



Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Estado da Arte da Pesquisa em Recursos Genéticos

Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Estado da Arte da Pesquisa em Recursos Genéticos

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Rafael Sandrini Filho
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

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

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

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

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

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

Ciências Biológicas e da Saúde

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

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

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

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

Conselho Técnico Científico

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
E79	Estado da arte da pesquisa em recursos genéticos [recurso eletrônico] / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-628-7 DOI 10.22533/at.ed.287191609 1. Genética – Pesquisa – Brasil. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da. CDD 575.1
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

Apresentamos o livro “Estado da Arte da Pesquisa em Recursos Genéticos”, um material rico e direcionado à todos acadêmicos e docentes da subárea da biologia denominada genética.

Sem sombra de dúvidas a genética e suas aplicações tem influenciado diversas pesquisas promissoras em todo o mundo, contribuindo de forma significativa na saúde, agricultura, economia e biotecnologia. Compreender essa ciência e suas diferentes interfaces é um dos objetivos principais do conteúdo desta obra.

A genética aliada à revolução tecnológica tem contribuído grandemente com o avanço no campo da pesquisa básica e aplicada. Da mesma forma as descobertas propiciadas pelos estudos e artigos de diversos pesquisadores possibilitaram um entendimento mais amplo desta importante área. Como sabemos a genética possui um campo vasto de aplicabilidades que podem colaborar e cooperar grandemente com os avanços científicos e entender um pouco mais da pesquisa e recursos genéticos é o enfoque desta obra.

Assim abordamos aqui assuntos relativos aos avanços e dados científicos aplicados aos recursos genéticos, oferecendo um breve panorama daquilo que tem sido feito no país. O leitor poderá se aprofundar em temas direcionados à variabilidade, diversidade genética, produtividade, variedades tradicionais, inovação, proteômica, novos protocolos, fruteiras nativas, populações, gargalo, seleção, variedade genética, produtividade, migração, criopreservação, dentre outros.

Esperamos que mais uma vez o conteúdo deste material possa somar de maneira significativa aos novos conceitos aplicados à genética, influenciando e estimulando cada vez mais a pesquisa nesta área em nosso país. Parabenizamos cada autor pela teoria bem fundamentada aliada à resultados promissores, e principalmente à Atena Editora por permitir que o conhecimento seja difundido e disponibilizado para que as novas gerações se interessem cada vez mais pelo ensino e pesquisa em genética.

Desejo à todos uma ótima leitura!
Benedito Rodrigues da Silva Neto

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
AVALIAÇÃO AGRONÔMICA DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA EM ANGOLA	
Rosalina Esperança Da Silva Carlos	
Sandra Domingos João Afonso	
Ricardo Franco Cunha Moreira	
Elaine Costa Cerqueira-Pereira	
DOI 10.22533/at.ed.2871916091	
CAPÍTULO 2	5
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PRODUTIVO E CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE AMOSTRAS DE VARIEDADES DE FEIJÃO-CAUPI DO ACRE PARA DESENVOLVIMENTO DE PROGÊNIES E SELEÇÃO DE LINHAGENS	
Caroline Nascimento dos Santos	
Joões Alves da Silva Pereira	
Vanderley Borges dos Santos	
Hiuri Negreiros de Albuquerque	
Mateus Martins da Silva	
Matheus Matos do Nascimento	
Maria Rosângela da Silva Melo	
Wilson José dos Santos	
DOI 10.22533/at.ed.2871916092	
CAPÍTULO 3	11
CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DE AÇUCENA (<i>Amaryllidaceae</i>) COLETADOS NO ESTADO DO CEARÁ	
Rita de Cassia Alves Pereira	
Ana Cecília Ribeiro de Castro	
Antônio Marcos Esmeraldo Bezerra	
DOI 10.22533/at.ed.2871916093	
CAPÍTULO 4	18
CONSERVAÇÃO DE TECIDOS DO APARELHO UROGENITAL DE AVES MANTIDOS EM SORO FISIOLÓGICO SOB-REFRIGERAÇÃO POR ATÉ 48 HORAS PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	
Tauane Catilza Lopes Fernandes	
Shaline Séfara Lopes Fernandes	
DOI 10.22533/at.ed.2871916094	
CAPÍTULO 5	26
DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Campomanesia adamantium</i> (Cambess.) O. Berg POR MEIO DE CARACTERES AGROMORFOLÓGICOS	
Diego Cerveira de Souza	
Terezinha Aparecida Teixeira	
DOI 10.22533/at.ed.2871916095	
CAPÍTULO 6	36
DIVERSIDADE GENÉTICA DO BACURIZEIRO (<i>Platonia insignis</i> MART.) UTILIZANDO O MARCADOR ISSR EM CHAPADINHA – MA	
Jonas Alves Mesquita	
Edyane Moraes dos Santos	
André Luiz Raposo Barros	
Gabriel Garcês Santos	
Claudio Adriano de Jesus Nascimento	

Luana Corrêa Silva
Phelipe Silva de Araújo
José de Ribamar Silva Barros
DOI 10.22533/at.ed.2871916096

CAPÍTULO 7 46

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA ABELHA TIÚBA (*Melipona fasciculata* SMITH, 1854 - HYMENOPTERA, APIDAE) BASEADA NO MARCADOR ISSR

Diego Marques Costa Silva
Gustavo Lucas Bezerra Tinoco
Jonas Alves Mesquita
Laelson Rodrigues Ferreira e Ferreira
Hugo Almeida Ferreira
Edyane Moraes dos Santos
José de Ribamar Silva Barros

DOI 10.22533/at.ed.2871916097

CAPÍTULO 8 58

MEL DE TIÚBA: AUMENTO DA PRODUÇÃO DE MEL POR MEIO DA MELIPONICULTURA MIGRATÓRIA

Gustavo Lucas Bezerra Tinoco
Diego Marques Costa Silva
Jonas Alves Mesquita
Hugo Almeida Ferreira
Laelson Rodrigues Ferreira e Ferreira
Gabriel Garcês Santos
José De Ribamar Silva Barros

DOI 10.22533/at.ed.2871916098

CAPÍTULO 9 67

USO DE CRIOPROTETORES PARA A PRESERVAÇÃO DE COLEÇÕES MICROBIANAS MANTIDAS PARA PD&I

Eunice Ventura Barbosa
Clarissa Varajão Cardoso
Helena Magalhães *In memoriam*
Evelize Folly das Chagas
Helena Carla Castro
Máira Halfen Teixeira Liberal

DOI 10.22533/at.ed.2871916099

SOBRE O ORGANIZADOR..... 79

ÍNDICE REMISSIVO 80

AVALIAÇÃO AGRONÔMICA DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA EM ANGOLA

Rosalina Esperança Da Silva Carlos

Mestranda em Recursos Genéticos Vegetais,
Universidade Federal Recôncavo da Bahia,
e-mail: rosalina.carlos258@gmail.com.

Sandra Domingos João Afonso

Estagiária de Investigação do Instituto Superior
Politécnico do Kwanza Sul, Rua 12 de Novembro,
Centro, Kwanza Sul- Angola,
sandra.afonso3@gmail.com.

Ricardo Franco Cunha Moreira

Docente, Universidade Federal do Recôncavo
da Bahia (UFRB), Rua Rui Barbosa 710, CEP:
44380-000, Cruz das Almas, BA,
ricardofcm@ufrb.edu.br.

Elaine Costa Cerqueira-Pereira

Pós-doctor, Universidade Federal do Recôncavo
da Bahia (UFRB), Rua Rui Barbosa 710, CEP:
44380-000 Cruz das Almas, BA
ellainecerqueira@yahoo.com.br

da parte aérea e produção de raízes. O experimento foi implantado no campo experimental da Companhia de Alimentos de Malanje, e conduzido durante duas safras consecutivas (2015/16 e 2017/18), localizada na Província de Malanje, em Angola. Utilizou-se o delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições. Os resultados apontam que houve ampla variabilidade genética nas características morfoagronômicas avaliadas nos 10 genótipos de mandioca.

PALAVRAS-CHAVE: *Manihot esculenta*, variabilidade, diversidade *genética*.

AGRONOMIC EVALUATION OF CASSAVA GENOTYPES IN ANGOLA

INTRODUÇÃO

As raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) são consumidas principalmente nos países em desenvolvimento, sendo uns dos principais alimentos energéticos para mais de 700 milhões de pessoas, as suas folhas são ricas em proteínas e vitaminas A e C, além de outros nutrientes (GAMEIRO, 2003; TININI et al., 2009).

Uma das razões que incentivaram os

RESUMO: Avaliaram-se as características morfoagronômicas de 10 genótipos de mandioca provenientes do banco de germoplasma do Instituto de Investigação Agronômico (IIA), foram avaliadas 10 variáveis quantitativas nomeadamente: o número de hastes, altura das plantas, diâmetro do caule, distância do entrenó, altura da primeira ramificação, número de raízes, diâmetro das raízes, comprimento das raízes, produção

portugueses a disseminar o cultivo da mandioca nos continentes africano e asiático é a farinha sendo o principal produto derivado para ser consumido (FILGUEIRA & HOMMA, 2016).

Para a população Angolana a mandioca é uma cultura de grande importância, pelo fato de ser de fácil cultivo, rústica e de boa produtividade. No ano de 2016 a produção mundial foi de 277,1 milhões de toneladas (FAO, 2018), Angola é o sétimo maior produtor mundial de mandioca com aproximadamente 10 milhões de toneladas.

Além de ser utilizada como matéria-prima em inúmeros produtos industriais a mandioca é empregada na alimentação humana e animal (FUKUDA et al., 2005).

Segundo AFONSO et.al (2019), as regiões de Angola onde estão as maiores áreas produtoras de mandioca são o Norte e o Oeste. A mandioca faz parte do cardápio da população angolana sendo muito consumidas as folhas cozidas e as raízes de diversas formas tais como: crua ou in natura, farinha de bombo, farinha musseque, cozida, frita e assada.

O presente estudo teve como objetivo avaliar as características morfoagronômicas de genótipos de mandioca, a fim de serem utilizados em programas de fomento do cultivo da mandioca em Angola.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram caracterizados 10 genótipos de mandioca provenientes do banco de germoplasma do Instituto de Investigação Agronômico (IIA) da Estação Experimental Agrícola de Malanje, e da IDA do Cuanza Norte e Uíge, foram introduzidos em campo experimental da Companhia de Alimentos de Malanje, e conduzidos durante duas safras consecutivas (2015/16 e 2017/18), localizada na Província de Malanje (Angola), com 368 metros de altitude, 8° 49' latitude Sul e 13° 13' de longitude (IGCA, 2016), com uma área total de 8960 m². O solo do local foi classificado como Fersialíticos (Diniz, 1973). O clima, conforme a classificação do (INAMET, 2004) é subtropical úmido, com temperatura média anual de 26° C, com uma amplitude térmica de 14° C, umidade relativa entre 80 e 85%, precipitações médias anuais entre 1000 e 1200 mm, bem distribuídas.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições, sendo cada parcela constituída por cinco linhas de 10 plantas, totalizando 50 plantas por parcela e cada linha tendo 10 metros de comprimento, dispostas no espaçamento de 0,90 metros entre linhas e 0,90 metros entre as plantas. Avaliou-se 10 variáveis quantitativas nomeadamente: o número de hastes, altura das plantas, diâmetro do caule, distância do entrenó, altura da primeira ramificação, número de raízes, diâmetro das raízes, comprimento das raízes, produção da parte aérea e produção de raízes.

Para diversidade genética, foram calculados os valores mínimos, máximo, média, desvio padrão, coeficiente de variação, teste de normalidade usado no *software* SAS

(SAS INSTITUTE, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Valores mínimos, máximo, média, desvio padrão, coeficiente de variação e teste de normalidade para as variáveis quantitativas, na qual segue a ordem: Número de hastes (NH), Altura das plantas (AP), Diâmetro do caule (DC), Distância do entrenó (DE), Altura da primeira ramificação (APR), Número de raízes (NR), Diâmetro das raízes (DR), Comprimento das raízes (CR), Produção da parte aérea (PPA), Produção de raízes (PR).

Variáveis	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	CV (%)	Teste de normalidade
NH	1,34	6,86	2,59	0,85	32,80	0,85**
AP	108,72	223,23	161,67	26,21	16,21	0,98*
DC	4,45	10,79	6,69	1,19	17,84	0,98*
DE	5,41	12,25	8,47	1,37	16,14	0,98*
APR	11,00	113,03	47,75	18,91	39,61	0,92**
NR	1,00	5,95	3,47	1,00	43,96	0,84**
DR	14,50	35,20	22,85	3,07	13,42	0,97*
CR	15,20	62,60	28,91	6,96	24,08	0,91**
PPA	4,00	32,00	13,35	5,66	42,44	0,94**
PR	9,90	107,50	39,57	18,76	47,41	0,93**

** e * significativo a 1% e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste de Shapiro-Wilks.

Na tabela 1 é possível observar a partir das estatísticas descritivas dos descritores quantitativos a amplitude dos coeficientes de variação (CV) variou de 13,42 para o variável diâmetro das raízes a 47,41 para a produção de raízes, respectivamente. Os coeficientes de variação (CV) quando encontrados em experimentos agrícolas de campo são considerados baixos valores inferiores a (10%), médios valores que estejam entre (10 á 20%), altos valores que estejam entre (20% á 30%) e muito altos quando apresentam valores superiores á (30%) (PIMENTEL, 2000)

As maiores variações foram observadas na altura da planta, que apresentou valores de (108,72 a 223,23 cm), com uma média de 161,67 cm altura da primeira ramificação variou de 11,00 a 113,03 cm, e apresentou uma média de 47,75 e comprimento das raízes (15,20 a 62,60 cm), tendo uma média de 28,91 cm. A menor variação foi observada para o diâmetro das raízes (14,50 a 35,20 cm), com média de 22,85 cm. Em relação ao desvio padrão, verificou-se uma variação de 18,91 a 26,21 para as variáveis alturas da primeira ramificação e a altura das plantas, indicando que a variável altura das plantas foi a que apresentou maior dispersão.

De acordo com a estatística descritiva, pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilks a 1% e 5 % de probabilidade, é possível inferir que as variáveis não seguem distribuição normal, uma vez que as variáveis foram significativas e altamente significativas.

CONCLUSÕES

Os resultados apontam que houve ampla variabilidade genética nas características morfoagronômicas avaliadas nas 10 variedades de mandioca.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, S. D. J.; LEDO, C. A. da S.; MOREIRA, R. F. C.; SANTOS, V. da S. ; BERGE, V.P.; MUONDO, P. A. 2019. **Selection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes based on agro-morphological traits in Angola**. African Journal of Agricultural, Vol. 14(7), pp. 447-460.
- FILGUEIRAS, G. C. HOMMA A. K. O. (2016) **Aspectos socioeconômicos da cultura da mandioca na região Norte**. In: Júnior. M. de S. M.; Alves, R. N. B. Cultura da mandioca. 1. ed. Brasília, DF: EMBRAPA, p. 15-49.
- Food and Agriculture Organization (FAO) 2018. **Agricultural production – Crops primary**. Disponível em: www.faostat.fao.org/faostat/collect.
- GAMEIRO, A. H., CARDOSO, C. E. L., BARROS, G. S. de C., ANTIQUEIRA, T. R., GUIMARÃES, V. di A. (2003) **A indústria de amido de mandioca**. 1. ed. Brasília: Embrapa informações tecnológicas, 201p
- SAS INSTITUTE. 2003. **SAS Technical Report. SAS/STAT software: Changes and Enhancement**, Release 9.0, Cary NC: SAS Institute.
- TININI, R. C. dos R.; COELHO, S. R. M.; MONTEIRO, V. H.; FIGUEIREDO, P. R. A. de; Schoeninger, V. (2009) **caracterização do teor de amido em raízes de mandioca para agroindústrias de extração de fécula**. Anais do I Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente, Cascavel – Paraná – Brasil. Cascavel- PR.
- PIMENTEL, G, F. 2000. **Curso de estatística experimental**. 14.ed. Piracicaba: Nobel, 477p.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PRODUTIVO E CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE AMOSTRAS DE VARIEDADES DE FEIJÃO-CAUPI DO ACRE PARA DESENVOLVIMENTO DE PROGÊNIES E SELEÇÃO DE LINHAGENS

Caroline Nascimento dos Santos

Universidade Federal do Acre

Rio Branco - Acre

Joões Alves da Silva Pereira

Universidade Federal do Acre

Rio Branco - Acre

Vanderley Borges dos Santos

Universidade Federal do Acre

Rio Branco - Acre

Hiuri Negreiros de Albuquerque

Universidade Federal do Acre

Rio Branco - Acre

Mateus Martins da Silva

Universidade Federal do Acre

Rio Branco - Acre

Matheus Matos do Nascimento

Universidade Federal do Acre

Rio Branco - Acre

Maria Rosângela da Silva Melo

Universidade Federal do Acre

Rio Branco - Acre

Wilson José dos Santos

Universidade Federal do Acre

Rio Branco - Acre

importância significativa para a recomendação de variedades e cultivares para os produtores da região, definindo as melhores práticas de manejo para a condução das lavouras. As espécies de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) estão entre as culturas de maior importância agrícola, social e econômica na região. Entretanto, ainda são utilizadas sementes tradicionais para plantio, que mesmo apresentando alto valor genético, apresentam baixa produtividade, sendo bastante suscetíveis a uma infinidade de pragas e doenças. Verifica-se, assim a necessidade da realização de variadas pesquisas de melhoramento, objetivando a seleção de materiais superiores. Dessa maneira, o objetivo desse trabalho foi iniciar o melhoramento e manejo de espécies agrícolas e industriais para cultivo no Acre, através da seleção de variedades crioulas de feijão-caupi, mediante avaliações. As variedades estudadas demonstraram alta variabilidade para as variáveis avaliadas. A variedade Branco P1, demonstrou as maiores médias, sendo viável para o desenvolvimento e seleção de linhagens.

PALAVRAS-CHAVE: *Vigna unguiculata*. Produtividade. Variedades tradicionais.

RESUMO: O Acre tem alto potencial produtivo para espécies agrícolas e industriais. Apesar das limitações de solo e ambientais, as pesquisas de melhoramento passam a ter uma

EVALUATION OF THE PRODUCTIVE
POTENTIAL AND MORPHOPHYSIOLOGICAL

CHARACTERISTICS OF SAMPLES OF ACRE COWPEA VARIETIES FOR PROGENY DEVELOPMENT AND SELECTION OF LINEAGES

ABSTRACT: Acre has high productive potential for agricultural and industrial species. Despite soil and environmental constraints, such as improvement surveys are of great importance for a visit of varieties and cultivars to producers in the region, defining as best management practices for crop management. The species of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) are among the crops of major agricultural, social and economic importance in the region. However, they are still planted for planting, which, although presenting high genetic value, present low productivity, being in fact susceptible to a plethora of pests and diseases; thus verifying the accomplishment of researches of superior results, aiming the selection of superior materials. Thus, the project was initiated with the cultivation of plants and products for non-acrid cultivation, through the selection of cowpea varieties, through evaluation. The studied varieties showed high variability for the evaluated units. A sample of White P1, demonstrated as media, being feasible for the development and selection of lineages.

KEYWORDS: *Vigna unguiculata*. Productivity. Traditional varieties.

1 | INTRODUÇÃO

Segundo Rocha (2009) o feijão-caupi, feijão-de-corda ou feijão-fradinho (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa bastante cultivada nos trópicos semiáridos da África, Brasil e Estados Unidos. No Brasil, a cultura tem grande importância nas regiões Norte e Nordeste, que têm tradição em seu cultivo, comércio e consumo. Apresenta crescente avanço na região Centro-Oeste, onde o cultivo tem sido conduzido de forma mecanizada, e é crescente a demanda por cultivares de porte ereto.

A cultura, explorada tradicionalmente por pequenos produtores em cultivo de sequeiro e com baixa tecnificação, tem sido alvo de pesquisas mais intensas nas últimas décadas, ao mesmo tempo que vem apresentando melhorias técnicas e econômicas nos mais diferenciados sistemas de produção que, juntamente com outros fatores, vêm contribuindo para o aumento progressivo da participação de empresários de médio e grande porte na produção e comercialização de feijão-caupi. Estes fatos têm gerado uma demanda por cultivares com características que atendam às necessidades dos sistemas de produção tecnificados, dentre elas, além do alto potencial de rendimento, da resistência a pragas e doenças e da qualidade de grãos, são necessárias características de porte e arquitetura adequados ao maior adensamento e à mecanização da cultura, inclusive da colheita (BEZERRA et al., 2008).

No Acre, o feijão-caupi surge como uma importante cultura, sendo cultivado em uma grande variedade de regiões do Estado, considerado este um importante centro de diversidade genética para diversas espécies de feijão, tanto caupi como comum, sendo estes a principal fonte proteica para as comunidades regionais.

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi iniciar o melhoramento e manejo de produção de variedades de feijão-caupi para cultivo no Acre, selecionando progênies de variedades tradicionais de feijão-caupi para o Estado.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na área experimental da Universidade Federal do Acre, localizada no município de Rio Branco, sob as coordenadas geográficas 67° 42' 18" W e 10° 01' 30" S e elevação de aproximadamente 165 metros. O clima do local é do tipo equatorial, quente e chuvoso; Am, pela classificação de Koppen e Geiger, com temperatura média de 26,2 °C e pluviosidade de 1935 mm anuais (CLIMATE-DATA.ORG, 2018).

As sementes foram coletadas entre 2012 e 2013, em dez municípios acreanos. Os tratamentos consistiam em quatro variedades crioulas de feijão-caupi: Branco, Preto, Manteiguinha e Barrigudinho. Foram avaliados os seguintes caracteres: altura de plantas (m), comprimento de grão (mm), largura de grão (mm), espessura de grão (mm) e peso de cinquenta grãos (g). O experimento foi realizado em Delineamento em blocos casualizados (DBC). As unidades experimentais consistiam em parcelas, formadas por duas linhas de 5 metros cada, e 1 metro entre as linhas. De cada parcela experimental foram selecionadas, para avaliação, 5 plantas, e de cada uma destas, 5 vagens, para medições de vagens e grãos. Para análise estatística foi utilizado o software Genes, onde realizaram-se análise de variância e teste de comparação de médias Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade (CRUZ, 2008).

A área, medindo 240 m², foi preparada de forma manual, com sulcamento de 1 m entre linhas, e 0,04 m de profundidade, realizado com o auxílio de enxadas. O plantio foi realizado no dia 22 de março de 2018, ocorrendo posterior replantio após 15 dias. Recomendou-se para imediata aplicação no plantio: 8,9 g/m de Superfosfato Triplo; 5 g/m de KCl. Os tratos culturais foram realizados mediante capina manual, e aplicação de palhada nas entrelinhas, assim como através do uso de defensivos, para o controle de pragas, principalmente a vaquinha (*Diabrotica speciosa*), coleóptero muito comum na região; adotando-se este modelo de manejo até o final do ciclo da cultura. A colheita foi efetuada 90 dias após o plantio.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 consta o resultado da análise de variância para três variáveis de 12 variedades de feijão-caupi. Houve significância, a 5% de probabilidade, para todas as variáveis. Para comprimento de grão (CG), largura de grão (LG), espessura de grão (EG) e peso de cinquenta grão (P50G) há alta variabilidade genética. Com isso comprova que poderá haver sucesso com seleção de novas progênies para uma futura instalação de um programa de melhoramento. Silva et al. (2016) também verificaram

diferenças significativas para massa de grãos em genótipos de feijão-caupi com cultivo em sequeiro e irrigado.

Conforme o teste de Scott-Knott observou-se que as maiores médias para comprimento de grãos (CG), em milímetros, foram dos genótipos Branco P1 e Branco P2, com 8,84 e 8,79, respectivamente. Porém, estes não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados as variedades Preto P1, P2 e P3, e Barrigudinho P1, P2 e P3, diferenciando-se estatisticamente somente das variedades Manteiguinha P1, P2 e P3 (Tabela 2).

FV	GL	QM			
		CG (cm)	LG (mm)	EG (mm)	PG (g)
Tratamento	11	2,769558**	1,010377**	0,664005**	10,567286**
Repetição	1	0,633750	0,275204	0,173400	0,988204
Erro	11	0,195695	0,125304	0,116691	0,479731
TOTAL	23				
CV (%)		5,90	6,24	7,40	9,79
Média geral:		7,4967	5,6729	4,6175	7,0754

Tabela 1 - Quadrados médios obtidos na análise de variância a 5% de probabilidade para comprimento de grãos (CG), largura de grãos (LG), espessura de grãos (EG), e peso de grãos (PG), das progênies para as variedades Barrigudinho, Manteiguinha, Caupi-preto e Branco.

