodução de prolina também aumentou a biomassa das raízes e o desenvolvimento de flores em plantas transgênicas em condições de seca.

A glicina betaína atua como um osmólito protetor não tóxico durante períodos de déficit hídrico em muitos organismos, incluindo algas, bactérias, plantas superiores e animais (TREBERG & DRIEDZIC, 2007). É sintetizada a partir da colina através de diferentes reações oxidativas em diferentes organismos (HAYASHI & MURATA, 1998). Em *Arthrobacter globiformis*, a colina oxidase catalisa a colina em glicina betaína. Em células de mamíferos e microorganismos como *Escherichia coli*, colina desidrogenase e betaína aldeído desidrogenase catalisam a reação oxidativa através de duas etapas: colina \rightarrow betaína aldeído \rightarrow glicina betaína. Nas plantas superiores, a via é a mesma, com a colina monooxigenase (CMO) catalisando o primeiro passo em vez da colina desidrogenase. Shen et

al. (2002) clonaram e caracterizaram o gene colina monooxigenase CMO de *A. hortensis* e o introduziram em *Nicotiana tabacum* var. Xanthi para testar seu efeito em várias tolerâncias ao estresse. As plantas transgênicas demonstraram uma melhor tolerância à seca.

As poliaminas são pequenos compostos nitrogenados que foram relacionados com uma variedade de respostas ao estresse nas plantas (BAJAJ et al., 1999). As principais enzimas envolvidas na sua biossíntese incluem ornitina descarboxilase, arginina descarboxilase, S-adenosilmetionina descarboxilase, espermidina sintase e espermina sintase (BAGNI & TASSONI, 2001).

A ligação entre as poliaminas e o estresse abiótico foi documentada pela acumulação de putrescina (RICHARDS & COLEMAN, 1952). A putrescina elevada pode causar lesão ou, uma resposta protetora resultante do estresse (REGGIANI et al., 1993). Capell et al. (2004) estudaram a resposta das plantas de arroz transgênico com o gene arginina descarboxilase, verificaram aumento dos níveis de putrescina ao estresse hídrico. Demonstraram que a manipulação da biossíntese de poliamina em plantas pode produzir germoplasma tolerante à seca. Kasukabe et al. (2004) clonaram o cDNA de espermidina sintase de *Cucurbita ficifolia* em *A. thaliana* e verificaram tolerância aumentada a vários estresse, como resfriamento, congelamento, salinidade, hiperosmose, seca e toxicidade. Estes resultados sugeriram um importante papel da espermidina como regulador de sinalização ao estresse.

Oligossacarídeos da família Rafinose (RFO) se acumulam durante o desenvolvimento das sementes, Taji et al. (2002) acreditaram que desempenham um papel na tolerância à dessecação das sementes. Foi observado que a tolerância à dessecação de sementes não foi alcançada na ausência de acumulação de rafinose (BRENAC et al., 1997). A galactinol sintase (GolS) catalisa a primeira etapa na biossíntese de rafinose (RFO) e desempenha um papel regulador chave na partição de carbono entre a sacarose e os RFOs (SARAVITZ et al., 1987). Portanto galactinol sintase potencialmente catalisa uma etapa chave na via metabólica, e seu gene fornece uma ferramenta experimental para manipular o nível de rafinoses em sementes ou tecidos vegetativos para analisar a sua função como osmoprotetores. Taji et al., (2002) superexpressaram o cDNA do AtGolS em *A. thaliana* sob condições de estresse de seca e frio, demonstrando melhor tolerância à seca. Este

estudo fornece uma evidência direta de que o gene *GolS* indutível por estresse controla o nível de RFOs, e que o galactinol e a rafinose desempenham papéis importantes na tolerância ao estresse hídrico.

Mattana et al. (2005) estudando a superexpressão de *Osmyb4* verificaram um acúmulo de soluto compatível (glicose, frutose, sacarose, prolina, glicina betaína e malato) e aumento da tolerância ao estresse em *A. thaliana*. Relataram a capacidade de *Myb4* induzir também a tolerância à seca em plantas transgênicas *Arabidopsis*, além de tolerar o frio e ao gelo.

A trealose (α , α -trealose ou α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosídeo) é um dissacarídeo não redutor da glicose que ocorre em vários organismos (ELBEIN, 1974). Engenharia genética de plantas com genes envolvidos na síntese de trealose, para o acúmulo deste açúcar, levou a mudanças na fotossíntese de plantas transgênicas quando comparado ao tipo selvagem. Plantas transformadas tiveram uma fotossíntese mais eficiente do que as plantas de tipo selvagem. Dos vários genes *AtTPS* descobertos, o *AtTPS1* é considerado o principal gene envolvido na biossíntese da trealose (LEYMAN et al., 2001), portanto, é a primeira escolha para engenharia genética de plantas na tolerância à seca.

O manitol é um açúcar-álcool não-cíclico de seis carbonos que tem seu papel na regulação de coenzimas, eliminação de radicais livres, armazenamento de energia e osmorregulação (STOOP et al., 1996). O *mtlD* é um gene bacteriano que codifica o manitol 1-fosfato desidrogenase. Plantas transgênicas transportando *mtlD* convertem manitol 1-fosfato em manitol, via fosfatases não específicas. A superexpressão deste gene mostrou maior tolerância ao estresse abiótico (BHAUSO et al., 2014).

O sorbitol é um importante produto final da fotossíntese, que estão relacionados com a tolerância ao estresse em plantas. Existem alguns transportadores de sorbitol que vem sendo elucidado por muitos estudos, demonstrando a importância dos genes como o *MdSOT3*, *MdSOT4* e *MdSOT5*. Trabalhos de engenharia genética, através da superexpressão destes genes tem sido realizados para confirmar o papel destes transportadores de sorbitol na tolerância ao estresse (FANG et al., 2012).

4.3. Remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Durante o funcionamento normal do metabolismo vegetal, espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser produzidas como resultado do metabolismo do oxigênio molecular, em processos ocorrentes nas mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomos e apoplasto (RIBEIRO et al., 2005). Destaca-se quatro formas de EROs, cada uma com um potencial de oxidação, a saber: radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($HO\cdot$) e oxigênio singleto (1O_2) (CARVALHO, 2008).

Existe uma homeostase entre a produção e eliminação dessas moléculas, de forma que, em condições normais não provocam danos celulares e são facilmente eliminadas pelo sistema antioxidante. Entretanto, quando a produção dessas moléculas supera a capacidade de sua eliminação, pode ocorrer eventos oxidativos deletérios (MITTLER, 2002). O sistema de defesa abrange agentes enzimáticos (Catalase (CAT); Superóxido Dismutase (SOD); Peroxidase (POX); Peroxidase do Ascorbato (APX); Peroxidase da Glutathione (GSH-POX); Glutathione Redutase (GR); Desidroascorbato Redutase (DHAR); Monodesidroascorbato Redutase (MDHAR) e agentes não enzimáticos (Ascorbato (Asc); Glutathione (GSH); Carotenos; α - tocoferol e Poliaminas) (BAILLY, 2004; BARBOSA et al., 2014).

Esse sistema de defesa antioxidante vegetal permite minimizar os efeitos das EROs, que quando rigidamente controladas, podem ser benéficas para a planta, uma vez que, a produção dessas moléculas funciona como um alarme que direciona o indivíduo às adaptações e aclimações no ambiente em mudança. Quando a planta está submetida a déficit hídrico, o nível normal de produção dessas moléculas é alterado. Mudanças na cadeia transportadora de elétrons, em resposta ao fechamento estomático, sobrecarregam a ação de eliminação das EROs pelo sistema de defesa, resultando em oxidação de proteínas, lipídios, DNA, RNA e até morte celular (CARVALHO, 2008; KIM & KWAK, 2010).

Dessa forma, as EROs desempenham duas funções importantes para as células: atuam como sinalizadoras, indicando uma condição de estresse biótico ou abiótico que a planta está submetida, favorecendo respostas de defesa (CARVALHO, 2008) e, são capazes de exacerbar os danos, levando ao estresse oxidativo, quando produzidas em excesso (FOYER & NOCTOR, 2005). Apesar

da resposta das plantas em condições de seca ser complexa e envolver diferentes genes e vias de sinalização, tem sido documentado que os sintomas de danos oxidativos podem ser utilizados para avaliar a formação e eliminação de EROs sob estresse hídrico. Alguns genes já foram utilizados para a engenharia de plantas tolerantes à seca (FANG & XIONG, 2015).

Estudos realizados por Wang et al. (2005) buscaram analisar o papel da superóxido dismutase (SOD), mais especificamente a superóxido dismutase de manganês (MnSOD), no desempenho de tolerância à seca em arroz. A SOD é uma importante enzima antioxidante, que atua como a primeira linha de defesa contra as EROs, pois, age sobre o radical superóxido, que além de ser uma das primeiras EROs produzidas, são extremamente radiotivas (BOWLER et al., 1992).

No estudo previamente citado, MnSOD de ervilha controlada por um promotor induzido por estresse oxidativo, foi introduzida em cloroplastos de arroz por meio de transformação por *Agrobacterium*. As plantas de arroz modificadas foram submetidas a condições limitantes de água e apresentaram respostas positivas ao estresse como, menor vazamento de eletrólitos, menores lesões, exibindo um perfil de maior tolerância ao estresse oxidativo. Os resultados indicaram que a expressão de MnSOD pode aumentar a tolerância à seca em arroz. A ação da MnSOD já havia sido identificada por McKersie et al. (1996) em alfafa, onde a expressão da MnSOD reduziu o dano causado pelo estresse oxidativo, melhorando a sobrevivência das plantas modificadas que foram introduzidas em ambientes com déficit hídrico.

A atividade das peroxidases (POX) também tem sido documentada em diferentes fontes literárias (RATNAYAKA et al., 2003; MIAO et al., 2006; KOUSSEVITZKY et al., 2008). No processo de atuação da SOD sobre o radical superóxido, ocorre sua dismutação em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 apesar de ser menos reativo que o radical superóxido, ainda é uma molécula tóxica ao metabolismo e precisa ser removido. A peroxidase do ascorbato (APX) e a peroxidase da glutatona (GSH-POX) são enzimas que podem atuar nessa remoção, utilizando o poder redutor do ascorbato e da glutatona, respectivamente, para reduzir H_2O_2 em água (MITTLER, 2002).

Dentre os genes que codificam essas peroxidases, o gene ATGPX3 que codifica uma GSH-POX em *A. thaliana*, foi identificado como responsável pela sinalização

do estresse por seca e como um eliminador de EROs, mais especificamente atuando na homeostase do H_2O_2 (MIAO et al., 2006). Ainda em culturas de *A. thaliana*, Desikan et al. (2000) identificaram quatro genes induzidos pela presença de H_2O_2 que apresentaram ação nos mecanismos de reparo e proteção celular. A expressão do gene CaPO2, uma isoforma da peroxidase, extraído da pimenta (*Capsicum annuum*), conferiu maior tolerância a seca e ao estresse oxidativo, enquanto que, perdas da função desse gene estava associado a maior suscetibilidade a esses estresses (CHOI & HWANG, 2012).

Em cafeeiro, Lima et al. (2002) e Pinheiro et al. (2004), sugeriram que a tolerância à seca pode estar relacionada a uma maior atividade das enzimas antioxidantes como SOD, APX e CAT. Os autores observaram que os genótipos com maiores capacidades de sobrevivência em déficit hídrico foram aqueles que apresentaram maior atividade e eficiência do sistema antioxidante.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seca é um dos fatores ambientais de estresse que causa maiores danos nos processos fisiológicos e metabólicos das plantas, limitando a distribuição e a produtividade de muitas culturas. Melhorar a tolerância à seca nas plantas tem sido um desafio para os melhoristas, fisiologistas e geneticistas, pois é uma característica genética complexa, com muitas vias metabólicas envolvidas. Desenvolver plantas tolerantes à seca requer a interação de muitos mecanismos, características, genes apropriados para cada cultura e o ambiente em crescimento. Vários são os desafios ainda para elucidar toda a complexidade dos mecanismos de resposta ao estresse hídrico. Nos últimos anos, como abordado nesse capítulo, a identificação de genes relacionados à resposta seca nas plantas, a determinação de seus padrões de expressão e compreensão de suas funções tem auxiliado a engenharia genética e a adoção de novas abordagens no melhoramento para tolerância à seca.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo

(FAPES) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

7. REFERÊNCIAS

ALEXANDERSSON, E.; FRAYSSE, L.; SJOVALL-LARSEN, S.; et al. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology*, v. 59, p. 469–484, 2005.

ALVES, A. A. C.; SETTER, T. L. Abscisic acid accumulation and osmotic adjustment in cassava under water deficit. *Journal Environmental and Experimental Botany*, v. 51, p. 259–271, 2004.

ANGELI, A.; MONACHELLO, D.; EPHRITIKHINE, G.; FRACHISSE, J. M.; THOMINE, S.; GAMBALE, F.; BARBIER-BRYGOO, H. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*, v. 442, p. 939-942, 2006.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, v. 166, p. 316, 2004.

AUDRAN, C.; BOREL, C.; FREY, A.; et al. Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiology*, v. 118, p. 1021–1028, 1998.

BAGNI, N.; TASSONI, A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids*, v. 20, p. 301-317, 2001.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, v. 14, n. 02, p. 93-107, 2004.

BAJAJ, S.; TARGOLLI, J.; LIU, L. F.; HO T. D.; WU, R. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Molecular Breeding*, v. 5, p. 493-503, 1999.

BALFAGÓN, D.; ZANDALINAS, S. I.; BALIÑO, P. et al. Involvement of ascorbate peroxidase and heat shock proteins on citrus tolerance to combined conditions of drought and high temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.127, p. 194-199, 2018.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINOLL, L. et al. Geração e

desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, v. 44, n. 3, 2014.

BARTLETT M.K., KLEIN, T., JANSEN, S., CHOAT, B., SACK, L. The correlations and sequence of plant stomatal, hydraulic, and wilting responses to drought. *PNAS* .v. 113 , n.46, p. 13098-13103, 2016.

BASU, S.; RAMEGOWDA, V.; KUMAR, A.; PEREIRA, A. Plant adaptation to drought stress. *F1000Research*, v. 5, 2016.

BECK, E.; H., FETTIG, S.; KNAKE, C. et al. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal Bioscience*, v.32, p.501-510, 2007.

BHAUSO, T. D.; THANKAPPAN, R.; KUMAR. A.; MISHRA, G. P.; DOBARIA, J. R.; RAJAM, M. Over-expression of bacterial mtID gene confers enhanced tolerance to salt-stress and water deficit stress in transgenic peanut (*Arachis hypogaea*) through accumulation of mannitol. *Australian Journal of Crop Science*, v. 8, n. 3, p. 413-421, 2014.

BOURSIAC, Y.; CHEN, S.; LUU, D. T.; et al. Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology*, v. 139, p. 790–805, 2005.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutases and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, v.43, p. 83-116, 1992.

BRENAC, P.; HORBOWICZ, M.; DOWNER, S. M.; DICKERMAN, A. M.; SMITH, M. E.; OBENDORF, R. L. Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed development and maturation. *Journal of Plant Physiology*, v. 150, p. 481-488, 1997.

CAPELL, T.; BASSIE, L.; CHRISTOU, P. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 26, p. 9909-9914, 2004.

CARVALHO, M. H. C. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior*, v. 3, n. 3, p. 156-165, 2008.

CHEN, J. Q.; MENG, X. P.; ZHANG, Y. et al. Over-expression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice. *Biotechnology letters*, v. 30, n. 12, p. 2191-2198, 2008.

CHENG, Z.; TARGOLLI, J.; HUANG, X. et al. Wheat LEA genes, PMA80 and PMA enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) Molecular Breeding, v.10, p.71–82, 1999.

CHOI, H. W.; HWANG, B. K. The pepper extracellular peroxidase CaPO2 is required for salt, drought and oxidative stress tolerance as well as resistance to fungal pathogens. Planta, v. 235, n. 6, p. 1369-1382, 2012.

CLOSE, T. J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. Physiologia Plantarum, v. 97, p.795–803, 1996.

CUTLER, S. R.; RODRIGUEZ, P. L.; FINKELSTEIN, R. R.; et al. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. Annual Reviews Plant Biology, v. 61, p. 651-679, 2010.

DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impact of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. Brazilian Journal of Plant Physiology, v. 18, p. 55–81, 2006.

DESIKAN, R.; NEILL, S.J.; HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Free Rad Biol Med, v.28, p.773–778, 2000.

DING, Y.; CAO, J.; NI, L.; et al. ZmCPK11 is involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and functions upstream of ZmMPK5 in abscisic acid signalling in maize. Journal of Experimental Botany, v. 64, p. 871-884, 2013.

ELBEIN, A. D. The metabolism of α, α -Trehalose. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, v. 30, p. 227-256, 1974.

FANG, L.; LEI, H.; ZHAO, X.; SHEN, X.; LIU, A.; LI, T. Isolation and characterization of two sorbitol transporter gene promoters in micropropagated apple plants (*Malus × domestica*) regulated by drought stress. Plant Growth Regulation, v. 68, n. 3, p. 475-482, 2012.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. Cellular and molecular life sciences, v. 72, n. 4, p. 673-689, 2015.

FEKI, K.; BRINI, F. Role of proteins in alleviating drought stress in plants. In: AHMAD, P. (Ed.). Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, p. 165-176, 2016.

FELLER, U., VASEVA, I. Extreme climatic events: impacts of drought and high temperature on physiological processes in agronomically important plants. *Frontiers in environmental science*. v. 2. Article 39. 2014.

FINN, J. T.; GRUNWALD, M. E.; YAU, K.W. Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions. *The Annual Review of Physiology*, v. 58, p. 395-426, 1996.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, v. 17, n. 7, p. 1866-1875, 2005.

GAMBOA, M. C., BALTIERRA, F., LEON, G., KRAUSKOPF, E. Drought and salt tolerance enhancement of transgenic *Arabidopsis* by overexpression of the vacuolar pyrophosphatase 1 (EVP1) gene from *Eucalyptus globulus*. *Plant physiology and biochemistry*, v. 73, p. 99-105, 2013.

GUO, L.; WANG, Z. Y.; LIN, H.; et al. Expression and functional analysis of the rice plasma membrane intrinsic protein gene family. *Cell Res*, v. 16, p. 277–286, 2006.

HANBA, Y. T.; SHIBASAKA, M.; HAYASHI, Y.; et al. Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol*. v. 45, p. 521–529, 2004.

HARE, P. D.; CRESS, W. A; VAN STADEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ*. v. 21, p. 535-553, 1998. In: DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impact of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 18, p. 55–81, 2006.

HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant physiology*, v. 51, p. 463-499, 2000.

HASTHANASOMBUT, S.; NTUI, V.; SUPAIBULWATANA, K. Expression of OsBADH1 gene in Indica rice (*Oryza sativa* L.) in correlation with salt, plasmolysis, temperature and light stresses. *Plant Omics* v. 105, p. 89–96, 2011.

HAYASHI, H.; MURATA, N. Genetically engineered enhancement of salt tolerance

in higher plants. In: Satoh K, Murata N (eds) Stress responses of photosynthetic organisms. Elsevier Press, Amsterdam, 1998, p. 133–148.

HETHERINGTON, A. M.; WOODWARD, F. I. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, v. 424, p. 901–908, 2003.

HINCHA, D. K.; HAGEMANN, M. Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochemical Journal*, v. 383, p. 277-283, 2004.

HOSY, E.; VAVASSEUR, A.; MOULINE, K.; et al. The *Arabidopsis* outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc Natl Acad Sci*, v. 100, p.5549–54, 2003.

HU, H.; XIONG, L. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. *Annual review of plant biology*, v. 65, p. 715-741, 2014.

HUNDERTMARK, M.; HINCHA, D. K. Proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) e seus genes codificadores em *Arabidopsis thaliana*, *BMC genomics*, v. 9, n. 1, p. 118, 2008.

IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; TAJI, T.; et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*, v. 27, p. 325–333, 2001.

JANG, J. Y.; LEE, S. H.; RHEE, J. Y.; et al. Transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses, *Plant Molecular Biology*, v. 64, p. 621-632, 2007.

KALDENHOFF, R.; FISCHER, M. Aquaporins in plants. *Acta Physiologica*, v. 187, p. 169-176, 2006.

KASUKABE, Y. et al. Overexpression of Spermidine Synthase Enhances Tolerance to Multiple Environmental Stresses and Up-Regulates the Expression of Various Stress- Regulated Genes in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, v. 45, n. 6, p. 712-722, 2004.

KIM, Y.H.; KWAK, S.S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S. D (Ed.). *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Flórida: Science Publishers, 2010. p.129-150.

KISHOR K. P. B. et. Al. Overexpression of A1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase

Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants'. *Plant Physiology*, v. 108, p. 1387-1394, 1995.

KOORNNEEF, M.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K. M.; SCHWARTZ, S. H.; et al. The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 36, p. 83–89, 1998.

KOUSSEVITZKY, S.; SUZUKI, N.; HUNTINGTON, S. et al. Ascorbate peroxidase plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *J Biol Chem*, v. 283, p. 34197–34203, 2008.

KUSAKA, M., LALUSIN, A. G., FUJIMURA, T. The maintenance of growth and turgor in pearl millet (*Pennisetum glaucum* [L. Leeke) cultivars with different root structures and osmo-regulation under drought stress. *Plant Sci*, v. 168, p. 1–14, 2005.

LACOMBE, B.; BECKER, D.; HEDRICH, R.; et al. The identity of plant glutamate receptors. *Science*, v. 292, p. 1486-1487, 2001.

LEYMAN, B.; VAN DIJCK P.; THEVELEIN, J. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trend and Plant Science*, v. 6, p. 510-513, 2001.

LI, Y. J.; HAI, R. L.; DU, X. H.; JIANG, X. N.; LU, H. Over-expression of a *Populus* peroxisomal ascorbate peroxidase (PpAPX) gene in tobacco plants enhances stress tolerance. *Plant Breeding*, v. 128, n. 4, p. 404-410, 2009.

LIMA, A. L.; DAMATTA, F. M.; PINHEIRO, H. A. et al. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Journal Environmental and Experimental Botany*, v. 47, p.239-247, 2002.

LIOTENBERG, S.; NORTH, H., MARION-POLL, A. Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 37, p. 341–50, 1999.

LUTTS, S.; MAJERUS, V.; KINET, J. M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, v.105, p.450-458, 1999.

MAGWANGA, R. O.; LU, P.; KIRUNGU, J. N. et al. Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) proteins family and their role in drought stress

tolerance in upland cotton. *BMC genetics*, v. 19, n. 1, p. 6, 2018.

MARIN, E.; NUSSAUME, L.; QUESADA, A.; et al. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J*, v. 15, p.2331–42, 1996.

MARUYAMA, K.; TAKEDA, M.; KIDOKORO, S. et al. Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant physiology*, v. 150, n. 4, p. 1972-1980, 2009.

MATTANA, M.; BIAZZI, E.; CONSONNI, R.; LOCATELLI, F.; VANNINI, C.; PROVERA, S.; CORAGGIO, I. Overexpression of Osmyb4 enhances compatible solute accumulation and increases stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, v. 125, p. 212-223, 2005.

MAYOR, A.; PINEDA, B.; GARCIA-ABELLÁN, J. O. et al. Overexpression of dehydrin tas14 gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato. *Journal of plant physiology*, v. 169, n. 5, p. 459-468, 2012.

MCKERSIE, B. D.; BOWLEY, S. R.; HARJANTO, E. et al. Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiology*, v. 111, n. 4, p. 1177-1181, 1996.

MEYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 Chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences*, v. 62, n. 6, p. 670, 2005.

MIAO, Y. L. V. D; WANG, P.; WANG, X. C. et al. An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell*, v.18, p.2749–2766, 2006.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, v.7, p. 405–410, 2002.

MORI, I. C.; MURATA, Y.; YANG, Y.; et al. CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺-permeable channels and stomatal closure, *PLoS Biol*, v. 4, p. 1749–1762, 2006.

MOUILLON, J.; GUSTAFSSON, P.; HARRYSON, P. Investigação estrutural de proteínas de stress desordenadas. Comparaç o de desidratos completos com pept deos isolados de seus segmentos conservados. *Physiol vegetal*, v. 141, p. 638–650, 2006.

NUCCIO, M. L.; RODEES, D.; MCNEIL, S.; HANSON, A. D. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 2, p. 128-134, 1999.

OKAMOTO, M.; TANAKA, Y.; ABRAMS, S. R.; et al. High humidity induces abscisic acid 80-hydroxylase in stomata and vasculature to regulate local and systemic abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* v. 149, p. 825–834, 2009

PANDEY, S.; ZHANG, W.; ASSMANN, S. M. Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Lett.*, v. 581, p.2325–2336, 2007.

PEITER, E.; MAATHUIS, F. J. M.; MILLS, L. N.; et al. The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature*, v. 434, p. 404-408, 2005.

PILOT, G.; PRATELLI, R.; GAYMARD, F.; et al. Five-group distribution of the Shaker-like K⁺channel family in higher plants. *J Mol Evol*, v. 56, p. 418-434, 2003.

PINHEIRO, H. A.; DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M. et al. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Sci*, v.167, p. 1307-1314, 2004.

POORTER, L.; MARKESTEIJN, L. Seedling traits determine drought tolerance of tropical tree species. *Biotropica*, v. 40, n. 3, p. 321-331, 2008.

RATNAYAKA, H. H.; MOLIN, W. T.; STERLING, T. M. Physiological and antioxidant responses of cotton and spurred anoda under interference and mild drought. *J Exp Bot*, v.54, p. 2293–2305, 2003.

REGGIANI, R.; AURISANO, N.; MATTANA, M.; BERTANI, A. J. *Plant and Physiology*, v. 142, p. 94-98, 1993.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELUZIO, M. C. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience journal*, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RICHARDS, F. J.; COLEMAN, R. G. *Nature*, v. 170, p. 460, 1952.

SARAVITZ, D. M.; PHARR, D. M.; CARTER, T. E. Galactinol synthase

activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. *Plant Physiology*, v. 83, p. 185-189, 1987.

SATO, Y.; YOKOYA, S. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant cell reports*, v. 27, n. 2, p. 329-334, 2008.

SEKI, M.; UMEZAWA, T.; URANO, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, v.10, p.296- 302, 2007.

SEO, M.; PEETERS, A. J. M.; KOIWAI, H.; et al. The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci*, v. 97, p.12908–12913, 2000.

SERRANO, R.; MULET, J. M.; RIOS, G.; et al. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany*, v. 50, p.1023–1036, 1999.

SHEN, Y. G. et al. AhCMO, regulated by stresses in *Atriplex hortensis*, can improve drought tolerance in transgenic tobacco. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 105, p. 815-821, 2002.

SIEFRITZ, F.; OTTO, B.; BIENERT, G. P.; et al. The plasma membrane aquaporin NtAQP1 is a key component of the leaf unfolding mechanism in tobacco. *Plant J*, v. 37, p. 147– 155, 2004.

SILVEIRA, J. A. G.; VIÉGAS, R. D.; ROCHA, I. M. A.; et al. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *Journal of Plant Physiology*, v.160, p.115-123, 2003.

SIVAMANI, E.; BAHIELDIN, A.; WRAITH, J. M. et al. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Sci*, v.12, p.:1-9, 2000.

STOOP, J. M. H.; WILLIAMSON, J. D.; PHARR, D. M. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*, v. 1, n. 5, p. 139-144, 1996.

SUH, M.C. et al. Cuticular Lipid Composition, Surface Structure, and gene expression in *Arabidopsis* stem epidermis. *Plant Physiol*, v.139, p. 1649-1665,

2005.

SUH, S. J.; WANG, Y. F.; FRELET, A.; et al. The ATP binding cassette transporter AtMRP5 modulates anion and Ca²⁺ channel activities in *Arabidopsis* guard cells. *J Biol Chem*, v. 282, p. 1916-1924, 2006.

SZEKELY, G.; ABRAHAM, E.; CSEPLO, A.; et al. Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis, *The Plant Journal*, v. 53, p. 11-28, 2008

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 5. ed., Artmed, 2013. 918 p.

TAN, B. C.; SCHWARTZ, S. H.; ZEEVAART, J. A. D.; et al. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc Natl Acad Sci, USA*. v. 94, p. 12235-40, 1997.

TREBERG, J. R.; DRIEDZIC, W. R. The accumulation and synthesis of betaine in winter skate (*Leucoraja ocellata*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 147, p. 475-83, 2007.

TYERMAN, S. D.; NIEMIETZ, C. M.; BRAMELEY, H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ*, v.25, p.173-194, 2002.

UEHLEIN, N.; LOVISOLO, C.; SIEFRITZ, F.; et al. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature*, v. 425, p. 734-737, 2003.

UENO, K.; KINOSHITA, T.; INOUE, S.; et al. Biochemical characterization of plasma membrane H⁺-ATPase activation in guard cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana* in response to blue light. *Plant Cell Physiol*, v. 46, p. 955-963, 2005.

WANG, F. Z.; WANG, Q. B.; KWON, S. Y. et al. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of plant physiology*, v. 162, n. 4, p. 465-472, 2005.

XIAO, B. Z.; CHEN, X.; XIANG, C. B. et al. Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions. *Mol Plant*, v. 2, p.73-83, 2009.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment*, v. 25, n. 2, p. 131-139, 2002.

XIONG, L.; ISHITANI, M.; LEE, H.; et al. The *Arabidopsis* *LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold and osmotic stress responsive gene expression. *Plant Cell.*, v. 13, p. 2063–2083, 2001.

XU, Z.; ZHOU, G. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of experimental botany*, v. 59, n. 12, p. 3317-3325, 2008.

YU, H.; CHEN, X.; HONG, Y. Y.; WANG, Y.; XU, P.; KE, S. D.; LIU, H. ; ZHU, J.; OLIVER, D. J.; XIANG, C. B. Activated expression of an *Arabidopsis* HD-START protein confers drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density. *The Plant Cell*, v. 20, n. 4, p. 1134-1151, 2008.

YU, Q.; HU, Y.; LI, J.; et al. Sense and antisense expression of plasma membrane aquaporin BnPIP1 from *Brassica napus* in tobacco and its effects on plant drought resistance. *Plant Sci*, v. 168, p. 647–656, 2005.

ZHANG, Y.; XU, W.; LI, Z.; et al. F-Box protein DOR functions as a novel inhibitory factor for abscisic acid-induced stomatal closure under drought stress in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, v. 148, p. 2121-2133, 2008.

ZHOU, S.; HU, W.; DENG, X. et al. Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *PLoS One*, v. 7, n. 12, p. e52439, 2012.

ZHU, J. K. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.*, v. 6, p. 66–71, 2001.

Capítulo 07

MARCADORES MOLECULARES BASEADOS EM SEQUÊNCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

Luara Lopes Sousa

Marcia Flores da Silva Ferreira

Talles Eduardo Ferreira Maciel

1. INTRODUÇÃO

A ciência não para e está sempre buscando novas descobertas, que na maioria das vezes surgem para melhorar a vida de todos nós. Não foi diferente com a biologia molecular. O desenvolvimento, relativamente recente, de inúmeras técnicas nesta área culminou no surgimento de inúmeros tipos marcadores moleculares que são ferramentas úteis para detectar a variabilidade genética entre dois ou mais indivíduos ou organismos. Marcadores moleculares são amplamente utilizados em diversas linhas de pesquisas e tem auxiliado na compreensão de diversos processos celulares.

Marcador molecular é qualquer caráter visível ou um fenótipo molecular proveniente de um segmento específico de DNA, que pode ser expresso ou não (SANSALONI, 2012). No contexto deste capítulo vamos entender marcadores moleculares como um segmento do DNA que apresenta variabilidade quando comparado à mesma região em outros indivíduos ou organismos. Diversas hipóteses, em inúmeras áreas, podem ser respondidas a partir destas comparações. Considerando as alterações nas sequências moleculares, estes podem ser de evolução lenta (adequados para estudos interespecíficos) ou de evolução rápida (apropriados para estudo de indivíduos, famílias e populações).

Os alelos em *loci* individuais segregam pelas gerações segundo padrão de herança Mendeliana, relacionada às características monogênicas ou que apresentam distribuição compatível com as esperadas em características poligênicas. A detecção de marcadores pode empregar diferentes técnicas, tais como, endonucleases de restrição, hibridização de ácidos nucléicos, amplificação de sequências de DNA

via PCR ou sequenciamento.

Marcadores moleculares em plantas são amplamente empregados em estudos de diversidade genética, inferência filogenética, estrutura genética de populações naturais, conservação e uso de recursos genéticos, melhoramento vegetal, obtenção de mapas de ligação, identificação de *loci* associados a características importantes ao melhoramento, tanto de natureza qualitativa, quanto quantitativa (QTL). A escolha do marcador molecular a ser utilizado depende dos objetivos a serem alcançados na pesquisa, da disponibilidade de recursos e da estrutura de laboratório.

No geral, o conteúdo genômico entre indivíduos de uma espécie, ou até mesmo entre espécies diferentes (em táxons próximos) é altamente conservado, sendo as variações genéticas mais comuns aquelas caracterizadas por diferenças em um único nucleotídeo quando comparada regiões equivalentes de genomas distintos. Estas variações, conhecidas como Polimorfismo de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP), são amplamente distribuídos no genoma de várias espécies e resulta de uma mutação ou indels (*insertions or deletions* - indels). Apesar de ser possível a ocorrência de qualquer um dos quatro nucleotídeos, comumente os SNPs são bialélicos devido à maneira que são originados e distribuídos entre os indivíduos da população. Quando tais mutações ocorrem em células germinativas, são herdadas pela progênie, transmitidas às gerações seguintes e após algumas gerações o SNP pode se fixar na população em uma frequência mínima de 1%, quando deixam de ser mutação e passam a ser consideradas polimorfismos (BROOKES, 1999).

A identificação e uso destes marcadores tem sido amplamente utilizado devido a possibilidade de sua identificação automatizada em plataformas de sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing* - NGS). Em um único experimento, diferentes abordagens utilizadas por estas metodologias, tem possibilitado a descoberta e genotipagem de centenas ou milhares de SNPs ao longo do genoma. Esse aumento da eficiência e os benefícios de baixo custo, aliado a possibilidade de aplicação em qualquer espécie, tornaram este marcador muito atrativo e popular. Assim a identificação de SNPs passou a ser relevante para genotipagem, mapeamento em escala fina, estudos de associação, de seleção genômica ampla, de variação genética dentro e entre espécies, bem como estudos

de pedigree; todos com grande aplicação no melhoramento de plantas.

A genotipagem de SNPs por NGS geralmente é realizado através de uma estratégia multiplex, que consiste no sequenciamento simultâneo de diferentes amostras. Para isto, é adicionado um pequeno adaptador (*barcode*) que difere para cada uma das amostras a ser sequenciada. Estes adaptadores são relativamente baratos e permitem a identificação e agrupamento das sequências de DNA por indivíduo.

Atualmente, duas metodologias de NGS para a genotipagem de SNPs têm se destacado, *Genotyping-by-Sequence* (GBS - Genotipagem por sequenciamento) e Diversity Array Technology (DArTseq). Ambas são baseadas na redução da complexidade genômica a partir de enzimas de restrição. Elas compartilham várias etapas, tais como a extração, quantificação, análise da qualidade do DNA, fragmentação, ligação dos adaptadores, amplificação por PCR, sequenciamento e análise das sequências com ou sem suporte de um genoma de referência, e identificação dos SNPs (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Entretanto, apresentam particularidades, como por exemplo no processo de preparo das bibliotecas para o sequenciamento.

Estas metodologias estão sendo aplicadas com diferentes propósitos em estudos envolvendo diversas espécies de plantas, tais como estudos filogenéticos em vários gêneros ou famílias (AL-BEYROUTIOVÁ et al., 2016; STETTER & SCHMID, 2017); descoberta de SNPs para construção de mapas genéticos de alta densidade (GUAJARDO et al., 2015; REN et al., 2015); estudos de associação genômica ampla (NIMMAKAYALA et al., 2014; SUKUMARAN et al., 2018); bem como estudos de diversidade genética (FU, CHENG, & PETERSON, 2014; BALOCH et al., 2017).

Neste capítulo será realizada uma introdução as metodologias GBS e DArTseq com foco na base teórica e aplicações, tendo como público alvo estudantes de graduação, pós-graduação e pesquisadores que tenham interesse sobre o assunto.

2. GENOTYPING BY SEQUENCING (GBS)

A metodologia da genotipagem por sequenciamento (GBS) foi desenvolvida pelo grupo do pesquisador Robert J. Elshire na Universidade de Cornell em 2011.

Embora desenvolvida utilizando a plataforma Illumina, esta metodologia pode ser executada empregando outras plataformas de NGS.

A construção de bibliotecas GBS baseia-se na redução de complexidade do genoma com enzimas de restrição (REs), pois a maioria das espécies estudadas tem genomas grandes e complexos. Esta abordagem é simples (comparado a obtenção de bibliotecas por outras metodologias), rápida, específica, altamente reprodutível e pode alcançar regiões do genoma inacessíveis por outras abordagens. Estas características explicam sua ampla utilização, inclusive em estudos de organismos com genomas grandes e complexos. Uma das vantagens desta técnica é que pode ser aplicada tanto a espécies que possuem genoma de referência quanto à espécies sem genoma de referência. Porém, o alinhamento com um genoma é essencial para aumentar o número de SNPs encontrados. Com a metodologia GBS é possível identificar centenas de milhares de SNPs no genoma (ELSHIRE et al., 2011).

A avaliação do DNA genômico sequenciado associado ao sítio de restrição, RAD (*Restriction site-associated DNA*) para descoberta de SNPs em larga escala e genotipagem foi primeiramente proposta por Baird et al. (2008). GBS utiliza uma abordagem semelhante a RAD, porém muito menos complicada: requer menos DNA, a geração dos fragmentos (utilizando adaptadores apropriados) é menos laboriosa, menor manuseamento das amostras e poucos passos de purificação. Soma-se ainda às poucas etapas enzimáticas a vantagem de não necessitar selecionar os fragmentos por tamanho (POLAND et al., 2012). O protocolo para GBS foi inicialmente desenvolvido para o milho (ELSHIRE et al., 2011). Desde então, esse procedimento tem sido utilizado com sucesso em várias outras espécies, com diversas finalidades, não podendo deixar de salientar que esta técnica tem sido otimizada para atender diferentes demandas de recursos financeiros e materiais.

Resumidamente, a metodologia para a construção da biblioteca GBS, proposta por Elshire et al. (2011), envolve as seguintes etapas (Figura 1):

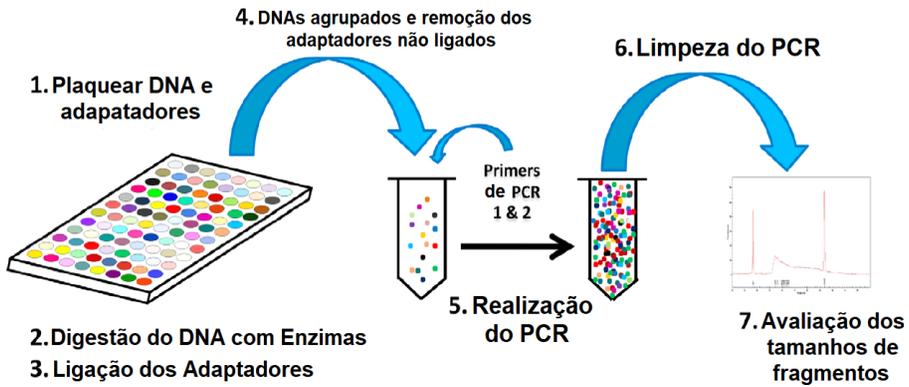


Figura 1. 1) Amostra de DNA, adaptadores *barcode* e adaptadores comuns são aplicadas na placa. 2) Digestão do DNA com uma enzima de restrição de corte coesivo visando reduzir a complexidade do genoma. 3) Ligação, com auxílio de enzima de ligação, do adaptador *barcode* à uma das extremidades dos fragmentos clivados e do adaptador comum a outra extremidade. 4) A enzima T4 ligase é inativada e uma alíquota de cada amostra é reunida e aplicada a uma coluna de exclusão por tamanho para remoção de adaptadores não ligados. 5) PCR com a adição de *primers* apropriados capazes de se ligar aos adaptadores ligados aos fragmentos clivados. 6-7) Purificação do produto da PCR e avaliação dos tamanhos dos fragmentos da biblioteca GBS obtida. Fonte: Elshire et al., (2011) com modificações.

1) Amostra de DNA, adaptadores *barcode* e adaptadores comuns são plaqueados em seco. As amostras analisadas devem conter DNAs com elevado grau de pureza, ou seja, devem ser livres de DNA contaminantes, RNAs, e menos de 5% de DNA organelar. O comprimento dos barcodes e a composição de nucleotídeos destes deve ser otimizado para evitar erros de sequenciamento. Neste passo, até 96 amostras de DNA podem ser processadas simultaneamente.

2) Digestão do DNA com uma enzima de restrição de corte coesivo visando reduzir a complexidade do genoma. Nesta etapa pode ser utilizada uma ou mais enzimas, evitando na maioria das vezes, a clivagem em regiões repetitivas do genoma; a fim de favorecer a representação de regiões com baixo número de cópias; fato este que simplifica o alinhamento computacional em espécies com alta diversidade genética.

3) As extremidades dos fragmentos clivados são ligadas, de um lado a adaptadores contendo *barcodes* e do outro ao adaptador comum; com auxílio de enzima de ligação. *Barcodes*, são sequências conhecidas, que proporcionam a separação das reads sequenciadas por amostra. O adaptador *barcode* é constituído pelo *primer*, por uma sequência *barcode* que varia de 4 a 8 pares de bases e por uma sequência complementar ao sítio de restrição clivado pela enzima. O adaptador comum, é constituído pelo primer e por uma sequência complementar ao sítio de restrição.

4) A enzima T4 ligase é inativada por aquecimento e uma alíquota de cada uma das amostras em estudo é retirada, misturada e aplicada a uma coluna de exclusão por tamanho, sendo este passo efetuado com o intuito de remover adaptadores não ligados.

5) Em seguida, tem-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta etapa inicia-se com a adição de *primers* apropriados capazes de se ligar aos adaptadores ligados aos fragmentos clivados. Estes *primers* têm ainda uma sequência complementar aos oligonucleotídeos presente na placa de sequenciamento. A etapa de PCR é realizada com o intuito de aumentar o *pool* de fragmentos.

6-7) Purificação do produto da PCR com posterior avaliação, em analisador de DNA, dos tamanhos dos fragmentos da biblioteca GBS obtida. Apenas os fragmentos ligados ao adaptador com *barcode* em uma extremidade e ao adaptador comum na extremidade oposta serão sequenciados. A otimização deste passo requer testes prévios visando identificar a melhor concentração de adaptadores a ser utilizada. Concentrações elevadas de *primers* pode resultar na presença de dímeros de *primers*, fato este que prejudica a análise. Fragmentos grandes (> 1Kpb) não são amplificados.

Durante o sequenciamento, pode ser gerado diversos tipos de combinações envolvendo os elementos presente no meio reacional. Qualquer sequência que não tenha os seguintes elementos em sua composição: adaptador *barcode*, sítio de restrição da enzima, inserto, sítio de restrição e adaptador comum; será descartada das futuras análises de bioinformática. Basicamente, as análises de bioinformática consistem de três etapas: análise da qualidade dos fragmentos sequenciamentos, identificação e filtragens dos SNPs (Figura 2).

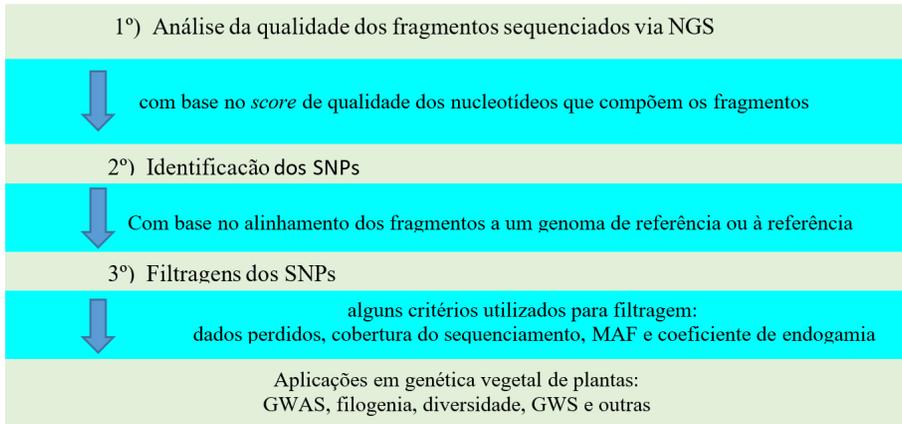


Figura 2. Etapas referentes às análises de bioinformática após o sequenciamento das amostras.

Várias características intrínsecas aos fragmentos sequenciados são capazes de interferirem na análise. Assim, os fragmentos precisam ser analisados com a finalidade de projetar o tipo de tratamento necessário para deixar os dados o mais adequado possível para análise. Um software amplamente utilizado para este propósito é o fastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/download.html#fastqc>). Como este software é possível avaliar desde o *score* de qualidade dos nucleotídeos dos fragmentos à composição e tamanho dos mesmos.

Para a identificação dos SNPs é preciso alinhar os fragmentos previamente separados por amostras a um genoma de referência. Quando não se tem o genoma de referência, as próprias sequências obtidas podem ser utilizadas para montar uma referência. Um dos programas que permite a identificação de SNPs é o TASSEL que funciona com base em um pipeline composto por vários plug-ins. Assim, temos um arquivo no formato .vcf contendo as informações dos polimorfismos encontrados. Arquivos neste formato contêm informações sobre a genotipagem, como a frequência alélica, heterozigose, posição dos SNPs, dentre outras informações. Por fim, estes SNPs podem ser carregados no visualizador genômico integrado (Integrative Genomics Viewer – IGV).

A etapa de filtragem dos SNPs é de fundamental importância, sendo necessária, principalmente, devido a erros que ocorrem durante o sequenciamento.

Assim, saber que um SNP representa a variabilidade genética nas amostras analisadas é de suma importância, uma vez que esta informação será implementada diretamente em inúmeras linhas de pesquisa. No entanto esta não é uma tarefa trivial. Plug-ins presente no pipeline de análise gera tabelas contendo informações essenciais para avaliar a natureza do SNP. Tais conclusões acerca da natureza dos SNPs são tomadas após análises utilizando pacotes específicos do R. Como critérios que podem ser utilizados para filtragem de SNPs, podemos citar: presença de dados perdidos, cobertura do sequenciamento, análise da frequência do menor alelo (MAF) e coeficiente de endogamia.

A aplicação desses parâmetros reduz a quantidade dos SNPs iniciais, entretanto sua utilização é importante para adequar os dados às características biológicas da população e, portanto, aumentar a confiabilidade dos polimorfismos detectados.

Na abordagem original proposta por Elshire et al., (2011) e descrita acima, apenas uma única enzima de restrição era utilizada para cortar a sequência genômica. Em um trabalho posterior, Poland et al. (2012) propuseram uma otimização para produção da biblioteca genômica a partir da utilização de duas enzimas de restrição, uma de corte frequente e outra de corte raro (Figura 3). A aplicação deste método foi realizada utilizando como modelo a cevada e o trigo; demonstrando a robustez do GBS para genotipagem em espécies com genomas grandes, complexos e até mesmo poliploides.