** significativo a 5% de probabilidade

Variedades	CG (cm)	LG (mm)	EG (mm)	PG (peso de grãos)
Manteiguinha P1	5,82a	4,45a	3,57a	3,27a
Manteiguinha P2	5,65a	4,53a	3,70a	3,42a
Manteiguinha P3	5,55a	4,55a	3,76a	3,51a
Branco P1	8,84b	5,98b	5,01b	9,17b
Branco P2	8,79b	5,97b	4,90b	9,02b
Branco P3	8,43b	5,94b	5,05b	9,08b
Preto P1	7,94b	6,32b	5,05b	7,86b
Preto P2	7,65b	6,03b	4,84b	7,84b
Preto P3	7,72b	6,17b	4,99b	7,86b
Barrigudinho P1	7,54b	5,95b	4,90b	7,23b
Barrigudinho P2	8,10b	6,10b	4,80b	7,96b
Barrigudinho P3	7,95b	6,11b	4,88b	8,73b

Tabela 2 - Valores médios das progênies para comprimento de grãos (CG), largura de grãos (LG), espessura de grãos (EG) e peso de grãos (PG), das progênies para variedades Barrigudinho, Manteiguinha, Caupi-preto e Branco.

As médias seguidas pela mesma letra não diferem ($p > 0,05$) estatisticamente entre si, conforme Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Para largura do grão (LG), espessura do grão (EG) e peso dos grãos (PG), não houve diferença estatística entre as variedades Branco, Preto e Barrigudinho. Em todas as progênies houve diferença estatística somente para a variedades de feijão Manteiguinha (Tabela 2).

A variedade Branco P1 não demonstrou as maiores médias, em milímetros, apenas para largura de grãos, entre todos os caracteres avaliados (Tabela 2).

Para peso de grãos, com a cultivar BRS Guariba, Gonçalves et al. (2009) encontraram 19 gramas, utilizando 100 sementes. Silva et al. (2016) encontraram valores que variaram de 12,10 a 18,45 gramas em cultivo sequeiro em 20 genótipos de feijão-caupi.

O tamanho do grão se constitui num fator de grande preferência de mercado, merecendo muita atenção para não ser marcadamente alterado durante o processo de seleção; já que há preferência por grãos com peso de 100 grãos em torno de 18 gramas.

4 | CONCLUSÕES

As variedades estudadas demonstraram alta variabilidade genética para as variáveis avaliadas.

A variedade Branco P1, apresentou as maiores médias, sendo viável para o desenvolvimento e seleção de linhagens.

REFERÊNCIAS

BEZERRA, A. A. de C.; TAVORA, F. J. A. F.; FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q. Morfologia e produção de grãos em linhagens modernas de feijão-caupi submetidas a diferentes densidades populacionais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, João Pessoa, v. 8, n. 1, p. 85-93, 2008.

CLIMATE-DATA.ORG. **Dados Climáticos para Cidades Mundiais**. Clima: Rio Branco. Disponível em: <https://pt.climate-data.org/location/4000/>. Acesso em 12 jul. 2018.

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

ROCHA, M. de M.; CARVALHO, K. J. M. de.; FREIRE FILHO, F. R. de.; LOPES, A. C. de A.; GOMES, R. L. F.; SOUSA, I. da S. Controle genético do comprimento do pedúnculo em feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 270-275, mar. 2009.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Wiley-Blackwell, v. 30, n. 3, p.507-512, 1974.

SMIDERLE, O.J.; MARINHO, J.T.S.; GONÇALVES, J.R.P.; VIEIRA JÚNIOR, J.R. **Colheita e Armazenamento de sementes**. In: ZILLI, J.E.; VILARINHO, A.A.; ALVES, J.M.A. A cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira. Boa Vista: Embrapa, 2009. 356p.

SILVA, G.C.; MAGALHÃES R.C; SOBREIRA, A.C; SCHMITZ, R; SILVA, L.C. Rendimento de grãos secos e componentes de produção de genótipos de feijão-caupi em cultivo irrigado e de sequeiro. **Revista Agro@mbiente Online**, Boa Vista, RR, v. 10, n. 4, p. 342-350, 2016.

VALADARES, R. N.; MOURA, M. C. C. L.; SILVA, A. F. A.; SILVA, L. S.; VASCONCELOS, M. C. C. A.; SILVA, R. C. Adaptabilidade e estabilidade fenotípica em genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) de porte ereto/semiereto nas mesorregiões leste e sul Maranhense. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, Campina Grande, v. 6, p. 21-27, 2010.

CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DE AÇUCENA (*Amaryllidaceae*) COLETADOS NO ESTADO DO CEARÁ

Rita de Cassia Alves Pereira

Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE

Ana Cecília Ribeiro de Castro

Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE

Antônio Marcos Esmeraldo Bezerra

Universidade Federal do Ceará, Departamento de
Fitotecnia, Fortaleza-CE

RESUMO: O conhecimento das espécies da família *Amaryllidaceae* é de extrema importância por se tratar de um recurso genético da flora nativa tropical de alto valor medicinal e ornamental. O objetivo deste trabalho foi caracterizar acessos de açucena coletados em onze localidades do Ceará. O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Agroindústria Tropical no município de Fortaleza (CE) no período de março/2017 a junho/2018. O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso, com quatro plantas por localidade e as variáveis analisadas foram: número, comprimento e largura de folha, (NF, CF, LF) diâmetro do bulbo (DB), número e comprimento de raízes (NR e CR), biomassa fresca e seca dos bulbos (BMFB e BMSB), das folhas (BMFF e BMSF) e das raízes (BMFR e BMSR). Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de médias pelo teste Tukey a 0,05% de probabilidade. Houve diferença significativa entre os acessos para todas as características.

As características que apresentaram maior variação foi biomassa fresca e seca dos bulbos. Os acessos provenientes dos municípios de Tauá, Aiuaba e Pacatuba foram os apresentaram os menores valores, enquanto que, o acesso de Russas, foi o que apresentou as maiores médias (BMFB: 524 g e BMSB: 128,9 g; BMFF: 111,6g e BMSF: 37,5g; BMFR: 106,0g e BMSR: 18,8g) em todas as características analisadas podendo ser utilizado em programas de melhoramento da espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Amarílis, Bulbos, Descritores

CHARACTERIZATION OF ACCESSES OF AÇUCENA (*Amaryllidaceae*) COLLECTED IN THE STATE OF CEARÁ

ABSTRACT: The knowledge of the species of the family *Amaryllidaceae* is of extreme importance because it is a genetic resource of tropical native flora of high medicinal and ornamental value. The objective of this work was to characterize accesses of sugar collected in eleven localities of Ceará. The experiment was conducted in a greenhouse of Embrapa Tropical Agroindustry in the municipality of Fortaleza (CE) from March / 2017 to June / 2018. The experimental design was a completely randomized design with four plants per locality and the variables analyzed

were leaf number, length and leaf width (NF, CF, LF) diameter of the bulb (DB), number and length of roots (NR and CR), fresh and dry biomass of the leaves (BMFB and BMSB), leaves (BMFF and BMSF) and roots (BMFR and BMSR). Data were submitted to analysis of variance and test of means by Tukey test at 0.05% of probability. There was a significant difference between accesses for all characteristics. The characteristics that presented greater variation were fresh and dry biomass of the bulbs. The accesses from the municipalities of Tauá, Aiuaba and Pacatuba were the lowest values, whereas the access of Russas was the one with the highest averages (BMFB: 524 g and BMSB: 128.9 g; BMFF: 111.6 g and BMSF: 37.5g, BMFR: 106.0g and BMSR: 18.8g) in all analyzed characteristics and can be used in breeding programs of the species.

KEYWORDS: Amaryllis, Bulbs, Descriptors.

1 | INTRODUÇÃO

A utilização de vegetação nativa no paisagismo pode ser relevante para a conservação, pelo fato da disponibilidade dessas plantas para a comercialização representar um diferencial no mercado e devido as características de adaptação ao meio, regionalismo, diversidade biológica e importante papel ecológico no paisagismo (HEIDEN et al., 2006). As plantas nativas podem ainda proporcionar ganhos ambientais devido à menor exigência para a sua manutenção, em função da rusticidade e adaptação (HEIDEN et al., 2007). Ademais, sua produção e comercialização constituem opção para a geração de emprego e renda (PEREIRA et al., 2012).

As bulbosas ornamentais de maior importância são as espécies da família Amaryllidaceae, cultivadas e comercializadas com diversas finalidades: flor de corte, planta para vasos e paisagismo. Possui elevado valor ornamental e grande apelo comercial, onde a conservação de sua diversidade natural é uma prioridade (TOMBOLATO *et al.*, 2010).

No Brasil, diversas espécies de Amaryllidaceae, podem ser encontradas em todas as regiões, e das 134 espécies ocorrentes, 75 são endêmicas. O extrativismo vegetal, a destruição do habitat natural, o plantio extensivo e outras atividades antrópicas têm eliminado diversas populações de espécies brasileiras de Amaryllidaceae (DUTHIL *et al.*, 2013). Estudar e conhecer as espécies pertencentes a esta família é importante não somente pelo conhecimento da diversidade, mas também pelo potencial ornamental na flora tropical que seus membros como espécie têm, dado ao fato de que o setor produtor de flores e plantas ornamentais no Brasil é quase exclusivamente composto por espécies de plantas introduzidas (AMARAL-LOPES & CAVALCANTI, 2015).

A conservação de recursos genéticos tem a finalidade de preservar a diversidade e a variabilidade das informações genéticas contida nos genomas dos indivíduos representativos das espécies (COSTA; SPEHAR, 2012). Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) são uma opção para a conservação de recursos

genéticos vegetais (COSTA *et al.*, 2011). A caracterização de bancos e coleções de germoplasma constitui uma ferramenta importante para a conservação e o melhoramento da espécie alvo, garantindo o uso eficiente do germoplasma (FIGAS *et al.*, 2018). A caracterização consiste na obtenção planejada e sistemática de dados com base na avaliação de características capazes de descrever e diferenciar os acessos existentes no banco de germoplasma, sendo apoiada em observações de variáveis qualitativas e em medidas de variáveis quantitativas de diversos caracteres morfológicos facilmente distinguíveis (BURLE; OLIVEIRA, 2010). O conhecimento das espécies desta família é de extrema importância por se tratar de um recurso genético da flora nativa tropical de alto valor medicinal e ornamental. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização morfológica de acessos da família Amaryllidaceae coletados em municípios do estado do Ceará.

2 | DESCRIÇÃO DA FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE

A família Amaryllidaceae abrange aproximadamente 72 gêneros e cerca de 1.450 espécies e vasta distribuição mundial. Apresenta distribuição cosmopolita, sendo os locais de maior incidência as regiões tropicais e subtropicais. Possui como centros de diversidade a América do Sul, África e Mediterrâneo, com apenas um gênero disperso pelo Novo e Velho Mundo. Os gêneros tropicais estão adaptados principalmente a habitats tradicionalmente secos ou ambientes completamente xéricos, onde os bulbos se mantêm dormentes (MEEROW; SNIJMAN 1998, MEEROW 2004). Essa distribuição da família Amaryllidaceae mostra um endemismo regional, com quatro grupos monofiléticos de organismos, que incluem os clados basicamente africanos, eurásianos, australasianos e americanos (AMARAL, 2012).

Amaryllidaceae é uma família de plantas bulbosas perenes desde há muito integradas na ordem de monocotiledóneas das Asparagales. Possui cerca de 73 gêneros e 1605 espécies estão incluídos nesta família (APG III, 2009). Quatro tribos, 12 gêneros e cerca de 100 espécies, representam a família no Brasil, incluindo táxons exclusivamente brasileiros, como *Cearanthes* Ravenna, *Eithea* Ravenna, *Griffinia* Ker Gawl, *Tocantinia* Ravenna e *Worsleya* (W. Watson ex Traub (DUTILH *et al.*, 2015).

O nome da família deriva do gênero Amarílís, motivo pelo qual é tradicionalmente designada por família das Amarílís. Por essa mesma razão, muitas das espécies desta família são introduzidas no mercado internacional de flores sob o nome comercial de Amarílís. Devido à ocorrência de espécies desta família se destacar por sua beleza, são bastante reconhecidas pela sua utilização no paisagismo (AMARAL, *et al.*, 2007). Diversos são os trabalhos que abordam espécies de Amaryllidaceae como úteis economicamente devido aos seus atributos como planta ornamental (DUTILH, 2005).

As Amaryllidaceae são plantas bulbosas e perenes de hábito herbáceo, com folhas com filotaxia dística ou em espiral, inflorescência escaposa, umbeliforme ou uniflora, envolta por duas ou três brácteas maiores e geralmente com mais brácteas

internas pequenas, pedicelos não articulados, estilete longo e estigma seco ou úmido, todas as raízes são adventícias e tem sua origem, e modo geral, na placa basal do bulbo (MEEROW; SNIJMAN, 1998). Os bulbos destas plantas possuem grande capacidade de armazenamento de nutrientes e água que são utilizados em épocas secas, momento em que a planta fica sem a parte aérea (ALVES-ARAÚJO; PESSOA; ALVES, 2012). Possuindo poucas e/ou pequenas populações, determinadas espécies tem distribuição geográfica limitada. Podem ser encontradas em diversos ambientes como matas, campos, montanhas, restingas brejos e sobre pedras e geralmente estas espécies são associadas à vegetação herbácea. Os habitats nativos das espécies silvestres da família Amaryllidaceae variam e geralmente florescem no final do inverno e primavera, com exceções ocasionais no outono. Inúmeras espécies são exploradas de modo predatório, por possuírem atrativo ornamental (DUTILH, *et al.*, 2013).

3 | METODOLOGIA

Foram avaliados onze (11) acessos da família Amaryllidaceae pertencentes ao Banco Ativo da Embrapa Agroindústria Tropical, localizado em Fortaleza-CE, coordenadas geográficas 3°45'05"S e 38°34'36"W. Os acessos são provenientes de coletas realizadas em onze municípios do Ceará: Aiuaba, Cascavel, Fortaleza, Guaramiranga, Itaitinga, Moraujo, Pacatuba, Pacoti, Parambu. Russas, Tauá (Tabela 1).

Municípios	Latitude	Longitude	Altitude
Aiuaba	06° 34' 25" S	40° 07' 25" W	466m
Cascavel	04° 07' 59" S	38° 14' 31" W	40m
Fortaleza	03° 43' 02" S	38° 32' 35" W	21m
Guaramiranga	04° 15' 48" S	38° 55' 59" W	900m
Itaitinga	03° 58' 10" S	38° 31' 41" W	60m
Moraujo	03° 28' 00" S	40° 40' 50" W	66m
Pacatuba	03° 59' 03" S	38° 37' 13" W	65m
Pacoti	04° 13' 30" S	38° 55' 24" W	736m
Parambu	06° 12' 40" S	40° 41' 40" W	478m
Russas	04° 56' 25" S	37° 58' 33" W	20m
Tauá	06° 00' 11" S	40° 17' 34" W	402m

Tabela 1: Municípios onde foram coletados os acessos de Amaryllidaceae. Fortaleza, CE. 2019.

Fonte: Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará-IPECE (2003).

O plantio dos bulbos foi realizado de janeiro a março/2016 em casa de vegetação protegida com 50% de sombreamento. Os bulbos foram cultivados em vasos de plástico com capacidade de 5 litros, preenchidos com uma mistura de substrato comercial e areia peneirada na proporção 3:1. Após o plantio, essas plantas foram irrigadas diariamente utilizando sistema de irrigação por aspersão por um tempo aproximado de 40 minutos. As avaliações foram realizadas no período de

janeiro a julho 2018. As plantas estavam com 30 meses de cultivo e se encontravam no estágio vegetativo de desenvolvimento. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado sendo os tratamentos representados pelos municípios com quatro repetição e três plantas por parcela. Os resultados foram submetidos à análise de variância e, observada a significância, pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Os descritores utilizados para a caracterização morfológica foram baseados no estágio de desenvolvimento em que as plantas se encontravam adaptados de *Amarilis* (*Hippeastrum Herb.*) da UPOV – União Internacional para Proteção de Novas Variedades de Plantas na língua Portuguesa para uso no SNPC – Sistema Nacional para Proteção de Cultivares, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (TOMBOLATO *et al.*, 2007), sendo: comprimento e largura de folha, diâmetro do bulbo, comprimento de raízes, biomassa fresca e seca dos bulbos, das folhas e das raízes.

O comprimento das folhas foi medido da extremidade da folha até o início do pedicelo, com auxílio de uma régua e os valores obtidos em centímetros (cm). A largura da folha foi medida com um paquímetro manual a partir da parte mais larga do limbo das folhas sendo o resultado expresso em centímetros (adaptada de Alves-Araújo; Alves, 2007). Os caracteres relacionados às folhas foram avaliados quando estas se apresentavam totalmente expandidas. Os bulbos foram lavados, e com auxílio de um paquímetro manual foi determinado o diâmetro. Para determinação da biomassa fresca foram determinados os pesos dos bulbos, folhas e raízes, com o auxílio de uma balança digital. O mesmo procedimento foi realizado para biomassa seca, após a secagem desses materiais em estufa com circulação de ar forçado a 45°C.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para todas características avaliadas, verificou-se grande variação entre os acessos (Tabela 2). Seguindo a classificação para os bulbos de *Narcissus* proposta por HANKS, (2003), na qual são divididos de acordo com circunferência: bulbo pequeno (10-12 cm), bulbo médio (12-16 cm) e bulbo grande (>16 cm), pode-se afirmar que os acessos estudados estão nessas três categorias: os acessos de Aiuaba (10cm), Tauá (10,5 cm) e Parambu (11cm) foram considerados pequenos; Pacatuba (15 cm), Pacoti (16,2 cm) e Moraujo (16,6 cm) médios e os outros municípios foram classificados como acessos de bulbos grandes destacando o acesso coletado em Russas que atingiu 33 cm de circunferência, biomassa fresca dos bulbos (524 gramas) e biomassa seca dos bulbos (128,9 gramas). Os acessos provenientes de Cascavel e Pacoti apresentaram maior comprimento de folhas (39,8cm; 39,5cm), enquanto que as folhas mais estreitas são oriundas de Aiuaba, Tauá e Parambu (1,7cm). O município de Russas, foi o que apresentou o acesso com médias superiores para todas as características. Essas plantas apresentam relevante riqueza florística com alto apelo

ornamental, podendo ser utilizado em programas de melhoramento da espécie para ser utilizado no paisagismo em especial na ornamentação de canteiros e jardins.

Município	DB (cm)	BMFB (gr)	BMFS (gr)	CF (cm)	LF (cm)	BMFF (gr)	BMSF (gr)	BMFR (gr)	BMSR (gr)
Aiuaba	10,0	23,6	4,7	22,5	1,7	18,8	2,4	34,0	9,0
Cascavel	19,3	107,2	21,4	39,8	4,1	30,0	6,2	26,9	6,7
Fortaleza	23,3	233,8	46,7	38,4	5,6	24,0	4,7	4,0	0,5
Guaramiranga	19,1	325,6	116,6	38,7	4,8	26,2	5,6	89,6	16,9
Itaitinga	25,0	198,0	40,2	38,4	3,0	87,0	23,8	91,2	17,3
Moraujo	16,6	152,9	30,4	28,8	3,7	32,0	2,3	65,0	15,0
Pacatuba	15,0	134,6	124,8	13,9	2,2	10,0	3,0	58,0	13,6
Pacoti	16,2	243,9	43,7	39,5	2,8	16,6	2,0	89,5	16,2
Parambu	11,0	34,9	6,3	20,4	1,7	5,0	2,0	32,1	6,2
Russas	33,9	524,0	128,9	41,9	5,2	116,6	37,5	106,0	18,8
Tauá	10,5	70,7	14,3	10,2	1,6	10,1	1,6	12,3	2,21

Tabela 2. Características morfológicas de acessos de açucena coletadas em municípios do Ceará. Fortaleza, CE, 2019.

Diâmetro do bulbo (DB), Biomassa fresca e Biomassa seca dos bulbos (BMFB e BMSB), Comprimento das folhas (CF), Largura das folhas (LG), Biomassa fresca e seca das folhas (BMFF e BMSF), biomassa fresca e seca das raízes (BMFR e BMSR).

REFERENCIAS

ALVES-ARAÚJO, A.; PESSOA, E.; ALVES, M. Caracterização morfoanatômica de espécies de Amaryllidaceae e Alliaceae do Nordeste Brasileiro. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 4, p. 68-81, 2012.

AMARAL, A.C., VEIGA, R.F.de A.; TOMBOLATO, F.C.; BARBOSA, W.; CONAGIN, A. Conservação in vitro de germoplasma indexado de três cultivares de amarílis (*Hippeastrum* Herb.). **Ornamental Horticulture** v. 13, n.2, p. 113-120, 2007.

AMARAL, A.C. *Habranthus* Herb.(Amaryllidaceae) no Brasil: estudo taxonômico, caracterização morfológica e relações filogenéticas. 167 f., il. Tese (Doutorado em Botânica) Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

AMARAL-LOPES, A. C.; CAVALCANTI, T. B. *Habranthus* (Amaryllidaceae) of Brasil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 1, p. 203-220, 2015.

APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society** 161: 105-121.

BURLE, M.L.; OLIVEIRA, M. Manual de Curadores de Germoplasma-Vegetal: Caracterização Morfológica. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

COSTA A.M.; A.; SPEHAR, R.S. Base genética da diversidade. **Conservação de recursos genéticos no Brasil. Brasília, DF: Embrapa**, p. 28-59, 2012.

COSTA, T.S.; DA SILVA, A.V.C.; LEDÓ, A.S.; DOS SANTOS, A.R.F.; SILVA JÚNIOR, J.F. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.5, p. 499-508, 2011.

DUTILH, J.H.A. Liliaceae sl. **Annals of Botany**, v. 88, p.1057-1069, 2005.

DUTILH, J.H.A. *et al.* Amaryllidaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M.A. Livro vermelho da flora brasileira. Rio de Janeiro: Andrea Jakobson Estúdio/Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 126-139, 2013.

DUTILH, J.H.A.; OLIVEIRA, R. S. Amaryllidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro. RJ**, 2015.

FIGÀS, M.R.; PROHENS, J; CASANOVA, C.; FERNÁNDEZ-DE-CÓRDOBA, P; SOLER, S. Variation of morphological descriptors for the evaluation of tomato germplasm and their stability across different growing conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 238, p. 107–115, 2018.

HANKS, G. R. **Narcissus and Daffodil: the genus narcissus**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 452

HEIDEN, G.; BARBIERI, R.L.; STUMPF, E.R.T. Considerações sobre o uso de plantas ornamentais nativas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas v.12, n.1, p.2-7, 2006.

HEIDEN, G.; STUMPF, E.R.T.; BARBIERI, R.L.; ROLLI, P.R. Uso de plantas subarborescentes e herbáceas nativas do Rio Grande do Sul como alternativa a ornamentais exóticas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.1, p.850-853, 2007.

INSTITUTO DE PESQUISA E ESTATÍSTICA ECONÔMICA DO CEARÁ (IPECE) Tabela dos municípios e coordenadas geográficas. Disponível em: www2.ipece.ce.gov.br/publicações/anuário/anuário_2003/Tabela%201.1.11.xls Anuário estatístico 2002/2003. Acesso em: 12 jun. 2019

MEEROW, A.W.; SNIJMAN, D.A. Amaryllidaceae. In: **Flowering Plants Monocotyledons**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 83-110, 1998.

MEEROW, A.W. Alliaceae, Amaryllidaceae. In: Smith, N.; Mori, S.A.; Henderson, A.; Stevenson, D.Wm. & Heald, S.V. (Eds.). **Flowering plants of the Neotropics**. The New York Botanical Garden, New Jersey. p. 408-412. 2004.

PEREIRA, Z.V.; FERNANDES, S.S.L.; SANGALLI, A; MUSSURY, R.M. Usos múltiplos de espécies nativas do bioma Cerrado no Assentamento Lagoa Grande, Dourados, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.7, n.2, p.126-136, 2012.

TOMBOLATO, A. F. C.; DUTILH, J. H. A.; BARBOSA, W.; VEIGA, R. F. A.; LUCON, T. N. Brazilian descriptor for *Hippeastrum* hybrids. In: **Building a sustainable future: the role of botanic gardens. Proceedings of the 3rd Global Botanic Gardens Congress, Wuhan, China, 16-20 April, 2007**. Botanic Gardens Conservation International, 2007. p. 1-11.

TOMBOLATO, A.F.C.; UZZO, R.P.; JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ M.D.S.; STANCATO, G.C.; ALEXANDRE, M.A.V. Bulbosas ornamentais no Brasil. **Ornamental Horticulture**, v. 16, n. 2, p. 127-138, 2010.

CONSERVAÇÃO DE TECIDOS DO APARELHO UROGENITAL DE AVES MANTIDOS EM SORO FISIOLÓGICO SOB-REFRIGERAÇÃO POR ATÉ 48 HORAS PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Tauane Catilza Lopes Fernandes

Universidade Federal do Ceará, Departamento de Zootecnia, Fortaleza-Ceará

Shaline Séfara Lopes Fernandes

Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Departamento de Biologia- Recursos Naturais, Dourados – Mato Grosso do Sul

RESUMO: A colheita de materiais biológicos no campo requer de aparatos técnicos científicos geralmente inacessíveis e de alta representabilidade econômica. O objetivo deste experimento foi testar a viabilidade de proteínas extraídas do aparelho urogenital de galos caipiras/Carijó (*Gallus gallus domesticus*), após refrigeração em caixa térmica de isopor no período de 24 e 48 horas. Dezesesseis amostras colhidas foram separadas em: testículo, epidídimo, ducto eferente funcional e o aparelho urogenital completo. O isopor foi vedado para simular condições de transporte em temperatura ambiente (30 a 35°C). As amostras retiradas nos seus referidos tempos de armazenamento foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C até serem liofilizadas. Liofilizadas as amostras foram submetidas à extrações de proteínas, quantificadas para avaliar sua concentração e avaliadas em gel de poliacrilamida 12,5% pela técnica de SDS-PAGE. Não houve efeito visual

na degradação das proteínas analisadas em gel, as bandas apresentaram características normais de distribuição e migração. As amostras referentes ao tratamento de 48 horas apresentaram sutil rastro de proteínas no gel, fator no qual pode estar relacionado ao tempo de exposição das amostras; aos tampões de extração ou pela permeabilidade do gel ao tempo de corrida. Para avaliação da integridade das proteínas aparentemente esta técnica se apresentou apta em condições de simulação do transporte do campo ao laboratório até 48 horas sob-refrigeração. Aperfeiçoar o processo de colheita de materiais em campo nos permite viabilizar pesquisas científicas e conservar as características biológicas estabelecendo mecanismos práticos e sustentáveis em regiões de difícil acesso.

PALAVRAS-CHAVE: inovação, proteômica, protocolo

CONSERVATION OF FABRICS OF THE UROGENITAL POISON OF BIRDS KEPT IN PHYSIOLOGICAL SERUM UNDER REFRIGERATION FOR UP TO 48 HOURS FOR PROTEIN EXTRACTION

ABSTRACT: The harvesting of biological materials in the field requires scientific

technical apparatus generally inaccessible and of high economic representativeness. The objective of this experiment was to test the viability of proteins extracted from the urogenital apparatus of goats caipiras/Carijó (*Gallus gallus domesticus*), after cooling in a Styrofoam thermal box in the period of 24 and 48 hours. Sixteen collected samples were separated into: testis, epididymis, functional efferent duct and complete urogenital apparatus. The Styrofoam was sealed to simulate transport conditions at room temperature (30 to 35 ° C). Samples taken at their storage times were frozen in liquid nitrogen and kept in a freezer at -80 ° C until lyophilized. Lyophilized samples were submitted to protein extractions, quantified to evaluate their concentration and evaluated in 12.5% polyacrylamide gel by SDS-PAGE technique. There was no visual effect on the degradation of proteins analyzed in gel, the bands presented normal distribution and migration characteristics. Samples from the 48-hour treatment showed a subtle trace of proteins in the gel, a factor in which it may be related to the exposure time of the samples; to the extraction plugs or by the permeability of the gel at running time. In order to evaluate the integrity of the proteins, this technique was apt to be able to simulate transport from the field to the laboratory for up to 48 hours under refrigeration. Improving the process of collecting materials in the field allows us to make scientific research feasible and to preserve the biological characteristics, establishing practical and sustainable mechanisms in difficult access regions.

KEYWORDS: innovation, proteomics, protocol

1 | INTRODUÇÃO

Análises proteômicas são essenciais para elucidação de processos biológicos por estarem envolvidas em praticamente todos os processos metabólicos, permite a elucidação de rotas metabólicas e identificação de moléculas bioativas que são alvos de novos fármacos (HEIN et al., 2013).

Técnicas relacionadas para extração, quantificação, identificação e purificação de proteínas afetam diretamente os achados científicos em função da qualidade do material colhido e sua armazenagem.

Partindo da colheita do material, o difícil acesso físico, a contaminação direta ou cruzada, o gasto com transportes e a dependência de equipamentos sofisticados (SANCHES, 2016) para seu armazenamento com botijão de Nitrogênio líquido e a sua manutenção constata onera os custos para desenvolvimento das pesquisas.

Desde 2016 (SANCHES, 2016) até os primórdios atuais os cientistas brasileiros estão enfrentando grandes desafios, com cortes ainda maiores nos orçamentos e a arrecadação menor afetando as agências de financiamento.

Mecanismos que facilitem o transporte do campo as dependências do laboratório para a realização das análises são fundamentais quando se prioriza meios sustentáveis para desenvolvimento de pesquisas e propagação de conhecimento ao público interessado.

Desenvolver métodos de preservação de tecidos é alvo dos principais assuntos

discutidos em diversos países, pesquisadores têm-se dedicado ao estudo da preservação de órgãos (BELZER et al., 1967), dando ênfase na descoberta de meios que permitam aumentar, cada vez mais, o tempo de estocagem.

Ideal para várias finalidades terapêuticas e pela facilidade de aquisição nas farmácias e drogarias o soro fisiológico 0,9% se destaca como alternativa promissora para a preservação de tecidos biológicos, devido sua estabilidade quando armazenado em temperatura ambiente ou em geladeira, não alterando suas concentrações de cloreto de sódio, portanto, seu uso é seguro e eficiente (RATTI et al., 2011). E este fato tem sido observado recentemente na mídia com o estudo do uso de pele de tilápia para tratar queimaduras (LIMA-JUNIOR et al., 2017).

Como proposta para a melhoria deste cenário exposto acima o presente estudo propõe a conservação de tecidos do aparelho urogenital de aves mantidos em soro fisiológico sob-refrigeração por até 48 horas para extração de proteínas.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Colheita do Material

O aparelho urogenital de galos caipiras/Carijó (*Gallus gallus domesticus*) foram colhetados no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, no Setor de Avicultura (3°44'33.4" de Latitude Sul, 38°34'44.2" de Longitude Oeste).

No momento do abate os aparelhos urogenitais foram retirados com auxílio de tesoura cirúrgica e pinças, lavados em solução de soro fisiológico para retirar o excesso de sangue e condicionados em tubos falcon de 50mL em solução de soro fisiológico 0,9% de NaCl em temperatura ambiente de 30°C a 35°C. As amostras após colhidas foram mantidas em caixa de isopor contendo gelo. Além do aparelho urogenital completo, foram colhidas partes que compõem o aparelho urogenital: Ducto deferente funcional, Epidídimo e Testículos. O transporte do material para o laboratório de Fisiologia Animal e Reprodução foi realizado em 2 minutos.

2.2 Armazenamento

No laboratório a caixa de isopor recebeu mais gelo em placas artificiais até cobrirem todas as laterais e superfícies superiores e inferiores dos tubos. Os tubos foram mantidos em suportes de plástico (Hacks) como medida precavida para evitar possíveis vazamentos e contaminações entre os materiais. Em seguida a caixa de Isopor foi vedada com fita adesiva e mantida em temperatura ambiente sobre bancada (simulando o transporte terrestre e ou aéreo). Terminados às 24 horas 08 amostras foram retiradas, restando 08 amostras que foram novamente vedadas até completar 48 horas.

As amostras retiradas nos seus referidos tempos de armazenamento foram

congeladas sem a presença do soro fisiológico em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C até serem liofilizadas. O procedimento de liofilização partiu de condicionar as amostras a 51°C por 12 horas. Depois de liofilizadas as amostras foram maceradas em cadinho de porcelana e foram retirados 100mg de cada amostra para realização do protocolo de extração de proteínas.

As amostras extraídas foram: Aparelho urogenital completo armazenado até 24 horas (apr 24H); Testículos armazenados até 24 horas (te 24H); Ducto deferente funcional armazenado até 24 horas (ddf 24H); Epidídimo armazenado até 24 horas (ep 24H); Aparelho urogenital completo armazenado até 48 horas (apr 48H); Testículos armazenados até 48 horas (te 48H); Ducto deferente funcional armazenado até 48 horas (ddf 48H); Epidídimo armazenado até 48 horas (ep 48H).

2.3 Extração de proteínas – protocolo proposto para esta técnica

Após a pesagem de 100mg de amostra estas foram condicionadas em tubo Eppendorf de 1,5mL e suspensas em 700 μ l de solução de: Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Fosfato Salina (PBS) a 1%. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de vórtex por 1 minuto a cada 15 minutos. O procedimento foi repetido por quatro vezes, perfazendo um total de 60 minutos. As amostras foram mantidas em geladeira (10 °C) entre as homogeneizações.

Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas a 5000g/ 12000 rpm a 4 °C por 30 minutos. Foi retirado 300 μ l do sobrenadante e condicionado em novo tubo Eppendorf de 1,5mL acrescido de 1mL de acetona gelada, homogeneizados à mão por 1 minuto e centrifugadas a 5000g/ 12000 rpm a 4 °C por 30 minutos. Descartado o sobrenadante por inversão dos tubos cuidadosamente e condicionados em geladeira em bandeja forrada com papel absorvente por 24 horas ou até a secagem absoluta da acetona. Após secas as amostras extraídas foram ressuspendidas em água ultrapura e congeladas em freezer -20 °C.

A concentração total de proteínas solúveis foi determinada seguindo a metodologia proposta por Bradford para análise de proteínas (BRADFORD, 1976).

2.4 SDS-PAGE

Para eletroforese unidimensional, foi alíquotado um volume contendo 25 μ g de proteína ao tampão de amostra (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 10% (v/v) glicerol, 0,2 M de Ditiotretol (DTT), 0,02% Azul de bromofenol), aquecido a 100 °C durante 90 segundos. Depois dessa prévia desnaturação as amostras foram aplicadas nas cavidades (poços) do gel de empilhamento (WILSON, WALKER, 2010). A programação da corrida proposta para este estudo foi: 140V, 70mA, 21w para 4 géis (placas duplas) na cuba SE 600 Ruby por duração média de 8 horas. Por gel individual deve-se usar corrente de 25mA. Após o término do tempo de corrida o foi corado com Coomassie Brilliant Blue (CBB-R250) por 12 h, e descorado por lavagens em solução contendo

etanol (40%), ácido acético (10%) em água bidestilada, como descrito por Souza et al. (2012) e Rodrigues et al. (2013). Depois da descoloração, o gel foi escaneado a 300 dpi (Scanner de Imagem, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) e salvo como arquivo TIFF.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de um novo protocolo com abordagem de menos é mais, fazendo o uso de soluções de extrações mais simplificadas como: SDS, PBS e Acetona facilita o mecanismo do processo de extração e diminui a concentração de eletrólitos que afetam diretamente a precipitação de proteínas, a quantificação e posteriormente a análise de identificação por espectrometria de massas.

Detergentes surfactantes como SDS agem rompendo as ligações não covalentes das proteínas, causando alteração na conformação estrutural nativa – desnaturação (BLOOR et al., 1995). E o PBS (cloreto de sódio +fosfato de sódio) é uma solução tamponante isotônica que permite manutenção do pH e estabilidade das reações bioquímicas como a da solução de soro fisiológico (cloreto de sódio + água).

Deste modo à separação por gel de poliacrilamida não é influenciada por esses sais, já que o SDS faz parte da produção dos géis e soluções tamponantes durante a corrida eletroforética, conferindo o nome a técnica SDS-PAGE e o PBS mantém a estabilidade das proteínas em pH tamponante da solução de corrida (WILSON, WALKER, 2010).

O SDS permite maior condutividade elétrica por ser um surfactante aniônico que se associa facilmente a micelas iônicas maior interação com micelas iônicas de moléculas orgânicas e polímeros pré-moldados a partir de oxido de etileno, celulose (MODOLON et al., 2009), xantana entre outros.

O excesso de sais utilizados como detergente para extração de proteínas afeta a quantificação de proteína pelo método de Bradford; a visibilidade dos extratos proteicos, vistos os impedimentos nas interações proteína-corante e posteriormente a identificação das proteínas pela espectrometria de massas (LAN et al., 2013).

Estudos apontam que o método de Bradford pode sofrer interferência da intensidade de cor por alguns compostos iônicos utilizados em sistema aquoso bifásico, a fim de aumentar a força iônica da fase aquosa bifásica (SILVÉRIO et al., 2012). A interferência de sais na quantificação de proteínas produzirá resultados errôneos de atividade específicas das proteínas/enzimas e de fatores de identificação e purificação (TREICHEL et al., 2016).

Como ambos os sais utilizados são compatíveis com a espectrometria de massas, ocorre uma diminuição de processos, não sendo necessário dessalinizar amostras pós- extração.

As amostras extraídas e submetidas à corrida eletroforética em gel de

poliacrilamida 12,5%- SDS/PAGE (Figura 1), para a avaliação da integridade das proteínas mostrou-se viável.

Não houve efeito visual na degradação das proteínas analisadas em gel, as bandas apresentaram características normais de distribuição e migração. As amostras referentes ao tratamento de 48 horas apresentaram sutil rastro de proteínas no gel, fator no qual pode estar relacionado ao tempo de exposição das amostras; aos tampões de extração ou pela permeabilidade do gel ao tempo de corrida. A técnica se apresentou apta em condições de simulação do transporte do campo ao laboratório em até 48 horas sob-refrigeração.

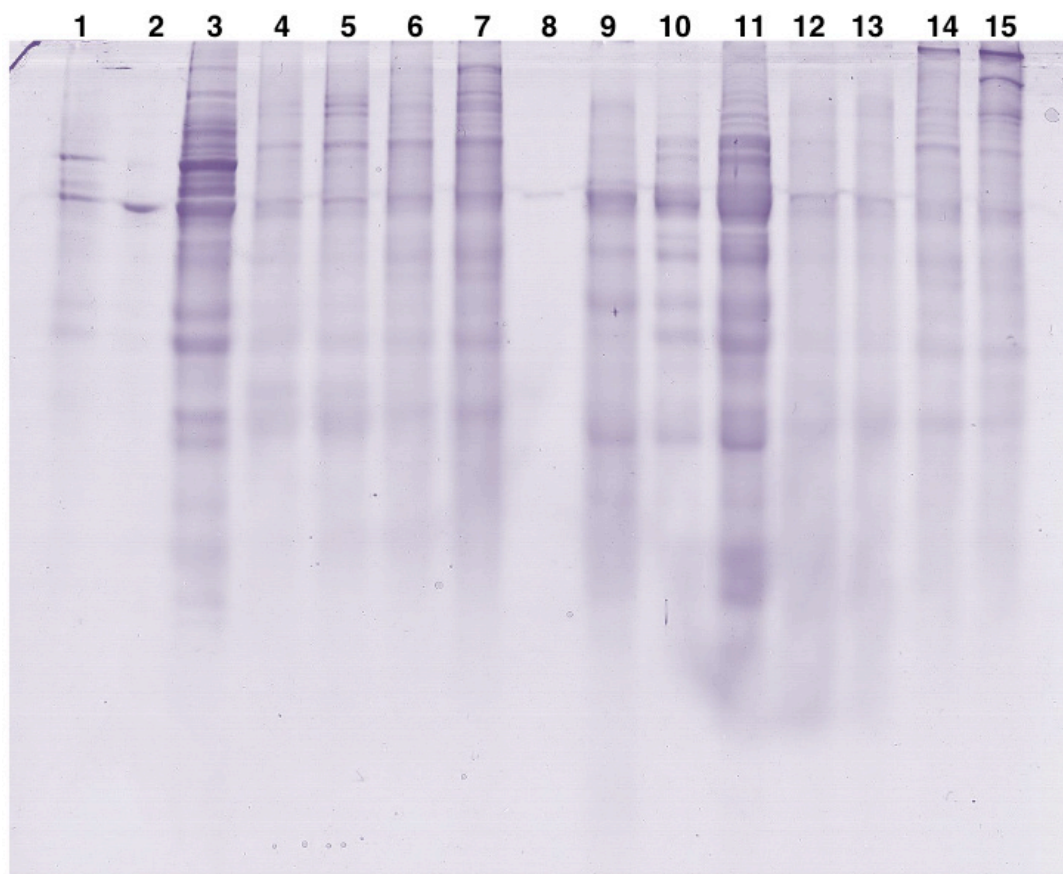


Figura 1. Gel de poliacrilamida 12,5% SDS/PAGE de aparelho urogenital de *Gallus gallus domesticus*. Legenda: Amostras: 1 e 2 - Aparelho reprodutor completo até 24 horas (apr 24H); 3 – Testículos (te 24H); 4 e 5 – Ducto deferente funcional (ddf 24 H) ; 6 e 7 – Epidídimo (ep 24H); 8- branco , 9 e 10 (apr 48H), 11 (te 48H), 12 e 13 (ddf 48H), 14 e15 (ep 48H).

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aperfeiçoar o processo de colheita de materiais em campo e simplificar as técnicas em laboratório nos permite viabilizar pesquisas científicas e conservar as características biológicas das amostras destinadas às análises ômicas, estabelecendo mecanismos práticos e sustentáveis de pesquisa no Brasil que possam ser reproduzidos tecnicamente sem complicações.

Aliado a esse fator o uso de protocolos de extração de proteínas que priorizem o

uso de soluções tensoativas com baixa toxicidade e baixa carga residual combinada a soluções isotônicas permitem à diminuição de resíduos pertinentes a técnica. Processos como identificação e purificação de proteínas são favorecidos pela menor contaminação residual, assim como o meio ambiente no processo de descarte.

Estes testes iniciais são bases para outros estudos com o intuito de conservar materiais biológicos de espécies nativas localizadas em regiões de difícil acesso. A proposta foi diminuir os custos totais com mão de obra e transporte uma vez que esta técnica substitui em parte o uso de botijão de nitrogênio líquido por até 48 horas e utiliza de materiais e solução de baixo custo e fácil aquisição. Colheitas de materiais biológicos no campo se transportadas até 48 horas para extração de proteínas se mostram viáveis.

5 | AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 – Bolsa CAPES, pela concessão da bolsa de incentivo a pesquisa e apoio técnico- científico.

REFERÊNCIAS

BELZER, F.O.; ASHBY, B. S.; DUMPHY, J. E. **24-hours and 72-hours preservation of canine kidney.** *Lancet.*, v.2, 536p., 1967.

BLOOR, D. M.; WAN-YUNUS, W .M. Z.; WAN-BADHI, W.; LI, Y.; HOLZWARATH, J. F.; WYN-JONES, E.; **Langmuir** , v.11, 3395p. 2. 1995.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v.72, n.(1-2), p.248-54,1976.

HEIN, M. Y.; SHARMA, K.; COX, J. Chapter 1 - **Proteomic Analysis of Cellular Systems.** In: *Walhout, A. J. M., Vidal, M., et al. Handbook of Systems Biology.* San Diego: *Academic Press*, p.3-25. 2013.

LAN, J.C., YEH, C., WANG, C., YANG, Y., WU, H. **Partition separation and characterization of the polyhydroxyalkanoates synthase produced from recombinant Escherichia coli using an aqueous twophase system.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.116, n.4,p. 499-505, 2013.

LIMA-JUNIOR, E.M.; PICOLLO, N.S.; MIRANDA, J.B.; RIBEIRO, W.L.C. et al.**Uso da pele de tilápia (Oreochromis niloticus), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras.** *Revista Brasileira de Queimaduras.* v.16, n.1, p.10-7, 2017.

MODOLON, S.M.; DAL BÓ, A.G.; FELIPPE, A.C.;MINATTI, E.; ZANETTE, D. **Auto- associação do Dodecilsulfato de sódio (SDS) com o polímero hidrofobicamente modificado etil (hidroxietil) celulose(EHEC).** *Química Nova*, v.32,n.8,p. 2046-50, 2009.

RATTI, B.A.; BRUSTOLIN, CA.F. UBER, A.P.; TORQUATO, A.S. **Soro fisiológico: potencial risco de perda de estabilidade após aberto e armazenado por trinta dias em diferentes meios.** In: *Anais...*

VII Encontro Internacional de Produção científica, 2011.

RODRIGUES, M. A. M.; SOUZA, C.E.A.; MARTINS, J.A.M.; J.P.A. REGO, J.P.A. et al. **Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility in Santa Ines rams.** *Small Ruminant Research*, v.109, n. (2–3), p. 94–100, 2013.

SANCHES, C. **O desafio de fazer pesquisa científica no Brasil.** 2016. Disponível em: <https://www.labnetwork.com.br/especiais/o-desafio-de-fazer-pesquisa-cientifica-no-brasil/>. Acesso em: Junho 2019.

SILVÉRIO, S. C., MOREIRA, S., MILAGRES, A. M. F., MACEDO, E. et al. **Interference of some aqueous two-phase system phase-forming components in protein determination by the Bradford method.** *Analytical Biochemistry*, v.421, n.2, p.719-24, 2012.

SOUZA, C. E.; SOUZA, C.E.; REGO, J.P.; LOBO, C.H.. et al. **Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams.** *Journal of Proteomics*, v. 75, n. 14, p. 4436-56, 2012.

TREICHEL, H.; GOLUNSKI, S.M.; MULINARI, J.; BALDISSARELLI, D. P. et al. **Interferências causadas na quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford em sistema aquoso bifásico.** In: *Anais... XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: Alimentação: a árvore que sustenta a vida*, Gramado-RS, 2016.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**, 7ed. 399p., 2010.

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg POR MEIO DE CARACTERES AGROMORFOLÓGICOS

Diego Cerveira de Souza

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

Terezinha Aparecida Teixeira

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

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de populações naturais de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg através de caracteres agromorfológicos de interesse comercial para produção de frutos, visando subsidiar a escolha de progenitores para futuros programas de melhoramento da espécie. Para tanto, foram avaliadas características importantes para plantios comerciais de fruteiras, relacionadas à qualidade de frutos (massa da matéria fresca dos frutos e da polpa, volume e diâmetro dos frutos e teor de polpa) e à produtividade (altura da planta e diâmetro da copa) de 110 indivíduos em fase produtiva em duas áreas naturais do Cerrado, nos municípios de Patrocínio e Lagoa Formosa/MG. Os dados foram submetidos à estatística descritiva e foram utilizados para estimar a diversidade genética entre os indivíduos por meio da Distância Euclidiana Média, com o posterior agrupamento

pelo método UPGMA. Os resultados mostraram que ambas as populações estudadas possuem alta variabilidade genética, bem como indivíduos com características desejadas para produção de frutos, aptos a serem inseridos em programas de melhoramento da espécie, especialmente na população de Lagoa Formosa, cujos frutos tiveram características físicas superiores aos coletados na população de Patrocínio.

PALAVRAS-CHAVE: Cerrado, gabirobeira, fruteiras nativas.

GENETIC DIVERSITY OF *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg BASED ON AGRO-MORPHOLOGICAL CHARACTERS

ABSTRACT: The present study aimed to evaluate the genetic diversity of natural populations of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg through agro-morphological characters of commercial interest to fruits production, aiming to subsidize the choice of progenitors for future breeding programs of the species. We evaluated important characters for fruit tree plantations, related to fruit quality (fruit and pulp mass, fruit volume and diameter and pulp content) and productivity (height of plant and crown diameter) of 110 individuals in productive phase in two natural areas of Cerrado, in the

municipalities of Patrocínio and Lagoa Formosa / MG. The data were submitted to descriptive statistics and were used to estimate the genetic diversity among individuals through the Mean Euclidean Distance, with the subsequent grouping by the UPGMA method. The results showed that both populations have high genetic variability and individuals with desirable characteristics to fruit production, suitable to be inserted in breeding programs of the species, especially in the population of Lagoa Formosa, whose fruits had physical characteristics superior to those collected in the population of Patrocínio.