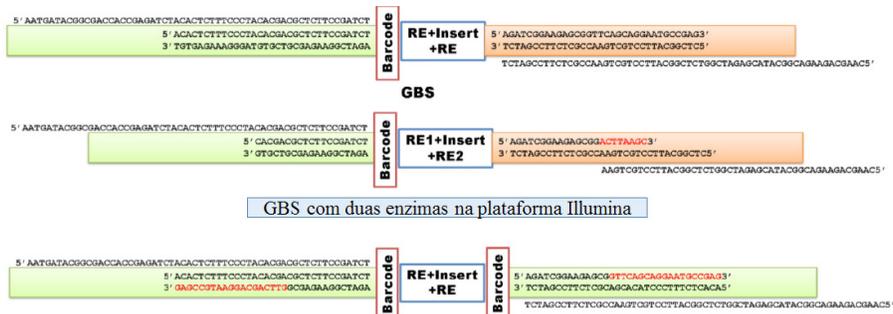


Figura 3. Variação da técnica de GBS para obtenção da biblioteca para sequenciamento. Algumas abordagens utilizam uma enzima de restrição, enquanto outras utilizam duas enzimas para a digestão do DNA genômico. RE: enzima de restrição. Fonte: Adaptado de Jiang et al. (2016).

2.1. Métodos de amostragem do genoma para descoberta de SNP em larga escala

A descoberta de SNPs em larga escala utilizando NGS é utilizada em diversas linhas de pesquisas. Seja por falta de recursos ou devido a qualquer outra causa, nem sempre é possível re-sequenciar um genoma inteiro para análise de SNPs. Devido ao aperfeiçoamento das técnicas destinadas a este propósito, em muitos casos, o re-sequenciamento total do genoma não é mais necessário.

A característica comum destes métodos que tem permitido tal análise é sequenciar uma fração do genoma da espécie em estudo, fração esta que seja representativa do todo. Estas técnicas são denominadas coletivamente como métodos de sequenciamento de amostragem ampla do genoma (*GWSS - Genome Wide Sampling Sequencing*). Assim, pode-se dizer que elas têm por finalidade a redução da complexidade do genoma. Conseqüentemente tem-se com vantagem a redução dos custos ao utilizar esta abordagem para detecção de SNPs. Tradicionalmente, os métodos GWSS envolvem três etapas comuns:

- 1) Digestão do DNA em estudo com enzimas de restrição,
- 2) ligação dos fragmentos obtidos à adaptadores específicos das diferentes plataformas de sequenciamento, e
- 3) amplificação por PCR para gerar as bibliotecas a serem sequenciadas.

A Figura 4 evidencia algumas estratégias de redução da complexidade do genoma.

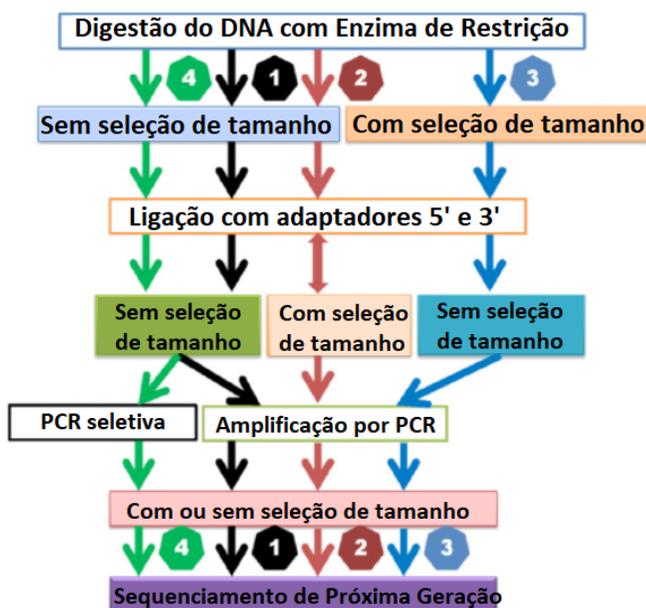


Figura 4. Diferentes estratégias para GWSS. 1) A sequência de passos indicada pela seta de cor preto representa uma estratégia de GWSS sem seleção por tamanho depois da digestão das enzimas de restrição e ligação dos adaptadores. A seleção por tamanho deve ser realizada após a amplificação por PCR. 2) GWSS como semi-seleção por tamanho. Estes métodos realizam a seleção depois da ligação com adaptadores. Alguns métodos podem combinar corte ao acaso com seleção por tamanho e então ligar com o segundo adaptador. 3) GWSS com seleção por tamanho imediatamente após a digestão. 4) GWSS com amplificação seletiva. Este método é dependente do desenho de *primers* para amplificação seletiva de produtos de sequenciamento. Teoricamente, os dois primeiros grupos de métodos permitem a redução da complexidade do genoma, enquanto os dois últimos podem resultar na redução da representação do genoma (Figura adaptada de Jiang et al., 2016).

A estratégia a ser utilizada depende de inúmeros fatores como: hipótese a ser testada, espécie em estudo, informações publicadas sobre a espécie em estudo, recursos financeiros disponíveis, estrutura do laboratório, profissionais especializados para análise dos dados, dentre outros.

2.2. Aplicações

Vários estudos em plantas têm utilizado a abordagem GBS (Tabela 1). Uma das principais aplicações é a caracterização de amostras e elucidação de relações filogenéticas, uma vez que relações resolvidas entre espécies cultivadas e seus parentes silvestres fornecem um recurso importante para o desenvolvimento das culturas, pelas espécies silvestres serem consideradas recursos genéticos valiosos, para selecionar características desejáveis; resultando em melhor adaptação a uma gama de ambientes, bem como resistência a pragas e a doenças (HAMON et al., 2017). Como exemplo tem-se a caracterização de materiais proveniente de uma coleção de germoplasma selvagem e cultivada de espécies de *Lens* spp.. Discordâncias são relatadas em relação à classificação no nível de espécies e subespécies, por estudos taxonômicos deste gênero, com base em morfologia, citogenética, hibridização e marcadores moleculares (WONG et al., 2015). A utilização de SNPs como ferramenta de triagem, através de GBS, permitiu uma melhor compreensão da classificação ao nível do táxon.

Com o mesmo propósito, o estudo do gênero *Coffea* utilizando o método GBS revelou informações sobre a evolução de genes envolvidos no conteúdo de cafeína entre as espécies. O conhecimento sobre espécies de café silvestre avançou recentemente, incluindo novas informações sobre as duas principais espécies da cultura (o café Arábica (*Coffea arabica*) e Robusta (*Coffea canephora*). Neste estudo, 81 amostras foram submetidas ao GBS, resultando na análise de 2.715 *loci*, nos quais foram detectados 28.800 SNPs. Estes foram suficientes para permitir a resolução das relações entre espécies.

Outra grande aplicação dos SNPs oriundos da metodologia GBS é a construção de mapas de ligação altamente saturados, importantes para a detecção de *loci* importantes agronomicamente. Os passos para a obtenção de um mapa de ligação saturado estão representados na Figura 5A e incluem: a) a obtenção de população experimental a partir de pais contrastantes, como populações F_2 , retrocruzamentos e RILs (Linhagens Endogâmicas Recombinantes); b) a identificação de polimorfismos nos pais; c) a genotipagem dos polimorfismos na população; d) a geração da planilha de dados; e) a construção de um mapa de ligação.

Outra utilização relevante dos dados GBS é a utilização em estudo de associação de Genoma Amplo (*Genome-Wide Association Studies* - GWAS) e Desequilíbrio de Ligação (DL). Como exemplo, uma coleção de cultivares de melancias representativa da diversidade genética da espécie, foi caracterizada por GBS e o grande número de SNPs detectados após mapeamento a um genoma de referência, criou uma oportunidade para realizar GWAS (NIMMAKAYALA et al., 2014). Os principais passos envolvidos na análise de estudos de GWAS estão representados na Figura 5B.

Embora GBS tenha se tornado um método popular de genotipagem de SNPs capaz de gerar até um milhão de SNPs por amostra, esta tecnologia tem algumas limitações, incluindo uma proporção relativamente grande de dados perdidos e altas taxas de erro na chamada do alelo, que ocorre devido à baixa cobertura do sequenciamento e também na genotipagem de germoplasma heterogêneo e altamente heterozigótico. Algumas dessas desvantagens foram contornadas através de uma intensa correção pós obtenção dos dados, incluindo a implementação de métodos confiáveis de imputação, reanálise de dados antigos usando ferramentas computacionais aprimoradas e aumentando a cobertura proporcionada pelo sequenciamento. A técnica DArTseq, discutida em seguida, é utilizada como uma alternativa ao GBS; enquanto gera menos informações de SNP (variando de alguns milhares à 350.000 SNPs dependendo da espécie), tem cobertura relativamente melhor e níveis mais baixos de dados perdidos (CHEN et al., 2016).

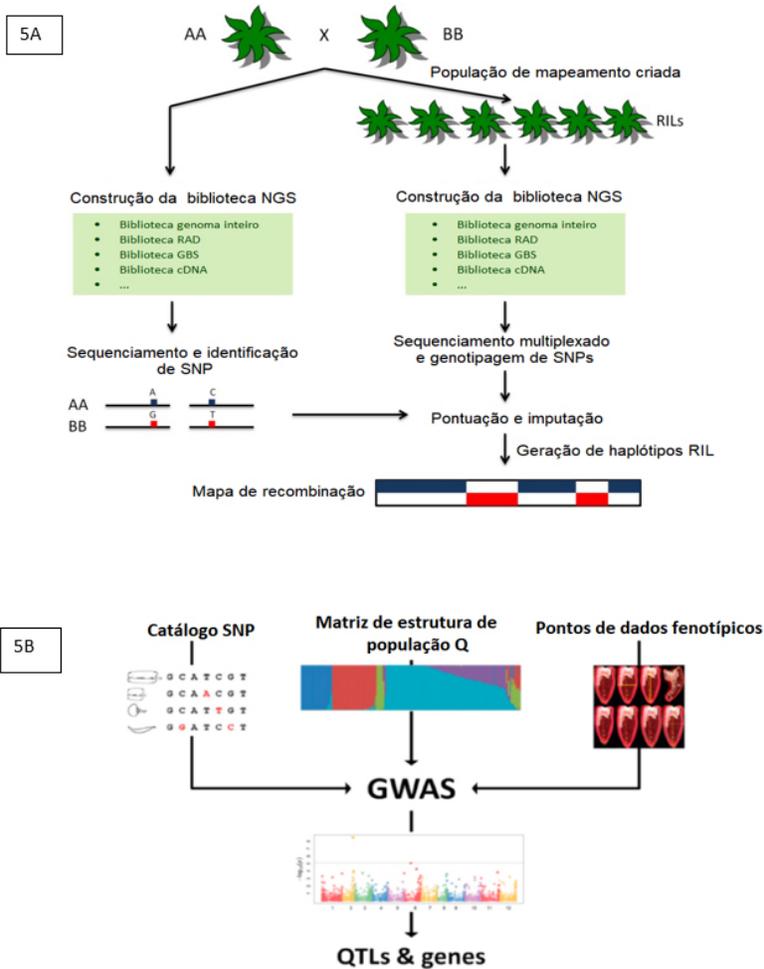


Figura 5. A) Diagrama esquemático de obtenção de um mapa de ligação. Os parentais (AA e BB) utilizados para criar a população de mapeamento são sequenciados via NGS e os SNPs entre eles identificados. As RILs são submetidas a mesma estratégia de construção de biblioteca que os parentais e sequenciadas em menor cobertura. A diversidade alélica por *locus* da população é determinada. Os haplótipos e os mapas de recombinação são criados. Blocos de haplótipos podem ser usados como marcadores para o mapeamento (Fonte: Adaptado de Deschamps, Laca & May (2012)). B) Estudos de GWAS são baseados: na obtenção de um catálogo de SNPs de alta densidade derivado da coleção de germoplasma; no conhecimento da estrutura populacional e espectro de frequências alélicas (matriz Q); e, nos dados fenotípicos de indivíduo da população. Os resultados podem ser exibidos como gráficos de Manhattan mostrando os valores p do genoma amplo de associações de características do SNP, sendo possível a identificação de genes. Fonte: Adaptado de Agostino & Tripodi (2017)

Tabela 1. Aplicações da metodologia GBS em diferentes estudos com diferentes espécies vegetais.

| Espécie | Estudo | Descrição | Plataforma/ Sequências obtidas | Referência |
|--|---|---|---|--|
| Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) | Mapa de ligação | de População F ₁ de 384 progênies. | 2000. Illumina 22.956 SNPs polimórficos nos genitores. | Li et al., 2014 |
| Algodão (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) | Detecção, Validação e Aplicação de SNPs | Populações RILs, selecionados ao acaso, e 11 genitores enviados para D2B, LLC (Ames, IA) e IGD (Cornell University, Ithaca, NY), respectivamente, para preparação da biblioteca distintas e análises. | Genome Analyzer 2000 (Illumina, Inc, San Diego, CA). 4.441 e 1.176 bons SNPs de D2B e IGD, respectivamente. | Islam et al., 2015 combined with a narrow genetic base of the cultivated varieties, has hindered the identification of polymorphic genetic markers and their use in improving this important crop. Genotyping-by-sequencing (GBS) |
| Cereja doce (<i>Prunus avium</i> L.) | Mapa de ligação genética saturado | de 675 mudas com um ano de idade. Primeiro mapa de ligação de alta densidade de cereja. | Illumina HiSeq2000. 11.854 SNPs após filtragem, 8.476 SNPs informativos. | Guajardo et al., 2015 |

(Continua...)

Tabela 1. Aplicações da metodologia GBS em diferentes estudos com diferentes espécies vegetais (Continuação).

| Espécie | Estudo | Descrição | Plataforma/ Sequências obtidas | Referência |
|--------------------------|---|---|---|------------------------|
| Gênero <i>Amaranthus</i> | Filogenia e evolução do tamanho do genoma | O GBS permitiu uma alta resolução taxonômica para análise filogenética de 35 espécies do gênero <i>Amaranthus</i> . Para comparar o uso de GBS com e sem uma sequência de referência, foram utilizados diferentes métodos e sequências de referência para a amostragem de SNPs. | Illumina HiSeq 2500. O número de leituras alinhadas diferiu entre as referências: <i>Beta vulgaris</i> apresentou 23.128 SNPs e <i>A. hypochondriacus</i> 264.176 SNPs. | Stetter & Schmid, 2017 |
| Gênero <i>Coffea</i> | Filogenia | África ou a Ásia indicados como a área de origem ancestral mais provável. | Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc., San Diego, CA). Após filtragem 28.800 SNPs. | Hamon et al., 2017 |
| Gênero <i>Lens</i> | Filogenia, e caracterização | 83 amostras originárias de 60 variedades diversas e variedades locais. | Illumina HiSeq 2500. 266.356 SNPs. Depois de filtrar 5.389 SNPs. | Wong et al., 2015 |

(Continua...)

Tabela 1. Aplicações da metodologia GBS em diferentes estudos com diferentes espécies vegetais (Continuação).

| Espécie | Estudo | Descrição | Plataforma/ Sequências obtidas | Referência |
|--|-----------------------------------|---|--|----------------------------|
| Grosselha-preta (<i>Ribes nigrum</i>) | Mapa de ligação genética saturado | de 200 amostras a partir da progênie F ₁ . Duas estratégias de bioinformática foram empregadas para a detecção de SNPs. Primeiro método: mapear as sequências de tags GBS em um conjunto de transcriptomas de referência e o segundo era usar o pipeline UNEAK do conjunto TASSEL de software. | Illumina GA II and/or HiSeq2000. Primeira estratégia: 1.572; Segunda: 18.450 SNPs. | Russell et al., 2013 |
| Mandioca (<i>M. esculenta</i>) | Mapa de alta resolução | 1045 genótipos, representando 917 acessos coletados de campos de fazendeiros e uma biblioteca de 64 clones genotipados em duplicata. | Illumina HiSeq2000. 6.756 SNPs usados no mapeamento. | Rabbi et al., 2014 |
| Melancia (<i>Citrullus lanatus</i>) | GWAS | 183 acessos de <i>C. lanatus</i> var. <i>lanatus</i> representando melancia doce de uma ampla área geográfica do mundo. | Illumina HiSeq 2500. 11.485 SNPs foram filtrados a partir de 23.693 SNPs genotipados | Nimmakayala et al., 2014 |
| Mostarda amarela (<i>Sinapis alba</i> L.) | Análise de diversidade genética | de 24 acessos de mostarda (quatro cultivares, 10 variedades crioulas, originadas de diferentes países, e 10 linhagens consanguíneas). | Roche 454 GS FLX. 828 SNPs obtidos após filtragem | Fu, Cheng & Peterson, 2014 |

3. DIVERSITY ARRAY TECHNOLOGY (DARTSEQ)

O método DArT foi inicialmente desenvolvido na Austrália por Andrzej Kilian com o intuito de suprir limitações de outras metodologias destinadas ao estudo de marcadores moleculares, sendo em 2001 incorporado à empresa de mesmo nome da técnica - Diversity Arrays Technology Pty. Ltd. (JACCOUND et al., 2001). Esta metodologia pode ser aplicada para avaliar diversos tipos de variabilidade presente no DNA. Para se ter uma ideia de sua eficiência, destaca-se a capacidade de genotipagem simultânea de centenas a milhares de SNPs, inserções e deleções (indels) presente no genoma.

A metodologia é baseada na redução da complexidade genômica das amostras por meio do uso de enzimas de restrição. A técnica, foi inicialmente desenvolvida para detectar polimorfismos via hibridização de sondas (DArT). No entanto, a partir de 2009, a empresa DArT P/L em Canberra na Austrália (www.diversityarrays.com), deu início a novas pesquisas visando otimizar e adaptar a metodologia para ser utilizada em plataforma NGS, que passou a ser chamada de DArTseq. A incorporação da plataforma de sequenciamento aumentou substancialmente o número de fragmentos genômicos analisados (1-2 ordens de grandeza) e, conseqüentemente, o número de marcadores obtidos, criando assim uma tecnologia com melhor custo benefício comparado ao método DArT inicial.

Assim como DArT, DArTseq utiliza a etapa de redução da complexidade do genoma, sendo este princípio utilizado por muitos outros métodos na avaliação da complexidade do genoma. Entretanto, DArTseq tem como vantagem a seleção inteligente da fração do genoma a ser estudado, fração esta que correspondendo predominantemente a genes ativos. Estes são obtidos através da utilização de uma combinação de enzimas de restrição que selecionam regiões de baixo número de cópias (mais informativas para a descoberta e genotipagem de marcadores) da fração repetitiva do genoma.

Assim, podemos dizer que a metodologia DArTseq é um sistema robusto de alto rendimento. Como vantagens, podemos destacar: custo relativamente baixo, elevada reprodutibilidade e acurácia, capacidade de fornecer informações de todo o genoma e flexibilidade na utilização. Conseqüentemente, possui diversas aplicações, que incluem caracterização de germoplasma, mapeamento

genético e marcação de genes, seleção assistida por marcadores moleculares e rastreamento de alterações de metilação do genoma. Além disso, por não depender do conhecimento prévio de sequência, é de especial interesse para espécies que não possuem dados moleculares ou quando os recursos são limitados.

Como mencionado anteriormente, a análise de DArTseq, para um novo organismo ou aplicação, começa com a otimização do método de redução da complexidade do genoma, sendo esta uma etapa laboriosa. O processo de otimização, geralmente, seleciona um método mais apropriado a uma determinada cultura, mas em muitos casos foram identificados vários métodos que oferecem vantagens específicas da aplicação.

A diferença entre os métodos de redução da complexidade do genoma pode ser tanto quantitativa (número diferente de fragmentos únicos na representação) quanto composicional (diferentes conjuntos de fragmentos capturados nas representações). Essas diferenças no tamanho e composição das representações se traduzem em eficiências na detecção de marcadores e na qualidade dos mesmos (taxa de chamadas e reprodutibilidade), podendo ser otimizadas em diferentes aplicações.

De acordo com Sansaloni et al. (2010), as etapas seguidas para a construção da biblioteca genômica na metodologia DArTseq são:

1) Digestão do DNA com enzimas de restrição visando a redução da complexidade genômica. Para isto, os DNAs são tratados com enzimas específicas que podem ser de corte raro ou frequente. O conjunto de fragmentos resultante desta etapa é chamado de representação do genoma. De acordo com os objetivos da pesquisa e a disponibilidade de recursos, esta etapa pode ser efetuada com diferentes abordagens. Após a digestão, adaptadores com sequências equivalentes apenas aos sítios das enzimas de corte raro são ligados aos fragmentos de restrição gerados, de forma que somente são amplificados os fragmentos com extremidades raro/raro.

2) Ligação dos adaptadores: após a digestão, as amostras de DNA são individualmente etiquetadas por meio da ligação a adaptadores *barcodes* e comuns. Os *barcodes* são especificamente desenvolvidos para cada uma das amostras e possui uma extremidade 3' que é complementar a extremidade gerada pelo corte da

enzima de restrição. Estas sequências indexadoras permitem rastrear os fragmentos gerados para cada amostra. Os adaptadores comuns, possuem uma extremidade livre para ligação com a extremidade gerada pelo corte coesivo da enzima. Os adaptadores são os mesmos para todas as amostras.

3) Amplificação dos fragmentos digeridos: os produtos resultantes foram amplificados através de PCR utilizando dois iniciadores com sequências complementares aos adaptadores ligados. O primeiro iniciador reconhece o adaptador *barcode* e o segundo iniciador reconhece o adaptador comum.

4) Agrupamento, purificação e quantificação das amplificações: todas as amplificações que tiverem sucesso devem ser agrupadas em um tubo de 1,5ml. Em seguida, esse conjunto deve ser purificado e quantificados com o objetivo de mais uma vez confirmar a ausência de dímero de adaptadores e calcular o volume necessário para a corrida de sequenciamento.

5) Geração de clusters e sequenciamento: as amostras são colocadas em uma *flowcell* e realiza-se amplificação para criar simultaneamente centenas de milhões de moldes de moléculas de DNA individuais. Posteriormente os clusters são sequenciadas em plataforma NGS.

3.1. Variações da DArTseq

De acordo com as informações disponibilizadas pela empresa Diversity Arrays Technology Pty. Ltd. (www.diversityarrays.com), a metodologia DArT-seq pode ser aperfeiçoada visando obter uma densidade diferenciada de marcadores, conforme pode ser visto em seguida.

DArTseq - Análise de Metilação - Enquanto o DArTseq “regular” é capaz de detectar a variação de metilação entre os marcadores SilicoDArT, também foi desenvolvido uma análise de metilação dedicada usando a plataforma DArTseq. Neste caso, foi criado dois métodos de redução de complexidade para cada amostra. Ambos os métodos usam a mesma enzima de restrição “corte raro”, enquanto duas enzimas de restrição isosquisômero, diferindo na sensibilidade à metilação da citosina, são usadas como enzimas de “corte frequente”. A comparação da composição da sequência das duas representações resultantes (bibliotecas) revela claramente diferenças no padrão de metilação através do genoma.

Tecnologias de menor densidade

DARtseqLD - Embora a maioria das aplicações do DARtseq seja direcionada para a análise do “genoma completo” e altas densidades de marcadores, há uma demanda crescente por ensaios de menor densidade e menor custo. O DARtseqLD é uma das soluções para essas necessidades. Ao selecionar aleatoriamente um subconjunto de fragmentos de um DARtseq “normal”, o método geralmente produz uma representação de ordem de grandeza menor e um número correspondentemente menor de marcadores. Na maioria dos organismos, este ensaio de baixa densidade (LD) está representando milhares de marcadores, sendo altamente apropriado para aplicações como Seleção Genômica, quando materiais com alto desequilíbrio de ligação são analisados.

DARtcap - DARtcap é usado em aplicações similares como DARtseqLD, mas aplica uma etapa seletiva após a redução de complexidade para genotipar marcadores específicos das representações DARtseq, pela utilização de “sondas de captura” de ácido nucléico que se ligam a fragmentos de restrição nas representações contendo os marcadores DARtseq específicos. Os fragmentos de restrição são altamente enriquecidos nesta etapa de captura e a maioria das sequências obtidas a partir do sequenciamento dos fragmentos capturados representam os marcadores almejados. O DARtcap é flexível em termos do número de marcadores que podem ser selecionados, mas na maioria dos casos, foi atingido de algumas centenas a alguns milhares de marcadores. DARtcap é particularmente útil em poliploides, uma vez que a etapa inicial de redução da complexidade (construção da biblioteca DARtseq) antes da etapa de captura selecionaria apenas uma das sequências homólogas na maioria dos loci. Esta característica permite uma genotipagem específica do sub genoma altamente eficaz e a obtenção de SNPs co-dominantes, mesmo em espécies poliploides, com pouca ou nenhuma informação sobre a sequência do genoma.

DARtag - O método DARtag tem como alvo um número semelhante de marcadores como DARtcap (muitas centenas a milhares), mas não está restrito a marcadores identificados pela plataforma DARtseq. Qualquer SNP (ou um pequeno indel) pode ser direcionado usando DARtag se houver alguma sequência genômica disponível em torno da variante base/indel. Na primeira etapa do DARtag, sondas moleculares especiais selecionam as pequenas regiões-alvo contendo variantes de

sequências. Na segunda etapa, as regiões-alvo são amplificadas e, em paralelo, o barcode específico da amostra é anexado. As bibliotecas geradas dessa maneira são sequenciadas e posteriormente são processadas usando o pipeline apropriado.

DArTmp - O DArTmp é usado em aplicações que exigem um número relativamente pequeno de marcadores, mas pode efetivamente processar algumas centenas de SNPs em um único ensaio. Não há um número mínimo de marcadores necessários para o ensaio. A vantagem deste método em comparação com qualquer plataforma de ensaio de marcador único está aumentando rapidamente com o aumento dos *loci* alvos. O ensaio DArTMP é muito semelhante em termos de requisitos e do processo ao ensaio DArTag, uma vez que também visa um pequeno trecho de sequência em torno da variante de sequência de interesse. A principal diferença é o modo como a seleção da sequência alvo acontece no primeiro passo do ensaio. Em DArTMP, utiliza-se um par de iniciadores oligonucleotícos em vez de uma sonda única aplicada em DArTag. As etapas consecutivas no laboratório e na parte de análise são as mesmas para DArTMP e s desenvolvimento de testes e na síntese de oligo é pequeno, permitindo a rápida adoção desse método em diversas aplicações que requerem apenas um número modesto de marcadores.

Diferentes estudos relacionadas ao uso da metodologia DArTseq estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Aplicação da metodologia DArTseq em diferentes estudos com diferentes espécies.

| Espécie | Estudo | Descrição | Plataforma / Sequências obtidas | Referência |
|--|--|---|---|-------------------------|
| Alho (<i>Allium sativum</i>) | Diversidade genética e estrutura do Banco de Germoplasma | 417 acessos de alho coletados na Espanha; Resultados obtidos consistentes com a variedade e origem geográfica; Análises de genotipagem e diversidade genética de espécies com genoma complexo e sem referência. | Illumina (San Diego, CA, United States) 14.392 SNPs - usados nas análises. | Egea et al., 2017 |
| Arroz africano (<i>Oryza glaberrima</i>) | Diversidade genética e estrutura populacional | 2.223 acessos cultivados de <i>O. glaberrima</i> de 23 países; variação genética baixa, com estrutura populacional clara, pelos países de origem. | Illumina HiSeq 2500. De 27.560 SNPs polimórficos em cinco espécies de <i>Oryza</i> , 16.532 SNPs foram polimórficos. | Ndjiondjop et al., 2017 |
| Cafê (<i>Coffea canephora</i>) | Identificação e origem genética | Coleção de 105 indivíduos de 87 acessos de <i>C. canephora</i> . Contribuiu para a compreensão do background genético de variedades de produtores de café. | Illumina HiSeq 2000. 10.806 SNPs, após filtragem dos marcadores com mais de 10% de dados perdidos e MAF abaixo de 1%, 4.021 SNPs. | Garavito et al., 2016 |
| Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) | Caracterização genômica | 188 acessos de feijoeiro (91 variedades locais e 97 cultivares brasileiras e internacionais. DArTseq gerou um grande conjunto de SNPs, com ampla cobertura genômica. | Illumina HiSeq2000. 6.286 SNPs foram obtidos de 181 acessos | Valdisser et al., 2017 |

(Continua...)

Tabela 2. Aplicação da metodologia DArTseq em diferentes estudos com diferentes espécies (Continuação).

| Espécie | Estudo | Descrição | Plataforma / Sequências obtidas | Referência |
|---------------------------------------|---|--|--|-----------------------------|
| Gênero <i>Secale</i> | Filogenia | Acessos de 16 unidades taxonômicas do gênero <i>Secale</i> . Fornecimento de nova visão da taxonomia do gênero, relativamente jovem, sugerindo que diferentes espécies e subespécies surgiram de diferentes acessos de <i>Secale</i> sp. | Illumina Hiseq 2000. 13.842 marcadores polimórficos DArTseq™ obtidos na forma de matriz de dados binários (presença (1) / ausência (0)). | Al-Beyroutiová et al., 2016 |
| Melancia (<i>Citrullus lanatus</i>) | Mapa genético saturado e identificação de regiões genômicas | População F2 de 144 plantas derivadas do cruzamento entre a cultivar K3 XPI 189225. Desenvolvimento de mapa de ligação de alta densidade. | Illumina Hiseq2500; 4.808 SNPs identificados a partir da genotipagem. | Ren et al., 2015 |
| Melão (<i>Cucumis melo</i> L.) | GWAS e construção de Mapa Genético de Alta Resolução | 120 acessos de grupos hortícolas com distribuição mundial. Painel GWAS com a melhor representação da diversidade. Associação para firmeza dos frutos. | Illumina HiSeq 2500; Total de 13.756 SNPs foram genotipados. | Nimmakayala et al., 2016 |
| Milho (<i>Zea mays</i>) | Seleção genômica para resistência | 447 linhagens de milho; seleção genômica para a resistência a <i>Stenocarpella maydis</i> . Identificou-se grupos resistentes a <i>S. maydis</i> em acessos tropicais. | Illumina, HiSeq 2000 (USA); 23.154 marcadores Dart-seq foram obtidos. | dos Santos et al., 2016 |

(Continua...)

Tabela 2. Aplicação da metodologia DArTseq em diferentes estudos com diferentes espécies (Continuação).

| Espécie | Estudo | Descrição | Plataforma / Referência Sequências obtidas |
|------------------------------|---|--|---|
| Trigo (<i>Triticum L.</i>) | GWAS e identificação dos pontos críticos de QTL | 208 linhas subconjunto dos 15.000 acessos do banco de genes CIMMYT caracterizados quanto a tolerância ao calor e à seca; | Illumina HiSeq 2500; 53.911 marcadores; 6.211 SNPs, após remoção dos monomórficos e verificação da MAF. |

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Avanços recentes nas técnicas de NGS resultaram numa redução drástica do custo do sequenciamento. Conseqüentemente surgiram abordagens para detecção de marcadores moleculares baseando-se no sequenciamento de nova geração, que tem como vantagem, além do custo, a quantidade de dados obtidos. O sucesso de tais abordagens pode ser comprovado pela enorme quantidade de trabalhos mundialmente publicados para diversas espécies. A possibilidade de trabalhar com espécies sem informações prévias sobre o genoma ajuda a justificar sua ampla utilização.

A base deste sucesso é a redução da complexidade do genoma. Assim, espécies com genomas grandes e complexos podem ser analisados de maneira confiável; utilizando apenas uma fração deste genoma como ponto de partida. Neste sentido, a obtenção da biblioteca GBS pode resultar de diferentes estratégias a ser definida de acordo com a hipótese científica e disponibilidade de recursos; tornando esta técnica altamente flexível.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES, ao CNPq e à FAPES/VALE pelo apoio financeiro. À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) pela infraestrutura e apoio profissional

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BEYROUTIOVÁ, M., SABO, M., SLEZIAK, P., DUŠINSKÝ, R., BIRČÁK, E., HAUPTVOGEL, P., KILIAN, A. & ŠVEC, M. (2016). Evolutionary relationships in the genus *Secale* revealed by DArTseq DNA polymorphism. *Plant Systematics and Evolution*, 302(8), 1083–1091. <https://doi.org/10.1007/s00606-016-1318-2>

BALOGH, F. S., ALSALEH, A., SHAHID, M. Q., ÇIFTÇI, V., SÁENZ DE MIERA, L. E., AASIM, M., NADEEM, M. A., AKTAŞ, H., OZKAN, H. & HATIPOĞLU, R. (2017). A whole genome DArTseq and SNP analysis for genetic diversity assessment in durum wheat from central fertile crescent. *PLoS ONE*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167821>

BROOKES, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), 177–186. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X)

CHEN, J., ZAVALA, C., ORTEGA, N., PETROLI, C., FRANCO, J., BURGUEÑO, J. (2016). The development of quality control genotyping approaches: a case study using elite maize lines. *PLoS ONE*, 11(4), 1-12.

D'AGOSTINO, N., & TRIPODI, P. (2017). NGS-based genotyping, high-throughput phenotyping and genome-wide association studies laid the foundations for next-generation breeding in horticultural crops. *Diversity*, 9(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/d9030038>

DESCHAMPS, S., LLACA, V., & MAY, G. D. (2012). Genotyping-by-Sequencing in Plants. *Biology*, 1(3), 460–483. <https://doi.org/10.3390/biology1030460>

DOS SANTOS, J. P. R., PIRES, L. P. M., DE CASTRO VASCONCELLOS, R. C., PEREIRA, G. S., VON PINHO, R. G., & BALESTRE, M. (2016). Genomic selection to resistance to *Stenocarpella maydis* in maize lines using DArTseq markers. *BMC Genetics*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0392-3>

- EGEA, L. A., MÉRIDA-GARCÍA, R., KILIAN, A., HERNANDEZ, P., & DORADO, G. (2017). Assessment of genetic diversity and structure of large garlic (*Allium sativum*) germplasm bank, by diversity arrays technology “genotyping-by-sequencing” platform (DARtseq). *Frontiers in Genetics*, *8*(JUL), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00098>
- ELSHIRE, R. J., GLAUBITZ, J. C., SUN, Q., POLAND, J. A., KAWAMOTO, K., BUCKLER, E. S., & MITCHELL, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, *6*(5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>
- FU, Y. B., CHENG, B., & PETERSON, G. W. (2014). Genetic diversity analysis of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) germplasm based on genotyping by sequencing. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *61*(3), 579–594. <https://doi.org/10.1007/s10722-013-0058-1>
- GARAVITO, A., MONTAGNON, C., GUYOT, R., & BERTRAND, B. (2016). Identification by the DARtseq method of the genetic origin of the *Coffea canephora* cultivated in Vietnam and Mexico. *BMC Plant Biology*, *16*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0933-y>
- GUAJARDO, V., SOLÍS, S., SAGREDO, B., GAINZA, F., MUÑOZ, C., GASIC, K., & HINRICHSEN, P. (2015). Construction of high density sweet cherry (*Prunus avium* L.) linkage maps using microsatellite markers and SNPs detected by genotyping-by-sequencing (GBS). *PLoS ONE*, *10*(5), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127750>
- HAMON, P., GROVER, C. E., DAVIS, A. P., RAKOTOMALALA, J. J., RAHARIMALALA, N. E., ALBERT, V. A., SREENATH, H. L., STOFFELEN, P., MITCHELL, S. E., COUTURON, E., HAMON, S., KOCHKO, A. DE, CROUZILLAT, D., RIGOREAU, M., SUMIRAT, U., AKAFFOU, S. & GUYOT, R. (2017). Genotyping-by-sequencing provides the first well-resolved phylogeny for coffee (*Coffea*) and insights into the evolution of caffeine content in its species: GBS coffee phylogeny and the evolution of caffeine content. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *109*, 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.02.009>
- HAYASHI, K., HASHIMOTO, N., DAIGEN, M., & ASHIKAWA, I. (2004). Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus. *Theoretical and Applied Genetics*, *108*(7), 1212–1220. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1553-0>

ISLAM, M. S., THYSSEN, G. N., JENKINS, J. N., & FANG, D. D. (2015). Detection, Validation, and Application of Genotyping-by-Sequencing Based Single Nucleotide Polymorphisms in Upland Cotton. *The Plant Genome*, 8(1), 0. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2014.07.0034>

JACCOUD, D., PENG, K., FEINSTEIN, D., & KILIAN, A. (2001). Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research*, 29(4), 25e–25. <https://doi.org/10.1093/nar/29.4.e25>

JIANG, Z., WANG, H., MICHAL, J. J., ZHOU, X., LIU, B., WOODS, L. C. S., & FUCHS, R. A. (2016). Genome wide sampling sequencing for SNP genotyping: Methods, challenges and future development. *International Journal of Biological Sciences*, 12(1), 100–108. <https://doi.org/10.7150/ijbs.13498>

LATEEF, D. D. (2015). DNA Marker Technologies in Plants and Applications for Crop Improvements. *Journal of Biosciences and Medicines*, 3(5), 7–18. <https://doi.org/10.4236/jbm.2015.35002>

LI, X., WEI, Y., ACHARYA, A., JIANG, Q., KANG, J., & BRUMMER, E. C. (2014). A Saturated Genetic Linkage Map of Autotetraploid Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Developed Using Genotyping-by-Sequencing Is Highly Syntenous with the *Medicago truncatula* Genome. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 4(10), 1971–1979. <https://doi.org/10.1534/g3.114.012245>

NDJIONDJOP, M.-N., SEMAGN, K., GOUDA, A. C., KPEKI, S. B., DRO TIA, D., SOW, M., GOUNGOULOU, A., SIE, M., PERRIER, X., GHESQUIERE, A. & WARBURTON, M. L. (2017). Genetic Variation and Population Structure of *Oryza glaberrima* and Development of a Mini-Core Collection Using DArTseq. *Frontiers in Plant Science*, 8(October), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01748>

NIMMAKAYALA, P., LEVI, A., ABBURI, L., ABBURI, V. L., TOMASON, Y. R., SAMINATHAN, T., VAJJA, V. G., MALKARAM, S., REDDY, R., WEHNER, T. C., MITCHELL, S. E. & REDDY, U. K. (2014). Single nucleotide polymorphisms generated by genotyping by sequencing to characterize genome-wide diversity, linkage disequilibrium, and selective sweeps in cultivated watermelon. *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-767>

NIMMAKAYALA, P., TOMASON, Y. R., ABBURI, V. L., ALVARADO, A., SAMINATHAN, T., VAJJA, V. G., SALAZAR, G., PANICKER, G. K., LEVI, A., WECHTER, W. P., MCCREIGHT, J. D., KOROL, A. B., RONIN, Y., GARCIA-MAS, J. & REDDY, U. K. (2016). Genome-Wide Differentiation of Various Melon Horticultural Groups for Use in GWAS for Fruit Firmness and Construction of a

High Resolution Genetic Map. *Frontiers in Plant Science*, 7(September), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01437>

POLAND, J. A., BROWN, P. J., SORRELLS, M. E., & JANNINK, J. L. (2012). Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032253>

QIU, X., PANG, Y., YUAN, Z., XING, D., XU, J., DINGKUNH, M., LI, Z. & YE, G. (2015). Genome-wide association study of grain appearance and milling quality in a worldwide collection of Indica rice germplasm. *PLoS ONE*, 10(12), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145577>

RABBI, I. Y., HAMBLIN, M. T., KUMAR, P. L., GEDIL, M. A., IKPAN, A. S., JANNINK, J. L., & KULAKOW, P. A. (2014). High-resolution mapping of resistance to cassava mosaic geminiviruses in cassava using genotyping-by-sequencing and its implications for breeding. *Virus Research*, 186, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.028>

RAMALHO, M. A. P. DOS SANTOS, J. B., PINTO, C. A. B. P., DE SOUZA, E. A., GONÇALVES, F. M. A. & DE SOUZA, J. C. (2012). *Genética na Agropecuária UFLA* (Vol. 5). Lavras.

RASHEED, A., HAO, Y., XIA, X., KHAN, A., XU, Y., VARSHNEY, R. K., & HE, Z. (2017). Crop Breeding Chips and Genotyping Platforms: Progress, Challenges, and Perspectives. *Molecular Plant*, 10(8), 1047–1064. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.06.008>

REN, R., RAY, R., LI, P., XU, J., ZHANG, M., LIU, G., YAO, X., KILIAN, A. & YANG, X. (2015). Construction of a high-density DArTseq SNP-based genetic map and identification of genomic regions with segregation distortion in a genetic population derived from a cross between feral and cultivated-type watermelon. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(4), 1457–1470. <https://doi.org/10.1007/s00438-015-0997-7>

RUSSELL, J., HACKETT, C., HEDLEY, P., LIU, H., MILNE, L., BAYER, M., MARSHALL, D., JORGENSEN, L., GORDON, S. & BRENNAN, R. (2013). The use of genotyping by sequencing in blackcurrant (*Ribes nigrum*): Developing high-resolution linkage maps in species without reference genome sequences. *Molecular Breeding*, 33(4), 835–849. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9996-8>

SANSALONI, C. P. Desenvolvimento e aplicações de DArT (Diversity Arrays

Technology) e genotipagem por sequenciamento (Genotyping-by-Sequencing) para análise genética em *Eucalyptus*. Brasília, 2012. f (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade de Brasília, Brasília, 2012. Retrieved from http://www.repositorio.unb.br/bitstream/10482/13400/1/2012_CarolinaPaolaSansaloni.pdf

SANSALONI, C. P., PETROLI, C. D., CARLING, J., HUDSON, C. J., STEANE, D. A., MYBURG, A. A., DA SILVA JR., O. B., PAPPAS JR., G. J., KILIAN, A. & GRATTAPAGLIA, D. (2010). A high-density Diversity Arrays Technology (DArT) microarray for genome-wide genotyping in *Eucalyptus*. *Plant Methods*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-16>

SCHEBEN, A., BATLEY, J., & EDWARDS, D. (2017). Genotyping-by-sequencing approaches to characterize crop genomes: choosing the right tool for the right application. *Plant Biotechnology Journal*, 15(2), 149–161. <https://doi.org/10.1111/pbi.12645>

STETTER, M. G., & SCHMID, K. J. (2017). Analysis of phylogenetic relationships and genome size evolution of the *Amaranthus* genus using GBS indicates the ancestors of an ancient crop. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 109, 80–92. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.12.029>

SUKUMARAN, S., REYNOLDS, M. P., & SANSALONI, C. (2018). Genome-Wide Association Analyses Identify QTL Hotspots for Yield and Component Traits in Durum Wheat Grown under Yield Potential, Drought, and Heat Stress Environments. *Frontiers in Plant Science*, 9 (February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00081>

TURCHETTO-ZOLET, A. C., TURCHETTO, C., ZANELLA, C. M., PASSAIA, G. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. (T. C. Pereira, Ed.). Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181p.

VALDISSER, P. A. M. R., PEREIRA, W. J., ALMEIDA FILHO, J. E., MÜLLER, B. S. F., COELHO, G. R. C., DE MENEZES, I. P. P., VIANNA, J. P. G., ZUCCHI, M. I., LANNA, A. C., COELHO, A. S. G., DE OLIVEIRA, J. P., MORAES, A. C., BRONDANI, C. & VIANELLO, R. P. (2017). In-depth genome characterization of a Brazilian common bean core collection using DArTseq high-density SNP genotyping. *BMC Genomics*, 18(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3805-4>

VIGNAL, A., MILAN, D., SANCRISTOBAL, M., & EGGEN, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics *Alain. Genetics Selection Evolution*, 34(March 2002), 275–305. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0275-0>

doi.org/10.1051/gse:2002009

WONG, M. M. L., GUJARIA-VERMA, N., RAMSAY, L., YUAN, H. Y., CARON, C., DIAPARI, M., VANDENBERG, A., BETT, K. E. (2015). Classification and characterization of species within the genus *lens* using genotyping-by-sequencing (GBS). *PLoS ONE*, *10*(3), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122025>

YANG, W., KANG, X., YANG, Q., LIN, Y., & FANG, M. (2013). Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *4*(1), 2–7. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-2>

Capítulo 08

MECANISMOS DE AÇÃO DE AGROQUÍMICOS NO CICLO CELULAR

Thammyres de Assis Alves

Carlos Eduardo de Oliveira Roberto

Micheli Sossai Spadeto

Milene Miranda Praça-Fontes

1. INTRODUÇÃO

A agricultura é um dos pilares da economia brasileira e existe uma grande perspectiva de crescimento agrícola para os próximos anos, entre os principais fatores associados a essa expansão está o uso de fertilizantes e de agroquímicos sintéticos. Esses produtos são utilizados para alcançar boa produtividade, sendo aplicados no campo objetivando o controle de plantas competidoras com as culturas de interesse econômico, além da facilidade no controle de invasoras nas lavouras (YANG & ZHU, 2013). A utilização de tais produtos é difundida no país, sendo os herbicidas um dos agrotóxicos mais empregados no consumo interno, colocando o Brasil no ano de 2009 como o maior consumidor de agroquímicos no mundo (INCA, 2015).

Os componentes ativos mais utilizados na classe dos herbicidas no Brasil são o glifosato, o 2,4-D e a atrazina, que em conjunto totalizam 84% do uso nacional de herbicidas (OLIVEIRA, FAVARETO & ANTUNES, 2013). O uso desses compostos é restrito devido à falta de seletividade em algumas culturas. Em bactérias encontradas no solo foram descobertos genes que estão relacionados à tolerância ao 2,4-D e ao glifosato e constatada que a transferência desses genes para certas culturas desencadeou o desenvolvimento de variedades tolerantes a tais produtos (QUEIROZ & VIDAL, 2014). Dessa forma, existe uma necessidade crescente de desenvolvimento de herbicidas que apresentem novos mecanismos de ação.

O uso inadequado e indiscriminado dessas substâncias tem provocado uma

grande pressão de seleção sobre plantas invasoras e problemas com a resistência dessas plantas, aos produtos convencionais, além de problemas relacionados à contaminação de águas, solos, acarretando problemas com a flora e a fauna, diminuindo assim a biodiversidade do local e aumentando a instabilidade de ecossistemas (SILVA et al., 2012). Ainda acarreta a contaminação de alimentos, levando à intoxicações e problemas de saúde nos consumidores finais, devida sua alta toxicidade (INCA, 2015).

Uma das alternativas para diminuir o uso de agrotóxicos está na busca de produtos naturais que possam vir a substituir ou minimizar as doses de produtos de alta periculosidade nas lavouras. Nesse contexto, metabólitos secundários podem ser usados diretamente ou indiretamente como modelos na obtenção de novos herbicidas, sendo os compostos alelopáticos (aleloquímicos) os que mais se destacam (WEIR, PARK & VIVANCO, 2004). Existem compostos fenólicos naturais, como o timol, carvacrol, guaiacol, e o eugenol que apresentam potencial atividade herbicida e são utilizados como substâncias testes, com resultados superiores aos compostos convencionais. O timol e o carvacrol são compostos que apresentam atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante e fitotóxica. O guaiacol apresenta atividade antisséptica e o eugenol exerce atividades alelopáticas, que se caracterizam pela inibição da germinação de sementes em várias plantas, ou diminuição do crescimento de outras (MIRANDA et al., 2015).

Os estudos iniciais de toxicologia focavam principalmente nos efeitos desses resíduos em animais. Entretanto, os vegetais têm se mostrado sensíveis a agentes tóxicos presentes no ambiente, sendo um importante grupo de organismos utilizados como organismos teste para avaliação de riscos toxicológicos. Além disso, vegetais são organismos receptores biológicos diretos de agroquímicos utilizados no campo e diferentes culturas, favorecendo seu uso em bioensaios, pois permite análise simultânea de diferentes mecanismos de ação do agente mutagênico, sendo excelentes indicadoras da genotoxicidade e mutagenicidade de compostos (GRANT, 1994; FERNANDES et al., 2009).

No teste de fitotoxicidade a variável analisada é o crescimento radicular, pois a redução desse parâmetro pode resultar de vários mecanismos isolados ou em conjunto, como inibição da absorção de nutrientes, inibição do alongamento celular, morte celular e inibição da divisão celular (FREITAS et al., 2016). Várias

pesquisas que comparam espécies vegetais, dentre elas a *L. sativa*, em teste de toxicidade, incluindo citotoxicidade, fitotoxicidade e genotoxicidade concluíram que esta espécie, eudicotiledônea, é um modelo muito sensível, tornando-a eficaz para tais experimentos (PINHEIRO et al., 2015; SILVEIRA et al., 2017).

Nos testes de citotoxicidade é possível uma ampla exploração e elucidação dos resultados a serem obtidos, além da determinação do modo de ação da substância (ANDRADE et al., 2010; YOUNG et al., 2012; ARAGÃO et al., 2015). Permitem identificar as alterações no ciclo celular, a partir da observação de anormalidades nas fases de divisão celular, nos cromossomos ou no núcleo das células (ANDRADE et al., 2010; KLACKNICK, 2011; KUMARI et al., 2011). Já o potencial genotóxico pode ser estimado a partir da análise de genotoxicidade das substâncias, que é baseada em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), analisando os fragmentos de DNA amplificados, por meio de alterações no padrão de eletroforese, verificando se afetam ou não a ligação do primer ao DNA.

O mecanismo de ação destes compostos envolve ainda a plasticidade da parede celular, o metabolismo de ácidos nucléicos e alterações no ciclo celular das plantas. Os processos provocados pelos agroquímicos modificam a síntese de auxinas e giberilinas, promovendo divisão e alongamento celular acelerado e desordenado no desenvolvimento do indivíduo, podendo inibir a divisão celular assim como seu crescimento (SENSEMAN, 2007). Dessa forma, por meio da avaliação da toxicidade é possível exibir o potencial que um composto apresenta em promover danos ao desenvolvimento de um organismo, tornando-se necessários estudos que possibilitem um monitoramento dos mecanismos de ação desses agroquímicos (SILVA et al., 2012).

Os parâmetros avaliados para determinar o mecanismo de ação dos agroquímicos com relação às alterações no ciclo celular apresentam resposta associativa entre si, sendo assim é importante fazer uma análise prospectiva integrada dos testes toxicológicos, mutagênicos e genotóxicos. Da mesma maneira, os testes de citotoxicidade quando realizados conjuntamente aos testes de fitotoxicidade, possibilitam ampla exploração e elucidação dos resultados observados na interação do material genético dos organismos vegetais com esses agroquímicos, além da determinação do modo de ação de tais substâncias (ANDRADE et al., 2010; YOUNG et al., 2012; ARAGÃO et al., 2015).

2. TESTES MUTAGÊNICOS

2.1. Fitotoxicidade

Os efeitos provocados por substâncias tóxicas podem ser avaliados em testes de fitotoxicidade, que estão relacionados à germinação e ao crescimento radicular e aéreo de sementes/plântulas de espécies modelo cultivadas em contato com agentes tóxicos (Figura 1). A variável mais integrativa analisada nesse teste é o crescimento radicular, pois a redução desse parâmetro pode resultar de vários mecanismos isolados ou em conjunto, como inibição da absorção de nutrientes, inibição do alongamento celular, inibição da divisão celular e por fim morte celular. Esse fato é devido às raízes sofrerem o primeiro contato com poluentes ambientais presentes no solo, elas são as primeiras a demonstrarem os efeitos da substância teste (FREITAS et al., 2016).

Os ensaios de fitotoxicidade permitem avaliar também a porcentagem de germinação, o índice de velocidade de germinação, e o crescimento aéreo. Esses testes são simples, confiáveis, rápidos e baratos, além de serem efetivos na averiguação de toxicidade de substâncias inorgânicas e orgânicas (VALERIO et al., 2007).



Figura 1. Sementes de *L. sativa*, planta modelo, após 48h de exposição ao herbicida comercial Boral.

2.2. Genotoxicidade

Para avaliar os danos no DNA do organismo modelo, provocados pelas substâncias testadas, podem ser realizadas análises moleculares com o desenvolvimento de marcadores ISSR e SSR que elucidam a genotoxicidade dessas substâncias. Esse estudo se baseia na PCR para avaliação dos fragmentos de DNA amplificados, por meio de alterações no padrão de eletroforese, já que mudanças no DNA afetam a ligação do *primer* ao DNA. Desta forma, a capacidade do componente teste em causar mutações, danos e distorções na estrutura do DNA pode ser detectada, apresentando-se como uma metodologia eficiente para avaliação de agentes genotóxicos (BERNARDES et al., 2015; ALVES et al., 2018). A partir das análises dos géis é possível avaliar a estabilidade genômica, calculando a porcentagem de polimorfismo e os valores da *Genomic Template Stability* (GTS), que referem à estabilidade do genoma a partir do ganho e perda de bandas. Segundo Cenkci et al. (2010), o valor de GTS sofre redução sempre que o nível de toxicidade da molécula teste aumenta. Na tabela 1 tem-se um exemplo da ação de moléculas de carvacrol, ácido carvacrol e o 2,4-D no DNA. As duas primeiras substâncias (carvacrol e ácido carvacrol) foram avaliadas a fim de verificar seu potencial herbicida (ALVES, 2017).

Outra análise realizada para identificar a genotoxicidade é o Teste de Cometa, uma técnica rápida, simples e sensível que analisa as lesões, monitora o dano e detecta efeitos de reparo no DNA em células individuais expostas a agentes genotóxicos. Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas). Apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, uma vez que pode ser utilizado para qualquer tipo de célula (qualquer tecido em que se possa extrair células nucleadas), sendo necessário apenas um pequeno número delas e por não necessitar de células em divisão (HARTMANN et al., 2003). Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano detectável no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Para alguns autores, o tamanho da cauda é proporcional à dimensão do dano que foi causado, mas é de consenso que a simples visualização do “cometa” já significa que danos estão presentes no

DNA, podendo ser quebras de fita simples, duplas, *crosslinks*, sítios de reparo por excisão e/ou lesões álcali-lábeis (HARTMANN et al., 2003; PAVÃO et al., 2007).

Tabela 1. Número de bandas que apareceram (+) e desapareceram (-) comparadas com o controle (solvente), baseadas em 7 primers utilizados para as raízes de alface tratadas com carvacrol 3mmol L⁻¹, ácido carvacrol 3mmol L⁻¹, 2,4-D e as respectivas percentagens de GTS. Fonte: ALVES, 2017.

| Primers | Solvente | | 2.4D | | | Ácido Carvacrol | | | | Carvacrol | | | | |
|---------|----------|-----|------|----|-----|-----------------|----|----|------|-----------|----|----|-----|-------|
| | N | GTS | + | - | a | GTS | + | - | a | GTS | + | - | a | GTS |
| UBC807 | 30 | 100 | 7 | 0 | 1.4 | 95.33 | 7 | 2 | 1.8 | 94 | 6 | 1 | 1.4 | 95.33 |
| UBC808 | 34 | 100 | 5 | 0 | 1 | 97.05 | 4 | 3 | 1.4 | 95.88 | 3 | 2 | 1 | 97.05 |
| UBC809 | 32 | 100 | 10 | 1 | 2.2 | 93.12 | 9 | 3 | 2.4 | 92.5 | 1 | 1 | 0.4 | 98.75 |
| UBC810 | 35 | 100 | 8 | 1 | 1.8 | 94.85 | 1 | 5 | 1.2 | 96.57 | 1 | 1 | 0.4 | 98.85 |
| UBC814 | 30 | 100 | 2 | 0 | 0.4 | 98.66 | 3 | 0 | 0.6 | 98 | 2 | 4 | 1.2 | 96 |
| UBC834 | 23 | 100 | 13 | 8 | 4.2 | 81.73 | 17 | 3 | 4 | 82.60 | 13 | 11 | 4.8 | 79.13 |
| UBC836 | 29 | 100 | 5 | 0 | 1 | 96.55 | 6 | 1 | 1.4 | 95.17 | 8 | 1 | 1.8 | 93.79 |
| Total | 213 | 100 | 50 | 10 | 12 | 94.36 | 47 | 17 | 12.8 | 93.99 | 34 | 21 | 11 | 94.83 |

*Onde: n = número de bandas observadas nas amostras do grupo controle; a = média do número de bandas que apareceram ou desapareceram nas amostras expostas à mesma concentração.

2.3. Citotoxicidade

A citotoxicidade é utilizada para avaliar danos provocados por agentes tóxicos, em diferentes concentrações e tempo de exposição, permitindo a avaliação dos cromossomos, quanto aos seus tamanhos, formas, números, além do comportamento, durante o ciclo mitótico e/ou meiótico por meio de análises microscópicas (FERNANDES et al., 2007). Nesse tipo de estudo é possível avaliar as alterações no ciclo celular, a partir da observação de anormalidades nas fases de divisão celular, nos cromossomos ou no núcleo das células (ANDRADE et al., 2010; KLACKNICK et al., 2011). Dessa maneira, os testes de citotoxicidade quando realizados conjuntamente aos testes de fitotoxicidade, possibilitam ampla exploração e elucidação dos resultados observados, além da determinação do modo de ação da substância (ANDRADE et al., 2010; YOUNG et al., 2012; ARAGÃO et al., 2015).

3. FORMAS DE DETECTAR A CITOTOXICIDADE

Os agentes tóxicos podem causar diferentes tipos de alterações nas células e podem ser avaliadas por meio das alterações nucleares, alterações cromossômicas e índice mitótico.

3.1. Alterações Nucleares

O núcleo é envolvido por uma dupla membrana chamada envoltório nuclear e contém uma grande quantidade de poros circulares, sendo a estrutura mais proeminente dentro das células eucarióticas. Esta organela desempenha duas importantes funções: (1) controla as atividades que ocorrem na célula, determinando quais moléculas por ela serão produzidas e quando devem ser produzidas; (2) armazena o DNA, passando para as células-filhas no processo de divisão celular (MELCER & GRUENBAUM, 2006).

As alterações nucleares são mudanças morfológicas e bioquímicas que ocorrem no núcleo celular e podem ser do tipo micronúcleo, broto nuclear, célula binucleada e núcleo condensado, que serão apresentados a seguir (FERNANDES et al., 2009; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; ALVES et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

3.1.1. MICRONÚCLEO

Micronúcleos (MNs) são pequenas quantidades de DNA que surgem no citoplasma quando, durante a mitose, cromossomos inteiros/fragmentados não são incorporados dentro do núcleo da célula filha, por não possuírem um centrômero (SANTOS et al., 2018). Assim, esses fragmentos de DNA que ficam para trás são incorporados dentro de núcleos secundários, que são chamados de micronúcleos, pelo fato de serem muito menores que o núcleo principal da célula, tendo de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo e normalmente há um micronúcleo por célula (DIETZ et al., 2000; FERNANDES et al., 2009; SANTOS et al., 2018).

Em virtude do atraso na disposição dos cromossomos na parte equatorial da célula ou por problemas associados com centrômero e cinetócoros, encontram-

se cromossomos inteiros no interior dos micronúcleos. Assim, um ou mais cromossomos sofrem erros de disjunção e são eliminados do núcleo principal. Outro fato associado à produção de micronúcleos é a exclusão de cromossomos alterados na telófase (SOUTO et al., 2010). Segundo Souto et al. (2010), há quatro critérios que devem ser avaliados para a correta classificação e determinação da frequência de MNs, sendo estes:

- 1- O diâmetro do MN deve ser menor que um terço do núcleo;
- 2- O MN não pode ser refratário;
- 3- A coloração do MN não pode ser mais escura que a do núcleo;
- 4- O micronúcleo não deve tocar o núcleo.

3.1.2. NÚCLEO CONDENSADO

No núcleo condensado a cromatina apresenta-se agregada em algumas regiões do núcleo, mas, ao mesmo tempo, é perdida em outras; possui um padrão nuclear estriado, sendo um indicativo de apoptose. A apoptose é uma forma de morte celular geneticamente programada com a função principal de manter a homeostase do tecido e para eliminar células com alterações no DNA que poderiam iniciar uma transformação maligna (SILVA et al., 2017). Esta variável pode crescer como resultado do aumento do dano assim como a inibição da síntese de DNA (KORDALI et al., 2008). Andrade-Vieira et al. (2011 e 2012) explicam que, em termos citológicos, a morte celular pode ser caracterizada pela presença de núcleo condensado.

3.1.3. BROTO

Os brotos são originados por cromossomos atrasados que são envolvidos pelo envoltório nuclear antes de serem incorporados aos cromossomos localizados no polo. Além disso, pode ser uma consequência da poliploidização, que é originada da amplificação do material genético, que são eliminados do núcleo e ficam ligados ao envoltório nuclear. Esta alteração nuclear não constitui uma anormalidade permanente, pelo fato do envoltório nuclear poder se reconstituir e englobar o broto (FERNANDES et al., 2009; SILVEIRA et al., 2017).

3.1.4. CÉLULA BINUCLEADA

As células binucleadas são células com dois núcleos principais, de intensidade e tamanho semelhantes; usualmente os núcleos apresentam-se muito próximos. Acredita-se ser originada de falha na citocinese durante o processo de replicação celular que resultam na formação de células poliploides (KANAGARAJ et al., 2017).

3.2. Alterações Cromossômicas

Os testes microscópicos possibilitam estudos da estrutura dos cromossomos e do seu desenvolvimento em diversas fases da divisão celular, permitindo verificar anormalidades na divisão, ou anormalidades/alterações cromossômicas (ARAGÃO et al., 2015; BERNARDES et al., 2015).

A área que atua nestes testes microscópicos é a citogenética, que possibilita a análise dos cromossomos, bem como, a visualização do seu tamanho, formas, número e comportamento durante a meiose e a mitose (ARAGÃO et al., 2015; BERNARDES et al., 2015).

Testes de alterações cromossômicas são utilizados para estimar o tóxico e os mecanismos de ação do agente tóxico, o qual pode ser clastogênico e/ou aneugênico. As alterações podem ter como consequência a formação de células poliploides e a eliminação do material genético, resultando em anomalias (BERNARDES et al., 2015). Substâncias clastogênicas induzem quebras no cromossomo, enquanto as aneugênicas inativam a estrutura celular como o aparato do fuso ou a inativação da região centromérica (SILVEIRA et al. 2017).

3.2.1. ALTERAÇÕES CLASTOGÊNICAS

As alterações clastogênicas (ACs) estão relacionadas à deformações na cromatina/DNA, gerando assim uma anomalia no cromossomo. As ACs que caracterizam a clastogenicidade são ponte e fragmentação cromossômica:

3.2.1.1 Ponte

A ponte é uma alteração clastogênicas que advém da quebra de uma extremidade do cromossomo. Com a ausência da região telomérica perde-se a estabilidade do cromossomo e este se junta a outro, assim o cromossomo se encontra dicêntrico, e durante a segregação este é puxado, formando uma ponte entre os polos (SANTOS et al., 2018).

Esta junção ocorre nas cromátides irmãs, por meio das extremidades de cada cromátide, a qual decorre da quebra de seus telômeros, seguidos então da fusão de cada extremidade quebrada, gerando o ciclo conhecido como, quebra-fusão-quebra (SILVEIRA et al., 2017).

Os cromossomos aderentes podem determinar à formação de pontes, uma vez que esse tipo de cromossomo tende a permanecer unidos, e se forem separados, causam quebras cromossômicas. Estas pontes podem ser múltiplas e persistir até a telófase (SANTOS et al., 2018).

3.2.1.2 Fragmento

Os fragmentos cromossômicos também chamados por quebra cromossômica é uma alteração derivada da interação do composto químico com a cromatina/DNA (FERNANDES et al., 2009; ARAGÃO et al., 2015). Esses fragmentos formados são acêntricos, pois as quebras ocorrem em regiões teloméricas podendo conduzir à formação de pontes cromossômicas, impedindo assim a ligação das fibras do fuso ao cromossomo, durante o ciclo celular, já que os microtúbulos se ligam diretamente aos centrômeros (FERNANDES et al., 2009; ARAGÃO et al., 2015; SILVEIRA et al., 2017).

3.2.2. ALTERAÇÕES ANEUGÊNICAS

Os agentes indutores das ACs também podem ser classificados, de acordo com seu mecanismo de ação, como aneugênicos (ALVES et al., 2018). Os agentes tóxicos que apresentam mecanismo de ação aneugênico promovem alterações caracterizadas por aneuploidias.

A aneuploidia é compreendida por alterações no número de cromossomos presentes nas células (TERMINI & VILLA, 2008). Dessa forma, agentes aneugênicos promovem instabilidade genômica, dando-lhes a capacidade de induzir alterações celulares, as quais podem ser precursoras de mutações (FERNANDES et al., 2009).

As alterações aneugênicas são decorrentes do mal funcionamento na maquinaria de formação do fuso mitótico, podendo ser devido à interrupção na polimerização do fuso mitótico durante a metáfase, ou na despolimerização dos microtúbulos durante a anáfase. Esse mal funcionamento pode propiciar à ligação unilateral no fuso dos cromossomos, inviabilizando, desta forma, seu deslocamento para os polos da célula (FERNANDES et al., 2009).

Assim, agentes aneugênicos são aqueles que atuam na formação do fuso mitótico, de maneira que os cromossomos não fiquem adequadamente orientados no plano equatorial da célula durante a metáfase ou apresentem falhas em seus deslocamentos para os polos da célula durante a anáfase, gerando por fim, células filhas com alterações no número cromossômico (FERNANDES, et al., 2009; BERNARDES et al., 2015). As ACs que caracterizam tal mecanismo de ação são: cromossomos perdidos, cromossomos não orientados, C-metáfases, multipolaridade, cromossomos com atraso e cromossomos aderentes (FERNANDES et al., 2009; ARAGÃO et al., 2017; SILVEIRA et al., 2017; ALVES et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

3.2.2.1 Perdido / Não orientado

Ambas as alterações são provenientes do mal funcionamento parcial dos microtúbulos. Essas alterações são formadas por “erros” na polimerização das fibras do fuso mitótico, ou seja, na incorporação de unidades de tubulina ao microtúbulo, fazendo com que o cromossomo não seja alinhado durante a divisão mitótica (SANTOS et al., 2018).

Quando tal alteração faz com que o cromossomo não seja alinhado na placa equatorial da célula durante a metáfase, dá-se o nome de cromossomo não orientado. Quando essa má incorporação de tubulinas promove o não deslocamento dos cromossomos na anáfase e telófase, dá-se o nome de cromossomo perdido

(Figura 2g) (SILVEIRA et al., 2017; ALVES et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

As alterações também podem advir da inibição da fosforilação da serina 10 da histona H3. Essa inibição inativa as regiões pericentroméricas e inibi a sinalização para que as fibras do fuso mitótico se fixem corretamente no cromossomo, não havendo dessa forma, o alinhamento correto dos cromossomos durante o ciclo celular (FREITAS et al., 2016).

3.2.2.2 C-Metáfase

A c-metáfase é originada a partir da inativação completa do fuso mitótico (FERNANDES et al., 2009). Decorre de distúrbios na polimerização e despolimerização dos microtúbulos. Essa alteração na dinâmica de funcionamento do fuso mitótico, resulta na parada do ciclo celular na fase metáfase, a qual se caracteriza pelo alto nível de condensação cromossômico e pela presença de centrômeros definidos (FREITAS et al., 2016).

3.2.2.3 Multipolar

A multipolaridade ocorre a partir da indução de múltiplos sítios de nucleação dos microtúbulos, estrutura responsável pela bipolaridade celular durante a mitose (FERNANDES et al., 2009). Essa alteração pode estar relacionada com desequilíbrio genético, podendo ocorrer em células poliploides devido ao aumento no conteúdo de DNA (FERNANDES et al., 2009). Além disso, a multipolaridade pode decorrer de mudanças na organização e no arranjo dos microtúbulos, devido as propriedades centrossomais (FREITAS et al., 2016).

Células com múltiplos polos durante a anáfase e que apresentem inibição na citocinese apresentam uma segregação cromossômica desigual e tendem a se organizar em uma única célula poliploide e com vários núcleos (FERNANDES et al., 2009).

3.2.2.4 Atraso

O atraso na segregação cromática ocorre devido à problemas na despolimerização dos microtúbulos. Isso retarda o encurtamento do fuso,

promovendo um atraso na movimentação dos cromossomos para os polos celulares. Tal alteração pode ter relação com a mudança nos níveis de Ca^{2+} citoplasmático promovida pelo agente tóxico (FERNANDES et al., 2009).

Além disso, essa AC está intimamente ligada com o broto (AN), pois cromossomos atrasados fazem com que o núcleo apresente formato irregular para englobar todo o conjunto cromossômico (FERNANDES et al., 2009).

3.2.2.5 Poliploidia

A poliploidia é observada devido a duas falhas na maquinaria do ciclo celular. A primeira forma é quando ocorre falhas na maquinaria de formação do fuso mitótico, dessa forma não ocorre a segregação cromatídica (FERNANDES et al., 2009).

Outra maneira é em consequência de ruptura do processo de citocinese, decorrentes de restrições na formação de fragmoplastos. A ausência de fragmoplastos inibe a geração de células filhas, fazendo com que as células mães se tornem poliploides (VIDAKOVIC' -CIFREK et al., 2002).

3.2.2.6 Aderente

A aderência cromossômica se caracteriza pela união dos cromossomos, sendo irreversível e podendo levar à morte celular. É uma alteração indicadora vários mecanismos de ação simultaneamente, sendo: aneugênico, clastogênico e epigenético (FREITAS et al., 2016; SILVEIRA et al., 2017; SANTOS et al., 2018). Essa alteração é indicadora de aneugenicidade por impedir a separação dos cromossomos durante a mitose, dando origem às células poliploides (SILVEIRA et al., 2017). Já o efeito clastogênico expresso por essa alteração, se relaciona com a capacidade do composto teste alterar as propriedades físico-químicas do DNA do organismo modelo. Tais alterações no DNA pode ocorrer no momento de condensação, a partir de mudanças estruturais dos cromossomos, ou durante a formação de ligações inter e intracromatídica, em que o composto pode se ligar aos grupos fosfato do DNA (FREITAS et al., 2016; SANTOS et al., 2018).

Além desses mecanismos de ação, a aderência cromossômica ainda pode

estar relacionada com alterações epigenéticas. Segundo Freitas et al. (2016), os cromossomos com aderência apresentam menor quantidade de sinais de fosforilação da serina 10 da histona 3. Além disso, os cromossomos aderentes emitem sinais difusos na célula, diferindo do padrão de sinalização de regiões pericentroméricas de cromossomos normais (FREITAS et al., 2016).

A seguir encontram-se algumas alterações nucleares e cromossômicas observadas em células meristemáticas de raízes de alface submetidas a tratamentos como substâncias tóxicas.

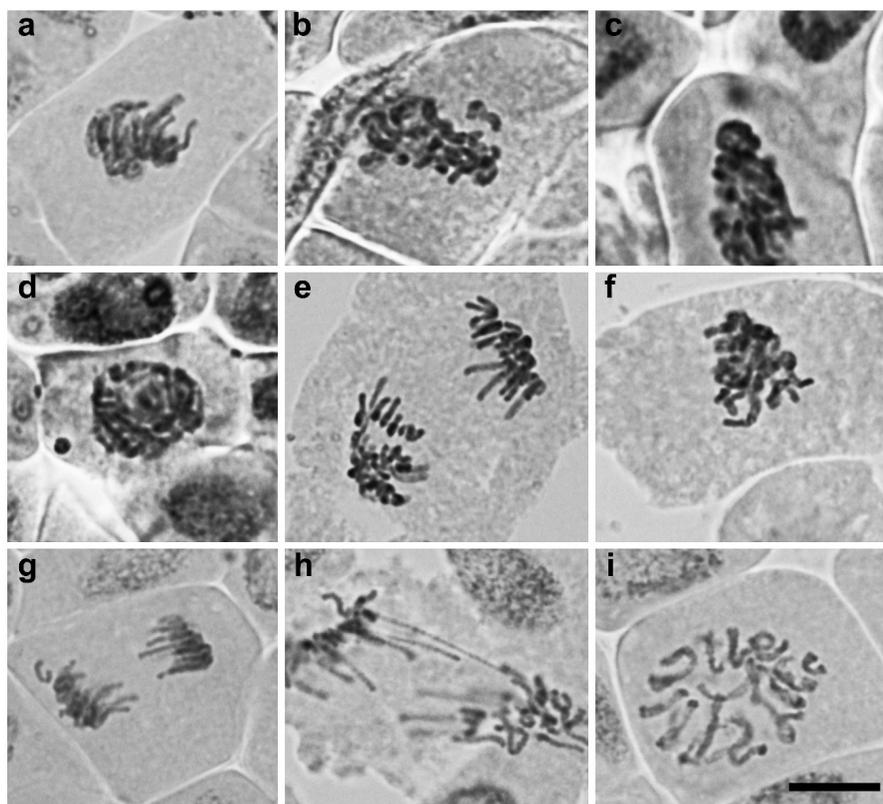


Figura 2. Alterações observadas em células meristemáticas de *L. sativa* tratadas com agroquímicos. Em que as células meristemáticas apresentam em **a**, **b**, **c** e **f** – aderência cromossômica; **b** – cromossomo não orientado, **d** – micronúcleo; **e** e **h** – multipolaridade, **g** – atraso e cromossomo perdido, **h** – ponte cromossômica; **i** – C-metáfase. Barra = 10 µm.

3.3. Índice Mitótico (IM)

O IM expressa a quantidade de células que estão em divisão, sendo calculado a partir da divisão do número total de células em mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo número total de células avaliadas (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014), de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{IM} = \frac{\text{Total de células em mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase)}}{\text{Total de células avaliadas}}$$

O IM é um importante parâmetro em avaliações de citotoxicidade de compostos (SANTOS et al., 2017). Trata-se de uma característica altamente responsiva, uma vez que, tanto o aumento quanto a diminuição em sua frequência podem representar toxicidade do composto teste (PINHEIRO et al., 2015).

A diminuição do IM representa que há uma menor quantidade de células em divisão mitótica, devido às alterações, proporcionadas pelos compostos químicos, presentes no composto teste (ARAGÃO et al., 2017). Já o aumento do IM, representa aumento no número de células em divisão mitótica. Esse aumento quando acompanhado da elevação nas porcentagens de ANs e ACs demonstra a toxicidade do composto químico. Nesse caso, as células filhas advindas de tais divisões apresentam alterações que podem provocar à morte celular ou comprometer a integridade genética das futuras gerações de células provenientes dessas células mães alteradas (PINHEIRO et al., 2015).

4. CONCLUSÃO

O estudo dos níveis de toxicidade dos agroquímicos aplicados nas plantações, os quais são consequentemente lançados ao ambiente, é importante para se ter um melhor manejo dos mesmos. Nesse sentido, os testes apresentados nesse capítulo podem ser uma alternativa para avaliar o efeito de tais substâncias nas células, por serem testes de baixo custo, por incluir plantas modelos sensíveis como a alface, sendo facilmente encontrados em casa rurais, e por possuem metabolismo semelhante ao de outros organismos.

Agradecimentos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

5. REFERÊNCIAS

ALVES, T. A.; PINHEIRO, P. F.; PRAÇA-FONTES, M. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CORRÊA, K. B.; ALVES, T. A.; DA CRUZ, F. A.; LACERDA JÚNIOR, V.; FERREIRA, A.; SOARES, T. C. B. Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxy acetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. *Industrial Crops and Products*. v. 114, p. 59-67, 2018.

ALVES, T. A. PROSPECÇÃO DA TOXICIDADE DE FENÓIS NATURAIS E DE SEUS RESPECTIVOS DERIVADOS ÁCIDOS FENOXIACÉTICOS EM BIOENSAIOS VEGETAIS. Alegre, Universidade Federal do Espírito Santo, 2017. 70p. (Dissertação Mestrado).

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Linner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 25, p. 626–631, 2010.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; GEDRAITE, L. S.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Spent Pot Liners (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v.74, p. 882–888, 2011.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. *Journal of Environmental Management*. v. 107, p. 140–146, 2012.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; BOTELHO, C.M.; PALMIERI, M.J.; LAVIOLA, B.G; PRAÇA-FONTES, M.M. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. *Anais da Academia Brasileira de Ciências (Impresso)*. v. 86, p. 373-382, 2014.

ARAGÃO, F. B.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; FERREIRA, A.; COSTA, A. V.; QUEIROZ, V. T.; PINHEIRO, P. F. Phytotoxicand cytotoxic effects of *Eucalyptus* essential oil on *Lactuca sativa* L. *Allelopathy Journal*. v. 35, p. 259-272, 2015.

ARAGÃO, F. B.; QUEIROZ, V. T.; FERREIRA, A.; COSTA, A. V.; PINHEIRO, P. F.; CARRIJO, T. T.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). *Revista de Biologia Tropical*. v. 65, p. 1-10, 2017.

BERNARDES, P. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; ARAGÃO, F. B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S. Toxicity of difenoconazole and tebuconazole in *Allium cepa*. *Water, Air and Soil Pollution (Dordrecht. Online)*. v. 226, p. 207-218, 2015.

DIETZ, J; DIEHL, A. S.; PROLLA, J. C.; FURTADO, C. D.; FURTADO, A. D. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. *Revista da Associação Médica Brasileira*. p. 207-211, 2000.

FERNANDES, T. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3), 252-259, 2007.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology Environmental Safety*. v. 72, n.6, p.1680–1686, 2009.

FREITAS, A. S.; FONTES CUNHA, I. M.; ANDRADE-VIEIRA, L.F.; TECHIO, V. H. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology Environmental Safety*. v. 124, p. 426–434, 2016.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*,v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. v.18, p. 45-51, 2003.

INCA. Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Acerca dos Agrotóxicos. 2015 Disponível em:<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf>. (Acessado em: 06 de Abril. de 2018).

KLANCNIK, K.; DROBNE, D.; VALANT, J.; DOLENC KOCE, J. Use of modified *Allium* test with nanoTiO₂. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 74, p. 85-92, 2011.

KORDALI, S.; ÇAKIR, A.; ÖZER, H.; ÇAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*. v. 99, n.18, p. 8788–8795, 2008.

FRAGA, C. M. A. S. et al. Atividade alelopática de óleos essenciais de plantas medicinais na germinação e vigor de aquênios de alface. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 36, n. 1, 2015.

OLIVEIRA, T. G., FAVARETO, A. P. A., ANTUNES, P. A., 2013. Agrotóxicos: levantamento dos mais utilizados no oeste paulista e seus efeitos como desreguladores endócrinos. *Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista*, 9(11).

PAVÃO, P. R. G. et al. Ausência de efeito genotóxico induzido por esteroides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas. *Rev. Bras. Educ. Fís. Esp. São Paulo*, Jan./Mar. v. 21, n. 1, p. 5-10, 2007.

PINHEIRO, P. F.; COSTA, A. V.; ALVES, T. A.; GALTER, I. N.; PINHEIRO, C. A.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. M. R.; PRAÇA-FONTES, M. M. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol and thymol in plant bioassays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 63, p. 8981-8990, 2015.

QUEIROZ, A. R. S.; VIDAL, R. A. O desenvolvimento de culturas tolerantes ao herbicida diclorofenoxiacetato: revisão de literatura. *Planta daninha*. Viçosa, MG. Vol. 32, n. 3, (jul./set. 2014), p. 649-654, 2014.

RAND, G. M. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment*. 2^aed., Washington: Taylor & Francis, 2000.

SANTOS, F. E.; CARVALHO, M. S. S.; SILVEIRA, G. L.; CORREA1, F. F.; CARDOSO, M. G.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; VILELA, L. R. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of hydroalcoholic extracts from *Solanum muricatum* Ait. and *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae) in the plant model *Lactuca sativa*. *Environmental Science and Pollution Research*. v. 25, p. 1-11, 2018.

SENSEMAN, S.A. (Ed.), *Herbicides*. 9a edição. Lawrence, EUA: Weed Science Society of America, p. 458, 2007.

SILVA, L. O. C. et al. Action of *Eleusine coracana* in the remediation of soils contaminated with picloram. *Planta Daninha*, v. 30, n. 3, p. 627-632, 2012.

SILVA, R. C.; NERIS, M. A.; LOPES, M. A.; CERQUEIRA, E. M. M.; MEIRELES, J. R. C. Danos cromossômicos e alterações nucleares em células esfoliadas do epitélio gengival de indivíduos com periodontite crônica moderada. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. v. 16, n. 1, p. 19-24, 2017.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B.; PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIERIA, L. F. Toxic effect so fenvironmental pollutants: comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. *Chemosphere*. v. 178, p. 359–367, 2017.

SOUTO, R.; BORGES, F. R.; CUNHA, D. M. C.; CRUZ, D. VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; CRUZ, A. D. Ferramenta Qualitativa o Teste de Micronúcleo como de Dano Genético: Aspectos Citotécnicos. *Estudos, Goiânia*. v. 37, p. 297-307, 2010.

WEIR, T. L.; PARK, S.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Currentopinion in plantbiology*, v. 7, n. 4, p. 472-479, 2004.

TERMINI, L.; VILLA, L. L. Biomarcadores na triagem do câncer do colo uterino. *DST-Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*. v. 20, n. 2, p. 125-131, 2008.

VALERIO, M. E.; GARCIA, J. F.; PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Science Total Environment*. v. 378, p. 63–66, 2007.

VIDAKOVIC'-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPERS, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. *Environmental Contamination and Toxicology*. v. 43, p. 284–291, 2002.

YANG, D. T.; ZHU, X. Modernization of agriculture and long-term growth. *Journal of Monetary Economics*, v. 60, n. 3, p. 367-382, 2013.

YOUNG, B. J.; RIERA, N. I.; BEILY, M. E.; BRES, P. A.; CRESPO, D. C.; RONCO, A. E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and environmental safety*. v. 76, p. 182-186, 2012.

MELHORAMENTO GENÉTICO PARTICIPATIVO

Carla Cristina Gonçalves Rosado
Liliana Aparecida Ribeiro Martins
Lucimara Cruz de Souza
Taís Cristina Bastos Soares

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento de plantas visa à obtenção de genótipos que atendam ao interesse do homem no que tange às características agrônômicas e à adaptação em diferentes condições edafoclimáticas das de sua origem. Assim, buscam-se plantas que apresentem alta produtividade, resistência à pragas e doenças, aumento de qualidades como teor de fibras, porcentagem de proteínas, aparência, e em algumas vezes, cultivares que sejam propensas à mecanização. Neste contexto, vários trabalhos envolvendo aspectos fisiológicos e bioquímicos de interesse foram e ainda estão sendo desenvolvidos. Estes estudos levaram ao desenvolvimento de cultivares em novas fronteiras agrícolas com diferentes latitudes e diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos que as culturas poderiam enfrentar.

O melhoramento genético acontece desde os primórdios da humanidade com a domesticação de muitas culturas. Essas primeiras populações selecionadas eram chamadas de crioulas e foram a base para o desenvolvimento das cultivares atuais. Esta domesticação já permitia a seleção de espécies de plantas com características desejáveis com base na diversidade genética das culturas, como plantas vigorosas e mais produtivas para o plantio.

No melhoramento convencional prioriza-se as variedades modernas, com alta adaptabilidade e uniformes, onde os estresses ambientais são minimizados. Entretanto, as seleções ocorrem em alguns centros de pesquisa, longe da realidade dos pequenos produtores rurais. Na maioria das vezes, esses produtores não tem acesso a essas variedades.

O melhoramento genético participativo (MGP) surge como alternativa

para pequenos produtores desenvolverem variedades adaptadas às condições edafoclimáticas e sociais das comunidades. O MGP começou a ser delineado nos anos 80, como um manejo da diversidade genética das culturas, levando em consideração os conhecimentos, experiências e preferências dos agricultores (MACHADO et al., 2002), e visando a construção de processos de cultivo mais sustentáveis. A importância da diversidade genética para o melhoramento reside no fato de que cruzamentos envolvendo genitores geneticamente divergentes são mais apropriados para produzir alto efeito heterótico e maior variabilidade genética das populações segregantes (CRUZ, 1990).

No MGP o trabalho é desenvolvido em grupos de produtores rurais, com uma organização descentralizada (SPERLING et al., 2001; MACHADO et al., 2002). Neste sistema de cultivo, o papel de cada produtor é bem estabelecido e o comprometimento do grupo é fundamental para o sucesso da organização. Estão entre os objetivos deste modelo de melhoramento, além da obtenção de alta produtividade das culturas, a conservação e promoção do aumento da biodiversidade, a utilização de variedades locais, a produção de sementes, dentre outros, que variam de acordo com a cultura (MACHADO et al., 2002).

Este capítulo abordará os aspectos ambientais e sociais do emprego do melhoramento genético participativo, principalmente no que tange a oportunidade para o crescimento dos pequenos produtores rurais.

2. ASPECTOS AMBIENTAIS DO MELHORAMENTO PARTICIPATIVO

As áreas produtivas da maioria das comunidades agrícolas brasileiras apresentam inúmeras limitações que afetam o desenvolvimento e a produtividade nesses ambientes (ALMEKINDERS & ELINGS, 2001). Na tentativa de contornar esses problemas, tecnologias baseadas no uso de agroquímicos e maquinários agrícolas foram intensificados a partir da década de 50, pois as técnicas rudimentares já não atendiam a produção de alimentos necessária (CHIARAVALLI & VALLADARES-PADUA, 2011).

Esse modelo tecnológico, iniciado no Brasil por volta da década de 60, ficou conhecido como Revolução Verde e veio como uma proposta de modificação das

práticas agrícolas e disseminação de sementes modificadas, visando melhoria na produtividade (SANTANA, 2005; LOWE, 2009). Nesse período, as variedades crioulas foram utilizadas no desenvolvimento de variedades modernas que eram mais produtivas e agronomicamente superiores, priorizando um modelo de pesquisa sem a participação dos agricultores e com intensa modificação do ambiente (NODARI & GUERRA, 2015).

Os pacotes tecnológicos utilizados possibilitaram um crescimento acelerado da agricultura e, a adoção de variedades modernas permitiu ganhos de produtividade em áreas favoráveis para o cultivo. Entretanto, o mesmo não foi observado para os agricultores familiares que além da falta de recursos financeiros, estavam localizados em áreas marginais, onde o cultivo é sujeito a variações ambientais complexas (ALMEKINDERS & ELINGS, 2001; CECCARELLI & GRANDO, 2007).

Além disso, esse novo padrão produtivo resultou em impactos sociais e ambientais como mecanização do trabalho, êxodo rural, contaminação dos ecossistemas, degradação dos solos, perda de diversidade genética, poluição do ar e dos recursos hídricos, fazendo com que a euforia das grandes safras fosse sendo substituída pela preocupação com a sustentabilidade da agricultura e os estresses ambientais e sociais após a Revolução Verde (ANDRADES & GANIMI, 2007).

Nessa nova perspectiva, o pensamento da sociedade moderna foi sendo direcionado para a sustentabilidade agrícola, onde a agricultura deveria ser uma atividade com menor utilização de insumos externos e energia, com alimentos de qualidade e isentos de contaminantes, com foco na preservação do equilíbrio ambiental (MACHADO, 1998).

Esse paradigma contribuiu para que surgisse a Agroecologia, ciência que visa o desenvolvimento agrícola de forma sustentável em curto, médio e longo prazo (ALTIERI, 1987). É uma ciência que está sendo construída por parcerias entre instituições (públicas e privadas) de pesquisa, ensino e comunidades rurais, valorizando a participação e organização dos agricultores locais com o objetivo de obter uma agricultura com a máxima preservação dos recursos naturais, participativa e com inclusão social e econômica (JESUS, 2005).

O melhoramento genético participativo destaca-se nesse processo, desempenhando importantes funções para a agricultura familiar desde a sua

introdução como uma modalidade de melhoramento. É um método que está vinculado à realidade do pequeno produtor e que oferece vantagens ao meio ambiente, objetivando reduzir o uso excessivo de insumos químicos e os problemas relacionados à estresses nutricionais, comuns nos solos utilizados por pequenos agricultores (MACHADO & MACHADO, 2003). Além disso, visa favorecer a ampliação, conservação da biodiversidade e a seleção de variedades locais adaptadas em diferentes regiões, minimizando os efeitos da interação genótipo x ambiente (MACHADO, 2014).

Os solos brasileiros utilizados para cultivo apresentam em sua maior parte características inadequadas para o desenvolvimento vegetal, como elevada acidez, deficiência de nitrogênio (N), fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg), além de possuir difícil acesso com relevo que impossibilita a mecanização, reduzindo a produtividade. A utilização de insumos químicos pode contribuir para atenuar alguns desses problemas, porém, além de ser uma técnica economicamente limitada para pequenos produtores, acarreta em contaminações ambientais (GUARÇONI, 2013; SOUZA et al., 2010).

As práticas agroecológicas, com enfoque participativo, buscam contornar essas limitações, reduzindo a utilização de agroquímicos para evitar a contaminação de fontes de água e a redução da qualidade do solo. Essas ações podem ser realizadas pelo uso de adubos orgânicos ou adubos minerais de baixa solubilidade, adubação verde, adoção de biofertilizantes e cobertura morta (SOUZA et al., 2010). As técnicas participativas como uma modalidade de melhoramento, podem ainda, contribuir para a aclimação das plantas em solos de baixa fertilidade, identificação e seleção de genótipos eficientes na utilização dos nutrientes e/ou adaptados à baixa fertilidade, permitindo a produção de forma mais sustentável (MACHADO & MACHADO, 2003).

Adicionalmente, o manejo da diversidade genética das culturas, em associação com pequenos agricultores, constitui uma estratégia para a valorização de variedades crioulas adaptadas em diferentes regiões e para a ampliação e conservação da biodiversidade (MACHADO et al., 2002; VIEIRA et al., 2008).

As variedades crioulas são importantes fontes de germoplasma e são essenciais para o desenvolvimento sustentável da agricultura familiar, por apresentarem boas qualidades nutricionais, elevado potencial produtivo e serem

bem adaptadas as condições locais (STELLA et al., 2006). Além disso, as variedades crioulas apresentam alta diversidade genética e permitem com que os agricultores produzam sua própria semente (NODARI & GUERRA, 2015).

A produção de sementes crioulas é uma das prioridades da Agroecologia, a utilização dessas sementes pelo produtor contribui para o resgate e a troca de conhecimento entre os agricultores, além de reduzir os custos de produção e os tornar menos dependente das grandes empresas fornecedoras das variedades híbridas (SANGALETTI, 2007).

Segundo Almekinders & Elings (2001), a base do melhoramento participativo para a valorização e seleção das variedades adaptadas aos cultivos locais é a produção e a troca de sementes entre os agricultores, para que haja difusão e manutenção das variedades. Entretanto, é fundamental que as estratégias utilizadas verifiquem o potencial e o grau de erosão genética dessas variedades, assim como sua adaptação ao manejo agroecológico. É importante priorizar a comunicação e conhecimento entre os agricultores para as decisões de quais materiais serão selecionados e cultivados (MACHADO, 2014).

Na seleção dos materiais no melhoramento convencional prioriza-se as variedades modernas, uniformes e com alta adaptabilidade, conduzindo os produtores a aderirem novas técnicas de manejo com a utilização de sementes transgênicas que podem conduzir à monocultura e ao uso excessivo de insumos externos, ameaçando e reduzindo a produção das variedades crioulas (MACHADO, 2014; RIBEIRO & RIBEIRO, 2017).

As práticas convencionais também buscam selecionar genótipos promissores em locais mais uniformes, onde os estresses ambientais são minimizados. As seleções ocorrem em alguns centros de pesquisa, ou seja, os indivíduos que são selecionados para um dado local são cultivados, posteriormente, em ambientes muito mais abrangentes (ANTUNES, 2011). A principal consequência dessa prática envolve a perda de produtividade, sendo que, muitos materiais podem ser descartados antes de serem testados em condições reais dos agricultores (CECCARELLI & GRANDO, 2007).

O melhoramento participativo surgiu como uma proposta para alcançar eficiência nessas seleções, viabilizando a identificação de genótipos, que possam ser cultivados em diferentes propriedades dos agricultores, assegurando sua melhor

produção nas condições reais de campo (ANTUNES, 2011; NAEIMI et al., 2017). Como a seleção das variedades pode ser realizada para diferentes localidades, essas se tornam menos vulneráveis ao ataque de pragas e doenças (ROCHA, 2014).

Tal estratégia possibilita minimizar os efeitos da interação genótipo x ambiente, assegura uma menor rejeição das cultivares, pois, o próprio agricultor tem papel crucial na seleção, possibilita maior valorização das variedades locais e, permite que melhoristas e agricultores avaliem os indivíduos de forma conjunta, sob diferentes condições biofísicas (MORRIS & BELLON, 2004; MACHADO, 2014). O melhoramento de forma participativa, portanto, contribui para a conservação do germoplasma de plantas locais, cultivadas e adaptadas aos sistemas de manejo das diferentes comunidades agrícolas (LONDRES, 2009).

3. ASPECTOS SOCIAIS NO MELHORAMENTO PARTICIPATIVO

A estratégia do melhoramento genético participativo é a inserção da diversidade genética nos sistemas locais, assim como, incentivar a seleção e intercâmbio de sementes. Para isso, apresenta como elemento fundamental a inclusão sistemática de conhecimentos, habilidades, experiências, práticas e saberes dos agricultores (MACHADO et al., 2008). Além do material em estudo ser melhor adaptado as condições edafoclimáticas, atendem também as condições sócio-econômicas do ambiente alvo, constituindo uma abordagem que tem por meta aliar bons resultados econômico e bem-estar dos agricultores (MACHADO et al., 2002).

O melhoramento de plantas convencional vem sendo utilizado no mundo todo, mostrando-se eficiente em melhorar o nível de produtividade em várias culturas, porém, tais resultados são focados em ambientes favoráveis ou naqueles modificados por irrigação ou uso de fertilizantes e controle químico. Porém, a agricultura familiar tem uma grande representatividade na produção agrícola, contribuindo em maior parte com o abastecimento alimentar no país, quando comparado aos estabelecimentos não familiares. E apesar de tal importância, esses espaços não são contemplados com os benefícios do melhoramento genético de plantas tradicional (CECCARELLI et al., 1996; MACHADO et al., 2002).