KEYWORDS: Cerrado, gabirobeira, native fruit trees.

1 | INTRODUÇÃO

O Cerrado é a savana mais rica do planeta em biodiversidade, possuindo várias espécies com potencialidades de desenvolvimento e produção comercial, como, por exemplo, as fruteiras, que já são utilizadas por populações locais e comercializadas às margens de rodovias e em feiras, para serem consumidas *in natura* ou transformadas em sucos, licores, sorvetes, geleias, doces, tortas, e bolos (ALMEIDA et al., 1987; SILVA et al., 2008; MALTA, 2011).

Quase a totalidade das fruteiras do Cerrado é explorada de maneira extrativista, muitas vezes predatória, por populações rurais e pequenos produtores, o que pode comprometer a conservação das espécies em seus habitats naturais e gerar o desequilíbrio ecológico e a degradação desses ecossistemas (SOARES et al., 2009). Essas espécies poderiam ser cultivadas em plantios comerciais, já que estão adaptadas aos solos locais e praticamente não necessitam de insumos químicos, apresentando baixo custo de implantação e manutenção dos pomares (COSTA et al., 2006). Porém, o nível de conhecimento sobre técnicas de plantio de frutas nativas do Cerrado ainda é incipiente, pois essas plantas encontram-se na sua maioria em estado selvagem (FERREIRA et al., 2009), de modo que a domesticação e o melhoramento genético são essenciais para a sua produção em escala comercial.

Dentre as fruteiras do Cerrado com potencial para desenvolvimento e produção comercial está a *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, popularmente conhecida como gabirobeira, guabirobeira, guaviroba ou guavira. A espécie possui ampla distribuição geográfica no território brasileiro, podendo ser encontrada no Distrito Federal e nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (SOBRAL et al., 2015). Os seus indivíduos se desenvolvem de forma arbustiva, com porte variando de 0,5 a 2,0 m de altura e apresentando muitas ramificações com ramos delgados (PELLOSO, 2011; MIRANDA, 2014). São plantas pouco exigentes quanto ao tipo de solo, crescendo naturalmente em solos com baixa fertilidade natural (VALLILO et al., 2006a). Após o plantio, começa a produzir frutos a partir de um a dois anos, sendo observada produtividade de 30 a 100 frutos por planta, com coloração que varia do verde-escuro ao verde-claro e amarelo (SILVA et

al., 2001).

Os seus frutos podem ser consumidos *in natura*, sendo considerados muito saborosos, suculentos, ácidos e levemente adocicados, e na forma de sucos, sorvetes, geleias, licores, vinhos e bolos (MARTINS et al., 2015). Também podem ser utilizados na indústria de alimentos e como flavorizantes na indústria de bebidas, devido aos seus atributos de qualidade como: elevada acidez, ácido ascórbico, minerais, fibras alimentares e hidrocarbonetos monoterpênicos, presentes em maior quantidade no óleo volátil dos frutos, e que lhes conferem o aroma cítrico (VALLILO et al., 2006b).

Mesmo apresentando grande potencial de comercialização para consumo humano, a espécie ainda não é cultivada em plantios comerciais e não chega aos grandes centros consumidores, sendo os seus frutos obtidos basicamente por ações extrativistas e comercializados nas regiões de coleta. Para a produção passar do método extrativista para o comercial é essencial o desenvolvimento de programas de melhoramento genético da espécie.

O sucesso de um programa de melhoramento inicia-se com a adequada seleção dos melhores genótipos, em germoplasma exótico ou em populações que não foram submetidas a nenhum processo de melhoramento, para fazerem parte da população base a ser melhorada (NASS; PATERNIANI, 2000; SHIMELIS; LAING, 2012), sendo recomendado o inter cruzamento de indivíduos de desempenho superiores e divergentes entre si (CRUZ et al., 2011). Portanto, ao se iniciar o programa de melhoramento genético de uma espécie é necessário conhecer a diversidade genética existente no germoplasma a ser trabalhado (PEREIRA et al., 2016).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de populações naturais de *C. adamantium* através de caracteres agromorfológicos de interesse comercial, visando subsidiar a escolha de progenitores para futuros programas de melhoramento da espécie.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo e amostragem das populações

Foram analisados 110 indivíduos de *C. adamantium* em fase produtiva, amostrados aleatoriamente em dois fragmentos vegetais naturais (55 indivíduos em cada), localizados nos municípios de Lagoa Formosa (18°40'23"S 46°26'59"O) e Patrocínio (18°56'10"S 46°57'58"O), no Estado de Minas Gerais, Brasil.

As áreas podem ser classificadas como cerrado sentido restrito (RIBEIRO; WALTER, 2008) e possuem características climáticas, edáficas e geomorfológicas semelhantes: clima tropical com estação seca de inverno (Aw), de acordo com a classificação de Köopen-Geiger; precipitação média anual variando entre 1.300 e 1.800 mm, concentrada nos meses de dezembro a fevereiro; temperatura média anual

entre 20 e 23 °C, com máxima de 30 °C em fevereiro e mínima de 15 °C em junho; relevo plano a suave ondulado; e predomínio de solos classificados como latossolos vermelhos ou amarelos (MOTTA et al., 2004).

2.2 Coleta e análise dos dados

Os 110 indivíduos foram demarcados no campo e tiveram suas características vegetativas e reprodutivas avaliadas, sendo escolhidas para avaliação características importantes para plantios comerciais de fruteiras, relacionadas à qualidade de frutos e à produtividade.

As características vegetativas aferidas foram altura da planta (ALT) e diâmetro da copa (DCO), com o auxílio de uma fita métrica. As características reprodutivas analisadas foram massa média da matéria fresca dos frutos (MMF) e da polpa (MMP); volume médio dos frutos (VMF); diâmetro dos frutos (DIF) e teor de polpa (TEP). A MMF e MMP foram avaliadas com o uso de uma balança de precisão (0,01 g), o VMF por meio do volume de água deslocado pelo fruto em proveta graduada de 500 mL e o TEP pela relação entre MMP e MMF. Para avaliação produtiva foram escolhidos aleatória e visualmente 20 frutos que apresentavam bom aspecto visual (sem deformações, manchas ou presença de patógenos ou pragas) e estavam maduros na época da coleta, totalizando 2.200 frutos avaliados.

Os dados foram submetidos à estatística descritiva (média, máximo, mínimo, desvio padrão e coeficiente de variação) e utilizados para estimar a diversidade genética entre os indivíduos através da Distância Euclidiana Média. Com base na matriz de dissimilaridade, os indivíduos foram agrupados através do método da ligação média entre os grupos – UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*). A consistência dos agrupamentos foi avaliada através de análises de bootstrap, empregando-se 1.000 permutações. A determinação do número de grupos foi feita utilizando-se o método de Mojena (MOJENA, 1977), sendo considerado $k = 1,25$ como regra de parada na definição de grupos, conforme sugerido por Milligan; Cooper (1985). A averiguação da existência de correlação entre os caracteres foi realizada por meio do coeficiente de correlação de Pearson, sendo a significância dos coeficientes verificada pelo teste *t* de *Student*, a 5 % de probabilidade. Análise de Variância (ANOVA) foi feita para determinação de diferenças significativas para cada caractere nas duas populações estudadas ($\alpha = 0,01$).

3 | RESULTADOS

Os resultados da estatística descritiva dos dados agromorfológicos estão apresentados na Tabela 1. Considerando os coeficientes de variação (CV) calculados, as características MMF, MMP e VMF apresentaram a maior variabilidade em ambas as populações, com $CV > 30\%$; enquanto que a característica DIF apresentou a menor

variabilidade, com $CV < 15\%$. Para cada uma das características avaliadas, os CV's foram semelhantes entre as duas populações.

Através dos resultados da ANOVA, verificaram-se valores médios significativamente superiores na população de Lagoa Formosa para maioria das características reprodutivas estudadas (MMF: $F = 8,67$, $df = 1$, $p = 0,0042$; MMP: $F = 22,44$, $df = 1$, $p < 0,0001$; VMF: $F = 7,43$, $df = 1$, $p = 0,0075$; TEP: $F = 48,38$, $df = 1$, $p < 0,0001$). Dentre as características reprodutivas, apenas o DIF não foi significativamente superior na população de Lagoa Formosa (DIF: $F = 4,58$, $df = 1$, $p = 0,0324$), provavelmente devido a sua baixa variabilidade. Não houve diferença significativa entre as populações para nenhuma das características vegetativas (ALT: $F = 3,90$, $df = 1$, $p = 0,0478$; DCO: $F = 2,90$, $df = 1$, $p = 0,0867$).

Parâmetro	População	Média	Máximo	Mínimo	DP ¹	CV ²
Altura da planta (cm)	LF	99,55	190,00	50,00	30,95	31,09
	PA	110,09	170,00	60,00	24,69	22,43
Diâmetro da copa (cm)	LF	174,45	270,00	70,00	44,19	25,33
	PA	160,35	300,00	90,00	42,51	26,51
Massa fresca dos frutos (g)	LF	3,24	7,27	1,67	1,15	35,37
	PA	2,68	4,70	1,24	0,83	31,00
Massa fresca da polpa (g)	LF	1,38	4,46	0,54	0,65	47,49
	PA	0,89	1,80	0,22	0,39	43,17
Volume dos frutos (cm ³)	LF	3,32	7,00	1,50	1,21	36,38
	PA	2,77	5,00	1,25	0,85	30,69
Diâmetro dos frutos (cm)	LF	1,70	2,39	1,31	0,22	12,94
	PA	1,61	1,97	1,21	0,19	11,98
Teor de polpa (%)	LF	41,61	61,30	27,74	6,15	14,78
	PA	32,62	48,93	13,20	7,35	22,55

Tabela 1. Estatística descritiva dos dados agromorfológicos das populações de Lagoa Formosa (LF) e Patrocínio (PA).

(¹) Desvio padrão, (²) Coeficiente de variação.

Os coeficientes de correlação calculados mostraram correlação significativa e positiva entre os caracteres vegetativos e entre os reprodutivos em ambas as populações, mas nenhuma correlação entre os vegetativos e reprodutivos (Tabela 2). Os caracteres mais fortemente relacionados foram MMF e MMP, sendo os coeficientes iguais a 0,953 e 0,978 para as populações de Lagoa Formosa e Patrocínio, respectivamente.

	ALT	DCO	MMF	MMP	VMF	DIF	TEP
ALT		0,438*	0,146	0,171	0,230	0,234	0,133
DCO	0,493*		-0,085	-0,034	-0,048	0,055	0,023
MMF	0,026	0,138		0,953*	0,940*	0,416*	0,825*
MMP	0,034	0,104	0,978*		0,868*	0,333*	0,813*

VMF	-0,005	0,206	0,891*	0,874*		0,664*	0,778*
DIF	-0,022	0,169	0,330*	0,325*	0,702*		0,345*
TEP	0,026	0,189	0,954*	0,917*	0,810*	0,246*	

Tabela 2. Acima da diagonal estão apresentados os coeficientes de correlação relativos à população de Lagoa Formosa e, na parte inferior, os coeficientes de correlação relativos à população de Patrocínio.

ALT: altura da planta, DCO: diâmetro da copa, MMF: massa fresca dos frutos, MMP: massa fresca da polpa, VMF: volume dos frutos, DIF: diâmetro dos frutos, TEP: teor de polpa.

O coeficiente de dissimilaridade médio obtido pela Distância Euclidiana Média, com base nos caracteres agromorfológicos, foi superior na população de Lagoa Formosa (0,447), em relação à população de Patrocínio (0,357). Com base na matriz de dissimilaridade, foi gerado um dendrograma para cada uma das populações. De acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo método de Mojena (1977) foram formados 11 grupos na população de Lagoa Formosa (Figura 1) e 9 na população de Patrocínio (Figura 2). Para ambas as populações, os cortes nos dendrogramas ocorreram em pontos semelhantes, correspondentes a 80,97 % (Lagoa Formosa) e 80,53 % (Patrocínio) da distancia máxima observada nos níveis de fusão, respectivamente.

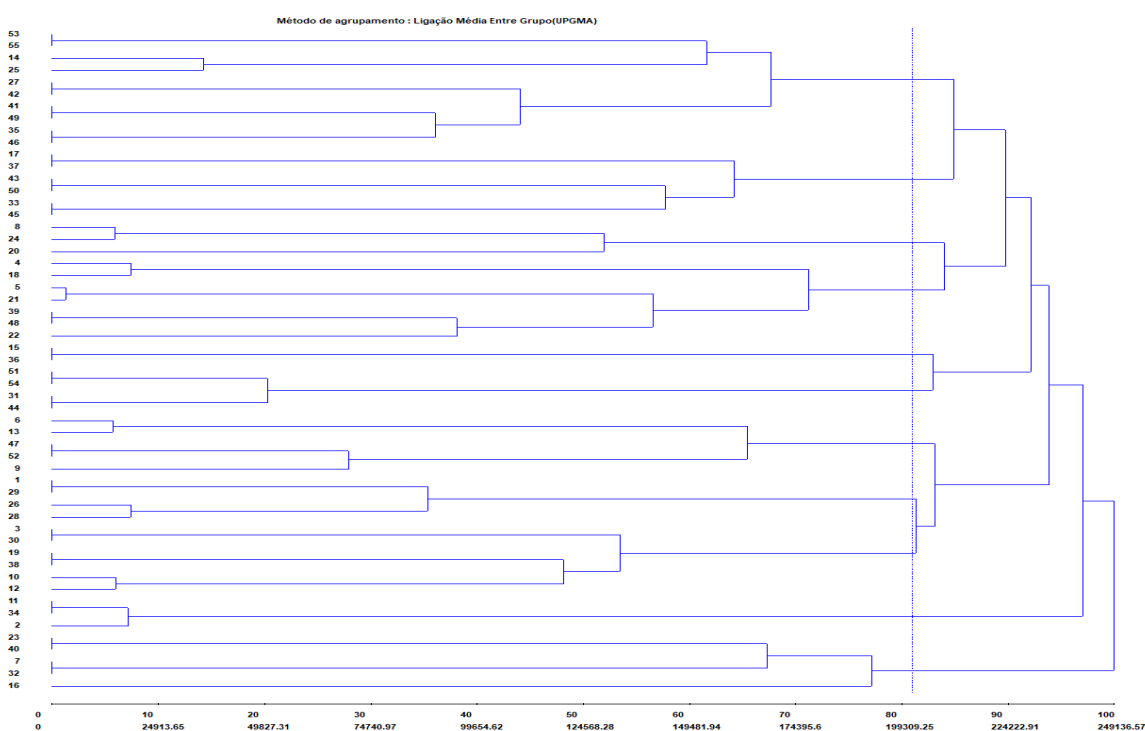


Figura 1. Análise de agrupamento pelo método UPGMA, a partir de distâncias genéticas expressas em Distâncias Euclidianas Médias, dos indivíduos pertencentes à população de Lagoa Formosa com base nas características agromorfológicas.

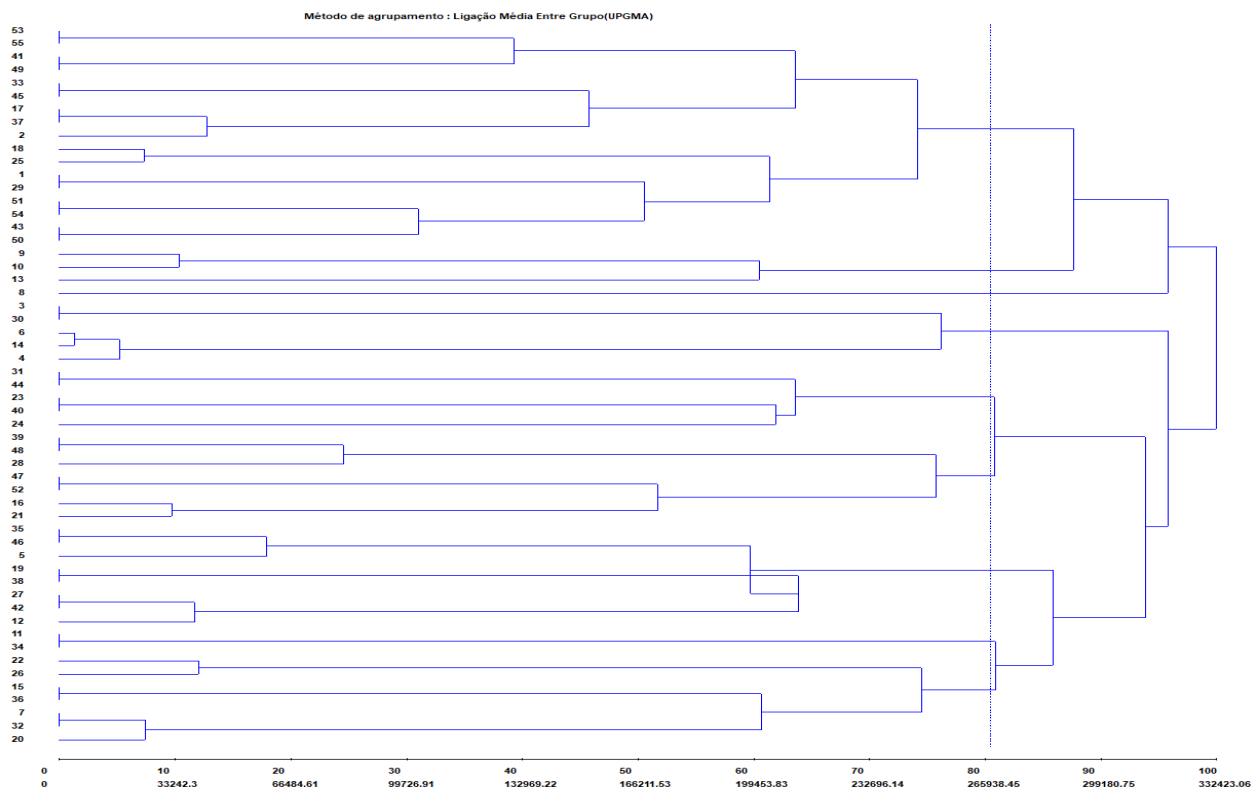


Figura 2. Análise de agrupamento pelo método UPGMA, a partir de distâncias genéticas expressas em Distâncias Euclidianas Médias, dos indivíduos pertencentes à população de Patrocínio com base nas características agromorfológicas.

Os indivíduos mais e menos divergentes, respectivamente, na população de Lagoa Formosa foram o 9 e o 19 (0,882) e o 12 e o 18 (0,039) e na população de Patrocínio foram o 8 e o 50 (0,746) e o 31 e o 49 (0,042).

4 | DISCUSSÃO

O melhoramento genético de plantas tem como meta o acréscimo da produtividade e a adequação da matéria prima ao produto final desejado, através do aumento da frequência de alelos favoráveis e da obtenção de ganhos genéticos em populações melhoradas (PIGATO; LOPES, 2001). Um programa de melhoramento de espécies frutíferas é composto por, basicamente, três etapas: a identificação de genótipos em fase produtiva da espécie, em áreas de sua ocorrência; a avaliação dos frutos desses genótipos; e a seleção e clonagem dos genótipos representativos da variabilidade genética da espécie, bem como daqueles com maior potencial de exploração comercial, passíveis de serem indicados como variedades (SOARES-FILHO; RITZINGER, 2011). Logo, para iniciar o programa, é imprescindível que o melhorista possua germoplasma com características adequadas para conduzir o melhoramento (NASS, 2011).

A fase de avaliação de germoplasma exótico ou em populações que não foram submetidas a nenhum processo de melhoramento, para sua posterior incorporação em materiais superiores, é conhecida como pré-melhoramento (NASS; PATERNIANI, 2000). No caso de espécies frutíferas, esse material genético é avaliado levando em

consideração características biométricas, químicas, físicas e nutricionais dos frutos, bem como a produtividade das plantas.

Na compra de frutos, a preferência dos consumidores sempre depende de parâmetros físicos, como massa, volume, diâmetro e teor de polpa (HAZARIKA et al., 2017). Da mesma maneira, esses parâmetros são essenciais na seleção de frutos para industrialização. São preferidos frutos com mais massa, maior volume, diâmetro e teor de polpa. Em ambas as populações avaliadas foi verificada uma alta variabilidade dos frutos.

Os valores elevados de CV mostram que as populações possuem alta variabilidade fenotípica. Com relação às características físicas dos frutos, essa alta heterogeneidade também já foi relatada em outros estudos com populações naturais da espécie (MELCHIOR et al., 2006; DRESCH et al., 2013). Na população de Lagoa Formosa, a maioria das características dos frutos foi significativamente superior em relação à população de Patrocínio, mostrando a sua superioridade para escolha de potenciais genitores. Embora a dissimilaridade média seja superior na população de Patrocínio, os indivíduos mais divergentes são encontrados na população de Lagoa Formosa, corroborando com os resultados da análise descritiva, onde os caracteres da população de Lagoa Formosa mostraram-se mais heterogêneos.

A existência de uma correlação significativa entre caracteres vegetativos e reprodutivos pode auxiliar na busca por genótipos superiores em programas de melhoramento de fruteiras. O conhecimento da correlação entre características agromorfológicas de uma determinada espécie pode aumentar os ganhos de seleção em seus programas de melhoramento, uma vez que, havendo uma correlação entre duas características, a seleção sobre uma irá impactar negativa ou positivamente a outra (RASHWAN, 2011). Para *C. adamantium*, ainda não há relatos na literatura de trabalhos envolvendo a correlação de seus caracteres agromorfológicos. A falta de correlação verificada em nosso estudo entre as características vegetativas e reprodutivas mostra a necessidade da avaliação conjunta desses caracteres para obtenção de progenitores. Os caracteres reprodutivos estão diretamente relacionados à qualidade dos frutos, uma vez que frutos com mais massa, maior volume e teor de polpa possuem maior apelo comercial. Já os caracteres vegetativos podem influenciar na produtividade das plantas, bem como nas ações de plantio e nos tratamentos culturais e silviculturais posteriores.

Próximos estudos deverão realizar a avaliação conjunta dos descritores fenotípicos com o uso de marcadores moleculares, a fim de aumentar a confiabilidade nas medidas tomadas pelos melhoristas e possibilitar maiores ganhos com os processos de seleção.

5 | CONCLUSÕES

Com base em suas características fenotípicas, ambas as populações avaliadas possuem alta variabilidade genética, bem como indivíduos com características

desejadas para produção de frutos, aptos a serem inseridos em programas de melhoramento da espécie, especialmente na população de Lagoa Formosa, cujos frutos tiveram características físicas superiores aos coletados na população de Patrocínio.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas do Cerrado: araticum, baru, cagaita e jatobá**. Planaltina: Embrapa CPAC, 1987. 83p.
- COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. Espécies de maior relevância para a região centro-oeste. In: VIEIRA, F. R.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (Eds.). **Frutas nativas da região centro-oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 320p.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 620p.
- DRESCH, D. M.; SCALON, S. P. Q.; MASETTO, T. E.; VIEIRA, M. C. Germinação e vigor de sementes de gabioba em função do tamanho do fruto e semente. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, n.3, p.262-271, 2013.
- FERREIRA, R. B.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. P.; NAVES, R. V.; SALGADO, A. L. Desenvolvimento de mudas de *Annona crassiflora* Mart. (araticum) em substratos com cinza de bagaço de cana. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.39, n.1, p.18-24, 2009.
- HAZARIKA, T. K.; LALCHHANMAWIA, J.; CHHANGTE, L.; CHHANGTE, L.; SHUKLA, A. C.; NAUTIYAL, B. P. Assessment of genetic variability in the endangered Citrus macroptera Mont. ("hatkora") from Mizoram, north-east India. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.64, p.321-330, 2017.
- MALTA, L. G. **Avaliação biológica de frutos do Cerrado brasileiro: guapeva, gabioba e murici**. 2011. 221f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- MARTINS, W. A.; MANTELLI, M.; SANTOS, S. C.; NETTO, A. P. C.; PINTO, F. Estaquia e concentração de reguladores vegetais no enraizamento de *Campomanesia adamantium*. **Revista de Ciências Agrárias**, v.38, n.1, p.58-64, 2015.
- MELCHIOR, S. J.; CUSTÓDIO, C. C.; MARQUES, T. A.; MACHADO-NETO, N. B. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* Camb. – Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p.141-150, 2006.
- MILLIGAN, G. W.; COOPER, M. C. An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. **Psychometrika**, v.50, n.2, p.159-179, 1985.
- MIRANDA, E. A. G. C. **Transferibilidade e validação de marcadores microssatélites derivados de EST para duas espécies de *Campomanesia* (Myrtaceae) do Cerrado**. 2014. 103f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.
- MOJENA, R. Hierarchical grouping method and stopping rules: an evaluation. **Computer Journal**, v.20, n.4, p.359-363, 1977.
- MOTTA, P. A. F.; BARUQUI, A. M.; SANTOS, H. G. **Levantamento de reconhecimento de média intensidade dos solos da região do Alto Paranaíba, Minas Gerais**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos,

2004. 238p.