Sayago (2008) trata o melhoramento participativo como uma transição

de uma “cidadania decretada” para uma “cidadania conquistada”, onde esta modalidade de melhoramento consegue romper a lógica burocrática do processo de melhoramento, antes focado apenas no melhorista. O MGP passa a reconduzir a autonomia dos agricultores sobre as sementes utilizadas e a construção de espaços intercientíficos, entre agricultores e cientistas.

Um segundo ponto nessa transição, remete ao uso de sementes pelos produtores. No modelo convencional de melhoramento, as sementes são mercadorias, possuem restrição de uso, como por exemplo, as sementes híbridas, e são adaptadas a padrões de agricultura industrial, possuindo uniformidade genética (REIS, 2012).

Em contrapartida, no melhoramento participativo, as sementes passam de mercadoria à um modelo técnico alternativo, onde as tecnologias sociais são baseadas no fortalecimento do intercâmbio entre agricultores. Embora ainda exista a possibilidade de comercialização, neste modelo de tecnologia social, não há interesse em criar restrições para que os agricultores possam reproduzir suas próprias sementes. E ainda, ao contrário de ser baseado no aumento da uniformidade genética, as tecnologias sociais de produção de sementes têm na manutenção da diversidade um objetivo e um trunfo, pois a diversidade permite a melhor adaptação às condições ecológicas e às necessidades dos agricultores (REIS, 2012).

A pesquisa participativa tem se mostrado muito recomendável em ocasiões onde pode-se prover melhorias de condição de vida aos envolvidos, pois nesse processo o aprendizado é desenvolvido conjuntamente, assim como a interdisciplinaridade e a integração entre diferentes culturas (NOVAES & GIL, 2009).

Dentre as metas do melhoramento participativo, podemos citar o incremento da biodiversidade e conservação do germoplasma. Esta proporcionará um maior acesso das comunidades ao germoplasma e à informação e conhecimento relacionado ao mesmo. Está relacionado também com uma maior eficiência nos custos, sendo estes compartilhados entre os dois setores envolvidos (ALMEKINDERS & ELINGS, 2001; SPERLING et al., 2001).

A capacitação e o fortalecimento das comunidades e dos agricultores levam a uma mudança na relação entre os parceiros envolvidos, onde a tomada de decisão

passa ter uma participação igualitária de todos, mudando também o acesso e o controle do germoplasma e das informações referentes ao mesmo. Isso faz com que as variedades só sejam lançadas após avaliação e aceitabilidade dos produtores, trazendo também um fortalecimento do sistema de intercâmbio de sementes, expandindo e institucionalizando o melhoramento participativo (SPERLING et al., 2001).

O sucesso do MGP na produção de variedades melhoradas para agricultores marginalizados em todo o mundo estimulou propostas para utilizar esta metodologia em outros campos, como para a criação de variedades adaptadas em sistemas de agricultura orgânica (HUMPHRIES et al., 2015). Os agricultores que trabalham nesse sistema também enfrentam problemas relacionados as condições ambientais e a falta de variedades adequadas, devido ao domínio no mercado de sementes convencionais/híbridas (CHIFFOLEAU & DESCLAUX, 2006).

No MGP, as variedades passam a ser desenvolvidas em conjunto com os agricultores, e não por um criador/cientista apenas. Esta mudança de competência muda o reconhecimento de que tanto cientista, quanto agricultor, tem perspectivas igualmente valiosas, mas criticamente diferentes, durante o processo de melhoramento vegetal (CECCARELLI, 2014). Aos melhoristas, através da troca de experiência com o agricultores, são identificadas novas demandas dos usuários das cultivares. Para o agricultor, o convívio com a pesquisa possibilita o contato com tecnologias mais avançadas e conhecimentos que poderão ser usados em sua rotina no campo.

Chiffolleau & Desclaux (2006) afirmam que “o melhoramento genético participativo pode ser interpretado como uma rede sócio-técnica inovadora” que incentiva a diversidade humana e biológica, capacitando diferentes atores durante o processo. A valorização das comunidades locais e o reconhecimento da importância do seu papel para a conservação e o uso da biodiversidade devem ser, por isso, continuamente estimulados (MACHADO et al., 2008).

4. APLICAÇÃO DO MELHORAMENTO PARTICIPATIVO NO BRASIL

4.1. Mandioca

Fukuda et al. (1997), iniciou em 1993 a pesquisa participativa com mandioca no semi-árido nordestino, como forma de criação de um elo entre produtores, pesquisadores e extensionistas. Com o objetivo de conhecer as demandas dos produtores para aumentar a probabilidade de aceitação das variedades melhoradas, os autores traçaram estratégias que por muitas vezes são deixadas em segundo plano no melhoramento convencional. Características como velocidade de brotação, vigor inicial, formato da copa, facilidade de destaque das raízes e da película das raízes, cor da película e do córtex e facilidade de colheita, são imprescindíveis aos pequenos agricultores como forma de maior resistência ao período de seca e pela facilidade de beneficiamento e colheita, feitos quase que exclusivamente por mão-de-obra familiar. Baseado nesses critérios de seleção estabelecidos pelos produtores dessa região foi possível selecionar uma variedade ideal para o semi-árido nordestino. Com esse estudo piloto, os autores concluíram que definitivamente, a forma tradicional de melhoramento e difusão das variedades selecionadas não funcionam para a adoção de variedades de mandioca na maioria dos ecossistemas. O aspecto cultural tem uma forte influência neste processo incorporação de variedades melhoradas. Portanto, quando se aplica o melhoramento participativo, a tendência é mudar a percepção e conhecimento dos produtores, aumentando as chances de implantação das novas variedades selecionadas.

4.2. Milho

Para a cultura do milho, pode-se citar o lançamento da variedade Sol da Manhã, que foi formada e selecionada com o objetivo de atender aos agricultores que enfrentam problemas de baixa fertilidade do solo, sobretudo deficiências de nitrogênio (MACHADO & FERNANDES, 2001). A variedade local de milho Sol da Manhã tem uma ampla base genética. Ela foi identificada em 1985, na Comunidade Agrícola Sol da Manhã situada em Seropédica, Estado do Rio de

Janeiro. Primeiramente, essa variedade passou pelo processo de melhoramento convencional na estação experimental da Embrapa Agrobiologia. Posteriormente, a variedade foi melhorada em colaboração de um grupo de agricultores da comunidade, que realizaram seis ciclos de seleção massal. A variedade foi avaliada em 1994 em ensaios de campo para rendimento de grãos e eficiência no uso de nitrogênio e mostrou-se eficiente no uso desse nutriente, sob condições de crescimento favoráveis e desfavoráveis. A estratégia de reprodução participativa foi altamente bem sucedida para o empoderamento da comunidade de pequenos agricultores.

Outro exemplo para a cultura do milho foi o trabalho desenvolvido por Machado et al. (2006), na comunidade Fortaleza, em Muqui, Espírito Santo, que desde 1993 iniciaram os trabalhos de produção comunitária de semente de milho. Uma parceria entre a Associação de Desenvolvimento da Comunidade Fortaleza e Adjacências, de Muqui-ES, a Prefeitura Municipal e a EMBRAPA-Agrobiologia foi estabelecida para além da produção de semente, ampliar a autonomia dos pequenos agricultores e investir em tecnologias produtivas e sustentáveis, que são o foco da agroecologia. Ensaios nacionais de milho variedade foram instalados entre os anos de 2001 e 2011 e campos comunitários de melhoramento participativo foram implantados entre 2001 e 2005. O resultado desse trabalho foi o desenvolvimento da variedade Fortaleza, originária da BR 106, melhorada de forma participativa e adaptada geneticamente às condições edafoclimáticas, tecnológicas e sócio-econômicas dos pequenos agricultores da comunidade, não exigindo por isso grandes quantidades de insumos. Este trabalho de seleção do milho Fortaleza demonstra a eficiência da participação dos agricultores no processo de melhoramento de plantas e reforça a importância da parceria entre instituições (públicas e privadas) de pesquisa, ensino e comunidades rurais para obter uma agricultura com a máxima preservação dos recursos naturais, participativa e com inclusão social e econômica.

4.3. Feijão

Sena et al. (2008) conduziram 10 experimentos onde foram avaliadas nove linhagens melhoradas de feijão, juntamente com a cultivar BRSMG Talismã,

em propriedades agrícolas com tradição na cultura do feijoeiro. Nesse trabalho, procurou-se inicialmente verificar se os agricultores tinham percepção dos diferentes fenótipos em grãos de feijão, como resistência a mancha angular e aspecto dos grãos, ou seja, a cor, tamanho, brilho e formato, que são fundamentais para o melhoramento do feijoeiro. Os resultados obtidos evidenciaram que os agricultores e melhoristas têm muitos objetivos comuns com relação aos fenótipos desejáveis de uma boa linhagem de feijão e, os agricultores foram capazes de avaliar os diferentes caracteres de forma satisfatória. Foi possível selecionar a linhagem OP-S-30, que apresentou maior produtividade média, com boa tolerância à mancha angular e bom tipo de grão. Também se destacaram as linhagens OP-S-16 e OP-S-80.

Portanto, da mesma forma relatada anteriormente neste capítulo para a cultura da mandioca e do milho, Sena et al. (2008) também concluíram como vantajoso o melhoramento participativo, pois o intercâmbio entre os agricultores e melhoristas propicia uma oportunidade ímpar de se discutirem problemas comuns à cultura e dá enorme vivência aos melhoristas para o estabelecimento das prioridades futuras dos programas de melhoramento em andamento na região, e como consequência, melhora a aceitação por pequenos produtores das novas variedades melhoradas.

5. DIFICULDADES E PERSPECTIVAS

Ao longo dos anos com o melhoramento convencional, o enfoque maior foram as grandes empresas e grandes empreendedores na área agrícola, o que distanciou os pequenos produtores rurais. Estes foram prejudicados nesse processo, e hoje possuem dificuldade de aceitação dessas novas tecnologias e resistência ao uso de materiais melhorados, por falta de conhecimento. A aproximação das universidades ao meio rural foi afetada por conta desses conceitos já estabelecidos entre os agricultores rurais. Esta barreira deve ser quebrada com a tentativa de inserção dos pequenos produtores nas universidades e centros de pesquisa, por meio de dia do campo, projetos de extensão, visitas técnicas e incentivos as atividades participativas.

Por parte dos melhoristas, uma dificuldade é que esse tipo de trabalho exige um maior deslocamento dos pesquisadores para acompanhamento dos

experimentos em diferentes locais, demandando assim, tempo e maiores recursos. Os melhoristas têm que se adaptar à rotina e cultura dos agricultores e utilizar apenas os espaços cedidos por eles.

Outro ponto importante de se observar é com relação às avaliações, que devem ser de forma simplificada para não ser um ponto limitante na parceria agricultor-melhorista. Existem caracteres de difícil classificação, que mesmo seguindo guias e escalas de avaliação são de difícil interpretação e entendimento, com isso, além de gerar dados não confiáveis, os agricultores ficam desmotivados por não conseguir avaliar tal característica. Uma forma de contornar esta situação são os treinamentos oferecidos por extensionistas e até mesmo os melhoristas, nas comunidades e associações comunitárias.

O melhoramento participativo desempenha papel importante na ampliação e conservação da biodiversidade a longo prazo. Atualmente, questões relacionadas com o aquecimento global e seus impactos negativos nas mudanças ambientais são discutidas e levadas em consideração para a tomada de decisão. Portanto, quanto mais exploramos a diversidade genética das espécies, maior as chances dessas espécies se adaptarem às novas condições climáticas, ou seja, a ampliação da base genética, diminui a vulnerabilidade genética e aumenta a probabilidade de êxito dos cultivos.

Nos últimos anos nota-se uma preocupação constante de universidades, centros de pesquisa e programas e projetos de extensão em trabalhar aspectos e características técnico-científicas, bem como os impactos sociais provenientes da prática agroecológica e agricultura sustentável. A população está buscando cada dia mais uma alimentação saudável, isentos de resíduos químicos e outros contaminantes. As pessoas estão atentas e mais informadas com relação às questões ambientais e sociais, fazem questionamentos sobre a origem dos alimentos, se foi produzido de forma sustentável ou não, possuem acesso fácil à informação e propagam o conhecimento de forma fácil. O acesso a alimentação saudável é uma realidade presente no nosso dia a dia, como por exemplo, os alimentos orgânicos e as feiras agroecológicas. Portanto, as parcerias agregam valor aos produtos produzidos por agricultores familiares, valorizam o pequeno produtor rural, o que incentivam o retorno e fixação do homem no campo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por muitos anos, quando se falava em agricultura familiar tínhamos a visão de atraso e ineficiência, como também da produção apenas para atender a demanda dos pequenos produtores com “aversão” ao mercado, sempre colocando a agricultura convencional como a mais tecnológica, produtiva e eficiente. Contudo, é preciso reconhecer que a agricultura familiar vem distanciando-se desses preconceitos, pois tem buscado estabelecer estratégias de inserção no mercado de maneira sustentável. Diante da perspectiva de sustentabilidade para o espaço rural é que surgem as propostas que buscam auxiliar e tornar a agricultura familiar competitiva e atualizada em termos científicos e tecnológicos.

O melhoramento genético participativo surge vinculado à essas questões, assim como questões sociais como a segurança e autossuficiência alimentar, bem como a conservação e recuperação dos recursos naturais, com a minimização de insumos químicos e ênfase aos sistemas agroecológicos, elementos fundamentais à adoção de um modelo agrícola sustentável.

O melhoramento genético participativo deve ser uma regra e não uma exceção, pois além de tornar os agricultores co-autores do processo, tem-se uma economia de tempo e dinheiro, visto que, durante o processo de melhoramento, os agricultores vão adotando aquilo que acreditam ser bom para eles e eliminando o que lhes parece não ser interessante.

Portanto, o melhoramento participativo é um exemplo da pesquisa dirigida à demanda, o qual enfoca e envolve os produtores que tradicionalmente não foram beneficiados pelo melhoramento, devendo complementar e não substituir o melhoramento de plantas convencional. Estes objetivos culminam com uma agricultura sustentável econômica e ecologicamente.

7. AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

8. REFERÊNCIAS

- ALMEKINDERS, C. J. M.; ELINGS, A. Collaboration of farmers and breeders: Participatory crop improvement in perspective. *Euphytica*, v. 122, n. 3, p. 425-438, 2001.
- ALTIERI, M. A. *Agroecology: the scientific basis of alternative agriculture*. Boulder: Westview Press, 1987. 227 p.
- ANDRADES, T. O.; GANIMI, R. N. Revolução verde e a apropriação capitalista. *CES Revista*, v.21, p. 43-56, 2007.
- ANTUNES, I. F. Biodiversidade e melhoramento participativo: razão e prática. 2011. Disponível em: < <http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/secoes/home.asp>>. Acesso em: 16 mar. 2018.
- CECCARELLI, S. Efficiency of Plant Breeding. *Crop Sci.* v. 55, p. 87–97, 2014.
- CECCARELLI, S.; GRANDO, S. Decentralized-participatory plant breeding: an example of demand driven research. *Euphytica*, v.155, p.349-360, 2007.
- CECCARELLI, S.; GRANDO, S.; BOOTH, R.H. International breeding programs and resource-poor farmers: Crop improvement in difficult environments. In: EYZAGUIRRE, P.; IWANAGA, M. (Eds.). *Proceedings of a workshop on participatory plant breeding. Italy: International Plant Genetic Resource Institute*, 1996. p. 99- 116.
- CHIARAVALLOTI, R. M.; VALLADARES-PADUA, C. O Uso da Terra. In: CHIARAVALLOTI, R. M.; VALLADARES-PADUA, C. *Escolhas Sustentáveis*. São Paulo: Matrix Editora, 2011. p. 65-83.
- CHIFFOLEAU, Y.; DESCLAUX, D. Participatory plant breeding: the best way to breed for sustainable agriculture. *International Journal of Agricultural Sustainability*. v. 4, n. 2, p. 119–130, 2006.
- CRUZ, C. D. Aplicações de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas. Piracicaba, 1990. 188 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1990.
- FUKUDA, W. M. G.; MAGALHAES, J. A.; CAYALCANTI, J.; PINA, P. R.; TAVARES, J. A.; IGLESIAS, C.; HERNANDEZ ROMERO, L. A.; MONTENEGRO, E. E. Pesquisa participativa em melhoramento de mandioca: uma

experiência no semi-árido do Nordeste do Brasil. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMP, 1997. 46p.

GUARÇONI, A. Fatores de sucesso no manejo nutricional do cafeeiro. *Informações Agronômicas*, n. 114, p. 1-12, 2013.

HUMPHRIES, S.; ROSAS, J.C.; GOMEZ, M.; JIMENEZ, J.; SIERRA, F.; et al. Synergies at the interface of farmer-scientist partnerships: Agricultural innovation through participatory research and plant breeding in Honduras. *Agriculture & Food Security*, v.4, p. 27, 2015.

JESUS, E. L. Diferentes abordagens de agricultura não-convencional: História e Filosofia. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. *Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável*. Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2005. 21-45 p.

LONDRES, F. *Semente crioula: cuidar, multiplicar e partilhar*. Passo Fundo: ASPTA, 2009. 78 p.

LOWE, B. *Green revolution: coming together to care for creation*. Illinois: InterVarsity Press, 2009. 192 p.

MACHADO, A.T. Construção histórica do melhoramento genético de plantas: do convencional ao participativo. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 9, n. 1, p. 35-50, 2014.

MACHADO, A. T.; SANTILLI, J. ; MAGALHÃES, R. A agrobiodiversidade com enfoque agroecológico: implicações conceituais e jurídicas. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 2008. 98 p.

MACHADO, A. T.; NUNES, J. A.; MACHADO. C. T. T.; LOURENÇO-NASS, L.; BETTERO. F. C. R. Mejoramiento participativo en maíz: su contribución en el empoderamiento comunitario en el municipio de Muqui, Brasil. *Agronomía Mesoamericana*, v. 17, n. 3, p. 393-405, 2006.

MACHADO, A. T.; MACHADO, C. T. T. Melhoramento vegetal participativo com ênfase na eficiência nutricional. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 38 p.

MACHADO, A. T.; MACHADO C. T. T.; COELHO, C. H. M.; ARCANJO, J. N. Manejo da diversidade genética do milho e melhoramento participativo em comunidades agrícolas no estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 22p.

MACHADO, A. T.; FERNANDES, M. Participatory maize breeding for low nitrogen tolerance. *Euphytica*, v. 122, p. 567–573, 2001.

MACHADO, A. T. Parceria entre órgãos públicos e comunidades agrícolas. In: SOARES, A. C.; MACHADO, A. T.; SILVA, B. M.; WEID, J. M. Milho Crioulo: conservação e uso da biodiversidade. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1998. p. 79-81.

MORRIS, M. L.; BELLON, M. R. Participatory plant breeding research: opportunities and challenges for the international crop improvement system. *Euphytica*, v. 136, p. 21-35, 2004.

NAEIMI, A.; KARBASIOUN, M.; ABBASI, F. Advantages and Disadvantages of Participatory Plant Breeding (PPB) in Iran: A Study Based on Breeders' Perceptions. *International Journal of Agricultural Management and Development*, v. 7, n. 2, p. 201-209, 2017.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. A agroecologia: estratégias de pesquisa e valores. *Estudos avançados*, v. 29, n. 83, p. 183-207, 2015.

NOVAES, M. B. C. de.; GIL, A. C. A pesquisa participante como estratégia metodológica para o estudo do empreendedorismo social em administração de empresas. *Revista de Administração Mackenzie*, v. 10, n. 1, p. 134-160, 2009.

RIBEIRO, D. D.; RIBEIRO, W. M. Nossa forma de produzir: estudo de variedades crioulas em sítios camponeses de Orizona e Vianópolis - GO. *Geoambiente online*, v. 1, p. 110-126, 2017.

REIS, M. R. Tecnologia Social de Produção de Sementes e Agrobiodiversidade. Brasília, 2012. 288 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

ROCHA, J. E. S. Melhoramento vegetal e recursos genéticos forrageiros. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2014. 78 p.

SANGALETTI, V. Resgate da produção e do uso de sementes de milho crioulo. *Cadernos de Agroecologia*, v. 2, n. 1, p. 276-279, 2007.

SANTANA, D. P. A agricultura e o desafio do desenvolvimento sustentável. Sete de Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. 18 p.

SAYAGO, D. Participação: olhar para fora ou olhar para dentro? *Revista sociedad cultura y desarrollo sustentable*, v. 4, n. 3, p. 543-558, 2008.

SENA, M. R.; ABREU, A. de F. B.; RAMALHO, M. A. P.; BRUZI, A. T. Envolvimento de agricultores no processo seletivo de novas linhagens de feijoeiro. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, p. 407-412, 2008.

SOUSA, G. G.; LACERDA, C. F.; CAVALCANTE, L. F.; GUIMARÃES, F. V. A.; BEZERRA, M. E. J.; SILVA, G. L. Nutrição mineral e extração de nutrientes de planta de milho irrigada com água salina. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 14, n. 11, p. 1143- 1151, 2010.

SPERLING, L., ASHBY, J. A., SMITH, S. E., WELTZEL, E., MACGUIRE, S. A framework for analyzing participatory plant breeding approaches and results. *Euphytica*, v.122, p. 439-450, 2001.

STELLA, A.; KAGEYAMA, P.; NODARI, R. O. Políticas públicas para a agrobiodiversidade. In: STELLA, A.; KAGEYAMA, P. (Eds.). *Agrobiodiversidade e diversidade cultural*. Brasília: MMA. 2006. p. 41-56.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; SILVA, M. S. Estado da arte e estratégias do melhoramento participativo: o exemplo da mandioca no Cerrado. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. de; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. (Eds.). *Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. p. 107-124.

Capítulo 10

MELHORAMENTO VISANDO QUALIDADE NUTRICIONAL DO FEIJÃO COMUM

Cíntia Machado de Oliveira Moulin Carias
Adésio Ferreira

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um alimento básico na população de alguns países da América Latina, África e Ásia, envolvendo aproximadamente 2 milhões de produtores dispersos nos países, com 64% da produção praticada pela agricultura familiar (PETRY et al., 2015, DELFINI et al., 2017). O Brasil se destaca como maior produtor e consumidor mundial de feijão comum, com produção nacional total na safra 2017/2018 de 3,28 milhões de toneladas (CONAB, 2018).

O legume é uma fonte notável de proteínas, lisina, fibra alimentar, carboidratos complexos, vitaminas, minerais e antioxidantes, sendo utilizada como alternativa em substituição a carnes e outros alimentos proteicos (CARVALHO et al., 2012; SPARVOLI et al., 2015; CASTRO-GUERRERO et al., 2016). Alguns desses componentes regulam a glicemia, função gastrointestinal (RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2018), fornecendo benefícios para pessoas com diabetes e/ou doenças cardiovasculares e câncer (CHANDRASEKARA et al., 2016; MARQUEZI et al., 2017) (Figura 1). Além disso, sem glúten, as leguminosas podem ser usadas como ingredientes para biofortificar as preparações para a população celíaca.

A deficiência de minerais no organismo pode levar a uma série de problemas de saúde. A deficiência de Ca, por exemplo, provoca osteoporose (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2018), zinco prejudica o crescimento e o sistema imunológico (SECONDO et al., 2018; SANNA et al., 2018) e na ausência de ferro no organismo pode causar anemia. O zinco é um constituinte essencial de diversas proteínas e lipídios, presentes nas membranas celulares e em moléculas de ácidos nucleicos (JORAY et al., 2015, ELENILDA et al., 2016), e o ferro responsável pela produção da hemoglobina no sangue, no transporte do oxigênio, entre outros. A deficiência do

ferro no organismo humano posiciona-se como a segunda deficiência nutricional de maior importância no mundo, afetando vários grupos de pessoas, principalmente mulheres, jovens e crianças (MILMAN, 2011; MARTINS, 2015).

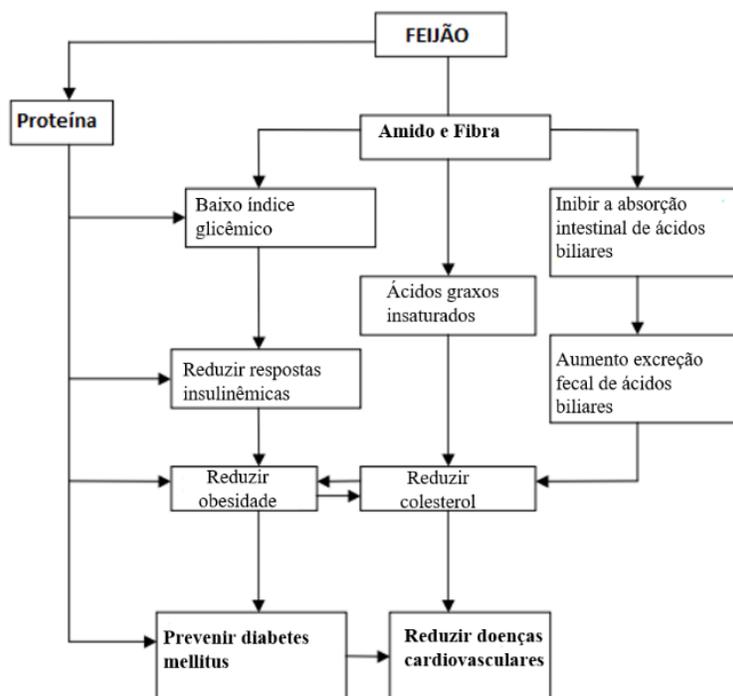


Figura 1. Mecanismos envolvendo redução de doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes mellitus por feijão (Adaptado de HAYAT et al., 2014).

Nesse sentido, o feijoeiro-comum é uma leguminosa de importância para o consumo humano direto e está presente diariamente na mesa do brasileiro, além de possuir quantidades relevantes de nutrientes nos grãos. Dessa forma, o que se busca por meio do melhoramento genético em muitas instituições, é obter cultivares com qualidade culinária, nutricional e funcional, junto com as características agrônômicas de interesse, contribuindo para sustentabilidade da cadeia produtiva.

Com base no exposto, tem-se como propósito neste capítulo, registrar, de maneira objetiva, especialmente para quem está iniciando os trabalhos na área,

o conhecimento dos aspectos gerais do feijão comum e a qualidade nutricional existente no grão, podendo auxiliar os melhoristas. Não se pretende esgotar o assunto, mas oferecer uma visão abrangente do conhecimento da cultura, sendo importante, pois acrescenta informações aos trabalhos de melhoramento genético de feijão comum.

2. FEIJÃO: ASPECTOS GERAIS

O feijão comum, pertence à família Fabacea, que compreende as leguminosas, sub-família Faboideae (Papilionoideae), gênero *Phaseolus*, tendo sido classificado por Linnaeus em 1753, como espécie *Phaseolus vulgaris* L. (SANTOS & GAVILANES, 2006; DEBOUCK, 1993). A espécie é originária das regiões de cultura inca, nas Américas Central e do Sul. A variabilidade genética está associada a dois centros de maior importância, conhecidos por pool gênico Mesoamericano (cultivares com faseolina do tipo “S”) e pool gênico Andino (cultivares com a faseolina “T”) (GEPTS & BLISS, 1985).

O gênero *Phaseolus* possui cerca de 55 espécies, das quais cinco são cultivadas: o feijão comum (*P. vulgaris*); o feijão do anual (*P. dumosus* Macfad); o feijão Ayocote (*P. coccineus* L); o feijão tepari (*P. acutifolius* A. Gray); e o feijão de lima (*P. lunatus* L) (ACOSTA-GALLEGOS et al., 2007) (Figura 2). Dentre estas cinco espécies cultivadas, *P. vulgaris* contribui com mais de 90% da produção mundial do gênero (SINGH, 2001).

Tomando por base o crescimento da planta, temos o crescimento determinado, onde apresentam o caule e os ramos laterais terminados em uma inflorescência e possuem número limitado de nós e a floração inicia-se do ápice para a base da planta (GRAHAM & RANALLI, 1997), e o indeterminado, onde o caule principal possui crescimento contínuo, com sucessão de nós e entrenós; as inflorescências são axilares e a floração inicia-se da base para o ápice da planta (JAUER et al., 2006). O crescimento do caule determina os principais tipos de planta do feijoeiro: arbustivo, prostrado e trepador. O feijão é espécie autógama, herbáceas, com folhas compostas por três folíolos ovais e as flores se reúnem em cachos e podem ser brancas, amarelas, azuis ou vermelhas, conforme a variedade do feijão (VILHORDO et al., 1996; GRAHAM & RANALLI, 1997). O fruto é denominado

vagem e as sementes apresentam inúmeras formas e cores: arredondadas, achatadas, alongadas, preta, branca, bege, entre outras (FERREIRA FILHO, 1941) (Figura 3, Figura 4).



Figura 2. Distribuição geográfica das formas silvestres das cinco espécies de *Phaseolus* domesticadas. As distribuições foram obtidas considerando todos os acessos silvestres com dados de passaporte no banco de dados do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (BITOCCHI et al., 2017).

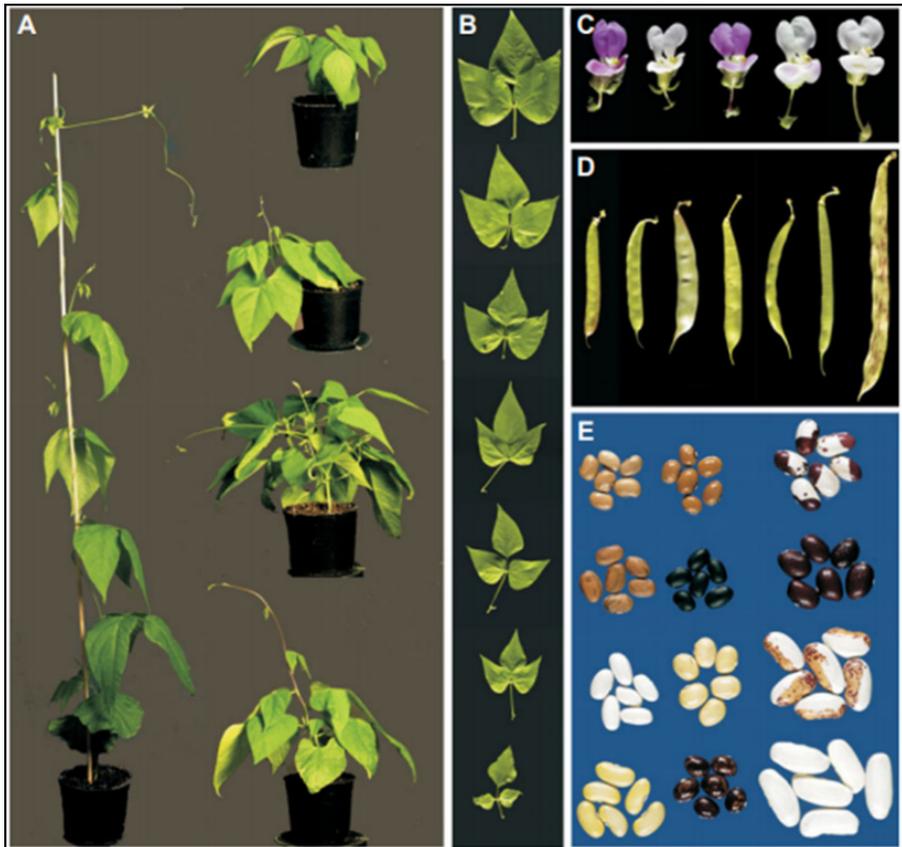


Figura 3. Variação do desenvolvimento da espécie *Phaseolus vulgaris* L. domesticadas. As variedades cultivadas de feijão diferem quantitativa ou qualitativamente para as seguintes características: hábito de crescimento, que varia de indeterminado a determinado (A); morfologia de folhas, folhetos e pecíolos (B); cor da flor e comprimento do pedúnculo (C); tamanho, forma e cor dos frutos (D); tamanho, forma e cor das sementes (E). As plantas foram cultivadas em conjunto e as amostras foram coletadas de nós comparáveis, na mesma idade; imagens em cada painel estão na mesma ampliação (ALONSO-BLANCO et al., 2005).



Figura 4. Variação tamanho, forma e cor das sementes de feijões crioulos cultivados no Espírito Santo, Brasil (Arquivo pessoal).

O ciclo vegetativo dessa leguminosa varia de 75 a 110 dias (KLUTHCOUSKI et al., 2009). Os cultivares são bastante adaptáveis às mais variadas condições de clima, solo e sistemas de cultivo. Sua comercialização é feita em supermercados, feiras livres, sacolões, mercados de bairros e muitas vezes utilizada como “moeda de troca” para os produtores (GOMES et al., 2012).

O feijoeiro comum é cultivado em três safras: primavera-verão (águas), verão-outono (seca) e outono-inverno (inverno), que contribuem para obtenção do produto ao longo do ano (VIEIRA et al., 2008). As safras são divididas de acordo com o período de colheita, classificando em: 1ª Safra - colheita de novembro a março; 2ª safra - colheita de abril a julho; e 3ª safra - colheita de agosto a outubro (EMBRAPA ARROZ e FEIJÃO, 2012; MENDONÇA, 2015). É cultivado por pequenos, médios e grandes produtores, nas mais variadas condições edafoclimáticas e em diferentes épocas e sistemas de cultivo.

No mercado brasileiro o feijão apresenta ampla variabilidade quanto a texturas, tamanho, tipo e cores do grão, variando de pretos, branco, mulatinho, manteigão, carioca, vermelho, roxo, entre outras. O consumo e a comercialização

são definidos quanto à preferência em relação as mesmas. O feijão-vermelho, o mais aceito na região da Zona da Mata mineira, tem peso médio de 100 sementes de aproximadamente 25 g, formato elíptico e cor do grão vermelho brilhante (VIEIRA et al., 2005). O feijão preto é mais popular no Rio Grande do Sul, em Santa Catarina, no sul e no leste do Paraná, no Rio de Janeiro, no sudeste de Minas Gerais e no sul do Espírito Santo (ELIAS et al., 2007). No entanto, os feijões do grupo carioca são os mais cultivados e consumidos pelos brasileiros, com característica marcante o tegumento com coloração bege e estrias marrons, hilo branco, apresentando ao redor halo de coloração creme (EMBRAPA ARROZ e FEIJÃO, 2012). Os feijões especiais (branco, vermelho, creme e amarelo) tem maior aceitação no mercado internacional.

A produção nacional estimada de feijão total na safra 2017/2018 é de 3,28 milhões de toneladas, 30,4% a mais em relação ao ano passado (CONAB, 2018). Nos últimos dez anos, houve redução de 38,7% na área plantada e o aumento na produção de 15,99%, com conseqüente aumento na produtividade média de aproximadamente 44,38% (EMBRAPA, 2016). Os três maiores produtores nacionais dessa leguminosa são Paraná (640,9 mil t), Minas Gerais (512,4 mil t) e Mato Grosso (484,5 mil t), que responderam, em média, por 52,57% da produção interna, com destaque para o Paraná que participa em torno de 21% do total nacional (CONAB, 2018).

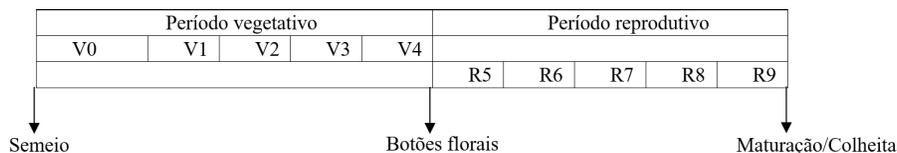
3. ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DA PLANTA

O ciclo biológico das plantas divide-se em três fases: fase vegetativa, reprodutiva e maturação/colheita. Na primeira fase inicia-se com a germinação da semente indo até a terceira folha trifoliolada (com folíolos abertos); na segunda fase, inicia-se com o aparecimento da pré- floração (após emissão do primeiro botão ou rácimo floral) e finaliza com a maturação e a terceira fase com a colheita.

Nas plantas de crescimento determinado, todas as gemas diferenciam-se em inflorescência, cessando o desenvolvimento vegetativo. Nas de crescimento indeterminado, continuam o aparecimento de estruturas vegetativas, mesmo após o fim da vegetativa, continuando a produzir simultaneamente folhas, ramos, hastes, flores e vagens. A uma importante fase no desenvolvimento das plantas, que é a fase

que refere-se a mudanças de função das gemas, de vegetativas para reprodutivas. É de curta duração, ocorre devido à inexistência na definição do momento preciso em que termina a fase vegetativa e inicia-se a fase reprodutiva. Estas fases, por sua vez, são subdivididas em dez etapas.

A fase vegetativa (V) é constituída das etapas V0, V1, V2, V3, V4 e a reprodutiva (R), das etapas R5, R6, R7, R8 e R9, conforme apresentado na Figura 5.



| |
|--|
| V0 – Germinação (iniciada a germinação da semente) |
| V1 – Emergência (50% dos cotilédones fora do solo) |
| V2 – Folhas primárias (par de folhas primárias abertos) |
| V3 – Primeira folha trifoliolada (com folíolos abertos) |
| V4 – Terceira folha trifoliolada (com folíolos abertos) |
| R5 – Pré- floração (após emissão do primeiro botão ou rácimo floral) |
| R6 – Floração (primeira flor aberta) |
| R7 – Formação de legumes (primeira vagem com a corola desprendida) |
| R8 – Enchimento de legumes (início de inchamento das vagens) |
| R9 – Maturação (primeira vagem começa a descolorir ou secar) |

Figura 5. Escala fenológica para feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (FERNANDEZ et al., 1985 apud SANTOS et al., 2015).

4. SEMENTES TRADICIONAIS

Sementes tradicionais, conhecidas também como crioulas são assim classificadas devido ao seu uso de modo habitual pelos produtores rurais, que, em sua maioria, utilizam sementes disponíveis entre os próprios familiares ou na comunidade rural. Este processo culmina com uma seleção natural de genótipos adaptáveis as condições adversas e sem um processo de melhoramento genético

tradicional (COELHO et al., 2010; KAUFMANN et al., 2018).

As sementes crioulas existentes nas propriedades familiares representam um valor genético precioso para a manutenção da biodiversidade e segurança alimentar (COPACHESKI, 2013). O cultivo desses genótipos proporciona a conservação dos recursos genéticos e existe a possibilidade desta diversidade genética ser utilizada em programas de melhoramento, a partir da caracterização para caracteres de interesse agrônômicos (COELHO et al., 2007a; PEREIRA et al., 2009; CABRAL et al., 2011), qualidade tecnológica (COELHO et al., 2007), nutricionais (PEREIRA et al., 2011), moleculares (MADAKBAS et al., 2016) e resistência a pragas e doenças (MIKLAS et al 2003; PERSEGUINI et al., 2016).

Alguns estudos comparando a diversidade molecular de variedades locais e cultivares comercial de feijão identificaram uma maior diversidade em variedades crioulas (EMYGDIO et al., 2003). Maciel et al. (2003) também encontraram maior similaridade entre cultivares derivadas do mesmo programa de melhoramento. Nutricionalmente, alguns acessos de feijões crioulos têm como característica, ser mais rico em proteínas que as variedades comerciais disponíveis no mercado. Foram reportados teores de proteína nos grãos até 35,2% em feijões crioulos, enquanto a média é de 22% (SANTALLA et al., 2004).

As sementes crioulas representam a garantia da agrobiodiversidade, sendo organismos vivos, com características fenotípicas diversas, que foram domesticadas pelas comunidades camponesas e que, portanto, integram seu conhecimento e sua prática social por gerações. É importância como fonte alimentar e renda para a agricultura familiar, como também, garantia de preservação das espécies locais (PEREIRA et al., 2009; LIMA & SANTOS, 2018).

Através do resgate e valorização de recursos genéticos crioulos, uma metodologia que tem ganhado força no contexto do melhoramento de plantas, é o Melhoramento Genético Participativo (MGP), no qual, a inclusão dos conhecimentos, habilidades, experiências, práticas e preferências dos agricultores são valorizadas. Os objetivos são mais amplos que os do melhoramento convencional, indo além do aumento de produtividade (SPERLING et al, 2001).

A conservação, aumento e manutenção da variabilidade genética; a obtenção e o uso de germoplasma adaptado a localidade de cultivo (variedades modernas ou locais, dependendo dos objetivos); a seleção e avaliação experimental de

variedades em conjunto com os produtores; o lançamento e a divulgação de novas variedades; a diversificação do sistema produtivo e a produção de sementes, constituem as diferentes metas do melhoramento participativo (ALMEKINDERS & ELLINGS, 2001).

Vale destacar, que há momentos que o sucesso do melhoramento convencional, com o lançamento de cultivares elites, não atende os pequenos agricultores, devido sua ausência ao nível de tecnificação, que as novas cultivares exigem. Neste contexto, o interesse do melhoramento genético participativo é a obtenção de um material que respondam bem a condições ambientais específicas, reduzindo assim a necessidade de uso intenso de insumos e tecnificação (LYRA et al. 2011).

Assim, o MGP valoriza as sementes crioulas e contribui para a obtenção de cultivares adaptadas a diferentes agroecossistemas, tolerante aos estresses bióticos e abióticos, resistência a pragas e doenças, com qualidade nutricional. Permitindo inverter a tendência da separação entre o agricultor e o melhorista formal, de modo que, juntando o conhecimento de ambos, seja possível desenvolver variedades novas ou melhorar as pré-existentes, mediante o estabelecimento de objetivos e metodologias em comum (MACHADO et al. 2002; SOUZA SOBRINHO et al., 2010).

5. ASPECTOS NUTRICIONAIS

A busca por alimentos que supra as carências nutricionais, com qualidade e com baixo custo, é o alvo para a sustentabilidade da cadeia produtiva. Há séculos estudos relacionados a esse tema vêm auxiliando na elaboração de novos produtos que correspondam às exigências dos produtores e dos consumidores (NKUNDABOMBI et al., 2016).

Nos grãos, sua composição química pode variar conforme a cultivar, localização geográfica, as condições edáficas (tipo de solo, pH, fertilidade, textura, matéria orgânica, entre outros) e as variações climáticas (temperatura, precipitação, fotoperíodo, radiação, entre outros) (BURATTO et al., 2009; RIBEIRO, 2010). No entanto, para indicar os genótipos mais promissores para serem incorporados em programas de melhoramento do feijoeiro, é de suma importância o estudo da

mesma.

O feijão fornece uma rica fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais Ca, Fe, Cu, Zn, K, P e Mg (CASTRO-GUERRERO et al., 2016), além de ácidos graxos insaturados (como o ácido linoleico), fibra alimentar (especialmente fibra solúvel que confere efeito hipoglicêmico), e vitaminas do complexo B (RAMÍREZ-CÁRDENAS et al., 2008; SILVA et al., 2009), tornando-se um dos alimentos mais completos na dieta alimentar humana.

Os teores em proteínas nas sementes de feijão são mais altos que em outros cereais (18–24 vs. 8–15%), com maior concentração de globulina e albumina (SPARVOLI et al., 2015). Das globulinas, destaque deve ser dado às faseolina, que representam a maior fração proteica de reserva do feijão (PARK et al., 2010; MONTOYA et al., 2010). No entanto, quanto a aminoácidos essenciais, tem-se a predominância de lisina, leucina, ácido aspártico e ácido glutâmico, e baixas concentrações de aminoácidos sulfurados, como metionina, cisteína, cistina e triptofano (LAJOLO et al., 1996; YIN et al., 2010; SPARVOLI et al., 2015). Os principais compostos químicos das sementes de feijão são ilustrados na Figura 6.

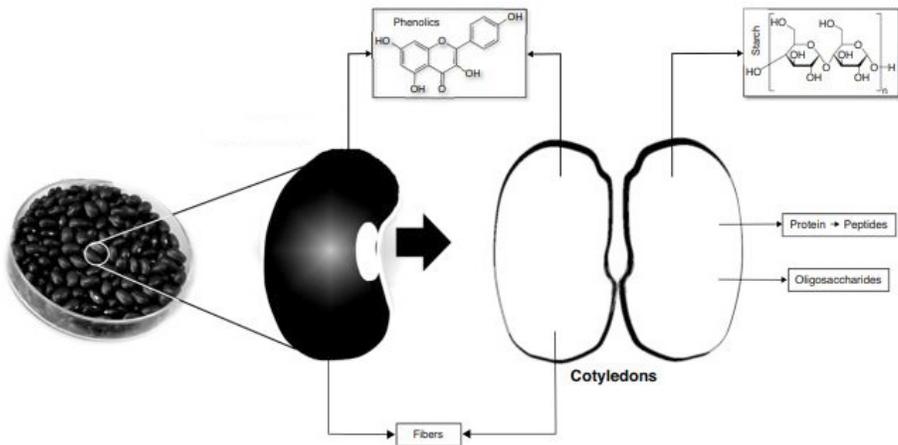


Figura 6. Compostos químicos em sementes de feijão (LOS et al., 2018).

Neste contexto, os feijões são deficientes em aminoácidos sulfurados e rico em lisina, e são consumidos juntamente com cereais, que são deficientes em lisina e relativamente ricos em aminoácidos sulfurados, resultando em um prato com boa qualidade proteica e alta digestibilidade proteica. Dessa forma, a mistura de feijão com arroz, prato mais consumido pela população brasileira, supre as necessidades de aminoácidos essenciais e tem digestibilidade de 80% (TEBA et al., 2009).

Os carboidratos representam a maior fração da composição centesimal do feijão, girando em torno de 55% a 65% do grão cru, e são constituídos por amido (45% a 60% do teor de carboidratos). Carboidratos na forma de fibra compreendem 17-23% e são compostos, basicamente, por pectina, celulose e hemicelulose (LAJOLO et al., 1996; SHIGA et al., 2009). O teor e a qualidade dos carboidratos são importantes determinantes da textura e da densidade do caldo. O amido de feijão apresenta baixo índice glicêmico por ser lentamente digerido, enquanto a fibra alimentar está associada à saúde gastrointestinal (GIANLUCA et al., 2015). As tabelas abaixo fazem referência a composição nutricional do feijão (Tabela 1 e Tabela 2).

Tabela 1. Composição mineral média de feijão cozido e seco.

| Minerais | Teor mg/g |
|-----------------|------------------|
| Ferro | 6,02 -18 |
| Cobre | 0,8 -2,74 |
| Zinco | 2,5 - 6,08 |
| Cálcio | 86 - 207,41 |
| Magnésio | 28,1- 239,47 |
| Manganês | 1,31 - 2,60 |
| Potássio | 442 -1542,5 |
| Fósforo | 295 - 542 |

Fonte: Adaptado de RAMIREZ – CÁRDENAS et al. (2008).

Tabela 2. Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível: Centesimal, minerais e vitaminas.

| Descrição | Um (%) | Energ (kcal) | (kJ) | Pro (g) | Lip (g) | Car (g) | Fi (g) | Ci (g) | Ca (mg) | Mg (mg) |
|--------------------------|---------------|---------------------|-------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| Feijão, carioca, cozido | 80,4 | 76 | 320 | 4,8 | 0,5 | 13,6 | 8,5 | 0,7 | 27 | 42 |
| Feijão, carioca, cru | 14,0 | 329 | 1377 | 20,0 | 1,3 | 61,2 | 18,4 | 3,5 | 123 | 210 |
| Feijão, fradinho, cozido | 80,0 | 78 | 326 | 5,1 | 0,6 | 13,5 | 7,5 | 0,8 | 17 | 38 |
| Feijão, fradinho, cru | 12,7 | 339 | 1419 | 20,2 | 2,4 | 61,2 | 23,6 | 3,5 | 78 | 178 |
| Feijão, jalo, cozido | 75,8 | 93 | 388 | 6,1 | 0,5 | 16,5 | 13,9 | 1,0 | 29 | 44 |
| Feijão, jalo, cru | 13,5 | 328 | 1372 | 20,1 | 0,9 | 61,5 | 30,3 | 3,9 | 98 | 170 |
| Feijão, preto, cozido | 80,2 | 77 | 322 | 4,5 | 0,5 | 14,0 | 8,4 | 0,8 | 29 | 40 |
| Feijão, preto, cru | 14,9 | 324 | 1354 | 21,3 | 1,2 | 58,8 | 21,8 | 3,8 | 111 | 188 |
| Feijão, rajado, cozido | 77,9 | 85 | 354 | 5,5 | 0,4 | 15,3 | 9,3 | 0,9 | 29 | 42 |
| Feijão, rajado, cru | 15,0 | 326 | 1363 | 17,3 | 1,2 | 62,9 | 24,0 | 3,7 | 111 | 170 |
| Feijão, rosinha, cozido | 82,6 | 68 | 284 | 4,5 | 0,5 | 11,8 | 4,8 | 0,6 | 19 | 43 |
| Feijão, rosinha, cru | 12,0 | 337 | 1410 | 20,9 | 1,3 | 62,2 | 20,6 | 3,6 | 68 | 184 |
| Feijão, roxo, cozido | 80,0 | 77 | 322 | 5,7 | 0,5 | 12,9 | 11,5 | 0,8 | 23 | 34 |
| Feijão, roxo, cru | 12,6 | 331 | 1387 | 22,2 | 1,2 | 60,0 | 33,8 | 4,0 | 120 | 162 |

Um= umidade; Ener=energia; Pro=proteína; Lip=lipídio; Car=carboidrato; Fi=fibras alimentares; Ci=cinzas; Ca= cálcio; Mg=magnésio (NEPA, 2011).

6. ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO DO FEIJÃO COMUM

O gênero *Phaseolus* possui cerca de 55 espécies todas diploides ($2n=2x=22$). Além do *P. vulgaris*, são também cultivadas outras espécies, como exemplo temos a fava (*P. lunatus* var. *lunatus*), mais adaptada ao trópico úmido, o feijão Ayocote (*P. coccineus* L.), que se adapta a climas médios – frescos e áreas úmidas, o feijão tepari (*P. acutifolius* Gray var. *latifolius*), adaptado a área quente e secas (EMBRAPA, 2007). Embora sua comercialização não seja significativa, essas espécies apresentam características de interesse aos melhoristas, como fonte de resistência a doenças e pragas, tolerância aos stress bióticos e abióticos, alto teor de elementos nutricionais, entre outros.

Vários programas de melhoramento de feijoeiro-comum têm buscado o desenvolvimento de novas cultivares com características agrônomicas de interesse, agregada a qualidade culinária, nutricional e funcional, corroborando assim, para a sustentabilidade da cadeia produtiva. Essas exigências tornam a atividade desafiante, porque não basta o genótipo ter bom desempenho na maioria das características agrônomicas, com baixa qualidade nutricional. Isso explica o quanto é oneroso e demorado o lançamento de uma cultivar que atenda às necessidades do produtor, consumidor e indústria. Mesmo assim, o melhoramento é a ciência que gera benefício social, econômico e ambiental.

O programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão obteve ganhos significativos entre 1985 e 2006, para feijão do tipo carioca (FARIA et al., 2013). O ganho estimado para produção de grãos foi de $17,3 \text{ kg ha}^{-1}$ /ano ou 0,72% ao ano. Avanços genéticos também foram obtidos na arquitetura da planta (2% ao ano) e tolerância ao acamamento (2% ao ano), ou seja, ao longo do processo de melhoramento as linhagens foram incrementadas com porte ereto o que possibilita maior tolerância ao acamamento. Foi observado também, aumento na qualidade de grão (2,4% ao ano) atendendo o padrão de mercado, por grãos cor creme, com listra castanho-claro, fundo claro, sem halos, e sem achatamento.

Visando quantificar os teores de proteína e minerais de linhagens de feijão pertencentes ao Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Lavras e verificar se existe relação entre a cor do grão e o teor de nutrientes, Silva et al. (2013) observaram variabilidade genética entre os diferentes grupos avaliados

e, também, entre as linhagens dentro de cada grupo. Em média, as linhagens de grãos pretos se destacaram para os teores de proteína, ferro e zinco. As linhagens de grãos tipo carioca, destacaram-se para manganês e magnésio. As linhagens com grãos de outras cores apresentaram maior teor de cálcio (BURATTO, 2009; SILVA et al., 2013).

A seleção assistida por marcadores (SAM) tem sido usada em programas de melhoramento de feijoeiro desde a década de 1990. As vantagens do uso de marcadores moleculares para programas de melhoramento de feijoeiro é que eles são virtualmente ilimitados em número, fácil de detectar e não afetados pelo ambiente. Os marcadores moleculares têm sido usados em várias maneiras, incluindo, estudos da origem e diversidade (GEPTS, 1998; SULZBACHER et al., 2017), domesticação (KOINANGE et al. 1996; BITOCCHI et al., 2017), controle de resistência a importantes doenças (NODARI et al., 1993; MIKLAS et al., 2003; PERSEGUINI et al., 2016) e identificação de indivíduos (ABDELMIGID, 2012).

Dentre os marcadores os SSR são amplamente utilizados para estudo de diversidade genética podendo diferenciar rapidamente indivíduos aparentados devido ao elevado grau de polimorfismo (ELLEGREN, 2004; BLAIR et al., 2012; MADAKBAS et al., 2016). No entanto, com o advento do sequenciamento de nova geração (NGS), os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) tornaram-se mais práticos para a genotipagem e descoberta de marcadores. O uso da tecnologia SNP pela SAM é muito mais rápido e menos dispendioso do que os antigos sistemas baseados em gel (HYTEN et al., 2010; CORTÉS et al., 2011; GORETTI et al., 2014; ZOU et al., 2014; BASSI et al., 2017; SANDHU et al., 2018)

No Brasil, as principais instituições geradoras de cultivares de feijão são as empresas do setor público como as Embrapas Arroz e Feijão e Clima Temperado, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), Lavras/UFLA e de Viçosa/UFV (VIEIRA et al., 2005; RAMALHO e ABREU, 2015) e a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina (EPAGRI). As cultivares desenvolvidas por essas instituições contribuíram expressivamente para o incremento na média nacional da produtividade e qualidade nutricional de grãos do feijão.

7. AGRADECIMENTOS

À FAPES, CAPES e CNPQ pela bolsa de pós-doutorado de Cíntia Machado de Oliveira Moulin Carias, de acordo com o Edital FAPES /CAPES N° 009/2014 - Bolsa de fixação de doutores. Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PPGGM) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

8. REFERENCIAS

ACOSTA-GALLEGOS, J.A. et al. Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. *Crop Science*, Madison, v.18, n.47, p.44-59, 2007.

ALMEKINDERS, C. J. M.; ELINGS, A. Collaboration of farmers and breeders: participatory crop improvement in perspective. *Euphytica*, v. 122, n. 03, p. 425 – 438, 2001.

ALONSO-BLANCO, C., MENDEZ-VIGO, B., & KOORNNEEF, M. From phenotypic to molecular polymorphisms involved in naturally occurring variation of plant development. *International Journal of Developmental Biology*, v. 49, n. 5-6, p. 717-732, 2005.

BASSI, D., BRIÑEZ, B., ROSA, J. S., OBLESSUC, P. R., ALMEIDA, C. P. D., NUCCI, S. M., ... & BLAIR, M. W. Linkage and mapping of quantitative trait loci associated with angular leaf spot and powdery mildew resistance in common beans. *Genetics and molecular biology*, v.40, n.1, p.109-122, 2017.

BLAIR, M.W.; PANTOJA, W.; MUÑOZ, L.C. First use of microsatellite markers in a large collection of cultivated and wild accessions of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). *Theor Appl Genet*. v.125, p.1137–47, 2012.

BITOCCHI, E., RAU, D., BENAZZO, A., BELLUCCI, E., GORETTI, D., BIAGETTI, E., ... & ATTENE, G. High level of nonsynonymous changes in common bean suggests that selection under domestication increased functional diversity at target traits. *Frontiers in plant science*, v 7, p. 2005, 2017.

BURATTO, J. S., CIRINO, V. M., SANTOS, M. B. S., LANGAME, D. E. M., SILVA, N. J.F., & CAVENAGHI PRÉTE, C. E. Variabilidade genética e efeito do ambiente para o teor de proteína em grãos de feijão. *Acta Scientiarum. Agronomy*,

v. 31, n. 4, 2009.

CABRAL, P. D. S.; SOARES, T. C. B.; DE PASSOS LIMA, A. B.; DE SOUZA ALEVES, D.; NUNES, J. A. Diversidade genética de acessos de feijão comum por caracteres agronômicos. *Revista Ciência Agronômica*, v. 42, n. 4, p. 898-905, 2011.

CARVALHO, M. J.; MARIANA, M. C.; ELENILDA, J. P.; MARILIA, R. N.; JOSE, L. V. C.; EDIANE, M. G. R.; SIDINE, C. F. Iron and zinc retention in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) after homecooking. *Food & Nutrition Research*, v. 56, 2012. 6p.

CASTRO-GUERRERO, N.A., ISIDRA-ARELLANO, M.C., FARIZA-COZAT, D.G., VALDES-LÓPEZ, O. Common Bean: a legume model on the rise for unraveling responses and adaptations to iron, zinc, and phosphate deficiencies. *Front. Plant Science*, v. 7, n. 600, 2016.

CHANDRASEKARA, A.; KUMAR, T. J. Roots and tuber crops as functional foods: a review on phytochemical constituents and their potential health benefits. *Int J Food Sci.*:3631647. 2016.

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

COELHO, C. M. M.; ZÍLIO, M. PIAZZOLI, D.; FARIAS, F. L.; SOUZA, C. A. de; BORTOLUZZI, R. L. da C. Influência das características morfológicas e físicas dos grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) na sua capacidade de hidratação e cocção. *Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre*, v. 5, p. 105-107, 2007a.

COELHO, C. M. M.; MOTA, M. R.; SOUZA, C. D.; MIQUELLUTI, D. J. Potencial fisiológico em sementes de cultivares de feijão crioulo (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Brasileira de Sementes*, v. 32, n. 3, p. 097-105, 2010.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2017/2018. Brasília: CONAB, 2018.

COPACHESKI, M.; BOFF, P.; BOFF, M. I. C.; PARIZOTTO, C. Revitalização de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) submetidas a tratamentos homeopáticos. *Cadernos de Agroecologia*, v. 8, n. 2, 2013.

CORTÉS, A.; CHAVARRO, C.; BLAIR, M. W. SNP marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet.* v.123, n.5, p.827–45. 2011.

DEBOUCK, D. Systematics and morphology. In: VAN CHOONHOVEN, A.; VOYSEST, O. (Eds.). Common beans: research for crop Improvement. Cali: CAB International, 1993. p. 55-118.

DELFINI, J.; MODA-CIRINO, V.; DE FÁTIMA RUAS, C.; DOS SANTOS NETO, J.; RUAS, P. M.; BURATTO, J. S.; GONÇALVES, L. S. A. Distinctness of Brazilian common bean cultivars with carioca and black grain by means of morphoagronomic and molecular descriptors. PloS one, v.12, n.11, p.188-798. 2017.

ELIAS, H. T., VIDIGAL, M. C. G., GONELA, A., & VOGT, G. A. Variabilidade genética em germoplasma tradicional de feijão-preto em Santa Catarina. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 42, n. 10, p. 1443-1449, 2007.

ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. Nature Reviews, v. 5, p. 435-445, 2004.

ELENILDA, J. P.; LUCIA, M. J.; CARVALHO, GISELA M. D.; FLÁVIO, S. N. C.; JOSÉ, L.V. C. Effect of different home-cooking methods on the bioaccessibility of zinc and iron in conventionally bred cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) consumed in Brazil, Food & Nutrition Research: v. 60, 2016.

EMBRAPA Arroz e Feijão. Origem e História do Feijão. 2007.

FERREIRA FILHO, J. C. A cultura do feijão: ABC do lavrador prático. 3ed. São Paulo: Melhoramentos. vol. 69, 1941. 32p.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Dados conjunturais da produção de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* L.) no Brasil (1985 a 2011): área, produção e rendimento), 2012. Disponível em: Acesso em: 3 abri. 2018.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Socioeconomia. 2016. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>> Acesso em: 04 abril. 2018.

GARCÍA-GONZÁLEZ, A.I.; AXTELE-SERRANO, Z.; LÓPEZ- TEROS, M.; SZLEJF, C.; MARTÍNEZ-RUIZ, A.; ROSAS-CARRASCO. Clinical interventions in osteosarcopenic obesity: nutrition, physical and psychological activity. Rev Med Inst Mex Seguro Soc, Spanish. v. 56, p.82-93. 2018.

GEPTS, P.; BLISS, F. A. F1 hybrid weakness in the common bean: Differential geographic origin suggests two gene pools in cultivated bean germplasm. Journal

of Heredity, v. 76, n. 6, p. 447-450, 1985.

GEPTS, P. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. HortScience, v. 33, p. 1124-1130, 1998.

GOMES, F. A.; LIMA, M. O.; MATTAR, E. P. L.; FERREIRA, J. B.; VALE, M. A. D. Aspectos nutritivos de feijões crioulos cultivados no vale do Juruá, Acre. Enciclopédia biosfera, v. 08, p. 85-96, 2012.

GORETTI, D.; BITOCCHI, E.; BELLUCCI, E, RODRIGUEZ, M, RAU D, GIOIA, T, ATTENE, G, MCCLEAN, P, NANNI, L, PAPA, R. Development of single nucleotide polymorphisms in *Phaseolus vulgaris* and related *Phaseolus* spp. Molec Breed. v.33, p.531-44. 2014.

GRAHAM, P. H.; & RANALLI, P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Field Crops Research, v. 53, p. 131-146, 1997.

HYTEN, D.; SONG, Q.; FICKUS, E.W.; QUIGLEY, C.V.; LIM J. S.; CHOI, I.Y.; HWANG, E. Y.; PASTOR-CORRALES, M.; CREGAN, P.B.; High-throughput SNP discovery and assay development in common bean. BMC Genomics.v.11, 475p. 2010.

HAYAT, I., AHMAD, A., MASUD, T., AHMED, A., & BASHIR, S. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. Critical reviews in food science and nutrition, v. 54, n. 5, p. 580-592, 2014.

JAUER, A.; DUTRA, L. M. C. D.; ZABOT, L.; UNRY, D.; LUDWIG, M. P.; FARIAS, J. R.; GARCIA, D. C.; LÚCIO, A. D.; FILHO, O. A. L.; PORTO, M. D. de M. Efeitos da população de plantas e de tratamento fitossanitário no rendimento de grãos do feijoeiro comum, Cultivar “TPS Nobre. Ciência Rural, v. 36, p. 1374-1379, 2006.

JORAY, M. L.; YU, T. W.; HO, E.; CLARKE, S. L.; STANGA, Z.; GEBREEGZIABHER, T.; STOECKER, B. J. Zinc supplementation reduced DNA breaks in Ethiopian women. Nutrition research, v. 35, n. 1, p. 49-55, 2015.

KAUFMANN, M. P., REINIGER, L. R. S., & WIZNIEWSKY, J. G
A CONSERVAÇÃO INTEGRADA DA AGROBIODIVERSIDADE CRIOLA. Revista Brasileira de Agroecologia, v. 13, n. 2, 2018.

KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR H. Fundamentos para uma agricultura sustentável, com ênfase na cultura do feijoeiro. Santo Antônio de Goiás, Embrapa

Arroz e Feijão, 2009. 452p.

KOINANGE, E. M.; SINGH, S. P.; GEPTS, P. Genetic control of the domestication syndrome in common bean. *Crop Science*, v. 36, n. 4, p. 1037-1045, 1996.

LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I.; MENEZES, E.W. Qualidade nutricional. In: Araújo, A. et al. *Cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Publicado por: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato – Potafos, Seção I, 1996. 23-45p.

LIMA, L. G., & DOS SANTOS, F. No semiárido de Alagoas, a resistência germina na terra: a luta territorial em defesa das sementes crioulas/In the Semi-arid of Alagoas, the resistance germinates on the land: the territorial struggle in defense of native seeds/En el Semiárido de Alagoas, la resistencia germina en la tierra: la lucha territorial en defensa de las semillas criollas. *Revista Nera*, n. 41, p. 192-217, 2018.

LYRA, D. H.; SAMPAIO, L.S.; PEREIRA, D. DE A. AMARAL, C. L. F. Conservação on farm da agrobiodiversidade de sítios familiares em Jequié, Bahia, Brasil. *Revista Ceres, Viçosa*, v. 58, n.1, p. 69-76, 2011.

LOS, F. G. B., ZIELINSKI, A. A. F., WOJECCHOWSKI, J. P., NOGUEIRA, A., & DEMIATE, I. M. Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition. *Current Opinion in Food Science*, v.19, p. 63–71, 2018.

MACHADO, A.T.; MACHADO C.T.T.; COELHO, C.H.M.; ARCANJO, J.N. Manejo da diversidade genética do milho e melhoramento participativo em comunidades agrícolas nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. 2002. 22p.

MARQUEZI, M. L., & JUNIOR, A. H. L. Estratégias de reposição hídrica: revisão e recomendações aplicadas. *Revista Paulista de Educação Física*, v. 12, n. 2, p. 219-227, 2017.

MARTINS, S. M. Estratégias de melhoramento do feijoeiro-comum para altos teores de ferro e zinco. 2015. Milman N. Anemia--still a major health problem in many parts of the world! v.90, n. 4, p. 369-77, 2015.

MADAKBAŞ, S. Y., SARIKAMIŞ, G., BAŞAK, H., KARADAVUT, U., ÖZMEN, C. Y., DAŞCI, M. G., & ÇAYAN, S. Genetic characterization of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions from Turkey with SCAR and SSR markers. *Biochemical genetics*, v. 54, n. 4, p. 495-505, 2016.

MENDONÇA, F. R. Seleção De Linhagens de Feijoeiro-Comum Com Escurecimento Lento, Tamanho Comercial e Alta Produtividade de Grãos e Arquitetura Ereta. 2015. 96f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2015.

MIKLAS, P. N.; COYNE, D. P.; GRAFTON, K. F.; MUTLU, N.; REISER, J.; LINDGREN, D. T.; SINGH, S. P. A major QTL for common bacterial blight resistance derives from the common bean great northern landrace cultivar Montana No. 5. *Euphytica*, v. 131, n. 1, p. 137-146, 2003.

MONTOYA, C.A.; LALLÈS, J.P.; BEEBE, S.; LETERME, P. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans. *Food Research International*.v 43, p. 443–9. 2010.

NEPA/UNICAMP – Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação/ Universidade de Campinas. TACO—Tabela brasileira de composição de alimentos. Campinas: UNICAMP—Universidade Estadual de Campinas, 2011.

PARK, S.J.; KIM, T.W.; BAIK, B-K. Relationship between proportion and composition of albumins, and *in vitro* protein digestibility of raw and cooked pea seeds (*Pisum sativum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 90, p. 1719-1725, 2010.

PEREIRA, T.; COELHO, C. M. M.; BOGO, A.; GUIDOLIN, A. F.; MIQUELLUTI, D. J. Diversity in common bean landraces from South Brazil. *Acta Botanica Croatica*, v. 68, p.79–92, 2009.

PEREIRA, T.; COELHO, C. M. M.; SANTOS, J. C. P.; BOGO, A.; MIQUELLUTI, D. J. Diversidade no teor de nutrientes em grãos de feijão crioulo no Estado de Santa Catarina. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v. 33, n. 3, p. 477-485, 2011.

PERSEGUINI, J. M. K. C.; OBLESSUC, P. R.; ROSA, J. R. B. F.; GOMES, K. A.; CHIORATO, A. F. CARBONEL, S. A. M.; GARCIA, A. A. F. VIANEL, R. P.; BENCHIMOL-REIS, L. L. Genome-Wide Association Studies of Anthracnose and Angular Leaf Spot Resistance in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *PLoS ONE*, v. 11, n. 3, 2016.

PETRY, N.; BOY, E, WIRTH, J.P.; HURRELL, R. F. Review: The potential of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) as a vehicle for iron biofortification. *Nutrients*. v. 7, p.1144–1173, 2015.

RAMÍREZ-CÁRDENAS, L.; LEONEL, A. J.; COSTA, N. M. B. Efeito do

processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 1, p. 200-213, 2008.

RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A. K., GAYTÁN-MARTÍNEZ, M., MORALES-SÁNCHEZ, E., & LOARCA-PIÑA, G. Functional properties and sensory value of snack bars added with common bean flour as a source of bioactive compounds. *LWT*, v. 89, p. 674-680, 2018.

RIBEIRO, N. D., CARGNELUTTI FILHO, A., POERSCH, N. L., & ROSA, D. P. Critério de seleção indireta para a produtividade de grãos em feijão. *Ciência Rural*, v. 40, n. 4, 2010.

SANNA, A., FIRINU, D., ZAVATTARI, P., VALERA, P. Zinc Status and Autoimmunity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, v. 10, n. 1, p. 68, 2018.

SANDHU, K. S., YOU, F. M., CONNER, R. L., BALASUBRAMANIAN, P. M., & HOU, A. Genetic analysis and QTL mapping of the seed hardness trait in a black common bean (*Phaseolus vulgaris*) recombinant inbred line (RIL) population. *Molecular Breeding*, v. 38, n. 3, p. 34, 2018.

SANTALLA, M. et al. Genetic diversity of Argentinean common bean and its evolution during domestication. *Euphytica*, Netherlands, v. 135, n. 1, p. 75-87, 2004.

SANTOS, J. B.; GAVILANES, M. L.; VIEIRA, R. F.; PINHEIRO, L. R. Botânica. In: CARNEIRO, J. E.; JÚNIOR, T. J. P.; BORÉM, A. (Ed.). Feijão do plantio à colheita. Viçosa: Ed. UFV, 2015. p.37-66.

SANTOS, J.B.; GAVILANES, M.L. Botânica. IN: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Ed.). Feijão. Viçosa: UFV, 2. ed. 2006. 41-66p;

SECONDO, A., BAGETTA, G., AMANTEA, D. On the Role of Store-Operated Calcium Entry in Acute and Chronic Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 11, p. 87, 2018.

SHIGA, T. M., FABI, J. P., DO NASCIMENTO, J. R. O., PETKOWICZ, C. L. D. O., VRIESMANN, L. C., LAJOLO, F. M., & CORDENUNSI, B. R. Changes in cell wall composition associated to the softening of ripening papaya: evidence of extensive solubilization of large molecular mass galactouronides. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 57, n. 15, p. 7064-7071, 2009.

SILVA, A.G.; ROCHA, L.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Alimentos e Nutrição, v.20, p. 591-598, 2009.

SILVA, M.O.; BRIGIDE, P.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Composição de cultivares de feijão comum. Brazilian Journal of Food and Nutrition, Araraquara, v.24, n.3, p. 339-346, 2013.

SINGH, S.P. Broadening the genetic base of common beans cultivars: A review. Crop Science, Madison, v.41, n.6, p.1659-1675, 2001.

SOUZA SOBRINHO F.; AUAD, A.M.; LÉDO, F.J.S. Genetic variability in *Brachiaria ruziziensis* for resistance to spittlebugs. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 10: p. 83-88, 2010.

SULZBACHER, L. J., da SILVA, V. P., ZAGO, B. W., & Lima, C. Análise da divergência genética através de caracteres agronômicos em genótipos de feijão comum. Análise, v. 38, n. 23, 2017.

SPARVOLI, F., BOLLINI, R., AND COMINELLI, E. “Nutritional value,” in *Grain Legumes*, ed A. De Ron (New York, NY: Springer Science+Business Media), p. 291–326, 2015.

SPERLING, L.; ASHBY, J. A.; SMITH, M. E.; WELTZIEN, E.; McGUIRE, S. A framework for analyzing participatory plant breeding approaches and results. Euphytica, Wageningen, v. 122, p. 439-450, 2001.

TEBA, C. S.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. Efeito dos parâmetros de extrusão sobre as propriedades de pasta de massas alimentícias pré-cozidas de arroz e feijão. Alimentos e Nutrição, Araraquara, v. 20, n. 3, p. 411-426, 2009.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P.; CARNEIRO, J. E. S. Melhoramento do Feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. 301-392p.

VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. Feijão. 2. ed. Viçosa: Editora UFV. 2008. 600p.

VILHORDO, B. W.; MIKUSINSKI, O. M. F.; BURIN, M. E.; GANDOLFI, V. H. Morfologia. In: ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; OSTE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. Cultura do feijoeiro no Brasil. Piracicaba: POTATOS, 1996. 71-99p.

YIN, S. W.; TANGA, C. H.; WENA, Q. B.; YANGA, X. Q.; YUANA, D. B. The relationships between physicochemical properties and conformational features of succinylated and acetylated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. *Food Research International*, n. 43, p. 730-738, 2010.

ZOU, X.; SHI, C. AUSTIN, R.S.; MERICO, D.; MUNHOLLAND, S.; MARSOLAIS, F.; NAVABI, A.; CROSBY, W.L.; PAULS, K.P.; YU, K.; CUI, Y. Genome-wide single nucleotide polymorphism and Insertion-Deletion discovery through next-generation sequencing of reduced representation libraries in common bean. *Mol Breeding*. v. 33, n. 4, p.769–78, 2014.

Capítulo 11

O GÊNERO *Mormodes* (ORCHIDACEAE)

Jaqueline Aparecida Gonçalves Soares

Nayara Magagnin Borges

Isane Vera Karsburg

1. INTRODUÇÃO

A família *Orchidaceae* é reconhecida no mundo científico como uma das maiores em espécies, aproximadamente 25.000, distribuídas em cerca de 700 gêneros (CHASE et al., 2015), sendo encontradas por todas as regiões de vegetação do globo, predominando nos ambientes trópicos e subtropicais (BARROS, 1990). Suas espécies podem ser encontradas em quase todos os lugares do planeta (JUDD et al., 2009).

No Brasil, de acordo com os dados publicados por Barros et al. (2012), ocorrem aproximadamente 2.443 espécies e 236 gêneros distribuídos por todas as regiões do país, a região sudeste é a mais representativa com 1566 espécies a região menos representativa é a região centro oeste com 533 espécies (BARROS et al. 2015).

A família *Orchidaceae*, apresenta milhares de híbridos (SUTTLEWORTH et al., 1997). Destaca-se o seu potencial ornamental pela enorme combinação de cores, tamanhos e fragrâncias. Conforme Lima (2012), algumas espécies como *Cyrtopodium cardiochilum* podem ter seu extrato usado na fabricação de cosméticos e remédios e a *Vanilla planifolia* é utilizada na alimentação.

As flores da família apresentam características particulares, tais como, a fusão das estruturas reprodutivas (androceu e gineceu), resultando no ginostêmio, a diferenciação de uma das pétalas, em labelo grãos de pólen, em mássulas ou polínias (KOCH e SILVA, 2012). E apresenta, praticidade adaptativa sendo capazes de habitar em condições extremas, o que pode ocasionar variação nas formas de vida, podendo ser terrestres vivendo diretamente no solo, rupícolas vivendo sobre rochas ou rochedos, epífitas vivendo sobre árvores (SHIRAKI e

DIAZ, 2012), existem também orquídeas saxícolas e aquáticas.

Como possuem uma grande variação principalmente na forma e coloração das peças florais, as orquídeas “adquiriram” ao longo do tempo algumas relações específicas com determinado grupo de polinizadores, assim garantindo seu sucesso reprodutivo, ou seja, formação de frutos e sementes. Para isso, muitas espécies apresentam modificações na estruturação dos verticilos florais (COMBADÃO, 2008).

A subtribo *Catasetinae* inclui diversos gêneros, sendo *Mormodes* um dos mais representativos (DODSON, 1975), apresenta oitenta espécies epífitas, de amplo apelo comercial oriundas de florestas tropicais quentes e de baixa altitude, distribuídas da América Central ao Centro-Oeste brasileiro (DRESSLER, 1968).

O gênero *Mormodes* foi descrito por John Lindley (1836), como estando muito próximo ao gênero *Catasetum*, porém são plantas de menor porte (DODSON, 1975), apresentando crescimento simpodial, com pseudobulbos bem desenvolvidos, carnosos, oblongos e anelados, que promovem o armazenamento de água em períodos de estiagem (HOEHNE, 1938). Suas folhas apresentam-se dísticas, estreitas, nervuradas (REICHENBACH, 1881).

Segundo Vasquez e Dodson (1998), o gênero *Mormodes* possui inflorescência geralmente produzida na parte inferior dos pseudobulbos, suas flores são vermelhas, vinho escuro, rosadas, amareladas ou pintalgadas. A sépala dorsal arqueada sobre a coluna e as sépalas laterais voltadas para trás, tem pétalas mais largas que podem ser arqueadas sobre a coluna ou eretas, o labelo é trilobado com lóbulos fortemente presos na base da coluna que se apresenta sempre torcida para um dos lados expondo o estigma, a antera contém de duas a quatro polínias (VASQUEZ e DODSON 1998).

2. FAMÍLIA *Orchidaceae* E O GÊNERO *Mormodes*

A família *Orchidaceae* se subdivide em cinco subfamílias: *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Vanilloideae*, *Orchidoideae* e *Epidendroideae* (SHIRAKI e DIAZ, 2012). A subfamília *Epidendroideae* inclui a maioria das orquídeas brasileiras tem grande valor ornamental.

Grande parte desta subfamília é de plantas epífitas, apesar de existirem

rupícolas e terrestres (SHIRAKI e DIAZ, 2012). Possui sete tribos sendo elas: *Epidendreae*, *Vandae*, *Cyrtodidaeae*, *Malaxideae*, *Arethuseae*, *Nervillieae* e *Triphoreae*, com mais de 10 mil espécies distribuídos em 34 subtribos (CHASE et al., 2015).

Dentro da tribo *Cyrtodidaeae* existe a divisão em subtribos nos quais são: *Cymbidiinae*, *Catasetinae*, *Cyrtopodiinae*, *Eriopsidinae*, *Maxillariinae*, *Oncidiinae* e *Stanhopeinae* (SHIRAKI e DIAZ, 2012).

A subtribo *Catasetinae* é composta pelos gêneros *Catasetum* Rich. ex Kunth com 176 espécies, *Clowesia* Lindl com 7 espécies, *Cyanaeorchis* Barb. Rodr com 3 espécies, *Cycnoches* Lindl com 34 espécies, *Dressleria* Dodson com 11 espécies, *Galeandra* Lindl com 38 espécies, *Grobya* Lindl com 5 espécies, *Mormodes* Lindl com 80 espécies, sendo um dos mais representativos (CHASE et al., 2015).

Segundo Barros et al. (2015), *Mormodes* pode ser encontrado no Norte do Brasil nos estados do Acre, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima. Na região Nordeste é encontrado no Maranhão. No Centro-oeste *Mormodes* estão distribuídas no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. No Sudeste também são encontradas em Minas Gerais e São Paulo (Figura 1).

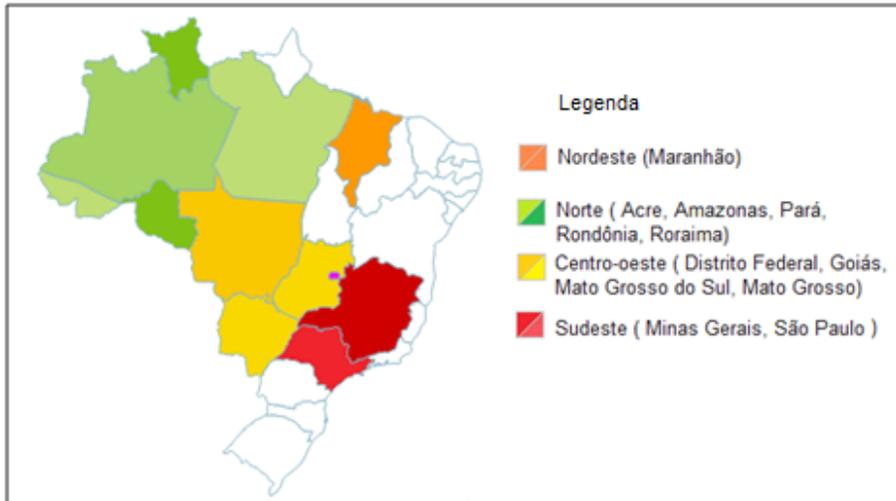


Figura 1. Mapa de distribuição do gênero *Mormodes* nos estados brasileiros (Fonte; BARROS et al., 2015)

O gênero *Mormodes* Lindl, foi proposto por Jonh Lindley em 1836. De acordo com Barros, et al (2015) são 24 espécies reconhecidas, e destas 19 são endêmicas para o Brasil (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de espécies do gênero *Mormodes* (Orchidaceae) endêmicas do Brasil

| Espécies |
|---|
| <i>Mormodes atropurpurea</i> Lindl |
| <i>Mormodes aurantiaca</i> Schltr |
| <i>Mormodes aurea</i> L.C.Menezes & Tadaiesky |
| <i>Mormodes auriculata</i> F.E.L.Miranda |
| <i>Mormodes buccinator</i> Lindl |
| <i>Mormodes carnealiana</i> Salazar & G.A.Romero |
| <i>Mormodes castroi</i> Salazar |
| <i>Mormodes cucumerina</i> Pabst |
| <i>Mormodes dasilvae</i> Salazar |
| <i>Mormodes densiflora</i> F.E.L.Miranda |
| <i>Mormodes elegans</i> F.E.L.Miranda |
| <i>Mormodes gurupiensis</i> Campacci & J.B.F.Silva |
| <i>Mormodes hoehnei</i> F.E.L.Miranda & K.G.Lacerda |
| <i>Mormodes issanensis</i> F.E.L.Miranda & K.G.Lacerda |
| <i>Mormodes jamanxinensis</i> Campacci & J.B.F.Silva |
| <i>Mormodes paraensis</i> Salazar & J.B.F.Silva |
| <i>Mormodes rodriguesiana</i> Salazar |
| <i>Mormodes rosea</i> Barb. Rodr |
| <i>Mormodes sinuata</i> Rchb.f. & Warm |
| <i>Mormodes tapoayensis</i> F.E.L.Miranda & K.G.Lacerda |
| <i>Mormodes tigrina</i> Barb.Rodr. |
| <i>Mormodes vernixioidea</i> Pabst |
| <i>Mormodes vinacea</i> Hoehne |
| <i>Mormodes warszewiczii</i> Klotzsch |

2.1. Aspectos Reprodutivos

Existem vários trabalhos de revisão taxonômica para família *Orchidaceae*, mas pouco se sabe sobre as adaptações nos órgãos reprodutivos, nas flores, frutos e sementes. Segundo Aoyama et al. (2006), uma das principais adaptações envolvendo órgãos reprodutivos é a que envolve a dispersão de sementes, que influencia não apenas na estrutura genética, mas também nos limites de cada população. A biologia floral consiste no estudo de todas as manifestações de vida da flor e preocupa-se em investigar os fatores envolvidos na reprodução das plantas desde a antese até a formação das sementes (PELLISSARO, 2012).

Os fatores morfológicos influenciam na forma e a estrutura dos vegetais, desta forma a morfometria das estruturas reprodutivas são de grande importância para se conhecer os possíveis polinizadores, dessa forma garantir a manutenção da diversidade da espécie (COSTA et al., 2009). O método de análise morfométrico de características florais tem por função tornar mais objetiva e precisa a coleta de dados, melhorando a capacidade de caracterização das espécies estudadas. Pouco se sabe sobre a variabilidade genética de espécies do gênero *Mormodes*. Desta forma métodos morfométricos podem ser usados com sucesso na inferência da variabilidade genética de espécies vegetais (CARDIM et al., 2001).

2.2. Aspectos Vegetativos

Orquidaceae é considerada uma das maiores famílias do reino vegetal e sua diversidade se concentra nas regiões tropicais (DELBONE et al., 2012). Para compreender seus processos adaptativos os estudos de anatomia vegetal têm se mostrado eficientes para serem utilizados na diferenciação de espécies, podendo ser utilizados como subsídios para a taxonomia utilizados para a diferenciação dos gêneros (PRIDGEON, 1982).

Adaptações vegetativas são aquelas que ocorrem em raízes, caules e folhas (DARRAULT, 2015). As estruturas morfológicas e funcionais das espécies epífitas variam de acordo com as condições do ambiente que as plantas vivem, sendo assim características morfológicas, anatômicas e fisiológicas evidenciam o alto grau de adaptação da espécie em um ambiente com variadas condições de intensidade

luminosidade e escassez hídrica e nutricional (DELBONE et al., 2012). Dettke et al. (2008), em estudos com três espécies do gênero *Maxillaria* que apresentam hábito epífita encontraram pseudobulbos com cutícula espessa que além de acumular água armazenam minerais e carboidratos.

Segundo Dressler (1981), uma das adaptações morfológicas das *Orquidaceae* ocorre na raiz, em sua maioria são aéreas nas epífitas, possuindo a presença de um tecido especial chamado de velame, que tem espessura variada dependendo do habitat em que a planta vive, variando de espécie para espécie.

3. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO GÊNERO MORMODES

3.1. Morfologia de estruturas vegetativas

O gênero *Mormodes* apresenta uma estrutura vegetativa comum a todos os gêneros de *Catasetinae* (VELASCO, 1983). Apresenta-se como planta epífita com cerca de 70 centímetros de altura, pseudobulbos longos, coberto bainhas com bases das números as folhas (Figura 2), estes estão agrupados um curto rizoma, vários entrenós, oblongos, de até 10 cm de comprimento, que são cobertos brácteas (SALAZAR, 1999).

As raízes são cilíndricas relativamente grossas com 3 a 8 mm de diâmetro, porção diferenciada coberta completamente por um velame e brotos adventícios (SALAZAR, 1988).

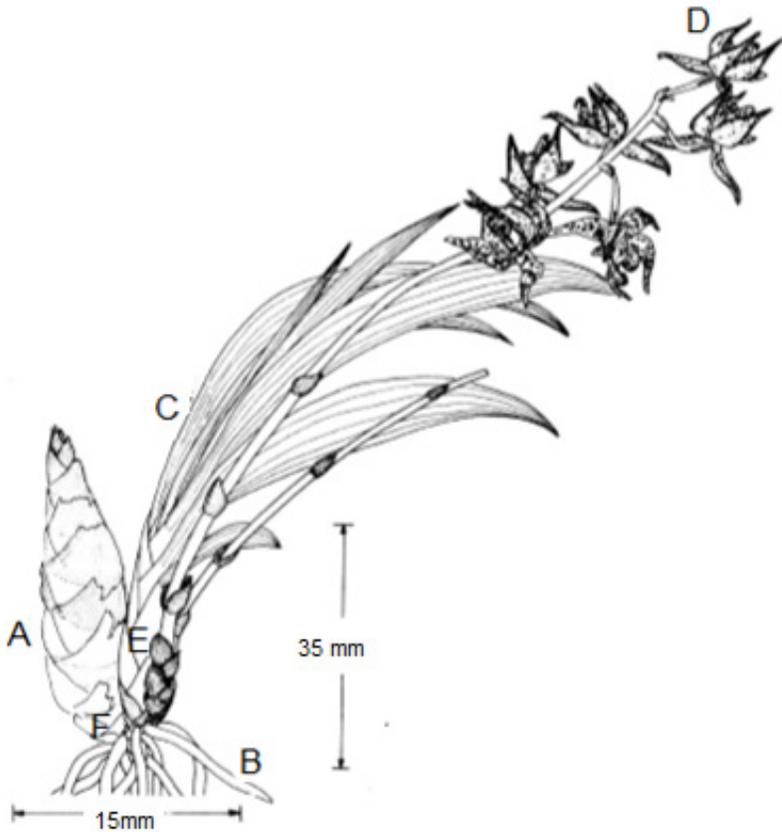


Figura 2. Estruturas vegetativas reprodutivas em *Mormodes tuxtlensis*. A pseudobulbo. B raízes. C folhas. D flores. E bractéolas. F inflorescência originada na base do pseudobulbo. Fonte: SALAZAR 1988.

3.2. Morfologia de estruturas reprodutivas

A inflorescência se origina geralmente da parte inferior do nó (Figura 3 F), situado acima do nó, perto da gema (MEISEL et al 2014). Mas, pode originar dos nós inferiores, do pseudobulbo, geralmente a partir do segundo entrenó. O escapo da inflorescência apresenta várias bractéolas (Figura 3 E). Cada flor está associada a uma bractéola, a qual protege os primórdios florais os botões mais jovens. Frequentemente, as brácteas florais produzem gotas de néctar na base da

superfície exterior. O gênero *Mormodes* ainda apresenta um acentuado dimorfismo floral (GERLACH, 2013).

As flores são muito vistosas de diferentes cores, vermelho, vinho escuro, laranja, rosa ou amarelo, podendo ter manchas (Figura 3 D). São geralmente hermafroditas, monomorfas, coluna torcida para um lado para melhor exposição do amplo estigma (HOEHNE, 1942).

A morfologia das flores causa confusão na identificação taxonômica devido ao fato de geralmente serem homogêneas (HOEHNE, 1942). Uma das particularidades das flores do gênero está na modificação na simetria bilateral, como resultado da torção no sentido oposto da coluna do labelo pouco antes da antese (SALAZAR, 1999).

Pétalas externas arqueadas podem ser recurvadas, achatadas, ovais, sendo mais larga do que a parte superior (Figura 3B). Sépala interna arqueada sobre pétalas podendo ser achatados (Figura 3 A, C), ovais, acuminadas (VELASCO, 1983).

A antera se localiza na posição ventral, sendo situada acima do ápice da coluna, consiste de lóculos separados. As anteras são removidas com o pólen quando o polínario é disparado (SALAZAR, 1999).

A antera (Figura 3F, G), geralmente, é representada por um “capuz” que cai no processo de retirada do pólen. Os grãos de pólen se apresentam unidos em polínias (SALAZAR, 1999).

O labelo fica, geralmente, voltado para a face dorsal do ginostêmio e é trilobado (Figura 3D, E), sendo um dos lobos parcialmente estéril, formando o rostelo, que é uma estrutura mais ou menos membranácea que separa a antera do estigma e tem funções ligadas à prevenção da autopolinização e ao transporte das polínias pelos polinizadores (SALAZAR, 1988).

No gênero *Mormodes* encontram-se funcionalmente o polínario (Figura 3H, I) na planta do sexo masculino, Rodrigues (2011). Segundo Dressler (1981), existem dois tipos de polínario, um tipo tem uso funcional, de curta duração no sexo masculino (estaminóide) e as flores possuem uma estreita coluna e um pistilóide.

De acordo com Dressler (1968), as flores do gênero *Mormodes* mantêm condições para que as abelhas de tamanhos médios a grandes, dos gêneros *Euglossa* e *Eulaema visitem* suas flores e com isso, as polínias ficam inseridas na cabeça ou

dorso. Uma das características mais peculiares dos gêneros *Euglossa* e *Eulaema* são a coleta de substâncias aromáticas pelos machos (OLIVEIRA et al., 2006).

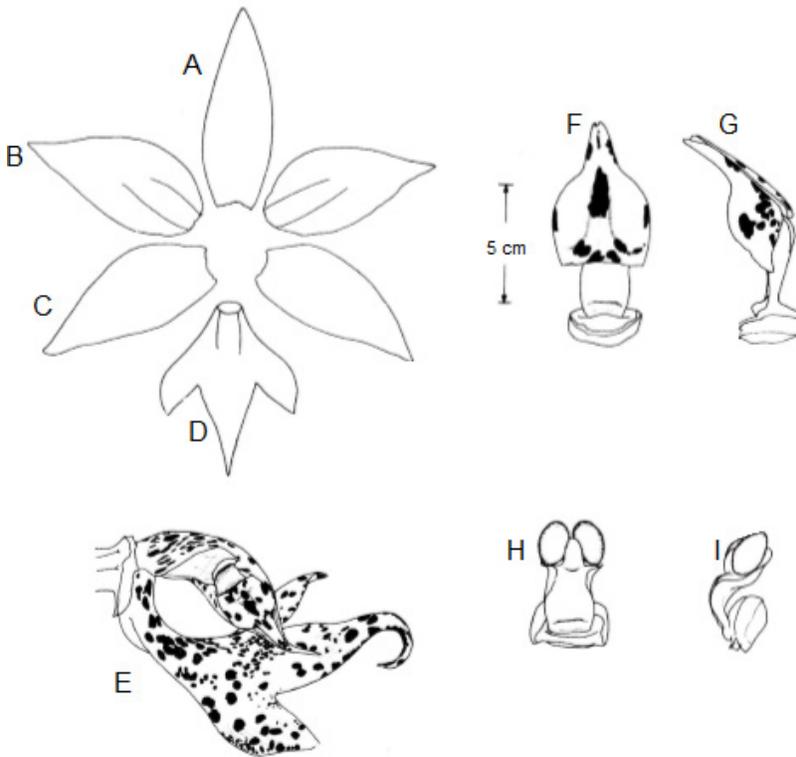


Figura 3. A Sépala dorsal; B Pétala Lateral; C Sépala lateral; D Labelo; E Labelo articulado; F Coluna vista frontal; G Coluna vista lateral; H Polínario visualização dorsal; I Polínario visualização lateral. Fonte: *Mormodes tuxtlensis*; SALAZAR 1988.

4. ASPECTOS CITOGENÉTICOS

A citogenética é o estudo da genética por meio da citologia, que engloba todo e qualquer estudo relacionado com o cromossomo, isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução (BERED, 1999).

Responsável pela transmissão de características herdáveis, o material genético está presente na sua grande maioria no núcleo da célula e está disposto em cromossomos que podem ser visíveis em etapas características da mitose e da meiose (SYBENGA, 1998). As diferenças cromossômicas refletem diferenças na origem da variação genética, ao passo que contestações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, refletem diferenças nos produtos de ação gênica, alterados por influências ambientais (CONTERADO, 2004).

O estudo dos cromossomos abrange conhecimentos sobre o número, nível de ploidia morfologia, organização, função e replicação bem como sua variação e sua evolução quer estejam eles isolados ou em conjunto, condensados ou distendidos (GUERRA, 1980; 2002; SYBENGA, 1998). A citogenética assume papel importante para conservação e caracterização de espécies, pois por meio desta, também é possível entender o, comportamento cromossômico na meiose e na mitose (SYBENGA, 1998). A caracterização citogenética deveria ser encarada como um pré-requisito e uma atividade básica na caracterização das coleções de germoplasma.

Apesar da existência de alguns estudos citogenéticos na família *Orchidaceae*, o número básico de cromossomos ainda é incerto, dificultando tanto a estimativa do nível de ploidia, quanto estudos de evolução cariotípica (FÉLIX e GUERRA, 2000). Ou mesmo para auxiliar na compreensão nos processos de hibridização.

A contagem do número de cromossomos tem muitas aplicações principalmente para traçar a evolução das espécies, bem como para fazer o melhoramento genético destas espécies (MONDIN e NETO, 2006), sendo considerada ferramenta de suporte indispensável nas etapas de planejamento, coleta, seleção de genótipos, manipulação e monitoramento genético além da conservação do germoplasma.