NASS, L. L.; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.581-587, 2000.

NASS, L. L. Pré-melhoramento vegetal. In: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. F.; FALEIRO, F. G.; FOLLE, S. M.; GUIMARÃES, E. P. (Eds.). **Pré-melhoramento de plantas: estado da arte e experiências de sucesso**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 23-38.

PELLOSO, I. A. O. **Caracterização fenotípica de frutos e desenvolvimento inicial de plantas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, em Mato Grosso do Sul**. 2011. 54f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2011.

PEREIRA, M. G.; RAMOS, H. C. C.; PEREIRA, T. N. S.; BATISTA, F. R. C. Marcadores moleculares no pré-melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2016. p. 94-128.

PIGATO, S. M. P. C.; LOPES, C. R. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênies de *Eucalyptus urophylla* S.T.Blake. **Scientia forestalis**, v.60, n.3, p.135-148, 2001.

RASHMAN, A. M. A. Study of genotypic and phenotypic correlation for some agro-economic traits in okra (*Abelmoschus esculents* (L.) Moench). **Asian Journal of Crop Science**, v.3, n.2, p.85-01, 2011.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa CPAC, 2008. p. 89-166.

SHIMELIS, H.; LAING, M. Timelines in conventional crop improvement: pre-breeding and breeding procedures. **Australian Journal of Crop Science**, v.6, n.11, p.1542-1549, 2012.

SILVA, D. B.; SILVA, J. A.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Frutas do Cerrado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 178p.

SILVA, M. R.; LACERDA, D. B. C. L.; SANTOS, G. G.; MARTINS, D. M. O. Caracterização química de frutos nativos do Cerrado. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1790-1793, 2008.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C.; SANTANA, J. R. F. **Marolo: uma frutífera nativa do Cerrado**. Lavras: Editora UFLA, 2009. 17p.

SOARES-FILHO, W. S. S.; RITZINGER, R. Pré-melhoramento de fruteiras nativas. In: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. F.; FALEIRO, F. G.; FOLLE, S. M.; GUIMARÃES, E. P. (Eds.). **Pré-melhoramento de plantas: estado da arte e experiências de sucesso**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 487-507.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. (2015) **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10308>>. Acesso em: 17 jul. 2017.

VALLILO, M. I.; BUSTILLOS, O. V.; AGUIAR, O. T. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg – Myrtaceae. **Revista do Instituto Florestal**, v.18, p.15-22, 2006.

VALLILO, M. I.; LAMARDO, L. C. A.; GABERLOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E.; MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.805-810, 2006.

DIVERSIDADE GENÉTICA DO BACURIZEIRO (*Platonia insignis* MART.) UTILIZANDO O MARCADOR ISSR EM CHAPADINHA – MA

Jonas Alves Mesquita

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Agronomia – Maranhão, MA

Edyane Moraes dos Santos

Universidade Federal de São Carlos, Doutoranda em Genética Evolutiva e Biologia Molecular – São Carlos, SP

André Luiz Raposo Barros

Universidade Estadual do Maranhão, Doutorando da Rede Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia (BIONORTE) – Maranhão, MA

Gabriel Garcês Santos

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Agronomia – Maranhão, MA

Claudio Adriano de Jesus Nascimento

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Mestrando em Agronomia – Rio de Janeiro, RJ

Luana Corrêa Silva

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Agronomia – Maranhão, MA

Phelipe Silva de Araújo

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Agronomia – Maranhão, MA

José de Ribamar Silva Barros

Universidade Estadual do Maranhão, Departamento de Química e Biologia/DQB – Maranhão, MA

Limpa, localizada no Município de Chapadinha. O local estudado foi a Reserva Extrativista da Chapada Limpa, em Chapadinha, Maranhão. Foram realizadas coletas de material foliar na reserva, onde foram separadas duas subpopulações de 15 indivíduos, totalizando 30 indivíduos. O DNA foi extraído segundo o protocolo CTAB, e logo após realizado PCR com os marcadores moleculares ISSR. Os resultados da AMOVA mostraram alta diversidade genética dentro das populações (82,2%) e baixa diversidade entre as populações (14,7%). Foram encontradas $\phi_{st} = 0,17$, $P < 0,001$ (FAMD), e $F_{st} = 0,147$ (Arlequin). Com relação ao índice de diversidade genética, a variação da heterozigosidade (H_e) foi de 0,133 a 0,533 (média - 0,333) na população 1 e 0,133 a 0,514 (média: 0,388) na população 2. Na análise do gargalo, H_e foi maior que H_{eq} na maioria dos locus, registrado nos modelos I.A.M. e S.M.M. O coeficiente de Jacard, calculados na matriz de distância variaram de 0,818 a 0,111, indicando altas e baixas correlações entre os indivíduos.

PALAVRAS-CHAVE: Reserva; populações; gargalo.

GENETIC DIVERSITY OF THE BACURIZEIRO

(*Platonia insignis* MART.) USING THE ISSR

RESUMO: O trabalho teve como objetivo o estudo da diversidade genética de populações de bacurizeiros na Reserva Extrativista Chapada

ABSTRACT: The objective of this work was to study the genetic diversity of populations of bacurizeiros in the Chapada Limpa Extractive Reserve, located in the municipality of Chapadinha. The study site was the Chapada Limpa Extractive Reserve in Chapadinha, Maranhão. Leaf collections were collected in the reserve, where two subpopulations of 15 individuals were separated, totaling 30 individuals. The DNA was extracted according to the CTAB protocol, and soon after performing PCR with the molecular markers ISSR. The AMOVA results showed high genetic diversity within populations (82.2%) and low diversity among populations (14.7%). We found $\phi_{st} = 0.17$, $P < 0.001$ (FAMD), and $F_{st} = 0.147$ (Harlequin). Regarding the genetic diversity index, the variation in heterozygosity (H_e) ranged from 0.133 to 0.533 (mean - 0.333) in population 1 and 0.133 to 0.514 (mean: 0.388) in population 2. In the bottleneck analysis, H_e was greater than H_{eq} in most of the locus, registered in the IAM models and S.M.M. The Jacard coefficient, calculated in the distance matrix ranged from 0.818 to 0.111, indicating high and low correlations between individuals.

KEYWORDS: Reserve; populations; neck.

1 | INTRODUÇÃO

O bacuri - “ba”- cair e “curi”- logo - (*Platonia insignis* Mart.), divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Malpighiales e Família Clusiaceae é considerada a única espécie do gênero *Platonia* (CAVALCANTE, 1996). É uma espécie nativa da Amazônia brasileira e possui centro de origem no Estado do Pará, onde estão estabelecidas densas e diversificadas populações naturais. É também encontrado, espontaneamente, nos outros Estados da Amazônia brasileira, no Piauí e Maranhão (CARVALHO, 2007). No Estado do Maranhão, a espécie está distribuída nas regiões da Amazônia Maranhense, Baixada Maranhense e nos Cerrados do extremo sul do Baixo Parnaíba (NASCIMENTO et al., 2007).

Ocorre em matas de terra firme e de vegetação aberta de transição, em áreas descampadas ou de vegetação baixa, sendo rara sua ocorrência em florestas primárias densas (CAVALCANTE, 1996). Desenvolve-se em regiões de clima úmido e semi-úmido e, também em regiões de cerrado e cerradão. Passou de uma fruta sem importância para uma árvore de interesse madeireiro e da valorização do seu fruto. O bacuri é uma das frutas mais populares da região amazônica. Contém polpa agridoce rica em potássio, fósforo e cálcio, que é consumida diretamente ou utilizada na produção de doces, sorvetes, sucos, geleias, licores e outras iguarias (ALVAREZ e POTIGUARA, 2013; HOMMA et al., 2010).

Existem poucos estudos moleculares e genéticos do Bacuri. A maioria dos estudos se referem a repetibilidade e relações fenotípicas (SILVA et al., 2009), bancos de germoplasma (GUIMARÃES, et al., 1992), composição e características do fruto (UEKANE, et al., 2017; LIMA E SILVA, et al., 2014; CARVALHO, 2003), métodos de

propagação (CARVALHO & NASCIMENTO, 2018), e aspectos ecológicos (SOUSA et al., 2000), entre outros trabalhos. Entre os estudos moleculares, destacamos o trabalho com marcadores ISSR Souza et al., (2013), em populações do Maranhão e Piauí, que encontraram 221 locus em 18 primers ISSR.

Entre os marcadores moleculares que inferem sobre a diversidade genética, marcadores dominantes binários, como o ISSR (“Inter simple sequence repeat amplification”), se destacam devido ao elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo (SALIMATH et al. 1995). O marcador molecular ISSR tem se mostrado uma poderosa ferramenta para análise da diversidade genética, bem como para a caracterização de diversas espécies. Por se tratar de um marcador multiloco que não requer conhecimento prévio do DNA a ser avaliado, o ISSR é uma técnica de baixo custo, de fácil uso e de grande reprodutibilidade.

No Maranhão, o bacurizeiro ocorre em áreas de intensa atividade agrícola, onde desmatamentos e queimadas são comuns e, como consequência, uma rápida redução no número de plantas existentes tem ocorrido e, por conseguinte, a diminuição da variabilidade genética (CARVALHO, et al., 2009). O surgimento de variedades adaptadas às condições de clima e solos do cerrado e os incentivos fiscais direcionados aos produtos de exportação, *comodities*, potencializam o processo migratório de ocupação das áreas, com agressão ao meio ambiente e às comunidades tradicionais (SOARES et al., 2007).

Tal perturbação pode acarretar em fragmentação das populações levando-as a uma limitação evolutiva. Estudos que comparam a estrutura genética populacional de espécies vegetais e graus de perturbação da paisagem são fundamentais para reconhecimento da perda genética real, fornecendo diretrizes para o uso racional dos recursos naturais e para que estratégias de conservação sejam propostas, garantindo a sobrevivência das espécies. Logo o trabalho teve como objetivo o estudo da diversidade genética de populações de bacurizeiros na Reserva Extrativista Chapada Limpa, localizada no Município de Chapadinha.

2 | METODOLOGIA

2.1 Área de Trabalho

Foram realizadas coletas de tecido foliar *Platonia insignis*, e georreferenciado os indivíduos estudados, no município de Chapadinha, Resex Chapada Limpa (Figura 1), com devida autorização do Sisbio (nº50329-1) e da autoridade competente do ICMBio-MA, responsável pela Resex.

A reserva extrativista Chapada Limpa, localizada na mesorregião leste do Estado do Maranhão, na cidade de Chapadinha, possui uma área de 11.973,05 hectares. Chapada Limpa é a quinta reserva extrativista criada no Maranhão, sendo a primeira

do bioma cerrado.

Na Resex a população tradicional faz extrativismo sustentável do babaçu (*Orbignya phalerata*), bacuri (*Platonia insignis*) e buriti (*Mauritia flexuosa*). Já Chapadinha possui uma área de 3247 km², uma população de aproximadamente 78348 habitantes e uma densidade demográfica de 22,59 habitantes km² segundo dados do IBGE (2016).

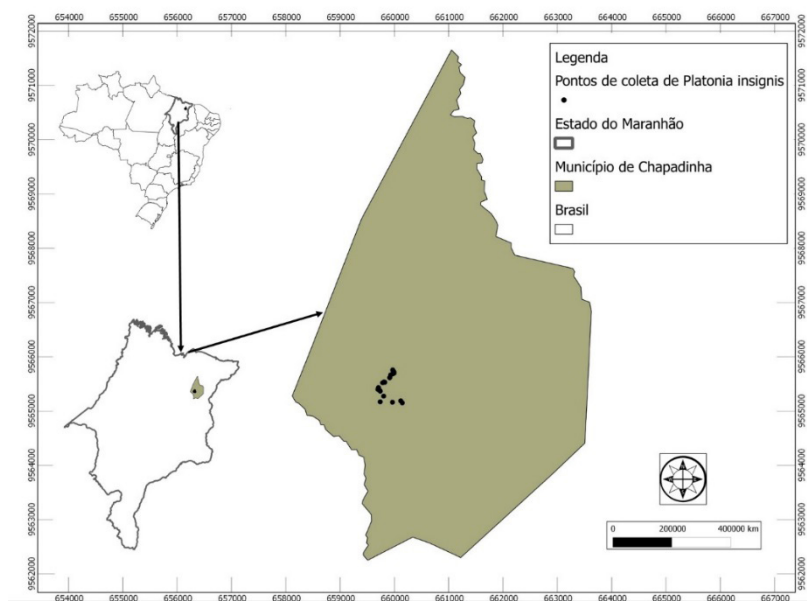


Figura 1: Localização da Resex Chapada Limpa- Maranhão e os pontos de coleta de *Platonia insignis*.

Foram amostradas 2 subpopulações divididas em dois agrupamentos (15 indivíduos por agrupamento), totalizando 30 indivíduos coletados. Dentro de cada agrupamento, os indivíduos foram amostrados em um espaçamento mínimo de 15 metros entre eles. De cada indivíduo foi coletado cerca de dez folíolos, que foram mantidos em sílica gel até o momento da extração de DNA.

2.2 Extração de DNA e PCR

A extração do DNA genômico foi realizada com base no protocolo no protocolo de Doyle e Doyle (1987), utilizando-se cerca de 1 g de folha seca de cada amostra. Após todo o procedimento de extração o DNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% para a visualização do material genético e confirmação de sua extração, análise de sua integridade e estimativa de sua concentração.

Após a extração de DNA e corrida em eletroforese, o material genético foi submetido à técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Foram selecionados 15 primers do marcador ISSR (UBC 807, UBC 808, UBC 809, UBC 810, UBC 811, UBC 817, UBC 825, UBC 826, UBC 827, UBC 828, UBC 829, UBC 834, UBC 840, UBC 888 E UBC 900) previamente padronizados por Souza et al. (2013).

Foi realizado reações de PCR em volume final de 20 μ L, contendo os seguintes

componentes: tampão de PCR [13,5 mM Tris-HCl (pH 8,3); 67,5 mM KCl; 2,0 mM MgCl₂], 200 μ M de cada um dos quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,7 μ M de primer, 1 U de Taq DNA polimerase, 20 ng de DNA genômico e água. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems), programada da seguinte forma: 95°C por 10 minutos, 35 ciclos [1 minuto a 95°C; 45 segundos a 50 - 62°C (dependendo do primer utilizado) e 2 minutos a 72°C] e extensão final a 72°C por cinco minutos. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% por 3 horas e 30 minutos e corados com 12,5x Brometo de etídio. Em seguida, foram visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados.

2.3 Análises Estatísticas

Os produtos amplificados foram designados como um único caractere, que teve sua presença representada por “1” e ausência por “0”. Os marcadores ISSR foram convertidos em uma matriz binominal (0/1). A relação genética entre os genótipos foi estimada pelo coeficiente de Jaccard, que resultou em uma matriz de similaridade. A concordância entre a matriz de similaridade e o dendrograma foi estimada pelo coeficiente de correlação cofenético (r), segundo Sokal e Rohlf (1962). O dendrograma foi encontrado através do Método do Grupo de Pareamento Não Ponderado usando médias aritméticas (UPGMA) para ilustrar a relação entre as duas populações coletadas. Todos os cálculos foram feitos no software PAST, versão 1.34 (Hammer et al., 2001).

A estrutura genética da população (heterozigosidade - H_e), bem como os valores de diferenciação genética de uma única população ou entre populações (índice de fixação- F_{st}) foram analisados no software Arlequin 3.11 (Excoffier et al., 2005). O teste de gargalo genético foi executado no software Bottleneck 1.2 (Cornuet e Luikart, 1997), para verificar se houve redução recente ou efetiva das populações através dos modelos de alelos infinitos (I.A.M.) e modelo de mutação por etapas (S.M.M.). O índice de Shannon, analisado por meio do programa Fingerprint Analysis with Missing Data 1.31 (FAMD), foi calculado para medir a diversidade da espécie na área. A análise de variância molecular (AMOVA) também foi usada para mostrar a distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações. A diversidade genética total registrada através da análise foi dividida em dois níveis hierárquicos distintos, ou seja, diferenças entre populações e entre indivíduos dentro de uma única população. A AMOVA foi realizada de acordo com Excoffier et al. (1992), com o auxílio do software Arlequin e FAMD. Todas as etapas foram realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular Warwick Kerr (LabWick) da Universidade Estadual do Maranhão.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises genéticas

Dos 15 primers de ISSR previamente selecionados e testados foram amplificados 12 e somente os locus UBC 827, UBC 900 e UBC 868 não foram amplificados. Com exceção dos locus UBC 807, 808, 840 e 825, o perfil eletroforético, resultante de reações envolvendo todos os primers utilizados, mostrou elevado nível de polimorfismo no DNA das amostras em estudo.

Os resultados da AMOVA (Tabela 1) da estrutura genética da população mostraram alta diversidade genética dentro das populações (82,2%) e baixa diversidade entre as populações (14,7%). Pontes et al. (2017) encontraram ϕ_{ST} 0,05 ($P \geq 0,001$), e variação de 6% entre progênies e 94% dentro das progênies em bacurizeiros da ilha de Marajó no Pará.

Os índices ϕ_{st} e F_{st} foram utilizados para medir a distância genética na população, eles foram executados em diferentes softwares (FAMD e Arlequim). Diferenças genéticas significativas foram encontradas: $\phi_{st} = 0,17$, $P < 0,001$ (FAMD); e $F_{st} = 0,147$ (Arlequim). Com relação ao índice de diversidade genética, a variação da heterozigosidade (H_e) foi de 0,133 a 0,533 (média - 0,333) na população 1 e 0,133 a 0,514 (média: 0,388) na população 2. O índice mostrou variação de 0,163 a 0,393 entre as duas populações. Quanto às espécies arbóreas, esse índice de diversidade genética estabelecido por Nei (1977), permanece elevado, no entanto, pode indicar pequena diferença populacional e perda de diversidade no curto prazo. O índice representa a heterozigosidade populacional (H_e) e gera valores entre 0 e 5 para cada locus. Souza (2013) comparou os resultados do índice de Nei e encontrou valores de diversidade genética (H_e) variando de 0,082 a 0,323 entre populações e 0,335 ao nível das espécies.

Fonte de Variação	Quadrados médios	Componente de variação	Taxa de variação
Na população	0.800	0.37	14.77273
Entre populações	60.667	2.16667	85.22727
Total	61.467	2.54222	-
F_{st}	0.14773	-	-
ϕ_{st}	0.17192	-	-

Tabela 1. Valores de AMOVA para populações de *Platonia insignis* na Reserva Extrativista Chapada Limpa, município de Chapadinha, Estado do Maranhão.

Teoricamente, os valores de F_{st} (ϕ_{st}) podem variar de 0 (sem divergência genética) a 1 (fixação de alelos); no entanto, o valor aqui observado foi muito inferior a 1. Wright (1978), por exemplo, sugeriu os seguintes valores na diretriz de interpretação da F_{st} : de 0 a 0,05, pouca diferenciação genética; de 0,05 a 0,15, diferenciação

genética moderada; de 0,15 a 0,25, grande diferenciação genética; e valores acima de 0,25 significam alta diferenciação genética. Logo na classificação de Wright (1965), os dados para os bacurizeiros em Chapadinha mostram moderada diferenciação genética. Os dados diferem de Pontes (2017), que encontrou F_{st} de 0,064 para bacuris no Pará.

O índice de diversidade de Shannon H , calculado no software FAMD, é comumente usado em estudos ecológicos para indicar a diversidade de espécies por área. O índice de Shannon foi de $0,030 \leq 0,175$ na população 1 e $0,041 \leq 0,204$ na população 2. O índice gera valores de 0 a 0,73 em uma escala logarítmica (Lowe et al., 2004). Os presentes dados corroboram os encontrados por Souza (2013), que estimaram o índice de diversidade de Shannon (H') e encontraram variação de $0,120 \leq H \leq 0,480$ e classificaram a população como apresentando altos índices de diversidade. Além disso, a variação de heterozigosidade na população variou de 0,133 a 0,533 na população 1, mas de 0,133 a 0,514 na população 2. No entanto, o índice variou de 0,163 para 0,393 na comparação entre as duas populações.

Locus	Teste Blotteneck			Índice de diversidade de Nei's				
	He	I.A.M.	S.M.M.	He		Média	Desvio	Total He
		Heq	Heq	Pop 1	Pop 2			
UBC 807	0.480	0.254	0.286	0.533	0.342	0.438	0.134	0.480
UBC 808	0.370	0.249	0.293	0.247	0.476	0.161	0.161	0.370
UBC 809	0.515	0.245	0.287	0.533	0.514	0.523	0.013	0.514
UBC 810	0.517	0.246	0.285	0.533	0.533	0.533	0.000	0.517
UBC 811	0.370	0.235	0.283	0.476	0.247	0.361	0.161	0.370
UBC 817	0.067	0.250	0.289	0.000	0.133	0.066	0.094	0.066
UBC 825	0.067	0.248	0.284	0.133	0.000	0.066	0.094	0.066
UBC 826	0.460	0.245	0.284	0.000	0.476	0.238	0.336	0.459
UBC 828	0.480	0.243	0.282	0.247	0.514	0.380	0.188	0.480
UBC 829	0.370	0.251	0.285	0.247	0.476	0.361	0.161	0.370
UBC 834	0.508	0.230	0.287	0.514	0.419	0.466	0.067	0.508
UBC 840	0.517	0.249	0.292	0.533	0.533	0.533	0.000	0.517
Média	0.393	0.245	0.286	0.533	0.361	0.361	0.039	0.393

Tabela 2. Teste Blotteneck (gargalo genético) e índices de diversidade de Nei para populações de *Platonia insignis* na Reserva Extrativista Chapada Limpa, município de Chapadinha, Estado do Maranhão.

Quando se trata do gargalo, H_e maior que H_{eq} na maioria dos locos foi registrado em ambos os modelos (I.A.M. e S.M.M.), com exceção dos loci UBC 817 e UBC 825, que apresentaram maiores valores de H_{eq} sobre heterozigose em ambos os modelos, evidenciando um possível decréscimo populacional a curto prazo (Tabela 4). O mesmo não foi observado no trabalho de Costa et al., (2015), trabalhando com mangaba (*Hancornia speciosa*), onde observou processo de deriva no modelo S.M.M.

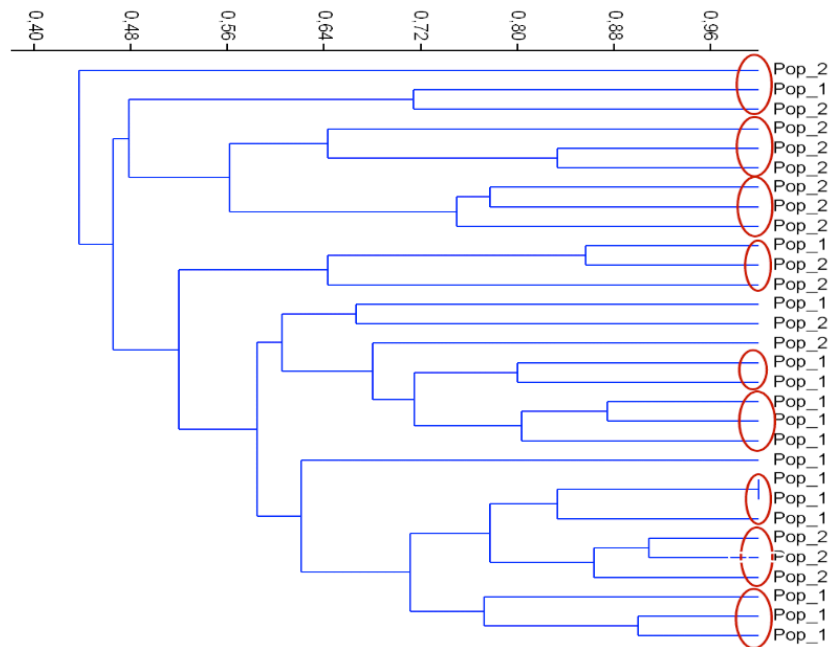


Figura 2. Dendrograma mostrando a similaridade entre indivíduos pertencentes às populações de *Platonía insignis* na Reserva Extrativista da Chapada Limpa.

Os valores do coeficiente de Jacard calculados na matriz de distância variaram de 0,818 a 0,111, indicando altas e baixas correlações entre os indivíduos. O dendrograma mostrou 9 pequenos aglomerados demonstrando agrupamentos que englobaram indivíduos pertencentes às populações 1 e 2 em grupos separados, bem como agrupamentos que incluíram indivíduos pertencentes a ambas as populações (Figura 2).

4 | CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram uma diferenciação genética gradativa do bacuri na Reserva Extrativista da Chapada Limpa, mesmo com uma moderada diversidade genética, que pode ser consequência direta dos intensos eventos de queimadas comuns na reserva. Os resultados também mostraram uma maior diferenciação genética dentro das populações e pouca entre as populações. O teste de gargalo genético, mostrou processo de deriva apenas em dois locus, mas que pode ao longo do tempo levar a uma perda efetiva de alelos nas populações visto que a diferenciação genética entre as mesmas é baixa e a espécie necessita de fluxo gênico por ser uma alógama.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, A. S.; POTIGUARA, R. C. V. Caracterização anatômica foliar de espécimes de *Platonía insignis* Mart. (Clusiaceae) em diferentes períodos sazonais. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, p. 562-569, 2013.

CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O. Technological innovations in the propagation of Açai

palm and Bacuri. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 1, 2018.

CARVALHO, J. E. U.; MULLER, C. H. Propagação do bacurizeiro. In: LIMA, M. da C. (Org.). **Bacurizeiro: agrobiodiversidade**. 1. ed. São Luis: IICA, p.29-46. 2007.

CARVALHO, J. E. U. de; NAZARÉ, R. F. R. de; NASCIMENTO, W. M. O. Características físicas e físico-químicas de um tipo de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) com rendimento industrial superior. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p.326-328, 2003.

CARVALHO, G. E. V.; SOUZA, V. A. B. de; COSTA, N. N.; SANTOS, A. W. O.; SILVA, R. R. Avaliação Biométrica de Plantas de Bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) sob Manejo de Brotações Jovens no Estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 4. nº 2, nov. 2009.

CAVALCANTE, P.B. Frutas comestíveis da Amazônia. **Belém: Museu Paraense Emílio Goldi**, 6. ed., p. 274, 1996.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 4, 2001-2014, 1997.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. **Phytochem Bull.** 19:11-15, 1987.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 7–50, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.479-491, 1992.

FERREIRA COSTA, D.; VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal-SP, n. 4, p. 970–976, 2015.

GUIMARÃES, A. D. G. **Coleta de germoplasma de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) na Amazônia. I. Microrregião Campos do Marajó**. Belém, Embrapa, Boletim de Pesquisa, p. 23, 1992.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**. v.4, p.1-9, 2001.

HOMMA, A.; CARVALHO, J. E. U. DE; MENEZES, A. J. E. A. de. **Fruta da Amazônia em ascensão: Bacuri**. Embrapa Amazônia Oriental, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ciência Hoje, pp. 40-45, junh. 2010

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE. **Cidades**, Chapadinha, 2019. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ma/chapadinha/panorama>>, Acesso em: 19/ jun/2019.

LIMA E SILVA, M. C. B.; HIANE, P. A.; NETO, J. A. B.; MACEDO, M. L. R. Proteins of Bacuri almonds: nutritional value and in vivo digestibility. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, n. 1, p. 55–61, 2014.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. Ecological genetics: design, analysis and application. **Blackwell Publishing**, Oxford, 2004. 344p.

NASCIMENTO, W. M. O. DO; CARVALHO, J. E. U. DE; MÜLLER, C. H. Ocorrência e distribuição geográfica do bacurizeiro. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, nº. 3, p. 657-660,

2007.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, p. 225-233, 1977.

PONTES, L. C. G.; MOURA, E. F.; MOURA, M. F.; RODRIGUES, S. M.; OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; THERRIER, J. Molecular characterization of progenies of bacurizeiro (*Platonia insignis*) from Marajó Island, northeastern Amazon. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 4, p. 293–300, 2017.

SALIMATH, S.S.; DE OLIVEIRA, A.C.; GODWIN, I.D.; BENNETZEN, J.L. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. **Genome**, p. 757-763, 1995.

SILVA, R. G.; CHAVES, M. C. L.; ARNHOLD, E.; CRUZ, C. D. Repetibilidade e correlações fenotípicas de caracteres do fruto de bacuri no estado do maranhão. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 31, n. 4, p. 587–591, 2009.

SOARES, J. L. N.; ESPINDOLA, C. R.; PEREIRA, L. C. Projeto de assentamento rural no cerrado maranhense: uma proposta Agroecológica. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.1, 2007.

SOUZA, I. G B; SOUZA, V. A B; LIMA, P. S C. Molecular characterization of *Platonia insignis* Mart. (“Bacurizeiro”) using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 5, p. 3835–3845, 2013.

SOUZA, V. A.B.; VASCONCELOS, L. F. L.; ARAÚJO, E.C. E.; ALVES, R. E. **O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.)**. Série Frutas Nativas, 11. Jaboticabal: Funep, p. 72, 2000.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon, Utrecht**, v.11, p.30-40, 1962.

UEKANE, T. M.; NICLOTTI, L.; GRIGLIONE, A.; BIZZO, H. R.; RUBIOLO, C. B.; ROCHA-LEÃO, M. H. .; REZENDE, C. M. Studies on the volatile fraction composition of three native Amazonian-Brazilian fruits: Murici (*Byrsonima crassifolia* L., Malpighiaceae), bacuri (*Platonia insignis* M., Clusiaceae), and sapodilla (*Manilkara sapota* L., Sapotaceae). **Food Chemistry**, v. 219, p. 13–22, 2017.

WRIGHT, S. **Variability within and among natural populations**. Vol. 4. The University of Chicago Press, Chicago. 1978.

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA ABELHA TIÚBA (*Melipona fasciculata* SMITH, 1854 - HYMENOPTERA, APIDAE) BASEADA NO MARCADOR ISSR

Diego Marques Costa Silva

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Medicina Veterinária – Maranhão, MA

Gustavo Lucas Bezerra Tinoco

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Medicina Veterinária – Maranhão, MA

Jonas Alves Mesquita

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Agronomia – Maranhão, MA

Laelson Rodrigues Ferreira e Ferreira

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Medicina Veterinária – Maranhão, MA

Hugo Almeida Ferreira

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Medicina Veterinária – Maranhão, MA

Edyane Moraes dos Santos

Universidade Federal de São Carlos, Doutoranda em Genética Evolutiva e Biologia Molecular – São Carlos, SP

José de Ribamar Silva Barros

Universidade Estadual do Maranhão, Departamento de Química e Biologia/DQB – Maranhão, MA

RESUMO: A abelha *Melipona fasciculata* Smith, popularmente conhecida como Tiúba, compreende as abelhas nativas e sem ferrão, usadas principalmente para a produção de mel, com uma grande predominância da espécie no Estado do Maranhão. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade genética antes e após o

manejo (seleção) das abelhas, com o marcador molecular ISSR. Foram coletadas abelhas das 32 colônias localizadas no meliponário na Universidade Estadual do Maranhão, antes e depois da seleção. Realizamos 64 extrações de DNA genômico das abelhas, sendo 32 antes da seleção e mais 32 após a seleção, baseada na metodologia da técnica descrita por Doyle & Doyle (1987), foi submetido a eletroforese para confirmar a presença do DNA. O material genético ele foi submetido a PCR com seis primers do marcador molecular ISSR. A diversidade genética foi de 0,17 antes seleção e 0,24 após a seleção. Na análise de variância AMOVA, foi possível verificar que a diferenciação genética ocorreu total dentro da população, o que pode ser associado ao fluxo gênico restrito desses indivíduos e o índice de fixação (F_{st}) ele se mostrou em um valor negativo de -0.0232. O agrupamento pelo o método de UPGMA permitiu a formação de quatro grupos distintos, aparecendo somente dois indivíduos geneticamente distantes. O marcador ISSR ele se mostrou de fundamental importância para o estudo da diversidade da abelha *Melipona fasciculata* nesta população.

PALAVRAS-CHAVE: Abelhas Sem Ferrão, Seleção, Variedade genética.

STUDY OF GENETIC DIVERSITY OF BEES

TIÚBA (*Melipona fasciculata* SMITH, 1854 - HYMENOPTERA, APIDAE) BASED ON ISSR MARKER

ABSTRACT: The bee *Melipona fasciculata* Smith, popularly known as Tiúba, includes native and stingless bees, mainly used for the production of honey, with a great predominance of the species in the State of Maranhão. The objective of this work was to evaluate the genetic diversity before and after the management (selection) of the bees, with molecular marker ISSR. Bees were collected from the 32 colonies located at the meliponário at the State University of Maranhão, before and after the selection. We performed 64 extractions of genomic DNA from the bees, 32 before selection and 32 after selection, based on the technique methodology described by Doyle & Doyle (1987), was submitted to electrophoresis to confirm the presence of DNA. The genetic material was subjected to PCR with six primers of molecular marker ISSR. The genetic diversity was 0.17 before selection and 0.24 after selection. In the analysis of variance AMOVA, it was possible to verify that the genetic differentiation occurred totally within the population, which can be associated to the restricted gene flow of these individuals and the fixation index (F_{st}) it was shown in a negative value of -0.0232. Grouping by the UPGMA method allowed the formation of four distinct groups, appearing only two genetically distant individuals. The ISSR marker was shown to be of fundamental importance for the study of the diversity of the bee *Melipona fasciculata* in this population.

KEYWORDS: Bees without stingers; selection; genetic variety.

1 | INTRODUÇÃO

Os meliponíneos, popularmente conhecidos como abelhas sem ferrão, assumem um papel importante nos ecossistemas por meio da polinização (MORGADO et al., 2002). Estão agrupados na Classe Insecta, Ordem Hymenoptera, Superfamília Apoidea, Família Apidae, Subfamília Meliponinae, existindo duas tribos: Meliponini e Trigonini. Os meliponíneos são abelhas sociais que vivem em áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006).

Kerr e Vencovsky (1982), descreveram sobre a quantidade mínima de ninhos de uma mesma espécie para evitar o endocruzamento e conseqüentemente perda da variabilidade genética, devido a produção de machos diplóides. A queda cada vez maior no número de alelos heterozigotos em função da endogamia, é um dos fatores que ocorrem, e eles são influenciados pelo fluxo gênico restrito, uma vez que populações distintas são interrompidas em cruzar genes entre si. Por conseqüência, isso aumenta a taxa de fixação de genes, amplia o nível de estruturação genético-populacional e torna alguns alelos raros por ocasião da deriva genética (SILVA et al., 2014).

Os marcadores moleculares vêm sendo empregados como uma importante ferramenta na conservação de espécies selvagens e/ou de interesse econômico por fornecerem dados importantes aos estudos populacionais, como: estimativas referentes

ao grau de variabilidade genética, grau de endogamia, diferenças entre populações, fluxo gênico entre populações, determinação do tamanho efetivo da população, dentre outros (SILVA et al., 2014).

Apesar da existência de poucos estudos genéticos relacionados às abelhas sem ferrão, tem sido recentemente demonstrado que os marcadores ISSR podem ser úteis na análise de populações de abelhas naturais, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de manejo desses importantes recursos genéticos (NASCIMENTO et al., 2010; TAVARES et al., 2013).

Os marcadores moleculares, fenótipos moleculares de polimorfismos específicos na sequência do DNA, apresentam-se em abundância ao longo do genoma dos seres eucariontes, sendo intensamente utilizados em estudos genéticos populacionais. Dentre estes estudos, destaca-se principalmente a caracterização de níveis e organização de variabilidade genética dentro e entre espécies afins, subpopulações e grupos de reprodução e progênies. Assim, atuam na amplificação de uma sequência de DNA delimitada por duas regiões microssatélites invertidas (BENZAQUEM et al., 2009).

A necessidade de um programa afim de conservar e obter produtividade é crucial para os meliponicultores, baseado principalmente na sua biologia comportamental e genética, gerando maior expectativa econômica e, conseqüentemente, preservando a biodiversidade e os recursos naturais necessários ao desenvolvimento (SILVA et al., 2014).

A presença da *Melipona fasciculata* está distribuída principalmente nos Estados do Pará e Maranhão (nordeste da Região Amazônica), encontradas principalmente nos mangues, devido a presença de árvores ocas. No Maranhão é conhecida popularmente como tiúba, é uma abelha com hábitos bastante higiênicos, caracterizando um mel de excelente qualidade e com um alto poder de produção (VENTURIERI et al, 2003).

O crescente interesse econômico pelos agricultores é devido a produção de pólen, geoprópolis, mas principalmente para obter o mel, que tem alcançado um alto valor aquisitivo no mercado. Dentro das instituições de ensino e pesquisa, essa tarefa também tem sido estimulada, com o objetivo de elucidar dúvidas quanto a genética, biologia, manejo, polinização e evolução das diferentes espécies, com a finalidade de aumentar o poder de produção, alinhado a conservação desses animais (BRITO, 2013).

Dessa forma, este trabalho teve como principal proposta o estudo da *Melipona fasciculata* através da análise da diversidade genética, com estudo do polimorfismo através do marcador ISSR que foi utilizado para caracterizar a estrutura populacional de colônias de um meliponário, localizado na Universidade Estadual do Maranhão, afim de verificar a estruturação genética antes e após técnicas de manejo, utilizando a abordagem PCR-ISSR.

2 | METODOLOGIA

2.1 Local das coletas

O meliponário está situado no Norte do Estado do Maranhão (Figura 1), limita-se com os municípios de Paço do Lumiar, São José de Ribamar, Raposa e com o oceano Atlântico ($44W 12' 45''$, $02S 35' 33''$). A cidade de São Luís está localizada numa área de encontro de duas floras: a flora da Amazônia e a flora nordestina.

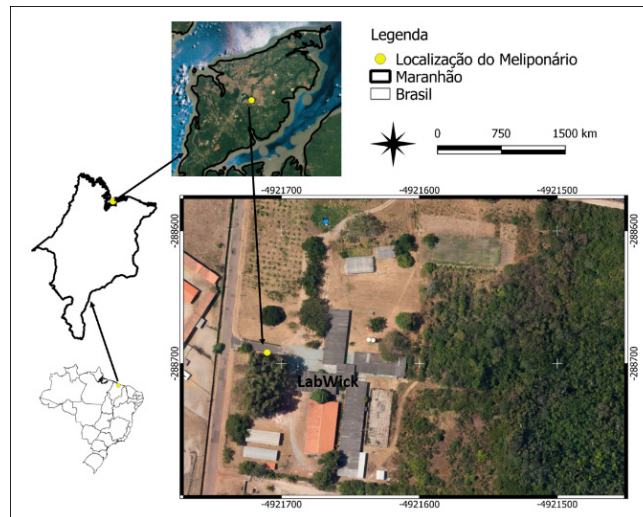


Figura 1. Mapa da Ilha de São Luís, com o ponto de localização do meliponário

2.2 Manejo das abelhas

As coletas foram realizadas no meliponário localizado na Universidade Estadual do Maranhão, que passaram por processo de seleção e manejo. Foi realizada uma coleta amostras de operárias de 32 colônias antes da seleção e outra após a seleção. Realizamos a primeira coleta antes da seleção das rainhas, no mês de fevereiro de 2017. Em seguida, no mês de março, fizemos a seleção das abelhas rainhas baseadas no método de melhoramento proposto por Vencovsky e Kerr (1982), que usa o parâmetro de tempo de coleta de operárias. Esperamos até outubro para poder realizar a segunda coleta (pós-seleção), totalizando um período de 7 meses da seleção até a segunda coleta.

2.3 Extração do DNA e amplificação via PCR

A extração de DNA genômico das abelhas foi baseada na metodologia da técnica descrita por Doyle & Doyle (1987), que utiliza CTAB, onde o DNA genômico foi obtido a partir do mesossoma das abelhas coletadas, eliminando-se as asas, cabeça e metassoma, utilizando-se 1 (um) tórax de *M. fasciculata*. Para a extração de DNA e análise molecular foi utilizada uma (01) abelha por colmeia, sendo no total 64 extrações (total de abelhas do antes e pós seleção).

Após todo o procedimento de extração submetemos o DNA a eletroforese

em gel de agarose 1% para a visualização do material genético e confirmação de sua extração, análise de sua integridade e estimativa de sua concentração. Após o término da corrida em eletroforese (duração de 30 minutos), visualizamos em aparelho transiluminador de UV que permitiu a visualização do DNA corado com brometo de etídio, sob as condições de 80 V e 90 mA.

Após a extração de DNA e corrida em eletroforese, o material genético foi submetido à técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - “*Polymerase Chain Reaction*”) segundo a metodologia de Mullis e Faloona (1987); Saiki *et al.* (1985) para a amplificação da região específica a ser investigada nesse projeto. A reação de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima *Taq* polimerase, isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, que é capaz de sintetizar polinucleotídeos em elevadas temperaturas.

Seis primers de ISSR e as condições de amplificação da PCR foram previamente selecionados do trabalho de Dias (2008), mas não foi obtido sucesso na amplificação com as mesmas temperaturas de anelamento em nosso trabalho com *Melipona fasciculata*, sendo assim necessário padronizar para cada um dos primers a temperatura de anelamento. Em um tubo de eppendorf estéril Axygen Scientific foram realizados para cada primer, quantidades diferentes de alguns dos constituintes do mix da PCR, em um volume total de 20 μ l para cada eppendorf (Tabela 2).

O programa de amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95° por 10 minutos, seguido de 25 ciclos de amplificação a 95° por 1 minuto, por 45 segundos a temperatura de pareamento do primer (que variou de acordo com o primer utilizado) e 72° por 2 minutos na extensão e para finalizar, mais 12 ciclos de 95° por um minuto na desnaturação, 45 segundos no anelamento (que variou novamente dependendo do primer), 2 minutos de 72° e finalizou o processo com 4° ao infinito para conservar a reação após o termino. Os primers utilizados foram os UBC 807, UBC 808, UBC 809, UBC 810, UBC 811 e UBC 826 e suas temperaturas de anelamento foram respectivamente 51-55°C, 53-50°C, 53-54°C, 53-50°C, 50-54°C e 55-58°C.

Componentes da reação de PCR	Primer 807	Primer 808	Primer 809	Primer 810	Primer 811	Primer 826
Tampão	2,0 μ l	2,0 μ l	2,0 μ l	2,0 μ l	2,0 μ l	2,0 μ l
dNTPs	1,5 μ l	1,5 μ l	1,5 μ l	1,5 μ l	1,5 μ l	1,5 μ l
DNA	1,3 μ l	1,2 μ l	1,3 μ l	1,3 μ l	1,3 μ l	1,4 μ l
Primers	3,0 μ l	3,5 μ l	3,5 μ l	3,0 μ l	3,5 μ l	3,5 μ l
Taq	0,2 μ l	0,2 μ l	0,2 μ l	0,2 μ l	0,2 μ l	0,2 μ l
MgCl ₂	1,7 μ l	1,2 μ l	1,7 μ l	1,7 μ l	1,2 μ l	1,3 μ l
Água	10,4 μ l	10,4 μ l	10,4 μ l	10,4 μ l	10,4 μ l	10,4 μ l

Tabela 2. Constituintes e volumes utilizados na preparação da PCR para amplificação com cada primer do marcador ISSR.

Os produtos das ampliações foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% por 50 – 100 minutos e corados com brometo de etídio. Em seguida, visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados caso acontecesse à amplificação (Figura 2).

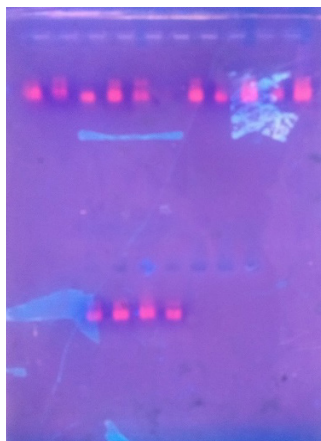


Figura 2. Eletroforese após PCR-ISSR para visualização do material genético

2.4 Análises genéticas dos marcadores ISSR

As análises foram realizadas diretamente no gel de agarose da amplificação da PCR. Os produtos amplificados foram designados como um único caráter, no qual a presença foi representada por “1” e a ausência por “0”. Os marcadores ISSR foram então convertidos em uma matriz binominal (0/1) no excel. A relação genética entre os genótipos foi estimada utilizando-se o coeficiente de distância de Jacard, resultando em uma matriz. O dendrograma foi obtido pelo método da ligação média não ponderada (UPGMA) para ilustrar as relações entre as caixas coletadas, com auxílio do software PAST 1.34 (Hammer et al., 2001). A similaridade genética será estimada entre as duas populações e calculada a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard.

O estudo de estruturação genética e do nível de variabilidade das populações (heterozigosidade - H_e) e diferenciação genética entre as populações (F_{ST}) (WEIR e COCKERHAM, 1984), foi analisado utilizando o programa Arlequin 3.11 (Excoffier et al, 2005). As populações foram agrupadas por subpopulações e as estatísticas de F de Wright (WRIGHT, 1978) foram utilizadas para analisar a estrutura genética das populações através de desvios entre as frequências alélicas das subpopulações (F_{st}). Uma outra medida de diversidade usada é o índice de Shannon, analisado pelo programa FAM - Fingerprint Analysis with Missing Data 1.31 (SCHLÜTER, 2013). A análise de variância molecular (AMOVA) foi também utilizada para revelar a distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações com o auxílio do programa Arlequin e também pelo software FAM.

Todas as etapas de análises da diversidade genética da abelha tíuba foram realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular- LabWick, na Universidade Estadual do Maranhão.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PCR-ISSR

Por meio do programa Arlequin a He antes da seleção foi de 0,17 e pós seleção de (0,24) (Tabela 3), estes valores são bem parecidos com os trabalhos de Nascimento (2018), que encontrou o valor de 0,18 para a espécie *Melipona quadrifascilata* e Nogueira (2009) de 0,19 em *Melipona fasciculata*, os dois com o marcador molecular ISSR. No trabalho de Silva (2007) também é possível observar um baixo valor de He, que foi de 0.086, mas utilizando marcador molecular microssatélites para a espécie *Melipona quadrisfasciata*, o que torna um valor realmente muito baixo.

Locus	Nº de indivíduos	He antes	He depois
1	32	0.12097	0.17540
2	32	0.17540	0.22581
3	32	0.22581	0.27218
4	32	0.17540	0.27218
5	32	0.22581	0.27218
6	32	0.12097	0.22581
Média	32.000	0.17406	0.24059
s.d.	-	0.04690	0.03919

Tabela 5. Valores de He antes e após seleção.

As hipóteses para explicar os baixos níveis de variabilidade genética na ordem Hymenoptera podem ser explicados pela a reprodução (sistema haplodiploide), a sociabilidade e características ecológicas quem envolvem o ambiente (NASCIMENTO, 2008). E apesar do valor obtido neste trabalho corroborar com outros estudos, o ISSR é um marcador universal, e para que tenhamos um valor sempre mais próximo do real, é necessário aumentar o número de loci.

Quanto ao sistema de reprodução das abelhas, as fêmeas são geradas a partir de ovos fecundados, o que caracteriza que elas são diploides, mas os machos, eles são originados de ovos não fecundados, que no caso são os haploides. Segundo Kerr (1976), a haplodiploidia gera poucos locos polimórficos, o que explica que esse é um dos motivos pela a diminuição das populações, pelo o aumento da fixação de alelos (NASCIMENTO, 2008; NOGUEIRA, 2009.) No local de estudo deste trabalho, o meliponário é formado somente por 32 colmeias, o que vai de acordo com a literatura sobre a perda de alelos por machos haploides, principalmente em locais com menos de 44 ninhos, já que segundo Kerr e Vencovsky (1982), esse é o número mínimo para que seja mantido pelo menos seis alelos diferentes para o loco CSD, para que não ocorra a probabilidade de ter homozigose neste loco (GONÇALVES, 2010).