Na tabela 1, é possível verificar o número cromossômico de algumas espécies de *Mormodes*, nisso se observa que além da variação morfológica que ocorre entre as espécies, há também a variabilidade cromossômica.

A citogenética visa o estudo dos cromossomos e seu comportamento durante as divisões celulares, morfologia, estrutura e quantidade (FELIX E GUERRA, 2000; FELIX 2001), as análises cariótipos são procedimentos importantes na diferenciação e nas características fenotípicas. Estudo cromossômico compreende, todo e qualquer estrutura morfológica, associada à organização, função, replicação, variação e evolução dos cromossomos (PENALOZA et al., 2005).

Tabela 1. Numero de cromossomos em espécies de Mormodes.

| Especie | Numero de cromossomos | Referencia |
|-------------------------|-----------------------|---------------|
| <i>M. vinacea</i> | $2n = 6x = 54$ | Soares, 2015 |
| <i>M. hoehnei</i> | $2n = 6x = 54$ | Soares, 2015 |
| <i>M. amazonica</i> | $2n = 4x = 36$ | Soares, 2015 |
| <i>M. paraensis</i> | $2n = 4x = 36$ | Soares, 2015 |
| <i>M. elegans</i> | $2n = 2x = 18$ | Soares, 2015 |
| <i>M. buccinator</i> | $2n = 54$ | Salazar, 1999 |
| <i>M. tuxtlensis</i> | $2n = 54$ | Salazar, 1999 |
| <i>M. histrio</i> | $2n = 54$ | Salazar, 1999 |
| <i>M. luxata</i> | $2n = 54$ | Salazar, 1999 |
| <i>M. lineata</i> | $2n = 54$ | Salazar, 1999 |
| <i>M. hooken</i> | $2n = 56$ | Salazar, 1999 |
| <i>M. warszewiczii.</i> | $2n = 56$ | Salazar, 1999 |

Segundo Jones e Daker (1968), Senghas (1992) e Salazar (1999), foram realizados estudos citogenéticos com o gênero Mormodes apresentando a variação de $2n=54$ a $2n=56$ cromossomos. Desta forma é fundamental comparar cito geneticamente espécies diferentes, ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie (AULER e BATTISTIN, 1999).

As mudanças no número de cromossomos ocorrem e resultam em um aumento no grau de ploidia. O aumento da ploidia em orquídeas é muitas vezes acompanhado por um aumento no tamanho das partes da planta; plantas são mais robustos e flores têm, geralmente, uma melhor forma, e poderia tornam-se maiores (CARNIER, 1996)

A poliploidia é o processo evolutivo importante para plantas está associado à condição ambiental (FÉLIX e GUERRA, 2005), pois favorece a diversificação ecológica e a ocupação de novos ambientes. Segundo Koop,

(2012) as plantas poliplóides são mais vigorosas, sugerindo que durante a domesticação plantas poliplóides foram preferencialmente selecionadas.

Das espécies descritas pela citogenética, pelo menos 75% tenham suportado, pelo menos uma vez na sua história evolutiva, um evento de duplicação de todos os cromossomos, não sendo diferente nas Orchidaceae, no qual se considera que mais de 90% das espécies poliplóides (MONDIN e NETO, 2006). Deste modo, o número cromossômico pode trazer subsídios importantes sobre aproximação genética de uma espécie com outras e juntamente com as demais características citológicas (FELIX, 2001).

O cruzamento interspecíficos é um fator importante para evolução das plantas e a possibilidade alterar o número cromossômico e trazendo consequências para evolução e caracterização das plantas (MONDIN e NETO, 2006). Desta forma poliplóida pode suceder dois eventos básicos que são a autoploidia e a alopoliploidia. A autoploidia consiste na duplicação do número de cromossomos pela própria espécie, de modo que uma espécie que deveria ter duas cópias do mesmo cromossomo, um vindo do pai e outro da mãe, passa a ter 4, 5, 6, 7 ou mais cópias do mesmo cromossomo. Por isso os

A variabilidade citogenética originada os níveis de ploidia também pode ser relacionada com a variação morfológica e adaptativa entre espécies deste modo o grau de ploidia varia muito entre espécies do mesmo gênero, demonstrando que os dados citogenéticos são importantes na revisão taxonômica (SILVA, 2007).

No Brasil não existem trabalhos que trazem informações sobre a morfologia dos cromossomos do gênero *Mormodes* por isso o estudo citogenético tem importância ornamental e econômica podendo proporcionar benefícios aplicáveis a curto, médio e longo prazo, visando o melhoramento genético. A variação dentro do gênero pode ter implicação evolutiva e taxonômico importante.

Em conclusão as espécies do gênero *Mormodes* a uma variação entre $2n=18$ a $2n=56$ cromossomos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOYAMA, E. M.; VIVEIROS, S. C. M. **Adaptações estruturais das plantas ao ambiente**. São Paulo, Instituto de Botânica, 2006. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal).

AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB31958>>. Access on: 18 Dez. 2015.

AULER, N. M. F.; BASTTISTIN, A. 1999. Análise do cariótipo de *Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macbr. *Ciência Rural*, Santa Maria. V. 29, n-1, 167-169p.

BARROS, F. Diversidade taxonômica e Distribuição geográfica das Orchidaceae brasileiras. **Acta Botânica Brasílica**. v.4, n.1, p.177-187, 1990.

BARROS, F.; VINHOS, F., RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A., FRAGA, C. N. & PESSOA, E. M. **Orquidacea, In lista de espécie da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012.

BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.;

BERED, F. Variabilidade genética: ponto de partida para o melhoramento de plantas. In: SACCHET, A. M. O. F. **Genética, para que te quero?** Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999. p. 99-104.

CARDIM, D. R.; CARLINI-GARCIA, L. A.; MONDIN, M.; MARTINS, M.; VEASEY, A. E.; ANDO A. Variabilidade intra-específica em cinco populações de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae ñ Oncidiinae) em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica**;V.24, n.4 (suplemento), p.553-560, dez. 2001.

CARNIER, A. Variação no número de cromossomos nas Orquídeas. *Jornal da ABRACC: Associação Brasileira de Cultivadores de Catasetíneas*, Ano 2, n. 6, 1996.

COMBADÃO, J. Luso orquídeas.**Boletim da Associação Portuguesa Orquidofilia**, Volume I, Nº 3, Maio/Junho de 2008.

CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; SALAZAR, G.; BERG, C.; e SCHUITEMAN, A. An updated classification of

Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society** 177.2 : 151-174. 2015.

CONTERADO, I. F.; **Estudos Citogenéticos de Espécies Americanas de *Luponus L.*: Número Cromossômico e Comportamento Meiótico.** Porto Alegre, UFSM. 2004, 123p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia).

COSTA, M. R. S. da; MAUÉS, M. M. **Morfometria dos verticilos florais de *Carapa guianensis* Aubl. Meliaceae (Andiroba): atributos adaptativos aos polinizadores.** In: Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE). Belém, PA. 2009 In: SEMINÁRIO CIENTÍFICO DA UFRA.

DARRAULT. R.O.; MEDEIROS, P. C.; LOCATELLI, E.; LOPES, A. V.; MACHADO.; I. C.; SCHLINDWEIN, C. Abelhas Euglossini. PÔRTO, C. K., ALMEIDA-CORTEZ, J. S., TABARELLI, M. **Diversidade Biológica e Conservação da Floresta Atlântica ao Norte do Rio São Francisco.** Ministério do Meio Ambiente: Brasília, 2005. p.257-278.

DE-MORAES, C. P.; SOUZA-LEAL, T. D.; BRESCANSIN, R. L.; PETTINI-BENELLI.; A., e SAJO, M. D. G. Radicular anatomy of twelve representatives of the *Catasetinae* subtribe (Orchidaceae: Cymbidieae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 84(2), 455-468.. 2012.

DELBONE, C. A. C.; ARAÚJO, R. R. de.; PISICCHIO, C. M. Estratégias Morfo-Anatômicas e Fisiológicas nas Espécies Epífitas da Família Orquidaceae. XII Congresso de Educação do Norte Pioneiro. Jacarezinho, 2012. **Anais** 2012.

DETTKE, G. A.; SANCHES-MARQUES, Â. M. M.; FERNANDES, M.; GUTIERRE, M. A. M. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Miltonia regnellii* (Lindl.) Rehb. f. (Oncidiinae, Orchidaceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v30(1), p9-16. 2008.

DRESSLER, R. L. Observations Orchids and Euglossine Bees in Panama and Costa Rica. **Revista Biologia Tropical** v15(1), p143-183. 1968.

DRESSLER, R. L. **The orchids: natural history and classification.** Harvard University Press, Cambridge. 1981. 250p.

DODSON, C. H. *Dressleria* and *Clowesia*: a new genus and na old one rivided in the *Catesetinae*. **Selbyana**, v.1. p130-137. 1975.

FÉLIX, L. P.; GUERRA, M. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian

species of Cymbidioid orchids. *Genetics and Molecular Biology*. v23: p957-978, 2000.

FELIX, L. P. *Citogenética e citotaxonomia de orquídeas do Brasil, com ênfase no gênero Habenaria Willd.* Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2001. 214p. (Tese -Doutorado em Botânica).

FELIX, L. P.; GUERRA, M. Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. ***Plant Systematics and Evolution***. v.254:p-131-148, 2005.

GERLACH, G. La Pesadilla de Lindley – La Biología Sexual de *Catasetum* y *Cycnoches*. ***Lankesteriana*** 13: 39 -46. 2013

GUERRA, M. S. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara. Bengtsson, 1980. 142p.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como analisar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC, 2002.

HOEHNE, F. C. As plantas ornamentais da flora brasileira. ***Boletim de Agricultura***, v.1, p,247-273,1938.

HOEHNE, F.C. Orchidáceas. ***Flora Brasílica***. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo, São Paulo. v.12, pt. 6, pp.1-218, t. 1-137.1942.

KOCH, A.K.; Silva. C. A. **Orquídeas Nativas de Mato Grosso**. Cuiabá. Carlini & Caniato Editorial; 2012.

KOPP, M. M. Origem, evolução e domesticação da alfafa. ***Embrapa Pecuária Sul-Capítulo em livro Técnico- Científico (ALICE)***, 2012.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenética*. Porto Alegre: ***Artmed***, 2009 3. ed. 612p.

LIMA, B. V. **Subsídios para o manejo cultural e fitopatológico de *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae)**. Viçosa, UFV. 2012. 102p. (Dissertação - Mestrado em Magister Scientiae).

LINDLEY, J. Genus *Mormodes* Lindl. *A Natural System of Botany*. 446. 1836.

MEISEL. J.E.; KAUFMANN.R.S.; POPULIN.F. *Orchidof Tropical America*.

An Introduction and Guide. Corell University Press, 2014.

MONDIN, M.; NETO, A. D. Citogenética vegetal enfatizando a família *Orchidaceae*. **Orchidstudium**. v.4, p.24-54, 2006.

OLIVEIRA, R.; MEDEIROS, P.; LOCATELLI, E.; LOPES, A.; SCHLINDWEIN, C. 2006. **Abelhas Euglossini (Hymenoptera – Apidae) no Centro de Endemismo Pernambuco**. In Diversidade Biológica e Conservação da Floresta Atlântica ao Norte do Rio São Francisco. Kátia Pôrto; Jarcilene Almeida-Cortez, Marcelo Tabarelli (org.). Ed 1, Vol. 1: 239-256. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.

PELLISSARO, T. M. **Fenologia e biologia floral de três espécies simpátricas de Psychotria L. Rubiaceae) em Floresta Estacional em Santa Maria, Rs, Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2012. 77p . (Dissertação - Mestrado em Agrobiologia).

PRIDGEON, A. M. Diagnostic anatomical characters in the *Pleurothallidinae* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**. V. 6: p. 921-938, 1982.

REICHENBACH, S. W. *Mormodes sinuata* Rchb.f.&Warn. **Otia Botannica**, v.90, p.3-5, 1881.

RODRIGUES, V.T. **Orchidaceae Juss.** Aspectos Morfológicos e Taxonômicos. São Paulo 2011. pp19.

SALAZAR, G. A. C. **Sistemática de Mormodes Seccion Coryodes (Orchidaceae, Catasetinae)**. México: Universidade Nacional Autônoma de México 1999. 161p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal).

SALAZAR, G. A. C. *Mormodes tuxtensis* Salazar, sp nova. **Orquídea**. México. 1988.

SILVA, J. T. Caracterização citogenética de espécies e variedades de bambu com potencial econômico no Nordeste. Pernambuco, Universidade Federal Rural. 2007. 60 p.(Dissertação Mestrado em Ciências Florestais).

SYBENGA, J. Forty years of cytogenetics in plant breeding: a personal view. In: LELLEY, T. Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement. Vienna: 1998.

SENGHAS. K. Subtribus Catasetiane. **Die Orchideen**. 3ª. Ed. Paul Parey. Berlin. P1574-1616. 1992.

SHIRAKI, J. N & DIAZ, E. M. **Orquídeas**. São Paulo. Secretaria do Verde e do

Meio Ambiente. 2012. 178p.

SOARES, J.A.G; Morfometria Floral e Citogenética de Cinco Espécies do Gênero *Mormodes* Lindley (1836)(Orchidaceae) da Amazônia Meridional Brasileira, Alta Floresta, Mato Grosso. Univesidade Estadual de Mato Grosso. 2015.90p. Dissertação (Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas).

SOUZA, M. S. **Bandeamento cromossômico em *Lippia alba***. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 65p. Dissertação (Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas).

SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. London: Unwin. Human, 434 p.1990.

SUTTLEWORTH, F. S.; ZIM, H. S.; DILLON, G. W. **Orquídeas: guia dos orquidófilos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura.1997. 158p

VASQUEZ, R.; DODSON, C. H. *Mormodes morenoi*. Revista **Sociedade Boliviana Botânica** v.2(1): 6, p4-6.1998

VELASCO, S. R. de .; *Mormodes Saccata* Species From Jalisco, Mexico. **Orquídea**. v. 9, p. 40, 1983.

VIERA, A; JUNIOR DOURADO,J; MIRANDA,D.P; MELLO.V.S; KARSBURG.I.V. Crescimento In Vitro De *Mormodes vinaceum* (Orchidacea) Em Diferentes Ph's Na Presença E Ausência De Carvão Ativado. XVII Encontro Latino Americano São José dos Campos. 2013.

VIERA, A; MIRANDA,D.P; MELLO.V.S; BENEVENUTI, A; KARSBURG.I.V. The Chromossomic Number *Mormodes vinaceum* (Orchidaceae). I Seminário De Biodiversidade E Agroecossistemas Amazônicos .Alta Floresta-MT, 2013

PERSPECTIVAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE *Coffea SPP.* VOLTADO A AMPLIAÇÃO DA EFICIÊNCIA NUTRICIONAL

Cyntia Meiry da Silva Machado

Lindomar de Souza Machado

Fabio Luiz Partelli

Marcelo Curitiba Espíndula

Ivoney Gontijo

1. INTRODUÇÃO

A cultura do café é mundialmente conhecida por ser grande gerador de riquezas, estima-se que é a terceira bebida mais consumida no planeta e a segunda no Brasil. Em 2018, é previsto que o Brasil se mantenha como o maior produtor e exportador de grãos de café do mundo (ICO, 2018), sendo o único país a produzir em larga escala grãos das duas principais espécies comercializadas (MARRACCINI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2015). O Brasil é maior produtor mundial de *Coffea arabica* e o segundo maior de *C. canephora* (ICO, 2018).

O parque cafeeiro vem se expandido ao longo dos anos (AMARAL et al., 2012; PREZOTTI & BRAGANÇA, 2013) devido à crescente demanda mundial pelo produto café. O Brasil é um dos poucos países do mundo onde apresenta clima favorável e com áreas vastas disponíveis para aumentar o parque cafeeiro e suprir a demanda mundial (FERNANDES et al., 2012), contudo, o país apresenta uma parcela significativa de solos que apresentam baixa fertilidade natural devido aos processos naturais de intemperização.

Os solos tropicais são naturalmente pobres em macronutrientes, apresentam acidez elevada e Al^{3+} disponível, assim necessitando de correção e suplementação mineral nos cultivos, o que onera o setor (PEDROSA et al., 2014), consequentemente, aumentando os custos de produção e elevando a necessidade de conhecimentos que permitam mitigar a situação (MARTINS et al., 2015).

O melhoramento genético de plantas podem promover avanços científicos relevantes em relação a cultura do cafeeiro, principalmente em estudos cujo o foco é a estabilidade do rendimento, uniformidade de maturação, tamanho de grão, vigor, tolerância ao fungo de ferrugem e produtividade (DALCOMO et al., 2015), assim como características fitotécnicas relacionadas ao crescimento, desenvolvimento, nutrição e eficiência nutricional (FONSECA et al., 2004; DAMATTA et al., 2007; FERRÃO et al., 2008; BRAGANÇA et al., 2010; MARTINS et al., 2015; MACHADO et al., 2016). Entretanto ainda é necessário elucidar com melhor clareza processos que expressam as tolerâncias e que governam a eficiências nutricionais na cultura.

Desta forma, torna-se fundamental a identificação de genótipos tolerantes, eficientes e responsivos aos nutrientes aplicados, permitindo melhor recomendar cultivares para cada condição de cultivo. Estima-se que o custo com fertilizantes com a cultura gire em torno de 30% do custo total da produção, além disso as fontes minerais não são renováveis, sendo um dificultador para a sustentabilidade do setor. Portanto, a otimização da eficiência nutricional de cultivares de café, reveste-se de grande importância (MARTINS et al., 2015; MACHADO et al., 2016; MARTINS et al., 2016).

Na busca da melhoria deste panorama, programas de melhoramento genético de plantas estão criando linhas de pesquisas voltadas as condições de estresse abióticos. Diante dessa nova perspectiva, tem-se buscado estratégias de identificação de plantas tolerantes a baixa disponibilidade do recurso natural e de plantas com maior eficiência no uso.

Diante deste contexto, objetiva-se com este trabalho revisar literaturas que abordem perspectivas sobre o melhoramento genético de *Coffea* visando eficiência nutricional, explorando os aspectos morfofisiológicos e as bases genéticas.

2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS ASSOCIADOS À EFICIÊNCIA NUTRICIONAL DO CAFEIEIRO

Na literatura são encontrados diversos trabalhos que discorrem sobre a nutrição mineral do cafeeiro, entretanto, são poucos os trabalhos em relação à eficiência nutricional desta cultura assim como os aspectos morfológicos e

fisiológicos relacionados a este. Muitas espécies e cultivares de plantas diferem quanto suas respostas à disponibilidade de nutrientes no solo, sendo associado as diferenças de aptidão de absorção, translocação e de utilização dos nutrientes. Esses fatores estão ligados as características morfológicas da planta, como comprimento, raio, taxa de crescimento e área superficial de raízes (BARBER, 1980), bem como a características fisiológicas associadas à cinética de absorção, à eficiência na translocação e metabolização de nutrientes (BARBER, 1995).

A eficiência de absorção é definida por Swiader et al. (1994) como a capacidade da planta em adquirir nutrientes do solo em razão do desenvolvimento radicular por meio da massa seca de raiz ou pelo comprimento do sistema radicular. Para um determinado genótipo, a eficiência nutricional é refletida na habilidade para produzir um alto rendimento em um solo que possui limitação de um ou mais nutrientes minerais em relação a um genótipo padrão (FEUILLET et al., 2008). As variáveis consideradas nos processos fisiológicos que abrangem a eficiência nutricional, tais como absorção de um dado nutriente, sua translocação e utilização pela planta, sugerem controle genético da nutrição (SACRAMENTO & ROSOLEM, 1998).

Existem vários mecanismos e processos na planta que contribuem para o uso eficiente de nutrientes. Esses mecanismos e processos são resumidos por Martins et al. (2015) e estão relacionados com as características morfológicas desejáveis, tais como sistema radicular eficiente, alta relação entre raízes e parte aérea, sistema radicular extensivo explorando maior volume de solo, colonização do sistema radicular por micorrizas e bactérias que fixam o nitrogênio. Os mesmos autores também chamam a atenção para as características fisiológicas desejáveis, tais como a habilidade do sistema radicular na modificação da rizosfera para superar baixos níveis de nutrientes, maior eficiência de absorção ou de utilização de nutrientes, capacidade de manter o metabolismo normal com baixo teor de nutrientes nos tecidos e alta taxa de fotossíntese.

A determinação de uma planta como sendo eficiente na absorção de nutrientes está relacionada a alguns fatores, entre eles: geometria e distribuição do sistema radicular, alterações químicas na rizosfera, presença de micorrizas, tolerância a condições de baixo pH, taxa mais rápida de absorção sob condições de baixas concentrações de nutrientes e entre outros (FAGERIA, 1998; MARTINS et al.

2015; MACHADO et al., 2016).

Para que uma planta seja considerada eficiente em translocar nutrientes, deve-se concentrar a maior porção do nutriente na parte aérea quando comparado com o nutriente total na planta (MARTINS et al. 2015). Neste sentido, Li et al. (1991) caracterizaram plantas eficientes quando possuem alta capacidade de translocação e de retranslocação, pois está amplamente ligada à capacidade de absorção e movimentação dos íons através das raízes e, também, à capacidade de o sistema de absorção liberar os íons para os vasos xilemáticos.

A eficiência de uso é subdividida em eficiência de aquisição, que corresponde ao total de nutrientes encontrados na planta por unidade de nutriente fornecido, e a eficiência de utilização, que é definida pela relação da massa seca total produzida por unidade de nutriente nas plantas (SWIADER et al., 1994). Em trabalhos recentes vem sendo mais difundido a eficiência na utilização com intuito de relatar genótipos com produção elevada de massa seca, com investimento mínimo de nutrientes aplicados (MARTINS et al., 2015).

As plantas podem ser agrupadas como “eficientes” e “ineficientes”, e “responsivas” ou “não-responsivas”, quando submetidas à avaliação de eficiência e resposta através do parâmetro genético denominado alfa quando se avalia a conversão dos nutrientes em massa seca (CIAT, 1978; FOX, 1978; AMARAL et al., 2012; MARTINS et al., 2013b; CHRISTO et al., 2014; MARTINS et al., 2015; MACHADO et al., 2016).

Diversos programas de melhoramento selecionaram cultivares modernas em condições de alta disponibilidade de nutrientes, a fim de se obter altas produtividades (WISSUWA et al., 2009). No entanto, sob estas condições, alguns genes relacionados a determinação das eficiências nutricionais podem ter sido perdidos, uma vez que características adaptativas podem representar um custo energético adicional às plantas.

Algumas pesquisas com café evidenciaram variação entre genótipos quanto a eficiência de uso de nutrientes. Reis & Martinez (2002) constataram que a eficiência de absorção e translocação de fósforo (P) e zinco (Zn) pelo cv. Catuaí (*C. arabica*) foi maior em relação ao Conilon (*C. canephora*), entretanto o mesmo não aconteceu com a eficiência de utilização, o Conilon apresentou maiores valores. Genótipos de *C. arabica* (Catuaí, Oeiras, H 419, H 514) variaram quanto

a eficiência de absorção e translocação de Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), enxofre (S) (TOMAZ et al., 2003), Zn, Cobre (Cu) e Manganês (Mn) (TOMAZ et al., 2006). Em outro estudo, Tomaz et al. (2008) observaram variação da eficiência nutricional para Potássio (K), Ca e Mg em razão da combinação enxerto / porta-enxerto, e na maioria das vezes, plantas enxertadas apresentaram menor eficiência de absorção, translocação e utilização em relação ao pé-franco. Em estudo que objetivou avaliar a eficiência de produção de raiz e parte aérea por unidade absorvida de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu e Zn em quatro cultivares de café arábica, Amaral et al. (2011) constataram maior eficiência na produção de raízes por unidade de N, P, K, Ca, Mg e S no cultivar ‘Acaiaí IAC-474-19’ e menor na ‘Rubi MG-1192’.

A eficiência de absorção dos nutrientes não foi afetada pelo porta-enxerto Apoatã IAC 2258, exceto para o K, que teve sua absorção aumentada (FERREIRA et al., 2010). Neste ensaio, os maiores índices de translocação dos nutrientes, à exceção do S, foram observados nas mudas enxertadas e o cultivar Topázio MG 1190 não se mostrou apta para a realização da enxertia, por apresentar menor eficiência de uso dos nutrientes quando foi enxertada. Os cultivares Palma II e Oeiras foram os que apresentaram melhor eficiência de uso dos nutrientes quando enxertadas, mostrando-se passíveis de serem enxertadas.

Os mesmos autores verificaram que os cultivares Palma II, Oeiras, Obatã, Topázio e Paraíso apresentaram os maiores índices de absorção de Ca e relatam que, possivelmente, a diferença detectada entre as cultivares se deu em função do desenvolvimento do sistema radicular, levando ao melhor desempenho na absorção de íons pelo cultivar Catimor, quando enxertado sobre ‘Mundo Novo’ e ‘Catuaí’. O maior índice de absorção de Mg foi encontrado no cultivar Paraíso, que não diferiu da Palma II e Oeiras. Tomaz et al. (2003) trabalhando com diferentes cultivares de *C. arabica* L. enxertados em *C. canephora* encontraram reduções de até 30% na eficiência de absorção de Mg em relação aos de *C. arabica* L. quando em pé franco.

A maior eficiência de translocação de N foi encontrada no cultivar Paraíso, que não diferiu das cultivares Catucaí 2SL, Oeiras, Obatã e Topázio (FERREIRA et al., 2010). Ainda no mesmo estudo, a cultivar Palma II apresentou o maior índice de eficiência de translocação de P, embora não diferindo das cultivares Catucaí 2SL, Oeiras, Topázio e Paraíso, assemelhando-se aos resultados encontrados para

eficiência de absorção de P.

Foram verificados que as mudas enxertadas apresentaram superioridade na eficiência de translocação dos macronutrientes, com exceção do S (FERREIRA et al., 2010). Por meio de cortes anatômicos de caules destes cafeeiros, verificou-se grande desenvolvimento de parênquima cortical, e, segundo os autores, o desenvolvimento deste calo pode influenciar negativamente a translocação de água e nutrientes do porta-enxerto para o enxerto, porém, o trabalho não encontrou resultados coincidentes, uma vez que as mudas enxertadas se apresentaram igual ou superiores às mudas de pé-franco quanto a eficiência de translocação dos nutrientes.

Com relação a micronutrientes, Ferreira et al. (2013), relata redução da eficiência de absorção de B, Fe e Mn, e aumento da translocação dos nutrientes em mudas enxertadas. Já o acúmulo de Zn foi maior no Apoatã em relação ao Mundo Novo e ao Mundo Novo enxertado sobre Apoatã (FAVARIN et al., 2007). Tomaz et al. (2011) verificaram que a cultivar Catuaí foi mais eficiente na produção de massa seca e utilização de B e Zn, quando combinado com materiais genéticos de Conilon ES 26 e ES 23.

A utilização de diferentes espécies nas combinações de enxerto/porta-enxerto influenciam tanto na eficiência quanto na exigência nutricional, sendo várias as causas dos diferentes índices de aproveitamento dos nutrientes, estando entre elas as exigências nutricionais variáveis (SIDDIQI & GLASS, 1981).

Plantas que apresentam maior ou menor eficiência nutricional podem estar relacionadas com a demanda de nutrientes em nível celular, compartimentalização, utilização na parte aérea, no transporte a curta e longa distância, na afinidade do sistema de absorção, concentração mínima e nas modificações da rizosfera (TOMAZ et al., 2011).

Numerosos conceitos sobre a eficiência nutricional de plantas cultivadas são relatados na literatura, mas pouco se conhece sobre a eficiência nutricional de cafeeiros *Coffea canephora* ‘Conilon’ e ‘Robusta’ (MARTINS et al., 2013a), embora alguns estudos já tenham sido realizados quanto a eficiência nutricional e capacidade responsiva em plantas jovens da cultura (MARTINS et al., 2013c; MARTINS et al., 2015; MACHADO et al., 2016). Para cafeeiros desta espécie ainda é necessário elucidar com melhor clareza, os processos que expressam a

mecânica de tolerâncias, principalmente à deficiência nutricional (MARTINS et al., 2016).

O cafeeiro Conilon possui ampla base genética (MONTAGNON et al., 2012) o que confere a característica de elevada diferenciação genética entre indivíduos da mesma espécie. Este fato está atrelado, entre outros aspectos, a sua característica de reprodução alógama, que ao longo do tempo proporcionou inúmeros cruzamentos ao acaso, ampliando sua base genética. Esta ampla variabilidade genética do ponto de vista do melhoramento vegetal da cultura é um fator de extrema importância. Entretanto, para as demais áreas de pesquisa em manejo, torna-se promotora de um frequente desafio, pelo fato de não ser possível sistematizar pontualmente um manejo para todas as cultivares recomendadas (MARTINS et al., 2016), visto que, as variedades são compostas por um agrupamento de genótipos (BRAGANÇA et al., 2001; FONSECA et al., 2004; RAMALHO et al., 2016).

Estudos com genótipos de diferentes ciclos de maturação evidenciaram exigências nutricionais diferenciadas durante o período compreendido entre a antese e a maturação (PARTELLI et al., 2014a; MARRÉ et al., 2015). Nestes estudos foram constatados maior velocidade de acúmulo de massa seca e nutrientes em frutos dos genótipos precoces, por isso, os autores sugerem que o manejo nutricional de cada genótipo siga suas especificidades culminando com diferentes quantidades e a formas de parcelamentos de fertilizantes durante o período de enchimento dos frutos.

Trabalhos de pesquisas têm evidenciando a diferenciação genética entre genótipos de *C. canephora* quanto a diferentes concentrações de nutrientes em folha mesmo sendo cultivados em mesmas condições climáticas e de fertilidade de solo como apresentado por Gomes et al. (2016). Esses resultados ressaltam claramente as diferenças genéticas existentes, visto que, os mecanismos que controlam a absorção, translocação e concentração foliar são genéticos, formando bombas, canais e carreadores.

A eficiência nutricional do fósforo leva em consideração a absorção, translocação e assimilação desse nutriente. Para o cafeeiro Conilon, foi estudado sistematicamente em teste que visava promover a interação de 13 genótipos (CV-01, CV-02, CV-03, CV-04, CV-05, CV-06, CV-07, CV-08, CV-09, CV-10, CV-11, CV-12 e CV-13) em diferentes níveis de fornecimento de fósforo (0, 50, 100

e 150% de fósforo recomendado para café Conilon) (MARTINS et al., 2013a; MARTINS et al., 2013b; MARTINS et al., 2013c). Os resultados indicam que os genótipos de Conilon exibem comportamentos significativamente diferentes, dependendo dos níveis de fornecimento de P_2O_5 no solo. Esse comportamento destaca a descoberta que as variáveis de crescimento vegetativo (número de folhas, diâmetro do caule, altura da planta e área foliar), de massa seca (folhas, caule e raízes) e eficiência de uso de fósforo, aumentam linearmente com o fornecimento de P_2O_5 no solo (MARTINS et al., 2013a.; MARTINS et al., 2013b).

A eficiência de absorção de fósforo na maioria dos genótipos de café Conilon apresentam ajuste do modelo quadrático. A eficiência de absorção é máxima entre 75 e 100% do suprimento de nutrientes no solo. Esse comportamento está associado à maior adaptação às condições adversas, entre genótipos da mesma espécie, assim como, a capacidade distinta que estes apresentam em alterar a configuração geométrica do sistema radicular, de forma a melhor exploração do solo em busca de nutrientes ou de adquirir os recursos necessários de maneira mais eficiente (TIFFNEY & NIKLAS, 1985). Os genótipos apresentaram diferenças na eficiência de translocação de fósforo, evidenciando diferenças genéticas no controle de transporte água e nutrientes.

A eficiência do uso de fósforo foi aumentada com a linearidade de fornecimento de P_2O_5 no solo, apresentando-se como comportamento comum na característica com os genótipos de café Conilon (MARTINS et al., 2013b). Porém, os resultados mostram que, independentemente do fornecimento de fósforo no solo, o café conilon tem alta eficiência na translocação de fósforo; com cerca de 75 a 95% do fósforo absorvido sendo translocado às folhas (MARTINS et al., 2013b). Nos estudos realizados por Martins et al., (2013a), os genótipos CV-02 e CV-13 foram classificados como não eficientes e não responsivo, por outro lado, os genótipos CV-04, CV-05 e CV-08 foram classificados como eficientes e responsivos ao fornecimento de fósforo no solo.

Martins et al. (2013a) e Tomaz et al. (2013) atribuíram à variação genética, grande parte do comportamento diferencial dos genótipos de café Conilon em relação ao vigor vegetativo, a nutrição e a eficiência nutricional. Em outro estudo analisando evidências de tolerância diferenciada entre genótipos de *Coffea canephora* à baixa disponibilidade de fósforo no solo, Martins et al. (2015),

verificou que foi possível realizar a identificação de tolerância entre os genótipos. Para tal, foram utilizadas 14 variáveis, relacionadas ao crescimento vegetativo, massa seca, acúmulo de nutriente e eficiência nutricional. Os resultados dos parâmetros genéticos indicaram ampla variabilidade genotípica para os genótipos de café Conilon cultivados em ambientes com baixa disponibilidade de fósforo no solo. Foi possível classificar os genótipos de café Conilon 67, 83, 77, 76, 22, 23 e 24 (CV-01, CV-03, CV-04, CV-05, CV-07, CV-08 e CV-09,) como tolerantes à baixa disponibilidade de fósforo no solo. Não há relação evidente entre o ciclo de maturação dos frutos e a tolerância de genótipos de café Conilon à baixa disponibilidade de fósforo no solo.

Estudos relativos à eficiência nutricional do café Conilon em relação ao fornecimento de K, verificou-se que não há evidências de que é receptivo ao fornecimento de potássio em solo, quando jovem. Os genótipos CV-01, CV-02, CV-03 e o CV-05 apresentaram alta eficiência de absorção e utilização de potássio, independente de K no solo (MACHADO, dados não publicados; apud MARTINS et al., 2016).

Comparando os cafés da espécie *C. canephora*, Ramos & Lima (1980) relataram que sistemas radiculares mais desenvolvidos com maior extensão e maior eficiência na absorção de água e nutrientes, confere maior resistência a fatores adversos do ambiente. DaMatta et al. (2007), relatam que essas características não são para todos os tipos de *C. canephora*, o que explica os distintos comportamentos verificados.

Em trabalho desenvolvido por Machado et al. (2016), verificou-se que dentro da cultivar clonal Vitória – Incaper 8142, constituída de 13 genótipos, há diferenças genéticas quanto a eficiência da resposta quanto a fertilização com nitrogênio. Os pesquisadores relataram que os genótipos CV-03, CV-07 e CV-08 foram classificados como não eficientes e não responsivos, os genótipos CV-06, CV-10, CV-11 e CV-12 como não eficientes e responsivos, já os genótipos CV-02, CV-05 e CV-13 como eficientes e não responsivos. Os genótipos CV-01, CV-04 e CV-09 foram classificados como eficientes e responsivos ao fornecimento de nitrogênio no solo. Apesar de não ter sido avaliado caracteres fisiológicos como atividade enzimática, pode-se inferir, pelas literaturas e pelos trabalhos em outras culturas, que possivelmente dentro do cultivar “Vitória Incaper 8142” há diferentes

níveis de atuação de enzimas envolvidas no processo de absorção, translocação e utilização de nitrogênio, entre elas a nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS), que são usadas na seleção de cultivares como proposto por Hirel et al. (2007).

Em outro estudo analisando os genótipos de Conilon de forma simultânea, agrupando os genótipos quanto a eficiência de absorção e utilização de N, P e K, Martins et al. (2016) verificou que os genótipos apresentam eficiências para absorver e utilizar N, P e K. Além disso, foi possível confirmar que os genótipos de café Conilon que apresentam ciclo de amadurecimento precoce têm altas eficiências associadas a absorção e utilização em ambiente com fornecimento adequado de N, P e K. Os mesmos autores sugerem o uso dos genótipos 67 e 76 (CV-01 e CV-04) para otimização do gerenciamento nutricional, sendo recomendados para plantações com baixo potencial tecnológico para explorar melhor suas eficiências de absorção e uso de N, P e K. Já os genótipos, 67, 48 e 02 (CV-01, CV-06 e CV-12) seriam recomendados para culturas com alto potencial tecnológico, pois, além da eficiência nutricional, apresentam capacidade de resposta, podendo ser explorados a dupla aptidão. Para programas de melhoramento, recomenda-se a exploração de genótipos de Conilon 67 e 02 (CV-01 e CV-12), pois estes apresentam simultaneamente alta absorção e eficiência de utilização de N, P e K.

Genótipos de cafeeiro Conilon possuem características diferenciadas de acúmulo de massa seca (PREZOTTI & BRAGANÇA, 2013; PARTELLI et al., 2014a; MARRÉ et al., 2015), eficiência e responsividade (MARTINS et al., 2013a; MARTINS et al., 2013b; MACHADO et al., 2016) mesmo quando adubadas com doses semelhantes de nutrientes. A variação genética é um dos principais fatores que promovem diferenças em relação à nutrição mineral de genótipos de uma mesma espécie, sendo fator de extrema importância na investigação de genótipos com potencial de adaptação às condições de limitação nutricional (MACHADO et al., 2004; TOMAZ et al., 2011).

Apesar do grande número de trabalhos que constata a diferença entre os genótipos quanto à eficiência de absorção e do uso de nutrientes, os mecanismos de ação pelo aumento da eficiência ainda não foram totalmente esclarecidos, requerendo novos estudos.

3. BASES GENÉTICAS DA NUTRIÇÃO MINERAL DE PLANTAS VOLTADAS AO MELHORAMENTO

A crescente demanda por aumento na produção de alimentos requer a expansão agrícola no mundo, aumentando a produção e produtividade dos cultivos. Dentro deste contexto, o fornecimento de elevadas doses de nutrientes contribui, significativamente, para o aumento da produtividade na agricultura. Entretanto, para tal é necessário a utilização racional das fontes de recursos não renováveis. Assim, a otimização da eficiência nutricional dos cultivos agrícolas é uma opção fundamental, não apenas para ampliar a produtividade e diminuir o custo de produção agrícola, mas também, para a prática de uma agricultura mais sustentável e menos impactante à natureza (FAGERIA, 1998).

As variações na absorção, transporte e redistribuição de nutrientes são influenciadas pelo controle genético (GABELMAN & GERLOFF, 1983), portanto, é possível melhorar e, ou, selecionar cultivares mais eficientes quanto ao uso de nutrientes. A eficiência de absorção de nutrientes pela raiz e a “preferência” por determinado elemento são características determinadas geneticamente, sendo as plantas capazes de absorver estes nutrientes contra um gradiente de concentração e acumulá-los, especialmente, no vacúolo.

Múltiplos fatores genéticos podem proporcionar alterações nas concentrações dos teores foliares dos nutrientes minerais, indicando que entre cultivares e entre linhagens existe maior ou menor eficiência de absorção, translocação ou utilização de nutrientes pela planta. Uma das formas da planta controlar a taxa de absorção dos nutrientes seria através do controle de expressão dos genes que codificam seus carreadores, canais e bombas.

São vários os mecanismos associados às características morfológicas e fisiológicas da planta que contribuem para maior utilização dos nutrientes, como: sistema radicular extenso que possibilita a exploração de maior volume do solo na busca de nutrientes e água principalmente em cultivos sequeiros (PARTELLI et al., 2014b; COUVRE et al., 2015), alta relação entre raízes e parte aérea, habilidade do sistema radicular em alterar a rizosfera (permitindo suplantar baixos níveis de nutriente), maior eficiência de absorção ou utilização de nutrientes, capacidade de sustentar o metabolismo normal com baixo teor de nutriente nos tecidos e

alta taxa fotossintética (MARTINS et al., 2015). As características morfológicas e fisiológicas das raízes contribuem decisivamente na eficiência de absorção e utilização de nutrientes como o fósforo e o potássio, que estão sujeitos aos mecanismos de difusão para serem transportados até as raízes (FURLANI et al., 1986).

Conhecer a alocação de nutrientes minerais é determinante para conhecer a exigência nutricional das plantas, em especial as do cafeeiro (LAVIOLA et al., 2007), permitindo assim maximizar a eficiência das adubações.

Em pesquisa avaliando a relação do sistema radicular e produtividade do café 'Conilon' de acordo com os métodos de propagado por sementes ou estaquia, não observaram diferenças quanto à taxa de assimilação fotossintética líquida de CO₂, nem quanto à condutância estomática, às concentrações internas de CO₂ e à eficiência do uso da água nas folhas, porém as plantas propagadas por estaquia foram mais produtivas (PARTELLI et al., 2014b), este resultado pode ter ocorrido devido as diferenças observadas na arquitetura e número de raízes secundárias verificadas, assim favorecendo uma possível maior absorção de nutrientes. Em estudo desenvolvido com café arábica em diferentes altitudes Laviola et al. (2008) verificaram variações nas concentrações de massa seca, N, P e K nos frutos, folhas e ramos produtivos nos períodos compreendidos entre a antese e a maturação. A ordem de acúmulo de macronutrientes pelos frutos, em mg por fruto, na época em que se obteve o máximo acúmulo foi: K (12,60) > N (9,79) > Ca (1,18) > Mg (0,78) > S (0,69) > P (0,65).

A relação entre a genética e a nutrição mineral de plantas tem ganhado maior atenção nos últimos anos, com o desenvolvimento de pesquisas em relação às variações no requerimento nutricional e na tolerância de plantas a condições de deficiência nutricional, e os resultados destes estudos indicam o desenvolvimento de cultivares capazes de se adaptarem a diferentes condições de solo, incluindo estresses nutricionais (AHMAD et al., 2001).

Pesquisas relacionadas a expressão de genes em cafeeiros que codificam transportadores ou reguladores de íons em plantas sob condições extremas de estresse são pouco ou quase nada avaliados. Contudo, alguns genes já foram identificados e caracterizados em plantas-modelo como *Arabidopsis*, em que os genes denominados hak e kea estão relacionados a transportadores de potássio,

denominados *hak* e *kea* (RODRÍGUEZ-NAVARRO & RUBIO, 2006). Informações referentes ao transporte de potássio em raízes de *Arabidopsis* revelaram que o gene *trh1* é responsável pela translocação de K^+ , que é essencial no crescimento de pelos radiculares (RIGAS et al., 2001). Descobertas recentes no que se refere ao isolamento e à caracterização de canais e transportadores de nutrientes também podem criar perspectivas para o melhoramento de plantas específicas, em especial para condições de estresses abióticos nutricionais.

A eficiência do uso de nutrientes (EU) é uma característica complexa, poligênica, muito influenciada pelo ambiente e no qual há considerável variação genética nos germoplasmas das principais culturas cultivadas (KANT et al., 2011). Portanto diversos genes e vias metabólicas estão associadas a maior ou menor EU. Dessa forma, uma única modificação de um constituinte metabólico, pode não ser suficiente para modificar expressivamente em mudanças da EU.

O mapeamento de *quantitative trait loci* (QTL) permite melhor entendimento sobre o controle genético e a herança da EU, indicando possíveis estratégias de seleção. Algumas pesquisas foram desenvolvidas voltadas a identificação de QTL de EU e regiões genômicas que possam estar envolvidas com EU em milho (GALLAIS & HIREL, 2004), arroz (CHO et al., 2007) e *Arabidopsis* (LOUDET et al., 2003) em condições de alta e baixa disponibilidade de N no solo. Desses QTL, vários são coincidentes para enzimas Glutamina Sintetase (GS) e Nitrato Redutase (NR) do metabolismo de N e caracteres relacionados à EU, principalmente em condições de baixa disponibilidade de N no solo (HIREL et al., 2007). Entretanto, até o presente momento, não há relatos na literatura de estudos de mapeamento de QTL visando a seleção de genótipos de *Coffea* eficiência de uso de nutrientes.

Alguns grupos de pesquisa têm buscado utilizar transformações genéticas em plantas no gênero *Coffea*, em especial nas espécies *C. arabica* e *C. canephora*, sejam por meio de *Agrobacterium* ou por biobalística, visando obter genótipos resistente a insetos, diminuir teor de cafeína, tolerância a seca e controle de maturação. Entretanto, não há relatos quanto à transformação visando genótipos mais eficientes no uso de nutrientes e, portanto, há uma enorme lacuna científica sobre o assunto a ser preenchida. Contudo, há alguns trabalhos em outras culturas de interesse que modificam a expressão de genes envolvidos na EU, como a modificação do promotor do gene da protease da senescência avançada dirigindo

a expressão da transferase isopentenil de *Agrobacterium* o que aumenta os níveis de citocinina em genótipos de milho e proporciona um fenótipo de *Stay green*, retardando a senescência e diminuindo a atividade fotossintética e os dias para o florescimento (ROBSON et al., 2004).

Alguns pesquisadores conseguiram realizar a superexpressão de uma isoforma da Glutamina Sintetase em genótipos de milho, o que propiciou o aumento de produtividade em 30% em relação as testemunhas não transgênicas (MARTIN et al., 2006), devido ao aumento da eficiência do uso do nitrogênio (EUN). Outros pesquisadores conseguiram aumentar na massa de grão em plantas de arroz por meio da superexpressão da NADH-GOGAT (TABUCHI et al., 2007).

Em outro estudo Lam et al. (2003) conseguiram aumentar a concentração de N em sementes de *Arabidopsis* com sintetase asparagina reforçada. Também há relatos de aumento de produtividade de grãos em condições de baixo suprimento de N em canola e arroz quando conseguiram a superexpressar a enzima alanina aminotransferase (BI et al., 2009). Dessa forma, estudos com diversas culturas demonstram que este é um caminho que pode ser trilhado e com elevada chance de obtenção de sucesso com a cultura do café.

Deste modo, é imprescindível que programas de melhoramento genético utilizem um conjunto de estratégias e métodos de melhoramento visando aumentar a eficiência do uso de nutrientes (EU) em genótipos de *Cofffea*. Mas também é possível fazer a seleção indireta de genótipos melhorados ou pré-melhorados em bancos ativos de germoplasmas quando se conhecem parâmetros que apresentam alta herdabilidade e controle genético, principalmente do tipo aditivo, que poderão ser realizados pelo desempenho individual, ou seja, o desempenho *per se* das linhagens ou das populações (FRITSCHENETO et al., 2011).

Quando o carácter for de baixa herdabilidade ou apresentar herança devido aos genes de efeito não aditivos, a seleção dos genótipos deverá ser realizada com base no desempenho em híbridos. Além disso, é importante ressaltar que, se houver efeito materno significativo, haverá diferenças na escolha de qual será o genitor feminino em determinado cruzamento.

Desta forma, deve-se atentar a herança genética existente na busca de genótipos eficientes e responsivos ao uso de recursos naturais, portanto é vital a adequada genotipagem e fenotipagem em banco ativo de germoplasma para

sucesso seletivo dos genótipos. A identificação e a quantificação de correlações genéticas entre os caracteres de eficiência nutricional e entre os caracteres agrônômicos permite programas de melhoramento genético realizar seleção indireta para caracteres de baixa herdabilidade e, ou, de difícil avaliação.