A ausência do fluxo gênico é outro fator que pode influenciar no aumento da endogamia, levando aos baixos resultados de diversidade genética encontrados. Silva *et al* (2014), cita que devido impossibilidade do deslocamento das rainhas que estão em intensa postura, faz com que o processo de dispersão das abelhas seja de forma bem mais lenta, isso associado a barreira geográficas e ambientais da região, como relevos e disponibilidade de uma florada para atender as necessidades, fazendo com que a população fique confinada e tenha efeitos negativos dentro dela (NASCIMENTO, 2008). No meliponário estudado, ele fica localizado dentro da área urbana de São Luís, havendo apenas um pequeno meliponário próximo, o que talvez ocorra uma troca de alelos entre as duas populações. O fluxo gênico dentro do próprio meliponário é existente, mas pelo os níveis baixos de H_e , é possível que sejam populações adaptadas a endogamia.

Comparando os níveis de H_e antes e após a seleção, é possível verificar que houve um pequeno aumento na diversidade genética, de 0,07 aproximadamente. Como o processo de seleção realizado, foi que inserimos rainhas de colmeias mais produtivas nas menos produtivas, estes indivíduos levaram consigo alelos que eram diferentes da colmeia originalmente, o que levou ao aumento da diversidade genética do meliponário que está sendo estudado. Uma hipótese que pode ser levantada, é que houve uma troca de alelos entre as rainhas do meliponário estudado com um outro, localizado dentro da Fazenda Escola da universidade Estadual do Maranhão, que foi adquirida de um município diferente. No trabalho de Gonçalves (2010), ele encontrou um valor de diversidade genética maior do que o esperado, e justificou o fato, por ter sido inserido ninhos no Campus proveniente de outras localidades, havendo assim troca de alelos entre os indivíduos.

Segundo a AMOVA, observou-se que a variação total se deve a diversidade genética existente dentro de cada população (Tabela 5), o que indica que não existe uma estrutura genética, as populações são similares entre elas, o que já era de se esperar pois neste trabalho, a população é a mesma, o que muda é seleção feita dentro dela, caracterizando uma população antes e outra após seleção. E como já visto nos níveis de H_e , a diferença entre os dois momentos foi mínimo, então não houve uma mudança significativa que o índice de AMOVA pudesse detectar uma diferença entre as “populações”.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre as populações	0.188	-0.01358	-2.23166
Dentro das populações	38.562	0.62198	102.23166
Total	38.750	0.60840	

Tabela 5. Análise de variância Molecular (AMOVA) considerando-se dois níveis hierárquicos

Os trabalhos de Nascimento (2008) e Nogueira (2009), mostram também que a maior parte da diversidade está dentro das populações, 45,66% e 32,60% entre; 79,08 e 27,20%. Vale (2013), também encontrou um nível maior entre populações dentro do grupo, que foi de 42,36 contra 18,23 somente entre os grupos pesquisados. Estes trabalhos citados também sugerem que esses valores foram encontrados devido a não distribuição dessas espécies no espaço geográfica, relacionado com o fluxo gênico restrito ou ausente dos indivíduos destas localidades, o que pode levar a um alto índice de endogamia.

O Fst é utilizado para estimar a diferença das populações a partir da variância da frequência de alelos, quanto mais próximo de 0 (zero), significa que a população não é geneticamente diferenciada, e quanto mais acima desse valor, mais frequências alélicas diferentes são encontradas (ZOLET *et al*, 2013). No presente trabalho, encontramos um valor negativo de $-0,0232$ (Tabela 5). Na literatura não encontrei nenhum valor referente negativo de Fst para abelhas, Melíponas e nem *Apis mellifera*.

Para explicar o fato de valor ter sido negativo em nosso estudo, levantamos a hipótese de que como não são duas populações propriamente ditas, mas sim de dois momentos (antes e depois da seleção) dentro da mesma população, esse valor foi negativo porque a comparação foi com os mesmos indivíduos e com uma pequena variação somente.

No dendograma formado a partir do programa PAST, foi possível fazer o agrupamento dos indivíduos de acordo com a similaridade genética, onde variou de 0,42 a 0,96 (Figura 4). As análises de agrupamento, considerando-se antes e após seleção, revelaram formação de quatro grupos, do qual é possível verificar que geneticamente estão todos bem próximos, com um coeficiente de correlação cofenética de 0,86, o que mostra que há um bom ajuste da demonstração gráfica e a sua matriz original. As formações dos grupos tiveram dentro de cada um, indivíduos dos dois momentos mais semelhantes que alguns outros, por exemplo, o indivíduo 20 antes da seleção e os indivíduos 6, 11 e 24 depois da seleção, mais próximos geneticamente do indivíduo 8 antes da seleção. Somente duas colmeias apareceram um pouco mais distantes dos grupos formados, sendo um de cada momento.

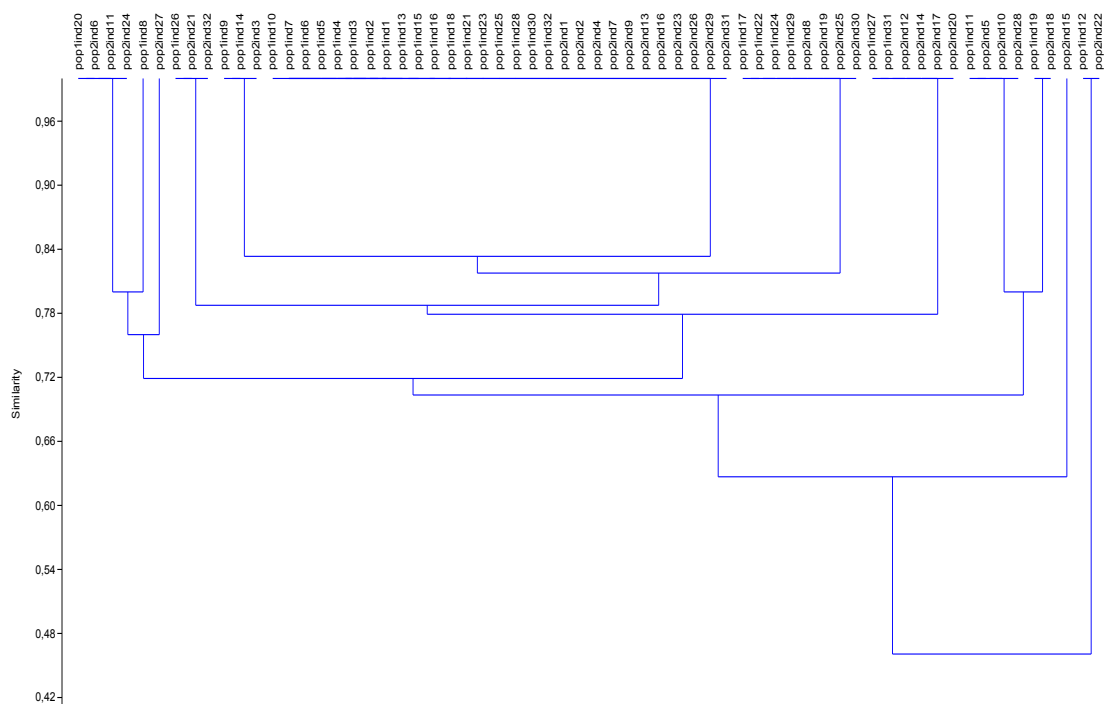


Figura 4. Dendograma de similaridade genética, obtida pelo o método UPGMA

4 | CONCLUSÃO

O estudo da diversidade genética de *Melipona fasciculata* com o marcador molecular ISSR possibilitou chegar às seguintes conclusões:

- Foi encontrado um baixo nível de variabilidade genética antes e após a seleção, o que condiz com a literatura quando se trata de indivíduos que tem sistema haplodiploide;
- Após seleção foi possível verificar um aumento nos níveis de heterozigidade, mostrando que é ela uma ferramenta que pode ser utilizada para aumento de produção;
- Na população estudada há indícios de fluxo gênico restrito, e com os dados foi possível observar que a população quase não tinha diferença genética;
- A migratório se torna bastante viável como uma forma de manejo e conservação das colônias do meliponário.

REFERÊNCIAS

ANDREATTI FILHO, Raphael Lucio et al. Comparação de métodos para extração de DNA na reação em cadeia da polimerase para detecção de Salmonella enterica sorovar Enteritidis em produtos avícolas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 115-119, 2011.

BENZAQUEM, Denise C.; FREITAS, Danival V.; VERAS, Ydrielly T.; BARROS, Waldir G.; SAMPAIO, Paulo de T. Seleção de Primers ISSR para análise genético populacional em espécies do gênero Aniba. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 61, 2009. Manaus - Amazonas. **Anais eletrônicos...**São Paulo: SBPC, 2009. Disponível em: Acesso em:

05 de abril de 2017.

FAQUINELLO, P.; BRITO, B. B. P.; CARVALHO, C. A. L.; LEITE, C. P.; ALVES, R. M. O. Correlação entre parâmetros biométricos e produtivos em colônias de *Melipona quadrifasciata* anthidioides Lepeletier (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 312–317, 2013.

CORTOPASSI-LAURINO, Marilda et al. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 275 - 292, 2006.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, p. 7 – 50. 2005.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2.ed. Brasília: **Embrapa CENARGEN**, 220 p.

GONÇALVES, Paulo Henrique Pereira. **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2010.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Eletrônica** v.4, p.1-9, 2001.

MORGADO, Leila. N.; CARVALHO, César. F.; SOUZA, Brígida.; SANTANA Márcia. P. Fauna de Abelhas (HYMENOPTERA: APOIDEA) nas Flores de Girassol *Helianthus annuus* L. em Lavras – MG. **Ciência e agrotecnologia**, n.26, p.1167 - 1177, 2002.

MULLIS, K. & FALOONA, F., Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol**, p. 335-350, 1987.

NASCIMENTO MA; BATALHA-FILHO H; WALDSCHMIDT AM; TAVARES MG; CAMPOS LAO; SALOMÃO TMF. Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier. **Genetic and Molecular Biology**, p. 394–397, 2010.

NASCIMENTO, M. A. **Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) no estado de Minas Gerais com marcadores ISSR**. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2008.

NOGUEIRA, J. **Variabilidade genética de *Melipona capixaba* MOURE & CAMARGO, 1994 (Hymenoptera: Apidae), espécie ameaçada de extinção: subsídios para sua conservação**. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal de Viçosa, 2009.

SCHLÜTER, P. M. **FAMD - Fingerprint Analysis with Missing Data 1.31 - Manual**. Institute of Systematic Botany. University of Zurich, p. 57, 2013.

SAIKI, R. K; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. & ERNHEIN, N., Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, p. 1350-1354, 1985.

SILVA, Geice Ribeiro da et al. **Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini), e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade**. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 299-308, 2014.

SILVA, R. B. **Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) no estado de Minas Gerais-Brasil**. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, 2007.

TAVARES MG; ALMEIDA BS; PASSAMANI PZ; PAIVA SR; RESENDE HC; CAMPOS AO; ALVES RMO; WALDSCHMIDT AM. Genetic variability and population structure in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae) from Bahia, Brazil, based on molecular markers. **Apidologie** 44: 720–728. 2013.

VALE, Kaline Aguiar Gonzalez. **Diversidade Genética e Estrutura de Populações da Abelha *Scaptotrigona* aff. *depilis* no Piauí**. Dissertação de Mestrado, Teresina, Piauí, 2013.

VENTURIERI, G. C.; RAIOL, V. F. O.; PEREIRA, C. A. B., Avaliação da criação racional de *Melipona fasciculata* (Apidae: Meliponina), entre os agricultores familiares de Bragança, PA, Brasil. **Biota Neotropica**, V. 3, n. 2, 7 p., 2003.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, 38: 1358–1370. 1984.

WRIGHT, S. Variability within and among natural populations. Vol. 4. **The University of Chicago Press**, Chicago. 1978.

ZOLET, A. C. T.; SEGATTO, A. L. A.; TURCHETTO, A.; SILVA, C. P.; FREITA, L. B. **Guia prático para estudos filogeográficos**, ed. Sociedade Brasileira de Genética 2013.

MEL DE TIÚBA: AUMENTO DA PRODUÇÃO DE MEL POR MEIO DA MELIPONICULTURA MIGRATÓRIA

Gustavo Lucas Bezerra Tinoco

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Medicina Veterinária – Maranhão, MA

Diego Marques Costa Silva

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Medicina Veterinária – Maranhão, MA

Jonas Alves Mesquita

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Agronomia – Maranhão, MA

Hugo Almeida Ferreira

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Medicina Veterinária – Maranhão, MA

Laelson Rodrigues Ferreira e Ferreira

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Medicina Veterinária – Maranhão, MA

Gabriel Garcês Santos

Universidade Estadual do Maranhão, curso de Agronomia – Maranhão, MA

José De Ribamar Silva Barros

Universidade Estadual do Maranhão, Departamento de Química e Biologia/DQB – Maranhão, MA

RESUMO: A abelha *Melipona fasciculata* Smith, conhecida popularmente como Tiúba, é uma espécie nativa que se encontra nas áreas de transição dos biomas Amazônia e Cerrado, criada com sucesso por centenas de criadores, sendo mais popular nos estados do Pará e Maranhão. Tradicionalmente, essa abelha tem sido empregada principalmente na produção de

mel e esta vocação se justifica por representar a abelha nativa com maior produtividade, uma vez que as colônias produzem em média 3,5 litros/ano. A Tiúba contribui para a polinização de plantas como o maxixe, jerimum, murici e tem preferências pelas plantas nativas como a jurubeba, sabiá e mirim. A comercialização do mel na Baixada Maranhense é uma importante fonte de renda para as famílias da região. Diante disso, o presente trabalho teve por finalidade observar a produção de mel por meio da meliponicultura migratória na região. Foram migradas trinta colmeias do meliponário do Laboratório de Genética e Biologia Molecular Warwick Estevam Kerr (Labwick-UEMA) para a cidade de Palmeirândia, localizada na Baixada Maranhense. Todas as colmeias foram pesadas antes da migração e apresentaram peso bruto médio igual a 5488.7667 ± 882.3993 g. Após período de sete meses, todas as colmeias foram pesadas novamente, apresentando peso bruto médio de 5668.6667 ± 976.6121 g. Ao analisar os dados estatisticamente, houve diferença significativa entre as duas médias produzidas. O ganho de peso mostrou estar correlacionado, por meio do teste de correlação de Pearson, com a produção de mel, mostrando que a meliponicultura migratória se constitui numa atividade viável.

PALAVRAS-CHAVE: Abelha Sem Ferrão; Produtividade; Migração.

HONEY OF TIÚBA: INCREASE OF HONEY PRODUCTION THROUGH MIGRATORY MELIPONICULTURA

ABSTRACT: The bee *Melipona fasciculata* Smith, popularly known as Tiúba, is a native species found in the transition areas of the Amazon and Cerrado biomes, successfully created by hundreds of breeders, being more popular in the states of Pará and Maranhão. Traditionally, this bee has been used mainly in the production of honey and this vocation is justified because it represents the native bee with greater productivity, since the colonies produce in average 3.5 liters / year. Tiúba contributes to the pollination of plants such as the maxixe, jerimum, murici and has preferences for native plants such as jurubeba, sabia and mirim. The commercialization of honey in Baixada Maranhense is an important source of income for families in the region. In view of this, the present work had the purpose of observing the production of honey by means of the meliponicultura migratory in the region. Thirty hives from the Meliponary of Genetics and Molecular Biology Warwick Kerr (Labwick-UEMA) were migrated to the city of Palmeirândia, located in the Baixada Maranhense. All hives were weighed prior to migration and had an average gross weight of 5488.7667 ± 882.3993 g. After a period of seven months, all hives were weighed again, with an average gross weight of 5668.6667 ± 976.6121 g. When analyzing the data statistically, there was a significant difference between the two averages produced. The weight gain showed to be correlated, through the Pearson correlation test, with honey production, showing that migratory meliponiculture constitutes a viable activity.

KEYWORDS: Bee Without Stinger; Productivity; Migration.

1 | INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão, também conhecidas como meliponíneos, realizam a polinização em diversos ecossistemas tropicais. No Brasil, existem aproximadamente 244 espécies válidas e cerca de 89 ainda não descritas, classificadas em 29 gêneros (PEDRO, 2014). Os meliponíneos são abelhas de fácil manejo e necessitam de pouco investimento para a sua criação. É uma atividade que pode ser integrada a plantios florestais, de fruteiras e de culturas de ciclo curto, podendo contribuir, através da polinização, com o aumento da produção agrícola e regeneração da vegetação natural (VENTURIERI et al., 2003). A Meliponicultura, ou criação de abelhas indígenas sem ferrão, é uma prática antiga entre as populações indígenas e tradicionais de todo o interior do Brasil e da América Latina, principalmente no México e América Central (NOGUEIRA-NETO, 1997; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2005; CORTOPASSILAURO et al., 2006).

A prática da criação apresenta potencial na produção de mel, com grandes perspectivas e tem sido importante ferramenta na agricultura familiar, como alternativa de provento financeiro, por apresentar características peculiares de baixo investimento de implantação de meliponários e a facilidade de manejo, outro fator importante a

conservação das espécies das abelhas e manutenção da biodiversidade (FREITAS et al., 2004; KERR, 2006). A produção de mel é a atividade mais conhecida das abelhas, porém a quantidade de mel produzida por colônia pelos meliponíneos é considerada baixa em relação às abelhas africanizadas (CARVALHO ET AL., 2003). O estabelecimento de técnicas de criação visando à produção de mel em larga escala necessita de tecnologias que propiciem o aumento da produtividade com baixo custo e alta eficiência.

A criação da *Melipona fasciculata* Smith, ou Tiúba, como é popularmente conhecida, faz-se predominante no Maranhão, compreendendo um diverso e abundante grupo de abelhas sociais que desempenham um importante papel econômico como fonte de renda, principalmente, para várias famílias de baixo poder aquisitivo do interior do Estado (BEZERRA, 2002). A maioria das colônias é transferida para caixas “caboclas” (caixas rústicas sem nenhuma padronização), outras, porém, são criadas no próprio tronco da árvore em que foram encontradas. O manejo dessas abelhas é feito com informações que os criadores adquiriram e vão passando de geração a geração, sendo poucos os que recebem um apoio técnico especializado.

Dentre as regiões do Estado do Maranhão que possui um dos maiores potenciais na produção de mel, por contar com uma melhor estrutura para o beneficiamento e possuir uma rica biodiversidade vegetal, é a microrregião da Baixada Maranhense (COAMEL, 2010). A Baixada Maranhense é uma área de rica biodiversidade por incorporar uma complexa conexão de ecossistemas, incluindo manguezais, campos abertos e inundáveis, babaçuais, estuários, lagunas e matas ciliares. Situa-se na região Noroeste do estado (1° 00' – 4° 00' S e 44° 21' – 45° 21' W), ao Sul encontra-se a formação de cocais, ao Leste os campos cerrados, Vegetação amazônica a Oeste e sistemas marinhos ao Norte (SANTOS, 2004; RIOS, 2005).

Uma das características peculiares da região da Baixada Maranhense são seus campos naturais inundados durante o período chuvoso, conhecida como “Pantanal Maranhense”. Neste período, os campos são dominados por macrófitas aquáticas nectarífera. Martins et. al, (2011), identificou em seu trabalho 45 tipos polínicos em mel de Tiúba na Baixada Maranhense, grande parte deste recurso se constituía da vegetação nativa da região. Como a região possui potencial meliponícola, o trabalho teve como principal objetivo estudar o aumento da produção de mel na Baixada Maranhense por meio da prática da meliponicultura migratória.

2 | METODOLOGIA

As colmeias usadas para a migratória são oriundas do meliponário do Laboratório de Genética e Biologia Molecular Warwick Estevam Kerr (Labwick-UEMA), com a abelha *Melipona fasciculata* Smith, a Tiúba do Maranhão e foram migradas para o sítio do meliponicultor Osmar Mario Pinheiro, localizado na cidade de Palmeirândia

(MA).



Figura 1. Meliponário do Laboratório de Genética e Biologia Molecular Warwick Estevam Kerr (LabWick/UEMA)

Foram migradas, em janeiro de 2018, trinta colmeias existentes no meliponário do Labwick, obedecendo as seguintes recomendações:

- a. O transporte para a cidade foi feito em um veículo com pouca trepidação (Figura 2 A);
- b. Na véspera da viagem, à noite, todas as colmeias foram fechadas;
- c. As entradas das colmeias foram raspadas e fechadas com uma tela de arame (Figura 2 B);
- d. Antes do transporte foi oferecido 5cc de água, para cada colmeia;
- e. Chegando ao local as colmeias foram instaladas em lugar sombreado, sobre suporte de madeira (Figura 2 C).

Devido à morte de duas colmeias, foi possível migrar apenas trinta.

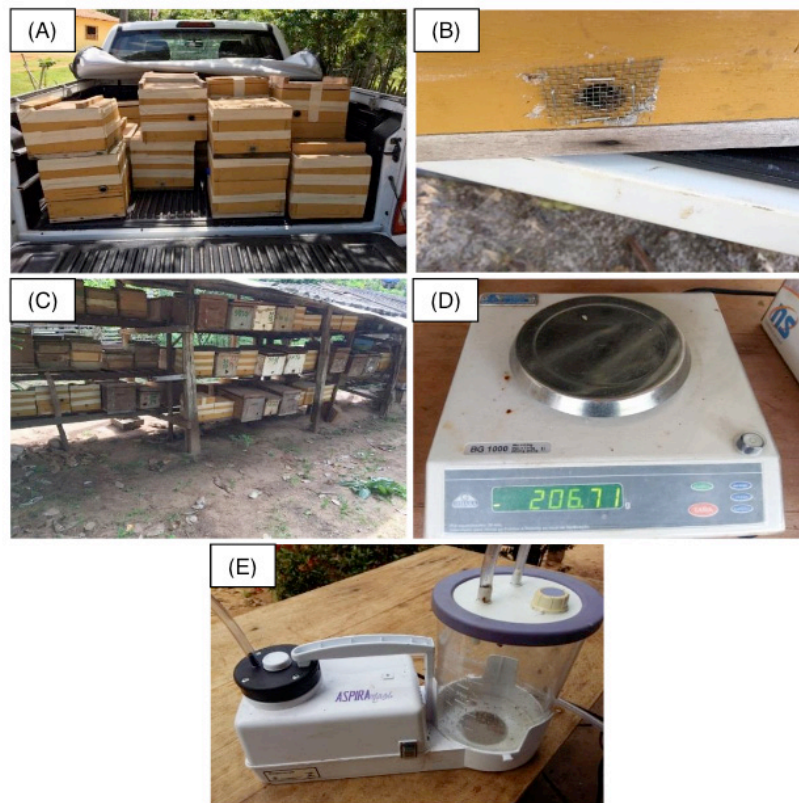


Figura 2. Veículo usado para transporte das caixas (A), colmeias fechadas com arame (B), meliponário em Palmeirândia (C), balança utilizada para pesagem (D) e microaspirador utilizado para sucção de mel.

Para fins comparativos, todas as caixas foram pesadas antes e após período de sete meses. Os resultados foram obtidos utilizando-se uma balança de precisão modelo BG 1000 (Figura 2 D). Para coleta do mel produzido pelas colmeias foi utilizado um microaspirador AspiraMax (Figura 2 E).

Os dados coletados antes e após a migração foram analisados estatisticamente utilizando o teste t de Student, através do software BioEstat 5.0. O nível de significância (alfa) adotado foi de 5% e graus de liberdade (GL) = n-1. Comparando-se as médias antes e após migração, o valor encontrado pelo teste determinou-se a diferença de peso das colônias tinha sido significativa. Para testar se a diferença no peso bruto médio das colmeias estava correlacionada com a produção de mel foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a análise das médias produzidas foi utilizado o teste t de Student entre duas amostras relacionadas, onde o valor de p foi igual à 0,0465. Como o valor de p encontrado foi inferior à 0,05, rejeitou-se a hipótese nula ($H_0: \mu_a = \mu_d$) e aceitou-se a hipótese alternativa ($H_a: \mu_a < \mu_d$), caracterizando aumento significativo no peso bruto das colmeias após a segunda pesagem.

Dados	Antes da migratória	Depois da migratória
Média do peso (g)	5488.7667	5668.6667
Desvio padrão	882.3993	976.6121
Média das diferenças	-179.9000	
(t) =	-1.7362	
Graus de liberdade	29	
(p) unilateral =	0.0465	
(p) bilateral =	0.0930	
IC (95%) =	-391.7946 a 31.9946	
IC (99%) =	-465.4655 a 105.6655	

Tabela 1. Resultados do teste t de Student.