É fundamental a quantificação da interação do genótipo com os níveis de disponibilidade do nutriente. Quando significativo, a seleção deve ser efetivada de acordo com o desempenho dos genótipos em apenas um ambiente, pois as expressões dos genes ocorrem de forma diferenciada quanto a quantidade e formas, variando em detrimento da disponibilidade do nutriente no solo.

A eficiência de utilização de nutrientes apresenta controle genético, principalmente dos efeitos aditivos, dessa forma são recomendados a utilização de métodos de melhoramento intrapopulacionais de seleção recorrente. No entanto, quando existe efeito de heterose (efeitos não aditivos), os métodos interpopulacionais são mais adequados e rápidos para obter cultivares superiores em EU.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os desafios para os próximos anos está o de suprir as crescentes necessidades da população mundial, elevando a produção de alimentos em regiões onde há escassez e, melhorar a utilização de recursos não renováveis, podendo isso ser realizado por meio do desenvolvimento de uma agricultura altamente produtiva e sustentável. A despeito, para que esses objetivos sejam alcançados, é essencial o desenvolvimento de cultivares mais eficientes nutricionalmente, em especial para cultura do café, visto que é crescente demanda mundial pelo grão.

A ONU estima que para 2100 a população mundial seja de 14 bilhões de habitantes e o Brasil seja responsável por 40% da produção mundial de alimentos. Os desafios para a agricultura que já são vários e enormes, exigirão de melhoristas de plantas, além de dedicação, muito conhecimento científico a fim de continuarem contribuindo para solucionar o principal desafio da humanidade, a segurança alimentar.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Z.; GILL, M. A.; QURESHI, R. H. Genotypic variations of phosphorus utilization efficiency of crops. *Journal of Plant Nutrition*, v. 24, n. 8, p. 1149-1171, 2001.

AMARAL, J. F. T.; MARTINEZ, H. E. P.; LAVIOLA, B. G.; FERNANDES FILHO, E. I.; CRUZ, C. D. Eficiência de utilização de nutrientes por cultivares de cafeeiro. *Ciência Rural*, v. 41, n. 4, p. 621-629, 2011.

AMARAL, J. F. T.; MARTINS, L. D.; LAVIOLA, B. G.; CHRISTRO, L. F.; TOMAZ, M. A.; RODRIGUES, W. N. A differential response of physic nut genotypes regarding phosphorus absorption and utilization is evidenced by a comprehensive nutrition efficiency analysis. *Journal of Agricultural Science*, v. 4, n. 12, p. 164, 2012.

BARBER, S. A. Soil-plant interactions in the phosphorus nutrition of plants. Soil-plant interactions in the phosphorus nutrition of plants. 1980. p. 591-615.

BARBER, S. A. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. John Wiley & Sons, 1995.

BI, Y. M. KANT, S., CLARK, J., GIDDA, S., MING, F., XU, J., ROCHON, A.; SHELP, B. J.; HAO, L.; ZHAO, R.; MULLEN, R. T.; ZHU, T.; MULLEN, S. R. T. Increased nitrogen-use efficiency in transgenic rice plants over-expressing a nitrogen-responsive early nodulin gene identified from rice expression profiling. *Plant, cell & environment*, v. 32, n. 12, p. 1749-1760, 2009.

BRAGANÇA, S. M.; DE CARVALHO, C. H. S.; DA FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G. Variedades clonais de café conilon para o Estado do Espírito Santo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 36, n. 5, p. 765-770, 2001.

BRAGANÇA, S. M.; MARTINEZ, H. E. P.; LEITE, H. G.; SANTOS, L. P.; LANI, J. A., SEDIYAMA, C. S.; ALVAREZ, V. H. Acumulação de matéria seca pelo cafeeiro conilon. *Ceres*, v. 57, n. 1, 2010.

CHO, Y. I.; JIANG, W.; CHIN, J. H.; PIAO, Z.; CHO, Y. G.; MCCOUCH, S. R.; KOH, H. J. Identification of QTLs associated with physiological nitrogen use efficiency in rice. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, v. 23, n. 1, 2007.

CHRISTO, L. F.; MARTINS, L. D.; COLODETT, T. V.; RODRIGUES, W. N.;

BRINATE, S. B.; DO AMARAL, J. E. F. T.; TOMAZ, M.A.;LAVIOLA, B. G. Differences between genotypes of *Jatropha curcas* L. are evidenced for absorption and use of nitrogen. African Journal of Agricultural Research, v. 9, n. 26, p. 2085-2094, 2014.

CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, Programa de frijol. Informe Annual, Cali, Colombia, p.12-13. 1978.

COVRE, A. M.; PARTELLI, F. L.; GONTIJO, I.; ZUCOLOTO, M. Distribuição do sistema radicular de cafeeiro conilon irrigado e não irrigado. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 50, n. 11, p. 1006-1016, 2015.

DALCOMO, J. M.; VIEIRA, H. D.; FERREIRA, A.; LIMA, W. L.; FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F.; FERRÃO, M.A.; PARTELLI, F Evaluation of genetic divergence among clones of conilon coffee after scheduled cycle pruning. Genetics and molecular research: GMR, v. 14, p. 15417-15426, 2015.

DAMATTA, F. M.; RONCHI, C. P.; MAESTRI, M.; BARROS, R. S. Ecophysiology of coffee growth and production. Brazilian journal of plant physiology, v. 19, n. 4, p. 485-510, 2007.

FAGERIA, N. K. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em periódico indexado. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, v. 2, n. 1, p. 6-16, jan./abr. 1998.

FAVARIN, J. L.; VITTI, G. C.; DOURADO NETO, D.; FAVARIN JUNIOR, J. L.; SALGADO, P. R. Relationship between zinc content in coffee plants and soil availability according to the soil extractant. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 31, n. 5, p. 1191-1196, 2007.

TEIXEIRA FERNANDES, A. L.; PARTELLI, F. L.; BONOMO, R.; GOLYNSKI, A. A moderna cafeeicultura dos cerrados brasileiros. Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics), v. 42, n. 2, p.231-240, 2012.

FERRÃO, R. G.; CRUZ, C. D.; FERREIRA, A.; CECON, P. R.; FERRÃO, M. A. G.; DA FONSECA, A. F. A.; CARNEIRO, P.C. DE SOUZA.; DA SILVA, M. F. Parâmetros genéticos em café Conilon. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 43, n. 1, p. 61-69, 2008.

FERREIRA, A. D.; DE CARVALHO, A. M.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, G. R.; BOTELHO, C. E.; CARVALHO, J. G. Absorção, translocação e eficiência

no uso dos macronutrientes em cafeeiros (*Coffea arabica* L.) enxertados em Apoaã IAC 2258 (*Coffea canephora*). Interciência, v. 35, n. 11, 2010.

FERREIRA, A. D.; CARVALHO, G. R.; ABRAHÃO, J. C. R.; REZENDE, R. M.; BOTELHO, C. E.; CARVALHO, A. M. D. Dynamics of micronutrient in grafted coffee. Revista Ceres, v. 60, n. 2, p. 262-269, 2013.

FEUILLET, C.; LANGRIDGE, P.; WAUGH, R. Cereal breeding takes a walk on the wild side. TRENDS in Genetics, v. 24, n. 1, p. 24-32, 2008.

DA FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; VERDIN FILHO, A. C.; VOLPI, P. S.; ZUCATELI, F. 'Conilon Vitória - Incaper 8142': improved *Coffea canephora* var. kouillou clone cultivar for the state of Espírito Santo. Crop Breeding and Applied Biotechnology, v. 4, p. 503-505, 2004.

FOX, R. H. Selection for phosphorus efficiency in corn. Communications in Soil Science & Plant Analysis, v. 9, n. 1, p. 13-37, 1978.

FRITSCHÉ-NETO, R.; MIRANDA, G. V.; DELIMA, R. O.; DE SOUZA, L. V.; DA SILVA, J. Herança de caracteres associados à eficiência de utilização do fósforo em milho. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 45, n. 5, p. 465-471, 2011.

FURLANI, A. M. C.; BATAGLIA, O. C.; AZZINI, L. E. Comportamento diferencial de linhagens de arroz na absorção e utilização de nitrogênio em solução nutritiva. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 10, n. 2, p. 51-59, 1986.

GABELMAN, W. H.; GERLOFF, G. C. The search for and interpretation of genetic controls that enhance plant growth under deficiency levels of a macronutrient. Plant and Soil, v. 72, n. 2, p. 335-350, 1983.

GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in Maize. Journal of experimental botany, v. 55, n. 396, p. 295-306, 2004.

GOMES, W. R.; RODRIGUES, W. P.; VIEIRA, H. D.; OLIVEIRA, M. G.; DIAS, J. R. M.; PARTELLI, F. L. Genetic diversity of standard leaf nutrients in *Coffea canephora* genotypes during phenological phases. Genetics and molecular research: GMR, v. 15, n. 4, 2016.

HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLÉRÉ, I. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. Journal of Experimental Botany, v. 58, n.9, p. 2369-2387, 2007.

ICO (International Coffee Organization). Trade statistics. Disponível em: <http://www.ico.org>. Acesso em 13 de fevereiro de 2018.

KANT, S.; BI, Y. M.; ROTHSTEIN, S. J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 4, p. 1499-1509, 2011.

LAM, H. M.; WONG, P.; CHAN, H. K.; YAM, K. M.; CHEN, L.; CHOW, C. M.; CORUZZI, G. M. Overexpression of the *ASN1* gene enhances nitrogen status in seeds of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, v. 132, n. 2, p. 926-935, 2003.

LAVIOLA, B.G.; MARTINEZ, H. E.P.; SALOMÃO, L. C. C.; CRUZ, C. D.; MENDONÇA, S. M. Acúmulo de nutrientes em frutos de cafeeiro em quatro altitudes de cultivo: cálcio, magnésio e enxofre. *Revista brasileira de ciência do solo*, v. 31, n. 6, 2007.

LAVIOLA, B. G.; MARTINEZ, H. E. P.; SALOMÃO, L. C. C.; CRUZ, C. D.; MENDONÇA, S. M.; ROSADO. Acúmulo em frutos e variação na concentração foliar de N P K em cafeeiro cultivado em quatro altitudes. *Bioscience journal*, v. 24, n. 1, 2008.

LI, B.; MCKEAND, S. E.; ALLEN, H. L. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings. *Forest Science*, v. 37, n. 2, p. 613-626, 1991.

LOUDET, O.; CHAILLOU, S.; MERIGOUT, P.; TALBOTEC, J.; DANIEL-VEDELE, F. Quantitative trait loci analysis of nitrogen use efficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 131, n. 1, p. 345-358, 2003.

MACHADO, C. T. D. T.; MACHADO, A. T.; FURLANI, Â. M. C. Variação intrapopulacional em milho para características relacionadas com a eficiência de absorção e utilização de fósforo. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 3, n. 01, 2004.

MACHADO, L. S.; MARTINS, L. D.; RODRIGUES, W. N.; FERREIRA, D. S.; CÔGO, A. D.; TOMAZ, M. A.; DO AMARAL, J. F. T. Efficiency and response of conilon coffee genotypes to nitrogen supply. *African Journal of Biotechnology*, v. 15, n. 35, p. 1892-1898, 2016.

MARRACCINI, P.; VINECKY, F.; ALVES, G. S.; RAMOS, H. J.; ELBELT, S.; VIEIRA, N. G.; CARNEIRO, F.A.; SUJII, P.S.; ALEKCEVETCH, J.C.; SILVA, V.A., DAMATTA, F. M., FERRÃO, M.A.; LEROY, T.; POT, D.; VIEIRA, L.G.E.; DA SILVA, F.R.; ANDRADE, A.C.; Differentially expressed genes and proteins

upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. *Journal of Experimental Botany*, 2012. p. 103

MARRÉ, W. B.; PARTELLI, F. L.; ESPINDULA, M. C.; DIAS, J. R. M.; GONTIJO, I.; VIEIRA, H. D. Micronutrient accumulation in conilon coffee berries with different maturation cycles. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 39, n. 5, p. 1456-1462, 2015.

MARTIN, A.; LEE, J.; KICHEY, T.; GERENTES, D.; ZIVY, M.; TATOUT, C.; ... & TERCÉ-LAFORGUE, T.; HABASH, D.Z.; LEA, P.J.; CHARCOSSET, A.; PERES, P. MURIGNEUX, A.; SAKAKIBARA, H.; EDWARDS, K.J.; HIREL, B.; Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *The Plant Cell*, v. 18, n. 11, p. 3252-3274, 2006.

MARTINS, L. D.; TOMAZ, M. A.; AMARAL, J. F. T. D.; BRAGANÇA, S. M.; MARTINEZ, H. E. P. Efficiency and response of conilon coffee clones to phosphorus fertilization. *Revista Ceres*, v. 60, n. 3, p. 406-411, 2013a.

MARTINS, L. D.; TOMAZ, M. A.; DO AMARAL, J. F. T.; BRAGANÇA, S. M.; RODRIGUES, W. N.; DOS REIS, E. F. Nutritional efficiency in clones of conilon coffee for phosphorus. *Journal of Agricultural Science*, v. 5, n. 1, p. 130, 2013b.

MARTINS, L. D.; TOMAZ, M. A.; DO AMARAL, J. F. T.; CHRISTO, L. F.; RODRIGUES, W. N.; COLODETTI, T. V.; BRINATI, S. V. B. Alterações morfológicas em clones de cafeeiro conilon submetidos a níveis de fósforo. *Scientia Plena*, v. 9, n. 4, 2013c.

MARTINS, L. D.; TOMAZ, M. A.; DO AMARAL, J. F. T.; CHRISTO, L. F.; RODRIGUES, W. N.; COLODETTI, T. V.; BRINATI, S. V. B. Evidence of genetic tolerance to low availability of phosphorus in the soil among genotypes of *Coffea canephora*. *Genet. Mol. Res*, v. 14, p. 10576-10587, 2015.

MARTINS, L. D.; RODRIGUES, W. N.; MACHADO, L. S.; BRINATE, S. V. B.; COLODETTI, T. V.; FERREIRA, D. S.; COGÔ, A.D.; APOSTÓLICO, M.A.; TEORDORO, P.E.; TOMAZ, M.A.; DO AMARAL, J. F. T.; PARTELLI, F.L.; RAMALHO, J.C. Genotypes of conilon coffee can be simultaneously clustered for efficiencies of absorption and utilization of N, P and K. *African Journal of Agricultural Research*, v. 11, n. 38, p. 3633-3642, 2016.

MONTAGNON, C.; PHILIPPE, C.; THIERRY, L. Amélioration génétique du caféier *Coffea canephora* Pierre: connaissances acquises, stratégies et perspectives. *Cahiers Agriculture*, Paris, v. 21, n. 2-3, p. 143-153, 2012.

PARTELLI, F. L.; ESPINDULA, M. C.; MARRÉ, W. B.; VIEIRA, H. D Dry matter and macronutrient accumulation in fruits of conilon coffee with different ripening cycles. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 38, n. 1, p. 214-222, 2014a.

PARTELLI, F. L.; COVRE, A. M.; OLIVEIRA, M. G.; ALEXANDRE, R. S.; VITÓRIA, E. L. D.; SILVA, M. B. D. Root system distribution and yield of Conilon' coffee propagated by seeds or cuttings. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 49, n. 5, p. 349-355, 2014b.

PEDROSA, A. W.; FAVARIN, J. L.; DE VASCONCELOS, A. L. S.; CARVALHO, B. V.; OLIVEIRA, F. B.; NEVES, G. B. Resíduo de *brachiaria* fertilizada com nitrogênio na adubação do cafeeiro. *Coffee Science*, v. 9, n. 3, p. 366-373, 2014.

PREZOTTI, L. C.; BRAGANÇA, S. M. Acúmulo de massa seca, N, P e K em diferentes materiais genéticos de café Conilon. *Coffee Science*, v. 8, n. 3, p. 284-294, 2013.

RAMALHO, A. R.; ROCHA, R. B.; SOUZA, F. F.; VENEZIANO, W.; TEIXEIRA, A. L. Progresso genético da produtividade de café beneficiado com a seleção de clones de cafeeiro Conilon. *Revista Ciência Agronômica*. v. 47, p. 516-523, 2016.

RAMOS, L. C. S.; LIMA, M. M. A. Avaliação da superfície relativa do sistema radicular de cafeeiros. *Bragantia*, v. 39, n. 1, p. 1-5, 1980.

REIS JR. R. A.; MARTINEZ, H. E. P. Adição de Zn e absorção, translocação e utilização de Zn e P por cultivares de cafeeiro. *Scientia agricola*, v.59, n.3, p.537-542, 2002.

RIGAS, S. et al. TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs. *The Plant Cell Online*, v. 13, n. 1, p. 139-151, 2001.

ROBSON, P. R.; DONNISON, I. S.; WANG, K.; FRAME, B.; PEGG, S. E.; THOMAS, A.; THOMAS, H. Leaf senescence is delayed in maize expressing the *Agrobacterium* IPT gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter. *Plant Biotechnology Journal*, v. 2, n. 2, p. 101-112, 2004.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, A.; RUBIO, F. High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, n. 5, p. 1149-1160, 2006.

RODRIGUES, W. N.; COLODETTI, T. V.; MARTINS, L. D.; BRINATE, S. V.

B.; TOMAZ, M. A.; DO AMARAL, J. F. T. Nutritional components of growth of Arabica coffee genotypes cultivated under different levels of phosphorus fertilization studied by path analysis. *Australian Journal of Crop Science*, v. 9, n. 12, p. 1214, 2015.

SACRAMENTO, L. V. S.; ROSOLEM, C. A. Eficiência de absorção e utilização de potássio por plantas de soja em solução nutritiva. *Bragantia*, v. 57, n. 2, p. 355-365, 1998.

SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. *Journal of plant nutrition*, v. 4, n. 3, p. 289-302, 1981.

SWIADER, J. M.; CHYAN, Y.; FREIJI, F. G. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids 1. *Journal of Plant Nutrition*, v. 17, n. 10, p. 1687-1699, 1994.

TABUCHI, M.; ABIKO, T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of experimental botany*, v. 58, n. 9, p. 2319-2327, 2007.

TIFFNEY, B. H.; NIKLAS, K. J. Clonal growth in land plants: a paleobotanical perspective. In TOMAZ, M. A. et al. Eficiência de absorção, translocação e uso de cálcio, magnésio e enxofre por mudas enxertadas de *Coffea arabica*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 27, n. 5, 2003.

TOMAZ, M. A.; MARTINEZ, H. E. P.; SAKIYAMA, N. S.; CRUZ, C. D.; PEREIRA, A. A. Absorption, translocation and utilization of zinc, copper and manganese in grafted seedlings of *Coffea arabica*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 30, n. 2, p. 377-384, 2006.

TOMAZ, M. A.; MARTINEZ, H. E. P.; CRUZ, C. D.; FERRARI, R. B.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. Genetics differences in the efficiency of absorption, translocation and use of K, Ca and Mg in grafted seedlings of coffee. *Ciência Rural*, v. 38, n. 6, p. 1540-1546, 2008.

TOMAZ, M. A.; PRIETO MARTINEZ, H. E.; NUNES RODRIGUES, W.; BINDA FERRARI, R.; ALVES PEREIRA, A.; SUSSUMU SAKIYAMA, N. Eficiência de absorção e utilização de boro, zinco, cobre e manganês em mudas enxertadas de cafeeiro. *Revista Ceres*, v. 58, n. 1, 2011.

TOMAZ, M. A.; Martins, L. D.; AMARAL, J. F. T.; RODRIGUES, W. N.;

BRINATE, S.V.B. Adubação Fosfatada no Cafeeiro Conilon. In: Fábio Luiz Partelli; Marcos Goes Oliveira; Marcelo Barreto da Silva. (Org.). Café Conilon: Qualidade, Adubação e Irrigação. 1 ed. São Mateus - ES, 2013, v. 1, p. 123-142.

WISSUWA, M.; MAZZOLA, M.; PICARD, C. Novel approaches in plant breeding for rhizosphere-related traits. *Plant and Soil*, v. 321, n. 1-2, p. 409, 2009.

Capítulo 13

RNA-SEQ: PRINCIPAIS CONCEITOS E CUIDADOS

Drielli Canal

Paola de Avelar Carpinetti-Oliveira

Camila Miranda Lopes-Ramos

Otávio José Bernardes Brustolini

Marcia Flores da Silva Ferreira

1. INTRODUÇÃO

Na década de 60 a primeira sequência de ácido ribonucleico (RNA) decifrada foi o RNA transportador (tRNA) da alanina, contendo 76 nucleotídeos. Cerca de 12 anos depois, um grupo de pesquisadores propuseram o sequenciamento do ácido desoxirribonucleico (DNA) pelo método de terminação de cadeia que utiliza ddNTPs (didesoxirribonucleosídeos trifosfatados), que não possuem o grupo hidroxila (3'-OH). A medida que os ddNTPs vão sendo incorporados aleatoriamente na cadeia de DNA, a ligação fosfodiéster não é formada, e a extensão da cadeia é interrompida. No mesmo ano, outro grupo de pesquisadores liderado por Gilbert desenvolveram o método de sequenciamento baseado no tratamento com substâncias químicas que clivam a molécula de DNA em nucleotídeos específicos. Para ambos os métodos, são produzidos fragmentos de diferentes tamanhos, marcados radioativamente, que são separados pelo princípio de eletroforese, possibilitando determinar a ordem das sequências de nucleotídeos que compõem os fragmentos da molécula de DNA (SHENDURE et al., 2017).

Com a automação das metodologias e paralelização dos processos, novas abordagens foram desenvolvidas a passos acelerados, e uma revolução das técnicas se denotou a partir de 2005, com surgimento de tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), baseadas no sequenciamento de alto desempenho ou *High Throughput Sequencing*. Essas metodologias tornaram possível o sequenciamento e análises de milhões de pares de bases em uma única corrida, com redução

considerável de quantidade amostral exigida, tempo e custo por base sequenciada. Com isso, permitiu gerar dados altamente informativos sobre a estrutura e conteúdo de genomas, transcriptomas e epigenomas afim de decifrar o código genético de organismos complexos, incluindo aqueles de interesse econômico para o homem (SHENDURE et al., 2017).

Algumas técnicas foram desenvolvidas para caracterizar e quantificar o transcriptoma, com destaque para o método denominado RNA-Seq, que se aplica a várias plataformas NGS. Dentre as principais aplicações da técnica podemos destacar: identificação e quantificação da expressão diferencial de genes, identificação de novos transcritos (RNAs mensageiros e pequenos RNAs), interpretação de elementos funcionais do genoma (regiões codificadores, não codificadores de proteínas, sequências reguladoras), determinação de sua estrutura transcricional (locais de início, extremidades 5' e 3'), detecção de polimorfismos (ex. SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*) e *indels* (pequenas inserções e deleções), bem como desvendar padrões de *splicing* alternativos ou novas isoformas (STEGLE et al., 2015; TRAPNELL et al., 2010; WANG et al., 2009; PICARDI, 2015).

Em eucariotos, o transcriptoma apresenta alto grau de complexidade, como a existência de elementos repetitivos, transposons, duplicações gênicas e variações nos níveis de ploidia. Além disso, o transcriptoma compreende de múltiplos conjuntos de RNAs que podem variar em dado conjunto celular, estágio específico de desenvolvimento ou condição fisiológica, sendo que um único gene poder originar múltiplos transcritos diferentes (isoformas). Essas propriedades refletem na plasticidade fenotípica encontrada nos organismos e sua relação com a heterogeneidade ambiental, que para plantas tem impacto significativo na evolução, ecologia e agricultura (WANG et al., 2009; ZHOU et al., 2012; TRAPNELL et al., 2010).

A técnica de RNA-Seq envolve múltiplas etapas, tais como isolamento do RNA, transcrição reversa, ligação de adaptadores, amplificação, sequenciamento e análise de dados. Ajustes apropriados em cada etapa dependem do objetivo específico de cada estudo (HAN et al., 2015; MERINO et al., 2016). Este capítulo discute as principais estratégias que devem ser consideradas em um delineamento experimental e análises de dados para RNA-Seq, os desafios associados a cada

etapa e fornece uma visão geral da aplicação dessa abordagem no melhoramento de plantas.

2. ASPECTOS GERAIS DA TECNOLOGIA DE RNA-SEQ

As moléculas de RNA podem ser diretamente sequenciadas, porém apresentam natureza instável e sofrem degradação rapidamente fora da célula (OZSOLAK et al., 2009). No geral, a maioria dos experimentos de RNA-Seq partem do princípio de isolamento de um subconjunto desejado de amostras de RNA, que são convertidos em bibliotecas de DNA complementar (cDNA), por meio de transcrição reversa. Em seguida as moléculas são fragmentadas aleatoriamente ou amplificadas em regiões de interesse, com posterior ligação de adaptadores e sequenciamento (Figura 1) (WANG et al., 2009).

As tecnologias NGS não conseguem sequenciar moléculas longas de uma vez. Portanto, são sequenciados fragmentos de sequências, conhecidos como leituras (*reads*), que variam de tamanho (20 a 20.000 nucleotídeos) dependendo da tecnologia utilizada. Normalmente, quanto maior o tamanho do fragmento da sequência obtido menor a acurácia do sequenciamento. Esse fato pode ser compensado pela geração de milhões de leituras que abrangem várias vezes um gene expresso (GOODWIN et al., 2016; MERINO et al., 2016).

Para a identificação das sequências geradas, podem ser utilizados softwares que comparam cada sequência gerada com sequências conhecidas e depositadas em banco de dados genômicos ou de transcritos, quando o organismo é bem estudado e possui essa informação disponível. Uma outra abordagem se aplica a montagem *de novo*, termo originado do latim (do início), no qual o transcriptoma pode ser inferido na ausência de uma sequência genômica de referência, o que tem possibilitado um grande avanço para pesquisas em organismos não modelo (ZHAO et al., 2011; CONESA et al., 2016). Ao final, os níveis de expressão de cada gene em determinada amostra podem ser quantificados e, normalmente, essa contagem baseia-se no número de sequências correspondentes a cada gene, denominados *counts* (Figura 1).

Tabela 1. Principais aplicações de RNA-Seq.

| Aplicação | Descrição |
|--|--|
| Sequenciamento total de RNA (<i>Total RNA Sequencing</i>) | Sequenciamento de todas as espécies de RNA presentes na amostra (exceto rRNA que geralmente são depletados devido a sua abundância). Reflete a expressão global de transcritos. Avaliação da expressão gênica diferencial. Detecção de novos transcritos. Detecção de RNAs precursores (por exemplo; pré-miRNA). Investigação de formas alternativas de splicing. |
| Sequenciamento de mRNA (<i>mRNA Sequencing</i>) | Isolamento e sequenciamento de mRNAs maduros (sofreram o processamento celular, possuem a cauda poli-A e o 5'-CAP). Detecção de novos mRNAs. Avaliação da expressão gênica diferencial. Investigação de formas alternativas de splicing. |
| Sequenciamento de RNA direcionado (<i>Targeted RNA-Seq</i>) | Sequenciamento de um conjunto específico de genes ou transcritos. Análise de genes e transcritos pouco expressos. Expressão específica de genes em amostras como FFPE (<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>). Avaliação da expressão gênica diferencial. Investigação de formas alternativas de <i>splicing</i> . |
| Sequenciamento de RNAs pequenos (<i>Small RNA Sequencing</i>) | Isolamento e sequenciamento de pequenos RNAs. Avaliação da expressão gênica diferencial. Detecção de novos transcritos. Investigação de formas alternativas de <i>splicing</i> . Compreensão do silenciamento gênico e da regulação pós-transcricional da expressão gênica. |
| Perfil Ribossomal (<i>Ribosome Profiling</i>) | Sequenciamento de fragmentos de mRNA protegidos pelo ribossomo. Obtenção de informações de mRNAs que estão sendo ativamente traduzidos, em uma célula em um determinado momento. Identificação dos sítios de início da tradução. Distribuição dos ribossomos em um mRNA. Prevê a abundância de proteínas. Avaliação da expressão gênica diferencial. |

RNA-seq apresenta vantagens em relação a outras técnicas de quantificação de RNA, tais como microarranjo (*microarray*), qRT-PCR e métodos de sequenciamento SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), CAGE (*Cap Analysis of Gene Expression*) e MPSS (*Massively Parallel Signature Sequencing*). Por exemplo, não depende obrigatoriamente de um conhecimento prévio do genoma; o custo vem diminuindo enquanto o número de sequências geradas aumentando; possui alta sensibilidade e reprodutibilidade; capacidade de detectar ampla faixa de expressão (incluindo níveis muito baixos); apresenta baixas taxas de erros experimentais; maior facilidade no preparo de amostras, sendo necessárias pequenas quantidades de amostras de RNA para o sequenciamento (WANG et al., 2009; CARVALHO; SILVA, 2010).

Dentre as inúmeras e crescentes aplicações da técnica de RNA-Seq, pode-se destacar algumas bem estabelecidas e de grande utilidade na tabela 1 e sua breve descrição.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Verificações devem ser aplicadas em várias etapas de um experimento para garantir a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados (MERINO et al., 2016; CONESA et al., 2016). A primeira etapa a ser considerada é responder uma pergunta biológica de interesse. E a partir da pergunta, considerar eficientemente quais recursos serão necessários para responder com confiança e desenhar um projeto experimental adequado. A figura 2 resume os principais passos que devem ser considerados em um delineamento experimental de RNA-Seq.

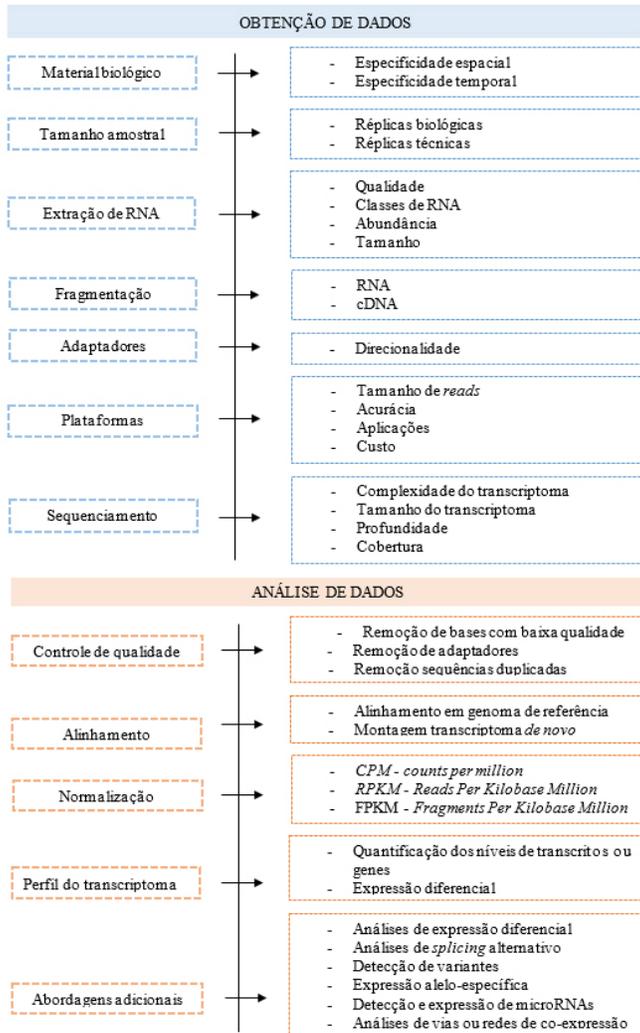


Figura 2. Fluxograma geral de pontos de checagem para análises de RNA-Seq.

3.1. Material biológico

É importante capturar o máximo de informações sobre as propriedades das amostras para posterior análises e interpretação de dados. Deve-se considerar que existe especificidade espacial, onde pode existir expressão diferencial entre células ou tecido específico e especificidade temporal, de forma que diferentes estágios

de desenvolvimento e de estímulos externos mostrarão assinaturas de expressão única.

Quando se inicia um experimento envolvendo RNA-Seq, a escolha do material biológico a ser utilizado não é trivial, principalmente quando se leva em consideração quais espécies de RNA estão sob investigação, que podem diferir em tamanho, sequência, características estruturais e abundância (HRDLICKOVA et al., 2017; KUKURBA et al., 2015).

3.2. Tamanho amostral

O tamanho amostral de cada experimento deve ser cuidadosamente considerado para que os resultados obtidos sejam confiáveis e reproduzíveis. Em um dado experimento, pode-se observar uma variação entre as amostras, refletindo nas diferenças naturais e independentes do experimento (variação biológica) ou por artefatos gerados durante a manipulação experimental (variação técnica) (AUER; DOERGE, 2010).

Identificar cada uma das duas variações e tentar reduzi-las é uma etapa crítica. Uma forma de reduzir o viés obtido pela variação técnica é por meio da utilização de réplicas experimentais, que se comportam de forma similar. Quando o experimento envolve um grande número de amostras que serão processadas em diferentes plataformas de sequenciamento ou em diferentes lotes, é importante incluir réplicas técnicas a partir da mesma amostra e processar aleatoriamente, afim de eliminar fatores desconhecidos que potencialmente podem afetar o resultado (CONESA et al., 2016).

Para reduzir a variação biológica devem ser realizadas réplicas biológicas, que são amostras com a mesma característica que definem um grupo de estudo e são a forma mais desejada de repetições pois fornecem a variação real entre as amostras biológicas. Quando o objetivo principal do trabalho é determinar estatisticamente os genes diferencialmente expressos, é recomendado pelo menos três repetições biológicas para cada condição. Para identificação de genes pouco expressos ou para resultados mais robustos de RNA-Seq são indicadas pelo menos 12 repetições biológicas (MERINO et al., 2016; CONESA et al., 2016; SCHURCH et al., 2016).

Como controle experimental, no início da construção de bibliotecas podem ser incluídos *spike-ins*, que são sequências controle de RNA com concentrações conhecidas e utilizadas nas etapas de análise computacional como padrões de expressão, para quantificar a abundância de transcritos, normalizar os dados e identificar análises contendo erros (CONESA et al., 2016; KUKURBA et al., 2015; ENDRULLAT et al., 2016).

3.3. Extração de RNA

Torna-se essencial extrair RNA de boa qualidade, intacto, e que representa o máximo de informação biológica. A integridade do RNA afeta diretamente os resultados do sequenciamento e pode ser mensurada pelo número de integridade do RNA (RIN, do inglês *RNA Integrity Number*), que varia de 0 a 10 em ordem crescente de integridade, com valores ideais considerados acima de 6 e é calculado com base nos picos das subunidades ribossômicas 18S e 28S. No entanto, é possível realizar experimentos de RNA-Seq com amostras de baixa qualidade de RNA, como por exemplo material fixado em parafina, mas apresenta algumas restrições quanto a análise de dados (KUKURBA et al., 2015).

Outro aspecto relevante na escolha do protocolo de extração de RNA, é a remoção de espécies de RNA que não são alvo do estudo, tais como RNA ribossômico (rRNA), RNA transportador (tRNA) e RNAs codificadores de histonas. Visto que o interesse de muitos estudos é interrogar a informação contida no RNA mensageiro (mRNA) pois codifica proteínas ou RNAs que participam de mecanismos de regulação, tais como pequenos RNAs (miRNAs, piRNAs, siRNAs) (CONESA et al., 2016; PICARDI, 2015).

Para mRNA bacteriano e RNAs poli (A-) tais como ncRNAs, snoRNAs, snRNAs, uma alternativa viável é a depleção ribossômica, ou seja, remoção do rRNA, mais abundante nas células e de pouco interesse para esses estudos. Para eucariotos, o método mais utilizado envolve protocolos que enriqueçam o mRNA com a seleção de RNAs que contenham a cauda poli-A (RNAs poli (A+)), tais como codificadores de proteínas e longos (lncRNAs > 200 nt), que representam somente 1 a 5% do RNA total (CONESA et al., 2016; PICARDI, 2015; HRDLICKOVA et al., 2017).

Outro método que remove RNAs abundantes é a realização de desnaturação e renaturação da dupla fita de cDNA na presença de nucleases específicas (DSN, do inglês *duplex-specific nuclease*), que digerem preferencialmente RNAs mais abundantes, que reanelam na dupla fita mais rapidamente do que menos abundantes. No entanto, essa abordagem dificulta algumas análises para amostras com pouca quantidade ou baixa qualidade de RNA (KUKURBA et al., 2015; HRDLICKOVA et al., 2017).

Novas abordagens também estão sendo desenvolvidas para enriquecer seletivamente regiões de interesse do transcriptoma, tais como a captura com base em hibridização, que utiliza um conjunto RNAs com sequências complementares aos genes de interesse. Também podem ser ligados oligonucleotídeos amplificados durante a transcrição reversa, sendo vantajosos para amostras parcialmente degradadas ou em pouca quantidade. Entretanto podem selecionar regiões que não apresentam interesse (*off-target*) devido anelamentos inespecíficos, e são dependentes de desenvolvimento específico para espécies estudadas (HRDLICKOVA et al., 2017; KUKURBA et al., 2015).

Para o estudo de pequenos RNAs, pode ser realizada a seleção de RNAs por meio de eletroforese em gel, onde é realizada uma corrida do RNA total extraído, corta-se a região com tamanho de interesse (14-30 nucleotídeos), e realiza-se a purificação. Podem também ser isolados por imunoprecipitação com anticorpos específicos para proteínas associadas a essas classes de RNA (HAFNER et al., 2008).

3.4. Fragmentação do RNA

A maioria das plataformas de NGS apresentam limitações quanto ao tamanho do fragmento que são capazes de sequenciar. Portanto, devem ser gerados fragmentos curtos antes do sequenciamento. A fragmentação pode ser feita diretamente no RNA ou no cDNA. Os RNAs podem ser fragmentados com soluções alcalinas, cátions divalentes (Mg^{2+} , Zn^{2+}) ou enzimas (RNase III), que clivam em sítios randômicos. Já as moléculas de cDNA podem ser fragmentadas por meio de Dnases pelo método baseado em transposons (HRDLICKOVA et al., 2017; BORODINA et al., 2011).

A vantagem de se fragmentar o RNA antes da construção da biblioteca permite que as sequências tenham uma distribuição uniforme ao longo do transcriptoma. Enquanto que na fragmentação do cDNA, estruturas secundárias de RNA se formam anterior a sua síntese ocasionando distorção e uma distribuição não uniforme de sequências ao longo do transcriptoma. Além disso, a fragmentação do cDNA é muito mais lenta e necessita de enzimas específicas (BORODINA et al., 2011).

3.5. Adaptadores

A ligação de adaptadores é uma etapa importante da construção das bibliotecas pois permitem a ligação de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para realizar a amplificação dos fragmentos, pelo método da Polimerase em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) e também permitem iniciar a reação de sequenciamento. Os adaptadores também podem ser utilizados para obter informações da direção que os transcritos se encontram no genoma.

Como alguns genes podem estar parcialmente ou completamente sobrepostos na mesma fita do DNA ou em fitas opostas, conhecer a polaridade do RNA é importante para identificar RNAs em ambas as fitas (senso e anti-senso), bem como seu tamanho exato. A identificação da direcionalidade das fitas também auxilia na montagem de transcriptoma *de novo* e detecção de polimorfismos como SNPs (BORODINA et al., 2011; MARTIN et al., 2013).

A direcionalidade das fitas pode ser detectada pela metodologia de adição de nucleotídeos UTP (deoxy-UTP) após a síntese da segunda cadeia de cDNA, e posterior remoção dessa fita por digestão enzimática. É possível também identificar a polaridade das fitas pelo método de Pedegrine, que consiste na ligação de oligonucleotídeos iniciadores ao fragmento, extensão das fitas de cDNA pela transcriptase reversa e incorporação de adaptadores (como *barcodes*) às extremidades do cDNA. E também outro método baseado na separação temporária da dupla-fita de DNA (*breathing*) para introduzir a sequência de adaptador (método BrADSeq) (HRDLICKOVA et al., 2017). Levin e colaboradores (2010) compararam sete métodos de construção de bibliotecas, avaliando a polaridade e especificidade das cadeias e no geral, o método dUTP foi o mais preciso e tem a

vantagem de ser compatível com o sequenciamento *paired-end*.

Após a obtenção das bibliotecas, o sequenciamento pode ser realizado para apenas uma extremidade dos fragmentos (do inglês *single-end*) ou são sequenciadas as duas extremidades dos fragmentos (do inglês *paired-end*). O sequenciamento *single-end* é mais barato e geralmente suficiente para estudos de níveis de expressão genética em organismos bem anotados, com genoma de referência, enquanto que o sequenciamento *paired-end* facilita a detecção de *splicing* alternativo, transcritos quiméricos, rearranjos genômicos, elementos de sequências repetidas e fusão de genes (ILLUMINA, 2016).

3.6. Preparo de bibliotecas

Existem diferentes protocolos para preparo da biblioteca de RNA-Seq, e sua escolha pode afetar a capacidade de detecção das leituras, além de fornecer diferentes visões para análises de dados. Por exemplo, o método TruSeq® (*Illumina*) é o mais utilizado, onde a etapa de fragmentação do mRNA acontece por meio de quebra iônica. A etapa de amplificação acontece no preparo da biblioteca, portanto as duplicatas de PCR podem ser identificadas pela posição de mapeamento. Enquanto o protocolo Smart-Seq® (*Illumina*), mais utilizado para menor quantidade amostral, o mRNA sofre transcrição reversa, e amplificação, sendo o cDNA fragmentado. Portanto duplicatas de PCR que surgem durante a etapa de pré-amplificação podem não ser identificadas pela posição no mapeamento. O método UMI-Seq (*unique molecular identifiers*) utiliza *tags* (etiquetas) como *barcodes*, para detectar e quantificar transcritos. Apresenta como vantagem identificação de transcritos com baixa frequência de amplificação, transcritos únicos, e foi otimizado para baixas quantidades amostrais, com custos reduzidos (PAREKH et al., 2016).

3.7. Plataformas de sequenciamento

Inúmeras plataformas de Sequenciamento de Nova Geração estão disponíveis e em desenvolvimento, afetando diretamente as análises e interpretação de dados (Tabela 2). Podem ser categorizadas como segunda geração de sequenciadores, 454

(*Roche Applied Science*), SOLiD (*Applied Biosystems*) e Illumina que detectam as bases marcadas com sinais secundários, fluoróforos ou câmeras. Terceira geração, que apresentam métodos de detecção com alteração do pH do meio (*Ion Torrent PGM*) e sequenciamento de uma única molécula em tempo real (*single molecule real time – SMRT*) (*Pacific Biosciences*). Considerada como quarta geração, a nova abordagem da *Oxford Nanopore Technologies* baseada na passagem de íons gerando uma corrente elétrica, proporcionando um sinal elétrico necessário para distinção de cada base, cuja abordagem é livre de amplificação, detectando diretamente a composição do DNA (VENKATESAN; BASHIR, 2011; QUAIL et al., 2012; GOODWIN et al., 2016; MUNROE; HARRIS, 2010).

A decisão de utilização das plataformas de sequenciamento dependerá também do tamanho transcriptoma, de sua complexidade (conteúdo de G + C), profundidade, cobertura, recursos disponíveis, e do tipo de aplicações em questão. Plataformas de sequenciamento também variam no tamanho da leitura fornecida. Leituras curtas (*short-reads*) necessitam de uma maior cobertura, possuem custo e taxas de erros mais baixos do que leituras longas (*long-reads*), que são mais informativas e permitem uma montagem menos ambígua do transcriptoma. A combinação de ambas as estratégias de tamanho de leitura é aconselhável para montagens *de novo* e para identificar isoformas (CONESA et al., 2016; GOODWIN et al., 2016; HRDLICKOVA et al., 2017).

Tabela 2. Especificações técnicas de plataformas de Sequenciamento de Nova Geração.

| Plataforma | Princípio Químico | Rendimento | Custo Gb US\$ | Taxa de erro (%) | Tamanho reads (bp) |
|-------------|-------------------------------------|----------------|------------------|---------------------|-----------------------|
| 454 | Pirosequenciamento | 35 Mb – 700 Mb | 9.000–40.000 | 1 | 400–1.000 |
| SOLiD | Ligação e codificação de duas bases | 80 Gb – 320 Gb | 70–130 | <0.1 | 50–75 |
| Illumina | Sequenciamento por síntese | 500Mb – 900 Gb | 7–1.000 | <1 | 25–250 |
| Ion Torrent | Detecção de próton | 60 Mb – 15 Gb | 25–3.500 | 1 | 200–400 |
| PacBio | Leituras detectadas em tempo real | 500 Mb – 7 Gb | 1.000 | 13 | 8–20 Kb |
| Nanopore | Corrente elétrica | > 4 Tb | 750 | 12 | > 200 Kb |

Fonte: Adaptado de GOODWIN et al., 2016.

3.8. Profundidade de Sequenciamento

A profundidade de sequenciamento (*depth*) corresponde ao número médio de vezes que um determinado nucleotídeo é representado em uma coleção de sequências. A profundidade desejada varia de acordo com os objetivos de cada experimento e a natureza das amostras de RNA. Amostras sequenciadas com maiores profundidades implicam em maior detecção de transcritos e sua quantificação será mais precisa. Além disso, o tamanho ideal da biblioteca depende da complexidade do transcriptoma designado (CONESA et al., 2016; PICARDI, 2015; SIMS et al., 2014).

Alguns autores argumentam que para identificar expressão diferencial de genes conhecidos, uma menor profundidade é exigida. Valores ideais variam entre 5 e 40 milhões de sequências. Outros autores recomendam que é necessário sequenciar até 500 milhões de sequências para quantificar precisamente genes e transcritos com baixos níveis de expressão, *splicing* alternativo, fusão de genes e descoberta de novos transcritos. Entretanto o aumento em excesso da profundidade, a partir de determinado momento passa a fornecer rendimentos decrescentes para amostras pouco complexas, resultando na detecção de ruído e transcritos que não são objetivo da pesquisa (*off-target*), com melhoria mínima na qualidade de dados. Uma abordagem utilizada para indicar a profundidade de sequenciamento ideal para um determinado conjunto de dados é o teste de saturação (LI et al., 2015; SMITH et al., 2010; CONESA et al., 2016; PICARDI, 2015; FU et al., 2014).

3.9. Cobertura

A cobertura (*coverage*) teórica ou esperada dos genes é designada pelo número de vezes que se espera que cada nucleotídeo seja sequenciado, dado um número de leituras de determinado comprimento e a suposição de que estejam distribuídas de maneira uniforme ao longo do genoma. Portanto esse termo descreve a densidade geral de sequências em relação às regiões de transcritos. Teoricamente, cada base deveria ter a mesma chance de ser sequenciada e conseqüentemente coberturas semelhantes. No entanto, os perfis de densidade de sequências geradas podem ser afetados pelo protocolo de preparo da biblioteca, amplificação por PCR,

degradação de RNA e complexidade do genoma. O perfil de cobertura é uma forma de verificação da uniformidade do experimento, onde deve ser realizada normalização de todos os genes na mesma escala e cálculo da cobertura para cada posição (LI et al., 2015; SIMS et al., 2014).

3.10. Controle de qualidade

Após o sequenciamento, os dados podem ser entregues em diferentes formatos, e o mais comum é o FASTQ, que contém valores de qualidade associados a cada base (*Phred score*). Inicialmente, é feito o controle de qualidade das sequências geradas e os dados podem ser tratados para aumentar a qualidade e confiabilidade das análises posteriores. As principais etapas são: remoção de sequências que contém bases com baixa qualidade, incluindo as extremidades 5' e 3' das sequências que geralmente apresentam maior taxa de erro proveniente do sequenciamento; remoção de bases referentes a sequência de adaptadores usados na construção da biblioteca; remoção de sequências duplicadas derivadas da etapa de amplificação ou outros contaminantes. Dentre as ferramentas disponíveis publicamente, o FastQC e NGSQC podem ser utilizados para análises de qualidade das sequências e programas como FASTX-Toolkit e Trimmomatic para trimagem de dados. Outros parâmetros que indicam a qualidade das sequências geradas são: a porcentagem de sequências mapeadas no genoma ou transcriptoma, a distribuição das sequências obtidas nos cromossomos e conteúdo GC (CONESA *et al.*, 2016; HAN et al., 2015; KUKURBA et al., 2015; ENDRULLAT et al., 2016).

3.11. Alinhamento

Uma vez que os dados sejam pré-processados, a próxima etapa é o alinhamento das leituras ao genoma de referência ou transcriptoma quando se tem informação disponível. O genoma referência pode ser obtido de bancos como o Ensembl, UCSC e NCBI. Existem vários parâmetros que podem ser definidos para o processo de alinhamento, incluindo: o número de diferenças permitidas entre a referência e a sequência de interesse, o número de diferenças permitidas na semente ou *seed* (região da sequência utilizada para iniciar o alinhamento), o

número permitido e a penalidade para intervalos dentro de uma sequência que não correspondem a referência (do inglês *gaps*). Exemplos de programas mais utilizados para essa estratégia de montagem com base em referência são Cufflinks e Scripture (MARTIN; WANG, 2011; GARBER et al., 2011).

Quando é realizado o sequenciamento de um organismo que não possui um genoma referência, é realizada a montagem *de novo* do transcriptoma. Em linhas gerais, os programas de montagem buscam por sobreposições entre as sequências para ordená-las até produzir uma sequência contínua, denominada de *contig*. Esses montadores usam como estratégia principal as metodologias de grafo de De Bruijn (Caminho Euleriano) ou grafos consensos de sobreposições (caminho Hamiltoniano). Alguns montadores são Trinity, Oases, Rnnotator, Multiple-k and Trans-ABYSS e IDBA-Tran, Cufflinks (MARTIN; WANG, 2011; GARBER et al., 2011).

3.12. Quantificação de níveis de transcritos

O número de leituras que são mapeadas em um gene de interesse ou transcrito é designado como nível de expressão gênica para determinada amostra. São usados diferentes modelos probabilísticos discretos para a contagem das sequências e para explicar a dispersão dos dados, tais como distribuição de *Poisson* e distribuição binomial negativa. Entretanto, estudos indicam que a variabilidade biológica não é totalmente capturada pela distribuição de *Poisson*, devido à grande dispersão dos dados (*overdispersion*), resultando em altas taxas de falsos positivos, sendo mais indicados para explicar os dados os modelos baseados na distribuição binomial negativa, pois consideram a super dispersão dos dados e réplicas biológicas (KUKURBA et al., 2015; CONESA et al., 2016).

Geralmente os arquivos de quantificação estão em formato GTF (do inglês *gene transfer format*) ou GFF (do inglês *General Feature Format*) e que contém informação das estruturas gênicas. É possível identificar a abundância de transcritos com ferramentas como samtools tview, IGV, Trinity, DESeq2, edgeR, BaySeq, NOISEq, SAMseq, Cufflinks sendo este último também podem ser utilizados na detecção de isoformas (LI et al., 2009; JAMES et al., 2011; HAN et al., 2015).

3.13. Normalização

Para comparar a expressão gênica entre amostras é necessário normalizar os dados para que todas as amostras estejam na mesma escala e sejam comparáveis. Por exemplo, amostras com transcritos maiores, geram um maior número de contagem de sequências, o que pode levar a um viés técnico e a falsa conclusão de que esse gene é mais expresso. Portanto, durante a normalização considera-se a profundidade de sequenciamento de cada amostra ou o número de sequências geradas que foram mapeadas no genoma referência (ROBINSON; OSHLACK, 2010).

Pode ser gerado um valor correspondente ao número de sequências por milhão (CPM, do inglês *counts per million*), dividindo-se o número de sequências de um determinado gene pelo número total de sequências mapeadas para a amostra correspondente, e multiplicado por milhão. Pode ser gerado um valor de RPKM (*Reads Per Kilobase Million*), onde o número de sequências é dividido pelo comprimento do gene e depois dividido pelo número de sequências mapeadas por um milhão de sequências geradas. É semelhante o método FPKM (*Fragments Per Kilobase Million*) que considera o sequenciamento *paired-end* onde as sequências provenientes de um mesmo par são contadas como um fragmento (CONESA et al., 2016).

A contagem de transcritos não depende apenas do número total de sequências geradas e do comprimento do gene, mas também da composição da população de RNA que está sendo amostrada. Como por exemplo, valores extremos de expressão de genes unicamente ou altamente expressos em uma condição experimental, caso não ajustados, forçam os valores da contagem para os genes remanescentes serem diminuídos e podem forçar os dados da análise de expressão diferencial serem inclinados para uma condição experimental. Exemplos de métodos de normalização que consideram o número total de sequências geradas, bem como a composição de diferentes populações de RNAs são o DESeq e TMM (EdgeR) (ROBINSON; OSHLACK, 2010).

3.14. Expressão diferencial

Uma das possíveis utilizações de experimentos de RNA-Seq é na identificação de genes e/ou transcritos diferencialmente expressos entre condições, por exemplo diferentes estádios de desenvolvimento, estímulos experimentais ou condições fisiológicas. A abundância de sequências mapeadas por gene, exon ou transcrito, bem como suas isoformas é comparada entre diferentes amostras (HAN et al., 2015).

Uma vez que a contagem das leituras provenientes de RNA-Seq são números inteiros que variam de zero a milhões e são altamente enviesados, muitos algoritmos de transformação foram aplicados as sequências para que os números possam ser ajustados a modelos de distribuição estatística para detecção de expressão diferencial.

É importante aplicar um teste estatístico para identificar os genes (ou transcritos) que se diferem, e, portanto, apresentam significância estatística. São geralmente baseados em valores p (p -values) gerados por um modelo estatístico.

Dentro os algoritmos desenvolvidos, dois muito utilizados são EdgeR e DESeq2, os quais são capazes de inferir a expressão diferencial considerando a distribuição binomial negativa dos dados e modelam a relação média-variância entre os grupos. Outros exemplos de algoritmos são baySeq, Cuffdiff, DEGSeq, EBSeq, voom, NOISeq, PoissonSeq, RSEM e SAMSeq (SCHURCH et al., 2016; LIN et al., 2016; KUKURBA et al., 2015).

4. APLICAÇÕES NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

A primeira sequência genômica de uma planta disponibilizada, a *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), repercutiu com a explosão de informação proveniente do sequenciamento. O transcriptoma começou a ser explorado em diferentes escalas, mas somente a partir de 2007 os primeiros estudos envolvendo RNA-Seq começaram a ser aplicados (WEBER et al., 2015).

A complexidade do transcriptoma reflete na dinâmica da expressão gênica associada a diferentes fases de desenvolvimento ou tecidos de inúmeras espécies de plantas (plasticidade espacial e temporal), e a ferramenta RNA-Seq têm

possibilitado descobrir genes e enzimas com efeito em características de interesse econômico ou envolvidos na biossíntese de metabólitos especializados, onde suas propriedades podem ser exploradas para aplicações biotecnológicas, medicinais e industriais. Também tem possibilitado responder questões de evolução, reprodução e poliploidia (MARTIN et al., 2013; ZENONI et al., 2010; ILUT et al., 2012; WEBER et al., 2015; HAO et al., 2012; XIAO et al., 2013; VLK; ŘEPKOVÁ, 2017).

Para o melhoramento de plantas, a descoberta de novos transcritos assim como a quantificação destes permite esclarecer mecanismos moleculares em resposta a estresses abióticos, tais como déficit hídrico, e interpretar as respostas a estresses bióticos, como infecção por patógenos e as vias metabólicas associadas aos mecanismos de defesa (VLK; ŘEPKOVÁ, 2017; MARTIN et al., 2013).

Análises de RNA-Seq permitem identificar novas classes de RNAs, mensurar níveis de transcritos expressos em níveis baixos ou específicos de um tipo celular, órgão ou tecido expandindo o alcance das pesquisas biológicas. Estudos detectaram pequenos RNAs com expressão diferencial, participando de mecanismos regulatórios pós-transcricionais e associados a modificações epigenômicas em plantas (MARTIN et al., 2011; MARTIN et al., 2013; CARVALHO; SILVA, 2010).

O RNA-Seq pode ser empregado na identificação de polimorfismos únicos (SNPs) em regiões transcritas e para o melhoramento genético representa uma vantagem na exploração da variação das características agrônomicas de interesse e a variação genética, relacionada a cultivares ou espécies próximas, contribuindo para o desenvolvimento de marcadores moleculares e podendo ser empregados como ferramentas em programas de seleção assistida (MARTIN et al., 2013; CARDOSO-SILVA et al., 2014).

A utilização de tecnologias NGS tem possibilitado examinar transcriptomas mitocondriais e cloroplastos, capaz de fornecer informações globais sobre o nível de transcrição e eventos de maturação de RNA. Auxilia na compreensão, por exemplo, da associação de ORFs com a Macho Esterilidade Citoplasmática (CMS) e pode resultar em vantagens significativas na logística de campos de produção, redução dos custos e aumento na qualidade da semente obtida (STONE; STORCHOVA, 2015).

Avanços contínuos nas tecnologias de sequenciamento, paralelo a otimização das ferramentas computacionais tem permitido caracterizar completamente o transcriptoma de diversas plantas, principalmente para espécies não modelo, expandindo fronteiras da biologia vegetal, tanto em nível micro (célula) quanto em nível macro (planta), unindo os campos da genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica em um novo paradigma da biologia de sistemas (MARTIN, et al., 2013; MCGETTIGAN, 2013).

Neste capítulo foram propostos pontos chaves de checagem no delineamento experimental e análise de dados, onde se deve prestar atenção nas diferentes escolhas e possibilidades para sucesso do estudo.

5. REFERÊNCIAS

AUER, P. L.; DOERGE, R. W. Statistical design and analysis of RNA sequencing data. *Genetics*, v. 185, n. 2, p. 405-416, 2010.

BORODINA, T.; ADJAYE, J.; SULTAN, M. *A strand-specific library preparation protocol for RNA sequencing*. *Methods Enzymol*, v. 500, p. 79–98, 2011.

CARDOSO-SILVA, C. B.; COSTA, E. A; MANCINI, M. C.; BALSALOBRE, T. W. A.; CANESIN, L. E. C.; PINTO, L. R.; CARNEIRO, S. M.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, A.P.; VICENTINI, R. De novo assembly and transcriptome analysis of contrasting sugarcane varieties. *PloS one*, v. 9, n. 2, p. e88462, 2014.

CARVALHO, M. C. D. C. G.; SILVA, D. C. G. D. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural*, p. 735-744, 2010.

CONESA, A.; MADRIGAL, P.; TARAZONA, S.; GOMEZ-CABRERO, D.; CERVERA, A.; MCPHERSON, A.; SZCZEŚNIAK, M. W.; GAFFNEY, D. J.; ELO, L. L.; ZHANG, X.; MORTAZAVI, A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology*, v. 17, n. 1, p. 13, 2016.

ENDRULLAT, C.; GLÖKLER, J.; FRANKE, P.; FROHME, M. Standardization and quality management in next-generation sequencing. *Applied & translational genomics*, v. 10, p. 2-9, 2016.

FU, G. K.; XU, W.; WILHELMY, J.; MINDRINOS, M.; DAVIS, R.W.; XIAO, W.; FODOR, S.P.A. Molecular indexing enables quantitative targeted RNA sequencing

and reveals poor efficiencies in standard library preparations. *Proc Natl Assoc Sci*, v. 111, p. 1891–1896, 2014.

GARBER, M.; GRABHERR, M. G.; GUTTMAN, M.; TRAPNELL, C. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature methods*, v. 8, n. 6, p.469, 2011.

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, v. 17, n. 6, p. 333-351, 2016.

HAFNER, M.; LANDGRAF, P.; LUDWIG, J.; RICE, A.; OJO, T.; LIN, C.; ... & TUSCHL, T. Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods*, v. 44, n. 1, p. 3-12, 2008.

HAN, Y.; GAO, S.; MUEGGE, K.; ZHANG, W.; ZHOU, B. Advanced applications of RNA sequencing and challenges. *Bioinformatics and biology insights*, v. 9, 2015.

HAO, D. C.; CHEN, S. L.; XIAO, P. G.; LIU, M. Application of high-throughput sequencing in medicinal plant transcriptome studies. *Drug Development Research*, v. 73, n. 8, p. 487-498, 2012.

HRDLICKOVA, R.; TOLOUE, M.; TIAN, B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, v. 8, n. 1, 2017.

ILUT, D. C.; COATE, J. E.; LUCIANO, A. K.; OWENS, T. G.; MAY, G. D.; FARMER, A; DOYLE, J. J. A comparative transcriptomic study of an allotetraploid and its diploid progenitors illustrates the unique advantages and challenges of RNA-seq in plant species. *American journal of botany*, v. 99, n. 2, p. 383-396, 2012.

ILLUMINA. RNA-seq Technology, 2016. Disponível em: <http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/mrna-seq.html>. Acesso em: 17 de março de 2018.

JAMES, T.; Thorvaldsdóttir, H.; Winckler, W.; Guttman, M.; Lander, E. S.; Getz, G.; Mesirov, J. P. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*, v. 29, n.1, p. 24-26, 2011.

KUKURBA, K. R.; MONTGOMERY, S. B. RNA sequencing and analysis. *Cold Spring Harbor protocols*, v. 2015, n. 11, p. pdb. top084970, 2015.

LEVIN, J. Z.; YASSOUR, M.; ADICONIS, X.; NUSBAUM, C.; THOMPSON, D. A.; FRIEDMAN, N.; GNIRKE, A.; REGEV, A. Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods. *Nature Methods*, v. 7, n. 9, p. 709–715, 2010.

LI, H.; HANDSAKER, B.; WYSOKER, A.; FENNELL, T.; RUAN, J.; HOMER, N.; DURBIN, R. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, v. 25, n. 16, p. 2078-2079, 2009.

LI, X.; NAIR, A.; WANG, S.; WANG, L. Quality control of RNA-seq experiments. In *RNA Bioinformatics*, Humana Press, New York, NY, pp. 137-146, 2015.

LIN Y.; GOLOVNINA, K.; CHEN, Z. X.; LEE, H. N.; NEGRON, Y. L.; SULTANA, H.; OLIVER, B.; HARBISON, S. T. Comparison of normalization and differential expression analyses using RNA-Seq data from 726 individual *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*, v. 17, n. 1, p. 28, 2016.

LU, B. ZENG, Z.; SHI, T. Comparative study of de novo assembly and genome guided assembly strategies for transcriptome reconstruction based on RNA-Seq. *Science China Life Sciences*, v. 56, n. 2, p. 143-155, 2013.

MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics*, v. 12, n. 10, p. 671, 2011.

MARTIN, L.; FEI, Z.; GIOVANNONI, J.; ROSE, J. K. C. Catalyzing plant science research with RNA-seq. *Frontiers in plant science*, v. 4, p. 66, 2013.

MCGETTIGAN, P. A. Transcriptomics in the RNA-seq era. *Current opinion in chemical biology*, v. 17, n. 1, p. 4-11, 2013.

MERINO, G. A.; FRESNO, C.; NETTO, F.; NETTO, E. D.; PRATTO, L.; FERNÁNDEZ, E. A. The impact of quality control in RNA-seq experiments. In *Journal of Physics: Conference Series*, v. 705, n. 1, p. 012003, 2016.

MUNROE, D. J.; HARRIS, T. J. R. Third-generation sequencing fireworks at Marco Island. *Nature biotechnology*, v. 28, n. 5, p. 426-428, 2010.

OZSOLAK, F.; PLATT, A.R.; JONES, D.R.; REIFENBERGER, J.G.; SASS, L. E.; MCINERNEY, P.; THOMPSON, J.F.; BOWERS, J.; JAROSZ, M.; MILOS, P.M. Direct RNA sequencing. *Nature*, 2009.

PAREKH, S.; ZIEGENHAIN, C.; VIETH, B.; ENARD, W.; HELLMANN, I. The

impact of amplification on differential expression analyses by RNA-seq. *Scientific reports*, v. 6, p. 25533, 2016.

PICARDI, Ernesto. *RNA Bioinformatics: Methods in Molecular Biology*. Springer New York, 2015. 415p.

QUAIL, M. A.; SMITH, M.; COUPLAND, P.; OTTO, T. D.; HARRIS, S. R.; CONNOR, T. R.; GU, Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC genomics*, v.13, n.1, p. 341, 2012.

ROBINSON, M. D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome biology*, v. 11, n. 3, p. R25, 2010.

SCHURCH, N. J.; SCHOFIELD, P.; GIERLIŃSKI, M.; COLE, C.; SHERSTNEV, A.; SINGH, V.; ... & BLAXTER, M. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? *Rna*, v. 22, n. 6, p. 839-851, 2016.

SHENDURE, J., BALASUBRAMANIAN, S., CHURCH, G. M., GILBERT, W., ROGERS, J., SCHLOSS, J. A., & WATERSTON, R. H. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*, v. 550, n.7676, p. 345, 2017.

SIMS, D.; SUDBERY, I.; ILOTT, N. E.; HEGER, A.; PONTING, C. P. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, v. 15, n. 2, p. 121, 2014.

SMITH, A. M.; HEISLER, L. E., ST ONGE, R. P.; FARIAS-HESSON, E.; WALLACE, I.; M.; BODEAU, J.; HARRIS, A. N.; PERRY, K. M.; GIAEVER, G.; POURMAND, N.; NISLOW, P. C. Highly-multiplexed barcode sequencing: An efficient method for parallel analysis of pooled samples. *Nucleic Acids Res*, v. 38, n. 13, p. e142, 2010.

STEGLE, Oliver; TEICHMANN, Sarah A.; MARIONI, John C. Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, v. 16, n. 3, p. 133, 2015.

STONE, J. D.; STORCHOVA, H. The application of RNA-seq to the comprehensive analysis of plant mitochondrial transcriptomes. *Molecular genetics and genomics*, v. 290, n. 1, p. 1-9, 2015.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B. A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; VAN BAREN, M. J.; ... & PACHTER, L. Transcript assembly and quantification

by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature biotechnology*, v. 28, n. 5, p. 511, 2010.

VENKATESAN, B. M.; BASHIR, R. Nanopore sensors for nucleic acid analysis. *Nature nanotechnology*, v. 6, n. 10, p. 615-624, 2011.

VLK, D.; ŘEPKOVÁ, J. Application of Next-Generation Sequencing in Plant Breeding. *Czech Journal of Genetics & Plant Breeding*, v. 53, n. 3, 2017.

XIAO, M.; ZHANG, Y.; CHEN, X.; LEE, E. J.; BARBER, C. J.; CHAKRABARTY, R.; MACNEVIN, G. Transcriptome analysis based on next-generation sequencing of non-model plants producing specialized metabolites of biotechnological interest. *Journal of biotechnology*, v. 166, n. 3, p. 122-134, 2013.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, v. 10, n. 1, p. 57, 2009

WEBER, A. P. M. Discovering new biology through sequencing of RNA. *Plant physiology*, v. 169, n. 3, p. 1524-1531, 2015.

ZENONI, S.; FERRARINI, A.; GIACOMELLI, E.; XUMERLE, L.; FASOLI, M.; MALERBA, G. Characterization of transcriptional complexity during berry development in *Vitis vinifera* using RNA-Seq. *Plant Physiology*, v.152, n. 4, p. 1787–1795, 2010.

ZHAO, Q. Y.; WANG, Y.; KONG, Y. M.; LUO, D.; LI, X.; HAO, P. Optimizing de novo transcriptome assembly from short-read RNA-Seq data: a comparative study. In *BMC bioinformatics*, vol. 12, No. 14, p. S2, 2011.

ZHOU, S.; CAMPBELL, T. G.; STONE, E. A.; MACKAY, T. F.; ANHOLT, R. R. Phenotypic plasticity of the *Drosophila* transcriptome. *PLoS genetics*, v. 8, n. 3, 2012.

Apoio: UFES, FAPES, CAPES, CNPq.

Capítulo 14

SELEÇÃO DE ÁRVORES MATRIZES NATIVAS VS VARIABILIDADE GENÉTICA

Marcos Vinicius Winckler Caldeira

Adelson Lemes da Silva Júnior

Karla Daniele Araújo da Silva

Fábio Demolinari de Miranda

1. INTRODUÇÃO

A fragmentação florestal e a perda de habitat estão entre as principais ameaças para a conservação da biodiversidade. Este tem sido um problema enfrentado por todo o mundo devido à intensificação do desmatamento, gerando a extinção e por vezes perda de espécies e até mesmo de ecossistemas inteiros (GANEM, 2011). Atualmente, no Brasil a fragmentação de habitats afeta todos os biomas, no entanto, pode-se destacar a Floresta Atlântica como sendo o bioma com maior impacto frente a esta problemática, tendo sua área original reduzida para apenas 12,4%, distribuída em fragmentos (SOS MATA ATLÂNTICA & INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2017).

Como resultado das várias atividades antrópicas, a fragmentação promove o isolamento espacial dos indivíduos e suas populações, estando a partir deste momento sujeitos ao aumento de autofecundações e cruzamentos correlacionados, alterando a dinâmica do fluxo gênico e até mesmo da deriva genética, podendo ocasionar em perda da diversidade genética (CALEGARI et al., 2010). Tais impactos ambientais têm despertado o interesse pelo desenvolvimento de estratégias e tecnologias que visem o manejo e a preservação do meio ambiente (LELES et al., 2006; GANEM, 2011).

Neste sentido, diversas pesquisas têm sido direcionadas aos estudos de ampliação da base florestal a partir da criação de áreas de preservação permanente (APPs), recuperação e restauração de áreas degradadas e ampliação dos plantios florestais (ALMEIDA, 2016; CORREIA et al., 2016; KLIPPEL et al., 2015).

Outras pesquisas realizadas buscam por espécies de interesse econômico e ecológico, a fim de utilizá-las como fonte de renda para o país e diminuir as taxas de desmatamento, proporcionando a manutenção das espécies (BORGES et al., 2014; MANGARAVITE et al., 2016). Sobre as técnicas de manejo utilizadas, pode-se envolver dentre outras atividades, a seleção de árvores matrizes e a criação de pomares de sementes (RODRIGUES et al., 2009). Estudos que apresentam orientações quanto à seleção de matrizes, estabelecimento de pomares de sementes, origem, procedência, número de matrizes, número de sementes coletadas e a importância da sua contribuição genética, possuem papel central nos programas de melhoramento e manutenção das espécies (SEBBENN, 2002).

2. MARCAÇÃO DE ÁRVORES MATRIZES

Árvores matrizes são aquelas que apresentam características fenotípicas superiores às demais da mesma espécie. Dentre as características avaliadas para a seleção de matrizes, algumas devem ser respeitadas para garantir de forma inicial o bom desempenho a todos objetivos de uso da espécie, como boa condição fitossanitária; ritmo de crescimento; porte; forma do tronco; forma da copa; ramificação; vigor; densidade da madeira e produção de sementes (NOGUEIRA & MEDEIROS, 2007).

Apesar das características comuns que uma árvore matriz deve conter, torna-se necessário considerar o real objetivo para o qual será destinada, pois caso a finalidade seja obtenção de madeira, a altura e o diâmetro do caule se tornam características imprescindíveis, já para a produção de frutos deve ser levado em consideração o tamanho e a forma da copa. Quando se deseja utilizar as árvores para recuperação ou restauração de áreas degradadas, o ideal é que seja realizada uma seleção aleatória englobando várias matrizes em locais que possuam características semelhantes da área onde será feito o plantio, neste caso o ambiente se torna outro fator a ser observado (SENA & GARIGLIO, 2008).

É importante destacar que no momento da seleção devem-se eleger várias árvores da espécie como matrizes num mesmo ambiente e em ambientes distintos para garantir a diversidade genética das populações, visto que para um maior ganho genético, é necessário garantir que os indivíduos superiores mantenham

variabilidade genética para futuras gerações (MARTINS et al., 2009).

Uma metodologia amplamente utilizada é o cadastramento de matrizes, contendo informações gerais sobre o indivíduo selecionado e o local onde está inserido, seguindo os critérios estabelecidos pelo Sistema Nacional de Sementes e Mudanças Florestais (Lei nº 10.711/2003) e regulamentados pelo Decreto nº 5.153/2004 (BRASIL, 2004). As informações obtidas por meio da ficha de cadastramento são: a data da seleção, o responsável pelo cadastramento em campo, estado, município, endereço da propriedade, nome da espécie, nome vulgar, número de cadastro da matriz, coordenadas (altitude, latitude e longitude), altura da árvore, diâmetro a altura do peito (DAP), estado reprodutivo, posição na paisagem, condições de luminosidade, umidade do solo, etc.

Para isto, alguns dados sobre a matriz são obtidos por meio da observação visual do responsável técnico, enquanto que outras informações são adquiridas com uso de equipamentos adequados. A verificação da localização exata da matriz é realizada com auxílio do Sistema de Posicionamento Global (GPS), o qual recebe um código de identificação e suas informações são arquivadas em um banco de dados. As árvores são marcadas com plaquetas correspondendo ao seu número de identificação e as medidas de altura e DAP podem ser obtidas com ferramentas como hipsômetros, réguas de medição, fita diamétrica, dentre outros.

Diferentes trabalhos de marcação de árvores matrizes podem ser destacados, por exemplo, nos estudos realizados com as espécies *Plathymenia reticulata* (SOUZA et al., 2016), *Senefeldera verticillata* (VIEIRA et al., 2016), *Anadenanthera peregrina* (MORO et al., 2016) *Anadenanthera colubrina* (SILVA et al., 2017) em fragmentos de Floresta Atlântica no Espírito Santo, com a finalidade de selecionar indivíduos da espécie para serem utilizados como matrizes para coleta de sementes nativas, apropriadas e viáveis para estratégias de conservação, recuperação e restauração de ambientes florestais degradados.

3. POMAR DE SEMENTES

Em conformidade com a legislação descrita no Capítulo XII do Decreto nº 5.153/2004, que regulamenta a Lei nº 10.711/2003 (BRASIL, 2004):

O Pomar de Sementes (PS) é “Pomar de Sementes - PS: plantação planejada, estabelecida com matrizes superiores, isolada, com delineamento de plantio e manejo adequado para a produção de sementes, e que se constitui de Pomar de Sementes por Mudanças - PSM, Pomar Clonal de Sementes - PCS, Pomar Clonal para Produção de Sementes Híbridas - PCSH e Pomares de Sementes Testados - PSMt ou PCSt”.

A criação de um pomar de sementes, ao contrário da seleção de árvores matrizes em ocorrência natural, visa selecionar matrizes em área de floresta plantada ou mesmo o estabelecimento de plantios com matrizes superiores, possuindo características pré-estabelecidas, de acordo com a finalidade do mesmo. Este método tem como objetivo solucionar problemas enfrentados com o custo da colheita de sementes em matrizes marcadas em florestas naturais, devido a menor produção e a dispersão, além do fato de muitas espécies possuírem poucos exemplares em determinados locais, o que pode levar a restrição da base genética (HIGA & SILVA, 2006).

A seleção de matrizes em florestas nativas é mais complicada, pois além dos pontos já mencionados acima, ainda existe a possibilidade de uma árvore apresentar maior diâmetro e altura devido a sua idade e não por sua origem genética (NOGUEIRA & MEDEIROS, 2007).

O pomar de sementes é uma ótima alternativa para a conservação de espécies florestais nativas (LORZA et al., 2006), e em contrapartida, pode ser utilizado também para maior produção de sementes com qualidade genética adequada e características pré-selecionadas, quando se conhece a demanda dos governos estaduais e federal por produção de madeira e produtos não madeiráveis, principalmente a partir de plantios com espécies nativas (HIGA & SILVA, 2006).

Utilizado em programas de melhoramento em todo o mundo, o emprego do pomar de sementes é caracterizada como a estratégia mais eficiente na produção de sementes melhoradas geneticamente, na qual a adoção de estratégias e o real objetivo de uso das matrizes irá garantir o sucesso do seu estabelecimento. Pois a maior probabilidade é de que as sementes produzidas possam no futuro

originar mudas com maior vigor, homogeneidade e pequeno número de descartes. Vale ressaltar que, para garantir o fenótipo desejado e a conservação desta nova população, torna-se necessário o mínimo de variabilidade genética possível para que possa adaptar-se às diversas condições impostas pelo ambiente (HOPPE et al., 2004).

De acordo com Sebbenn (2002), pomares de sementes devem possuir uma ampla base genética, podendo ser obtida por meio da obtenção de indivíduos representativos de uma ou várias populações, o que garantiria a coleta de sementes para os diferentes objetivos de uso como produção madeireira, restauração ambiental ou florestal e conservação das espécies.

Pesquisas envolvendo a criação de pomares de sementes com diferentes finalidades já foram realizados, como por exemplo, o estudo realizado com a espécie *Dipteryx alata*, onde o objetivo foi estimar a variabilidade genética de um teste de progênies tendo como uma das finalidades a formação de pomar de sementes para utilização em programas de restauração (CANUTO et al., 2015). Outro estudo realizado com as espécies *Myracrodruon urundeuva*, *Astronium fraxinifolium* e *Terminalia argentea*, teve por objetivo avaliar a variação genética e a seleção das melhores progênies visando a formação de um pomar de sementes para uso em futuros trabalhos de melhoramento (OTSUBO et al., 2015).

A espécie *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* também foi alvo de estudos relacionados a pomares de sementes, no qual foi realizada a caracterização da diversidade genética em uma população estabelecida em área de floresta plantada na região sul do estado do Espírito Santo com a utilização de marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR), determinando o potencial da população para ser utilizada como pomar para coleta de sementes e produção de mudas com variabilidade genética confirmada, demonstrando dois agrupamento genético distintos, bem como os indivíduos que constituem cada um dos grupos (SILVA JÚNIOR et al., 2017).

Por fim, um estudo similar ao anterior foi realizado também em uma área de floresta plantada na região sul do Espírito Santo, no entanto, a espécie de interesse foi a *Anadenanthera peregrina*, sendo realizada a caracterização genética de sua população por meio de marcadores SSR (*simple sequence repeats*), constatando a divergência genética entre os

indivíduos e conseqüentemente o potencial da população para ser utilizada como futuro pomar de sementes (CORTELETE, 2016).

4. IMPORTÂNCIA, ESTRATÉGIAS E VERIFICAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA NA SELEÇÃO DE MATRIZES

A incorporação do conceito de variabilidade genética como o resultado da quantidade de variação dos genes (alelos) e locos envolvidos na expressão de um determinado caráter, tem sido um ponto imprescindível na seleção de árvores matrizes, utilizado tanto para o melhoramento de espécies vegetais quanto para a conservação e manutenção das mesmas em diferentes habitats (KAGEYAMA & GANDARA, 2004).

Sobre o melhoramento de espécies florestais, o objetivo é garantir o aumento da produtividade e melhoria do recurso florestal, mantendo a base genética da população para que possa ser utilizada em futuros trabalhos de melhoramento (ODA et al., 1989). Simultaneamente, a melhoria na conservação e manutenção das espécies poderá ser obtida por meio da ampla base genética, contrapondo os efeitos da depressão endogâmica, que é a redução da autorregeneração pelo aumento da endogamia e coancestria da população que favorece a perda de alelos necessários ao valor adaptativo (SEBBENN, 2006). Em geral, uma população que possui uma base genética restrita, ou seja, pouca variabilidade genética estará suscetível a pragas, doenças e estresses ambientais, diminuindo as chances de sobrevivência de seus indivíduos (ELLSTRAND & ELLAN, 1993).

Uma estratégia realizada para contornar esta situação é o número de árvores matrizes utilizadas na coleta de sementes. Para isto, a determinação é de que a coleta seja realizada em um número mínimo de árvores para um determinado local, ou de um número mínimo de locais para uma determinada região (SEBBENN, 2002; SEBBENN, 2003). A recomendação é que a coleta realizada deva possuir um tamanho efetivo (N_e) de 50, ou seja, não são necessárias 50 árvores matrizes para compor o lote de sementes, pois se tratando de espécies florestais nativas as mesmas são caracterizadas em grande maioria como alógamas, além disto, deve-se considerar que os cruzamentos ocorram aleatoriamente entre indivíduos não aparentados (VENCOVSKY, 1967).

Estudo realizado por Sebben (2006), afirma que 12 árvores matrizes seriam suficientes para atingir um N_e igual a 50, pois a probabilidade é de que uma árvore matriz possa ser polinizada por até quatro árvores pais, conseqüentemente as sementes produzidas por essa matriz irão possuir uma representatividade genética de cinco indivíduos. Porém, o número de matrizes selecionadas deve ser aumentado caso haja suspeita de cruzamentos entre indivíduos aparentados, sendo indicado um mínimo de 25 matrizes.

Outro parâmetro adotado para o aumento da variabilidade genética e a diminuição de cruzamentos parentais é a distância entre as matrizes, que devem variar entre 50 a 100 m. Contudo, árvores localizadas em florestas nativas e muito próximas umas das outras devem ser consideradas como um grupo, devendo a coleta ser realizada em, no mínimo, três árvores por grupo, e em pelo menos cinco grupos diferentes, com distâncias igual ou superior a 50 m. Para florestas plantadas o recomendado é a utilização do maior número de árvores possíveis, pois dessa forma há uma maior probabilidade de serem mantidas nas próximas gerações as características superiores das matrizes (SENA & GARIGLIO, 2008).

No entanto, o ideal é que as estratégias sugeridas anteriormente possam ser verificadas por meio de análises laboratoriais, pois a constatação da variabilidade genética e a detecção de polimorfismos em estudos genéticos vegetais demonstram como a diversidade genética está distribuída dentro e entre os grupos, direcionando estratégias mais adequadas para a manutenção das espécies (CRUZ et al., 2011).

Como uma ferramenta eficaz para determinação da variabilidade genética contida nas espécies e em suas populações, podemos destacar os marcadores moleculares. Estes por sua vez, são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares podem ser classificados de acordo com o grau de especificidade e informatividade, sendo divididos como marcadores dominantes (RAPD, AFLP, ISSR e SCARs) e marcadores codominantes (RFLP, VNTR e SSR) (MARCELINO et al., 2007). A diferença para esta classificação está nos resultados obtidos, pois os marcadores dominantes não possuem a capacidade de diferenciar o genótipo homocigoto “dominante” (AA) do heterocigoto (Aa), enquanto que nos marcadores codominantes ambas as formas podem ser discriminadas (CRUZ

et al., 2011).

Vários estudos realizados com o auxílio dos marcadores moleculares já foram desenvolvidos, incluindo pesquisas relacionadas a conservação de espécies ameaçadas de extinção e melhoramento de espécies vegetais. Estudo realizado por Souza et al. (2017), estimou a diversidade genética da espécie *Plathymenia reticulata* localizada em fragmentos de Floresta Atlântica no Espírito Santo, utilizando dez *primers* ISSR, no qual 156 fragmentos foram amplificados, sendo 101 polimórficos (64,74%), ou seja, uma ampla variabilidade genética.

No entanto, existem estudos em que a verificação da variabilidade genética é baixa, como o encontrado em uma população da espécie *Elaeis guineenses*, por meio da utilização de seis *primers* ISSR, os quais geraram 68 locos, sendo 34 polimórficos. Os autores afirmam que a baixa diversidade genética na população pode ser explicada pelo gargalo genético, indicando redução no número de alelos (CHAGAS et al., 2015).

5. CONSIDERAÇÃO FINAIS

Também chamadas de árvores porta-sementes, árvores mães, plantas mães, entre outros termos corriqueiramente utilizados, as árvores matrizes fornecem informações acerca do comportamento do plantio, uma vez que se sabe de longa data que suas características predominam nas progênies. Sabe-se que as melhores sementes são obtidas de árvores de meia idade (árvores nem tão jovens, e nem tão velhas), com crescimento vigoroso e livre de pragas e doenças, que estejam preferivelmente em grupos (o que facilita a fecundação cruzada) e que apresentem crescimento rápido, vigor, forma desejada do tronco, boa altura, ramificação desejada (considerando-se, também, a desrama natural quando for o interesse), uma copa ampla e boa produção de sementes em várias coletas sucessivas.

É possível observar que em função da exploração indevida por recursos florestais e madeireiros e até mesmo na abertura de áreas para agricultura e pastagens com foco agropecuário, atualmente têm-se no país biomas extremamente reduzidos, sendo constituídos por fragmentos florestais. Nesse contexto, pesquisadores vêm buscando desenvolver pesquisas relacionadas com a conservação de espécies florestais nativas e estruturação das mesmas nos mais

diversos ambientes. Para estes estudos, a criação de pomares de sementes com espécies nativas têm sido um método eficaz para suprir parte desta demanda. Cabe ressaltar que além das pesquisas com conservação das espécies, programas dos governos estadual e federal tem demandado cada vez mais a utilização de sementes para o estabelecimento de plantios com espécie nativas, visando maior produção de madeira e produtos não madeiráveis.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Edital N° 011/2013 PPE Agropecuária (Processo N° 65766261/2014) e Edital CNPq/FAPES N° 012/2014 (Processo FAPES N° 64946088/2013). Além disso, às instituições parceiras IF Baiano campus Teixeira de Freitas, IFES campus Alegre e BIOFIX (UFPR).

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D. S. Recuperação ambiental da Mata Atlântica [online]. 3rd ed. rev. and enl. Ilhéus, BA: Editus, 2016, 200 p.

BRASIL. Decreto n° 5.153, de 23 de julho de 2004. Aprova o Regulamento da Lei n° 10.711, de 5 de agosto de 2003, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudas - SNSM, e dá outras providências. Diário Oficial, Brasília, DF, 23 jul. 2004. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/d5153.htm>. Acesso em: 28 Fev. 2018.

BORGES, D. B.; NETO, E. M.; GAIOTTO, F. A. Development of microsatellite primers for *Melanoxylon braúna* (Fabaceae): an endangered and endemic tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Genetics Resources**, v. 7, p. 65-68, 2014.

CALEGARI, L.; MARTINS, S. V.; GLERIANI, J. M.; SILVA E.; BUSATO L. C. Análise da dinâmica de fragmentos florestais no município de Carandaí, MG, para fins de restauração florestal. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.34, n.5, p.871- 880, 2010.

CANUTO, D. S. O.; ZARUMA, D. U. G.; MORAES, M. A.; SILVA, A. M.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M. Caracterização genética de um teste de progênies de *Dipteryx alata* Vog. proveniente de remanescente florestal da Estação

- Ecológica de Paulo de Faria, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, n. 4, p. 641-648, 2015.
- CHAGAS, K. P. T.; SOUSA, R. F.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, p. 147-152, 2015.
- CORREIA, G. G. S.; MARTINS, S. V.; NETO, A. M.; SILVA, K. A. Estoque de serapilheira em floresta em restauração e em Floresta Atlântica de tabuleiro no sudeste brasileiro. **Revista Árvore**, v.40, n.1, p.13-20, 2016.
- CORTELETE, M. A. Diversidade genética de *Anadenanthera peregrina* (L.) SPEG. (Fabaceae) em área de plantio no sul do Espírito Santo. Alegre, 2016. 44 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2016.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. 1a ed. **Visconde do Rio Branco-MG: Suprema**, 2011. 620 p.
- ELLSTRAND, N. C.; ELAN, D. R. Population genetic consequences of small populations sizes: implication for plant conservation. **Annual Review of Ecological Systematics**, v.24, p.217-242, 1993.
- FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Brasília: Embrapa – CERNAGEN, p. 220, 1998.
- GANEM, R. S. (Org.). Conservação da biodiversidade: legislação e políticas públicas. Série memória e análise de leis. Brasília: Câmara dos Deputados, 2011. 434p.
- HIGA, A. R.; SILVA, L. D. Pomares de Sementes de Espécies Nativas - Situação Atual. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. **Pomar de Sementes de Espécies Florestais Nativas**. Curitiba: FUPEF, 2006. p. 13-40.
- HOPPE, J. M.; GENRO, C. J. M.; VARGAS, C. O.; FLORIANO, E. P.; REIS, E. R.; FORTES, F. O.; MÜLLER, I.; FARIAS, J. A.; CALEGARI, L.; DACOSTA, L. P. E. Produção de Sementes e Mudanças Florestais. **Caderno Didático 1**, p. 388, 2004.
- KAGEYAMA, P.; GANDARA, F.B. Recuperação de áreas ciliares. In: RODRIGUES, R.R. & LEITÃO FILHO, H.F., eds. **Matas ciliares: Conservação**

e recuperação. 2.ed. São Paulo, Universidade de São Paulo, FAPESP, p.249-269. 2004.

KLIPPEL, V. H.; PEZZOPANE, J. E. M.; SILVA, G. F.; CALDEIRA, M. V. W.; PIMENTA, L. R.; TOLEDO, J. V. Avaliação de métodos de restauração florestal de Mata de Tabuleiros-ES. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.39, n.1, p.69-79, 2015.

LELES, P. S. S.; LISBOA, A. C.; NETO, S. N. O.; GRUGIKI, M. A.; FERREIRA, M. A. Qualidade de mudas de quatro espécies florestais produzidas em diferentes tubetes. *Floresta e Ambiente*, v. 13, n. 1, p. 69-78, 2006.

LORZA, R. F.; SOUZA, F. M.; NAKASHIMA, R. Pomares de Sementes de Espécies Nativas -Situação Atual. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. **Pomar de Sementes de Espécies Florestais Nativas**. Curitiba: FUPEF, 2006. p. 41-64.

MANGARAVITE, E.; VINSON, C. C.; RODY, H. V. S.; GARCIA, M. G.; CARNIELLO, M. A.; SILVA, R. S.; OLIVEIRA, L. O. Contemporary patterns of genetic diversity of *Cedrela fissilis* offer insight into the shaping of seasonal forests in eastern South America. **American Journal of Botany**, v. 103, n. 2, p. 1-10. 2016.

MARCELINO, F. C.; BINNECK, E.; ABDELNOOR, R. V.; NEPOMUCENO, A. L. Ferramentas biotecnológicas aplicadas à cultura da Soja. **Circular Técnico 47**, Londrina, PR: Embrapa Soja, p. 6, 2007.

MARTINS, R. N.; OLLIVEIRA, G. A. G.; ARAÚJO, J. A. P. L.; SIQUEIRA, J.; TOMASELLI, I.; DELESPINASSE, B.; RODRIGUES, R.; GORNISKI, D. Plano de ação para o desenvolvimento integrado do Vale do Parnaíba – PLANAP. Manual de técnicas de produção de mudas florestais. **CODEVASF**, Curitiba, 2009. 43p.

MORO, K. M.; SOUZA, L. C.; SILVA JUNIOR, A. L.; CORTELETE, M. A.; PEREIRA, A. G.; VIEIRA, A. A. R.; SOUZA, M. C.; MIRANDA, D. F. Avaliação e georeferenciamento de árvores de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg (Fabaceae) para coleta de sementes. **XXI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VII Encontro de Iniciação à Docência** – Universidade do Vale do Paraíba. 2016.

NOGUEIRA, A. C.; MEDEIROS, A. C. de S. Coleta de Sementes Florestais Nativas. **Circular Técnico 144**, Colombo - PR: Embrapa Florestas, p. 11-22, 2007.

ODA, S.; MENCK, A.L.M.; VENCOSKY, R. Problemas no melhoramento genético clássico do eucalipto em função da alta intensidade de seleção. **IPEF**:

Instituto de pesquisas e Estudos Florestais, Piracicaba, n.41-42, p.8-17, 1989.

OTSUBO, H. C. B.; MORAES, M. L. T.; MORAES, M. A.; NETO, M. J.; FREITAS, M. L. M.; COSTA, R. B.; RESENDE, M. D. V.; SEBBENN, A. M. Variação genética para caracteres silviculturais em três espécies arbóreas da Região do Bolsão Sul-Mato-Grossense. **CERNE**, v. 21, n. 4, p. 535-544, 2015.

RAMALHO, A. B. et al. Diversidade genética entre genótipos de *Bertholletia excelsa* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Floresta**, v. 46, n. 2, p. 207-214, 2016.

RODRIGUES, R. R.; BRANCALION P. H. S.; ISERNHAGEN, I. Pacto para a restauração ecológica da Mata Atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal. São Paulo: Instituto BioAtlântica. p. 12-23, 2009.

SEBBENN, A. M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, v. 14, n. 2, p. 115-132, 2002.

SEBBENN, A.M. Número de populações para a conservação genética in situ de espécies arbóreas. **Revista do Instituto Florestal**, v.15, n.1, p.45-51, 2003.

SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. **Pomares de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUPEF, 2006. p. 193–198.

SENA, C. M.; GARIGLIO, M. A. Sementes Florestais: Colheita, Beneficiamento e Armazenamento. **Guia Técnico**, Natal: MMA. Secretaria de Biodiversidade e Florestas, v. 2, p. 28, 2008.

SILVA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, L. C.; PEREIRA, A. G.; CALDEIRA, M. V. W.; MIRANDA, F. D. Genetic diversity of *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex. Ducke) Barneby, in a forest area in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 1-10, 2017.

SILVA, K. D. A.; ALVES, B. Q.; SOUZA, M. C.; SILVA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, L. C.; SILVA, F. D.; MIRANDA, F. D.; CALDEIRA, M. V. W. Seleção de árvores matrizes de *Anadenanthera colubrina* (VELL.) BRENAN. ocorrentes em um fragmento de floresta atlântica no Espírito Santo. **XXI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVII Encontro Latino**

Americano de Pós-Graduação e VII Encontro de Iniciação à Docência – Universidade do Vale do Paraíba. 2017.

SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2015-2016.** São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica. São José dos Campos, 2017. 69p.

SOUZA, L. C.; SILVA JÚNIOR, A. L.; MORO, K. M.; MIRANDA, F. D. Seleção de árvores matrizes de *Plathymenia reticulata* Benth. em um fragmento florestal no município de Guaçuí-es. **XXI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VII Encontro de Iniciação à Docência – Universidade do Vale do Paraíba. 2016.**

SOUZA, L. C.; SILVA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, M. C.; KUNZ, S. H.; MIRANDA, F. D. Genetic diversity of *Plathymenia reticulata* Benth. in fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 1-13, 2017.

VENCOVSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, n.35, p.79-84, 1987.

VIEIRA, A. A. R.; SOUZA, L. C.; SILVA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, M. C.; PEREIRA, A. G; MIRANDA, F. D.; CALDEIRA, M. V. W. seleção de árvores matrizes da espécie *Senefeldera verticillata* (Vell.) CROIZAT em dois fragmentos florestais do sul do Espírito santo. **XXI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VII Encontro de Iniciação à Docência – Universidade do Vale do Paraíba. 2016.**



Apoio:



CCAÉ-UFES

**Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo
Alto Universitário, s/n, Guararema, Alegre-ES**