Segundo Kerr (2006), pode se obter a produção de mel pela a diferença de peso da primeira pesagem e da segunda, antes e depois da florada respectivamente, e, ao obter os resultados das pesagens o meliponicultor já conhecerá (pela diferença de peso) quais são as colônias com maior aumento de peso (SANTOS & BEZERRA, 2008).

Barros (2006) relacionou o peso de colônias de *M. scutellaris* à maior produção de mel. Entretanto Aidar (2010) relata que apenas a pesagem da colônia não é suficiente para avaliar o seu desempenho. Assim esta deve servir como auxílio, sendo uma informação importante quando se avalia a produtividade principalmente em épocas de boas floradas.

Os resultados das pesagens das colônias de *M. fasciculata* Smith estão apresentados na Tabela 2, onde mostra o peso das colmeias antes da migração e após o período passado na cidade de Palmeirândia (MA). A colmeia K23 foi a que apresentou maior ganho de peso, enquanto outras colmeias tiveram seu peso diminuído.

Identificação das colmeia	Peso (g)	
	Antes da migração	Depois da migração
K01	5162	5475
K02	5449	5825
K03	6066	7025
K04	3556	3700
K05	6428	6175
K06	6208	6000
K07	6481	6500
K08	5683	5825
K10	5653	5625
K11	4971	5600
K12	5612	5792
K14	5459	5700
K17	7043	7400
K18	6991	6450

K19	6085	6400
K20	6429	6150
K21	5949	6175
K22	5124	4500
K23	5222	6950
K24	5168	5123
K25	5225	6300
K26	5469	6750
K27	5343	5090
K29	4355	4290
K30	4475	4575
K31	4525	4450
K32	3521	4150
K33	6176	5325
K34	4543	4000
K35	6300	6740

Tabela 2. Resultado das pesagens das colmeias antes e após a migração.

Alves et al. (2012a) pesou sessenta colônias de *M. scutellaris* e encontrou um peso médio de $2,54 \pm 0,65$ Kg. Nesse trabalho o peso bruto médio antes da migração foi de 5488.7667 ± 882.3993 g e 5668.6667 ± 976.6121 g após período de sete meses, havendo um aumento no peso bruto médio das colônias. Contudo Alves et al. (2019b), encontrou correlação entre o peso da colônia e produção de mel (0,058), baixa e positiva, mas não significativo.

n (pares) =	30
r (Pearson) =	0.5850
IC 95% =	0.28 a 0.78
IC 99% =	0.17 a 0.82
t =	3.8171
GL =	28
(p) =	0.0007
Poder 0.05 =	0.9669
Poder 0.01 =	0.8761

Tabela 3. Resultados do coeficiente de correlação de Pearson.

Considerando que esse aumento de peso pode ter sido ocasionado por vários fatores como pólen, discos de cria, cera, geoprópolis e também mel, o coeficiente de correlação de Pearson mostrou que a diferença de peso entre as duas pesagens está significativamente relacionada à produção de mel, já que o valor de p foi de 0,0007, portanto, rejeitou-se $H_0: p = 0$ e aceitou-se $H_a: p \neq 0$ (Tabela 3), mostrando que o mel foi o principal fator no ganho de peso das colmeias.

4 | CONCLUSÃO

As colmeias de *M. fasciculata* Smith utilizadas na migratória apresentaram, no peso bruto, diferença significativa entre as duas pesagens, sendo a média de peso bruto depois da migratória maior que antes da migratória. O aumento na produção de mel foi significativo e mostrou que o mel foi o principal fator no ganho de peso das colmeias, logo a meliponicultura migratória se faz viável para aumento da produção em épocas em que em uma determinada região não há florada disponível para as abelhas.

REFERÊNCIAS

- AIDAR, D.S. **A mandaçaia: biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. FUNPEC-Editora. Ribeirão Preto. Brasil. 161 pp. 2010.
- ALVES, R. M. O.; SANTOS, D. R.; NASCIMENTO, A. S.; SODRÉ, G. S.; CARVALHO, C. A. L. Correlation between production and biometric parameters in colonies of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Scientific Electronic Archives**, v. 12, p. 91 - 97, 2019.
- ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; FAQUINELO, P.; LEDO, C. A. D.; FIGUEREDO, L. Parâmetros biométricos e produtivos de colônias de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) em diferentes gerações. **SINSECTA**, v. 24, p. 105 - 111, 2012.
- BARROS J.R.S. Genetic breeding on the bee *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponinae). **Acta Amazonica**, p. 115-120, 2006.
- BEZERRA, M.D.B. **Beekeeping, an essential activity to the household economy of the humid tropics**, p. 144-203. In: Moura, E.G. de (Org.) Agro-environments of transition: from the humid tropics and semi-arid. UEMA. 300 pp. 2002.
- CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O; SOUZA, B. de A. **Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos**. Salvador: Ed. SEAGRI, 42 p. 2003.
- COAMEL. **Cooperativa Agroecológica dos Meliponicultores da Baixada Maranhense**, 2010. <http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/qas/uploads/2278/apis_183.pdf>. Acesso em: 10/06/2019.
- CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; HEARD, T.; AGUILAR, I.; VENTURIERI, G. C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P. Global Meliponiculture: Challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, p. 275–292, 2006.
- DE MENEZES PEDRO, S. R. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348–354, 2014.
- FREITAS, B.M., PEREIRA J.O.P. Crop consortium to improve pollination: can West Indian cherry (*Malpighia emarginata*) attract Centris bees to pollinate cashew (*Anacardium occidentale*) (eds.). In: **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. 1 ed. Fortaleza: Imprensa Universitária da UFC, p. 193-201, 2004.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; GONÇALVES, L. S.; DE JONG, D. ; FREITAS, B. M. . **Abelhas e desenvolvimento rural no Brasil**. Mensagem Doce, São Paulo, v. 80, p. 3 - 18, 2005.

MARTINS, A. C. L.; RÊGO, M. C.; CARREIRA, L. M. M.; ALBUQUERQUE, P. M. C. Espectro polínico de mel de tíuba (*Melipona fasciculata* Smith, 1854, Hymenoptera, Apidae). **Acta Amazonica**, v. 41(2), p. 183 – 190, 2011.

RIOS, L. **Geografia do Maranhão**. 4. ed. São Luís: Central dos Livros, 2005.

SANTOS, E. M. D; BEZERRA, J. M. **Análise do peso de colônias de abelhas tíuba (*Melipona compressipes fasciculata* smith, 1854-hymenoptera, apidae) na região da baixada ocidental maranhense**. Monografia (Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, 2008.

SANTOS, O.M. **Avaliação dos usos e ocupação das terras da Bacia Hidrográfica do Rio Pericumã – MA, utilizando como parâmetros os padrões recomendáveis para uma área de proteção ambiental. São Luís, 112f**. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão. 2004.

VENTURIERI, G.C; RAIOL, V.F.O; PEREIRA, C.A.B. Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona fasciculata* (Apidae: Meliponina), entre os agricultores familiares de Bragança-PA, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2003.

USO DE CRIOPROTETORES PARA A PRESERVAÇÃO DE COLEÇÕES MICROBIANAS MANTIDAS PARA PD&I

Eunice Ventura Barbosa

Instituto de Biologia - Universidade Federal Fluminense

Niterói - Rio de Janeiro

Clarissa Varajão Cardoso

Instituto de Biologia - Universidade Federal Fluminense

Niterói – Rio de Janeiro

Helena Magalhães *In memoriam*

Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal Geraldo Manhães Carneiro (CEPGM) - Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro

Niterói - Rio de Janeiro

Evelize Folly das Chagas

Instituto de Biologia - Universidade Federal Fluminense

Niterói - Rio de Janeiro

Helena Carla Castro

Instituto de Biologia - Universidade Federal Fluminense

Niterói - Rio de Janeiro

Maíra Halfen Teixeira Liberal

Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal Geraldo Manhães Carneiro (CEPGM) - Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro

Niterói – Rio de Janeiro

microrganismos por longos períodos é importante para a sua utilização em Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação (PD&I). A correta preservação das cepas é fundamental para evitar contaminações e mutações, podendo levar à perda das características morfológicas, fisiológicas e genéticas. O Laboratório de Biotecnologia do CEPGM da PESAGRO-RIO realiza exames para o diagnóstico, a prevenção e o controle de enfermidades em animais de produção, e mantém a “Coleção de Microrganismos Patogênicos para Animais de Produção”. Até 2010 as cepas eram mantidas à -20°C, sem crioprotetores. Porém em 2011 foi adquirido um ultrafreezer -80°C, e 595 cepas congeladas à -20°C foram reativadas e avaliadas quanto à viabilidade, identidade e pureza. Dessas, apenas 64 (10,76%) estavam viáveis. Desde então segue-se o protocolo de preservação à -80°C, utilizando o *Skim Milk* comercial com adição de 10% (p/v) glicerol, que são autoclavados separadamente a 121°C/15min, e em seguida homogeneizados e acondicionados em criotubos de 3mL, levados ao freezer -20°C por 2 dias, e posteriormente acondicionados no ultrafreezer -80°C. Do total de 632 cepas bacterianas isoladas de 2011 a 2018, 442 cepas (69,93%) estão preservadas à -80°C em *Skim Milk* com glicerol, e 190 (30,07%) à -20°C em BHI com glicerol, para futuras pesquisas. Em 2016 e 2017 foram

RESUMO: O armazenamento de

repicadas 427 cepas isoladas entre 2013 e 2015, que estavam mantidas à -80°C, e 100% apresentaram-se viáveis. Os resultados indicam que o uso de crioprotetores favoreceu a preservação e a estabilidade das cepas, tanto no congelamento à -80°C como à -20°C.

PALAVRAS-CHAVE: Criopreservação; *Skim Milk*; Glicerol.

ABSTRACT: Storage of microorganisms for long periods is important for your use in Research, Development & Innovation. The correct preservation of strains is essential to avoid contamination and mutations, which can lead to the loss of morphological, physiological and genetic characteristics. The Biotechnology Laboratory of the CEPGM of the PESAGRO-RIO performs exams for the diagnosis, prevention and control of diseases in farm animals, and maintains the “Collection of Pathogenic Microorganisms for Farm Animals”. Up to 2010 strains were maintained at -20°C, without cryoprotectants. However, in 2011, a -80°C freezer was purchased, and 595 strains frozen at -20 °C were reactivated and evaluated for viability, identity and purity. Of these, only 64 (10.76%) were viable. Since then we follow the preservation protocol at -80°C, using the Skim Milk commercial added with 10% (w/v) glycerol, which are autoclaved separately at 121°C/15min, and then homogenized and packed in 3mL cryotubes, taken to the -20°C freezer for 2 days, and subsequently packed in -80°C freezer. Of the total of 632 bacterial strains isolated from 2011 to 2018, 442 strains (69.93%) are preserved at -80°C in Skim Milk with glycerol, and 190 (30.07%) in BHI with glycerol, at -20°C in BHI with glycerol for future researches. In 2016 and 2017 we worked with 427 strains isolated between 2013 and 2015, which were kept at -80°C, and 100% were viable. The results indicate that the use of cryoprotectants favored the preservation and stability of strains in both freezing at -80°C and at -20°C.

KEYWORDS: cryopreservation; Skim Milk; Glycerol

1 | INTRODUÇÃO

Atividades de diagnóstico e de pesquisa epidemiológica de Recursos Genéticos Microbianos de origem animal estão diretamente relacionadas com Defesa Sanitária Animal, Medicina Veterinária Preventiva, Saúde Pública e Segurança dos Alimentos, uma vez que Saúde Animal envolve questões relacionadas às enfermidades dos animais, às doenças zoonóticas, e ao controle dos riscos em toda a cadeia alimentar, visando assegurar ao consumidor a oferta de alimentos seguros e, ao animal, o seu bem-estar (LIBERAL *et al*, 2013).

Paralelamente, os microrganismos representam uma importante fonte de recursos genéticos para avanços e estudos biotecnológicos, assim como para o desenvolvimento de novos fármacos, aplicações na saúde, agricultura, indústria e meio ambiente (OLIVEIRA *et al*, 2006).

Ao longo dos anos, pesquisadores vêm destacando a importância do

conhecimento da biodiversidade microbiana para o desenvolvimento humano e animal. Nesta temática, o aprimoramento de técnicas destinadas à conservação de espécimes microbiológicas é de grande valia para a conservação e manutenção das mesmas. Muitas instituições investem na elaboração de estoques (biobancos) de cepas através de inúmeras técnicas de preservação, como por exemplo a liofilização (Figura 1) e a criopreservação (FIGUEIREDO, 2001; HOLLAND *et al*, 2003; PAOLI, 2005).



Figura 1. Equipamento de liofilização.

KEITH (1913), foi responsável por um dos primeiros relatos sobre a criopreservação de microrganismos utilizando diversos agentes como possíveis crioprotetores (Quadro 1), em temperaturas abaixo de 0°C, por um período entre 4 a 8 meses. Com o resultado de seus experimentos, o cientista chegou às seguintes conclusões:

- Existe uma relação direta entre a temperatura e o tempo de preservação;
- As baixas temperaturas não destroem as bactérias: ao contrário, por diminuir o metabolismo bacteriano elas favorecem a sua preservação durante mais tempo;
- Peptonas adicionadas aos meios de preservação ajudam na manutenção e na viabilidade da amostra.

Crioprotetores	Temperatura	Resultado
Suspensão Aquosa	-20°C	1% se manteve viável após 5 dias e inviável após algumas semanas.
Leite puro e diluído	-20°C	Quanto menos diluído o leite maior a taxa de recuperação.
Glicerina (5 a 42%) em água	-20°C	A maioria permaneceu viável por até 6 meses.

Solução de Açúcar de Cana 10% sobre crescimento em ágar após 24 horas	-10°C	A maioria permaneceu viável por até 8 meses.
---	-------	--

Quadro 1. Exemplos de crioprotetores e sua viabilidade (Fonte: KEITH, 1913).

Segundo COSTA (2010), ainda não existe um método de conservação padrão, e que determine a eficiência da estocagem dos microrganismos a longo prazo. A preservação deve ser capaz de garantir a viabilidade, a isenção de contaminações e a estabilidade genética das células microbianas (QUINN *et al*, 2005). Sendo assim, a escolha do procedimento mais adequado para a conservação das cepas vai depender das características do espécime em estudo, e das vantagens e desvantagens das técnicas disponíveis (COSTA, 2010).

São imprescindíveis a manutenção e o armazenamento de forma cuidadosa, utilizando-se técnicas e protocolos já validados previamente. Portanto, a maior preocupação quanto aos métodos de preservação, como a criopreservação, reside nos efeitos sobre a estabilidade dos espécimes (HOLLAND *et al*, 2003). A criopreservação é caracterizada pelo emprego de metodologias que possibilitam a manutenção de uma variedade de organismos e/ou tipos celulares em condições de baixas temperaturas (COSTA, 2010).

Tecnologias à base de refrigeração promovem um significativo retardo nas taxas de deterioração de bens perecíveis. A utilização de baixas temperaturas, como ocorre por exemplo na criopreservação, favorecem a estocagem de organismos vivos por longos períodos. A criopreservação destaca-se como uma das técnicas mais empregadas na conservação da biodiversidade microbiana (DAY & MCLELLAN, 1995; MYAMOTO-SHINOHARA *et al*, 2000; PAOLI, 2005).

Avanços em pesquisas científicas desenvolveram métodos que possibilitaram que diferentes tipos celulares se mantivessem viáveis em baixas temperaturas. Técnicas de criopreservação são empregadas para a preservação de microrganismos, células teciduais, pequenos organismos multicelulares e organismos mais complexos, como embriões (SIMIONE, 1998).

Alguns projetos de pesquisa objetivam melhorar a manutenção do padrão morfológico, genético, bioquímico ou fisiológico, impedindo alterações nos componentes da parede celular e perda de virulência; sendo que, grande parte dos bancos de coleções usam pelo menos duas metodologias de estocagem, visando garantir a manutenção e viabilidade das cepas (SILVA *et al*, 1994; BRILHANTE *et al*, 2004; GIRÃO *et al*, 2004).

Em todos os continentes as Instituições de Ensino e Pesquisa procuram manter as suas Coleções de Culturas Microbianas, uma vez que elas desempenham um papel relevante na conservação *ex situ* de microrganismos nativos, na distribuição e identificação de Recursos Genéticos Microbianos, bem como na organização e disponibilização de informações associadas aos seus acervos. O armazenamento de microrganismos por longos períodos é extremamente importante para a sua utilização

em Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação (PD&I). A correta preservação das cepas é fundamental para evitar contaminações e mutações, podendo levar à perda das características morfológicas, fisiológicas e genéticas (LIBERAL *et al*, 2013).

O Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal Geraldo Manhães Carneiro (CEPGM), da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO) mantém, há mais de quatro décadas, o “Banco de Germoplasma de Microrganismos de Interesse em Medicina Veterinária e Saúde Pública”. Nele estão preservadas cepas de bactérias isoladas de animais pesquisados em Projetos de Pesquisa específicos, e, também, cepas oriundas de animais atendidos na prestação de serviços de diagnóstico. Dispõe-se, ainda, de cepas recebidas de Instituições de Ensino e Pesquisa Nacionais e Estrangeiras, bem como amostras de Coleções de Culturas de Referência Nacionais e Internacionais, de Coleções Biológicas Científicas e de Coleções de Serviço nacionais.

Em 1992, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) fez um levantamento sobre as Coleções de Cultura de Microrganismos relacionados à Agropecuária, e publicou o “Catálogo de Bancos Ativos de Germoplasma de Microrganismos”, onde foram listadas as Coleções de Micro-organismos mantidas por diferentes Instituições Nacionais (LIBERAL *et al*, 2013). Nesse Catálogo foi incluído o “Banco de Germoplasma de Microrganismos” do CEPGM da PESAGRO-RIO, que vem sendo preservado e ampliado, desde então.

A Área de Biotecnologia do CEPGM da PESAGRO-RIO coordena projetos de PD&I que visam ao diagnóstico, à prevenção e ao controle de enfermidades que acometem os animais de produção. No laboratório, o patógeno é isolado, identificado e mantido na “Coleção de Microrganismos Patogênicos para Animais de Produção” (CMPAP), que integra a Vertente Microbiana de Recursos Genéticos, da Embrapa. A CMPAP foi implantada em 1976 e, atualmente, preserva cerca de 700 cepas bacterianas importantes em Sanidade Animal e Saúde Pública. Esse material genético preservado é essencial para pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica no Agronegócio, destacando-se como um valioso “bem intangível”, que pode ser utilizado, inclusive, para a preparação de um Plano Nacional de Biossegurança na Pecuária Brasileira, no caso de ameaça de uma guerra biológica.

Ressalta-se, ainda, que na busca por inovação, os recursos genéticos microbianos se destacam como uma oportunidade para o desenvolvimento de produtos e/ou processos ligados à biotecnologia, gerando perspectivas ambientais e serviços ecológicos sustentáveis com foco no agronegócio.

A bioprospecção - atividade de pesquisa que visa identificar componentes do patrimônio genético e/ ou informação sobre conhecimento tradicional associado com o potencial de uso comercial - é um dos principais caminhos para o desenvolvimento sustentável da pecuária nacional, promovendo-se o aumento da produtividade das cadeias produtivas animais, e, ainda, a disponibilização de inovações tecnológicas aplicáveis em várias regiões do País (LIBERAL *et al*, 2013).

2 | METODOLOGIA

Atividades de diagnóstico e de pesquisa epidemiológica de Recursos Genéticos Microbianos de origem animal desenvolvidas pela Equipe Técnica do CEPGM da PESAGRO-RIO levaram à criação da “Coleção de Microrganismos Patogênicos para Animais de Produção” (CMPAP). A CMPAP está vinculada ao Projeto componente “Coleções Institucionais de Microrganismos”, da “Vertente Microbiana de Recursos Genéticos”, do Portfólio “Gestão Estratégica de Recursos Genéticos para Alimentação, Agricultura e Bioindústria” da Embrapa (REGEN), compondo o Macroprograma 1: “Grandes Desafios Nacionais”. Os projetos associados contam com a parceria de Unidades da Embrapa (Recursos Genéticos e Biotecnologia, Gado de Leite, e Agroindústria de Alimentos), e Instituições de P&D, tais como: FIOCRUZ, UERJ, UFRJ, UFF, UNB, UENF, e UFRGS, dentre outras.

Origem das Amostras

As cepas bacterianas mantidas na CMPAP são oriundas de isolamentos de materiais biológicos coletados de animais vivos ou que tenham vindo à óbito. Estas amostras são provenientes de Projetos de Pesquisa, prestação de serviços de diagnóstico e de cepas de referência com relevância para a Defesa Sanitária Animal e Saúde Pública.

Isolamento e Identificação Microbiana

Após a coleta e o isolamento, os microrganismos de interesse são selecionados em meios nutrientes e seletivos para posterior caracterização fenotípica e genotípica.

São utilizados métodos da Bacteriologia Clássica (Figura 2) e da Microbiologia Molecular (Figura 3) como forma de identificação das cepas, e quando demandado, genes de virulência e de resistência são pesquisados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

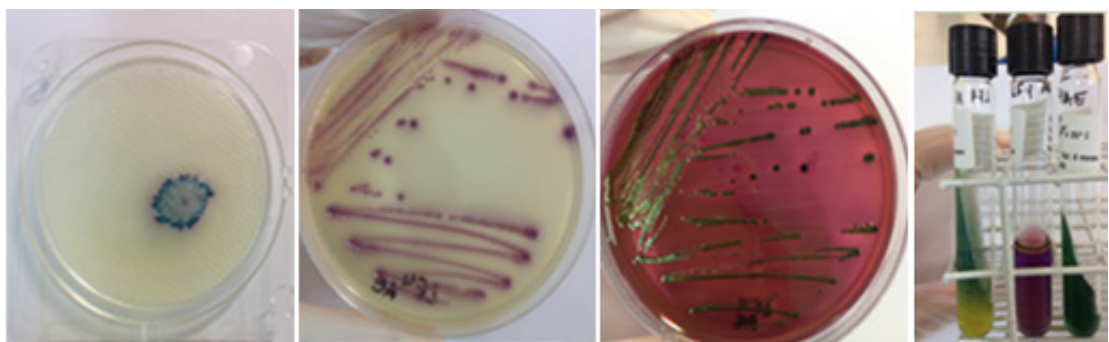


Figura 2. Confirmação da viabilidade, identidade, e pureza das cepas bacterianas por meio de testes bioquímicos.

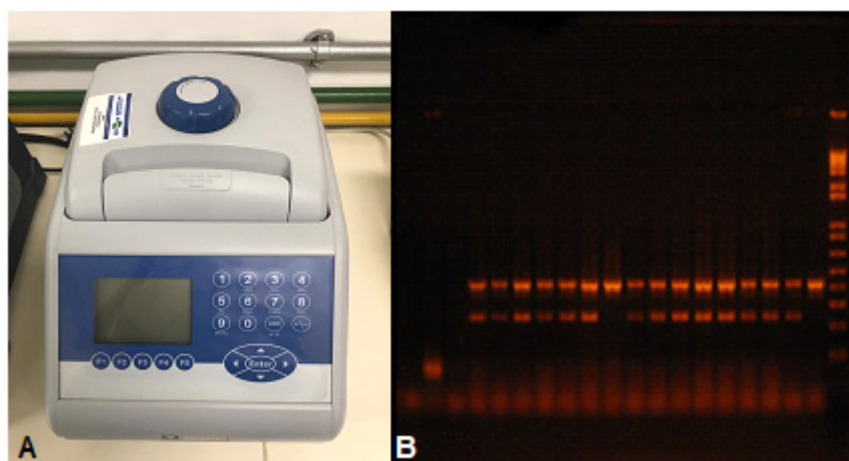


Figura 3. Equipamentos de Biologia Molecular. A. Termociclador para realização do ensaio da PCR. B. Visualização do resultado no gel de eletroforese.

Após a avaliação da espécie microbiana, estas são analisadas e verificadas quanto à melhor forma de conservação: qual o tipo de crioprotetor e a faixa de criogenia a ser escolhida.

Manutenção das Cepas

Para a manutenção das cepas, as amostras são semeadas em Tríplice Soja Ágar (TSA) a 37°C durante 24 horas, fazendo-se um inóculo bem denso. Decorrido o tempo de incubação, o inóculo crescido é transferido para o crioprotetor escolhido, em criotubos graduados de 3 mL e homogeneizados no vórtex (Figura 4).

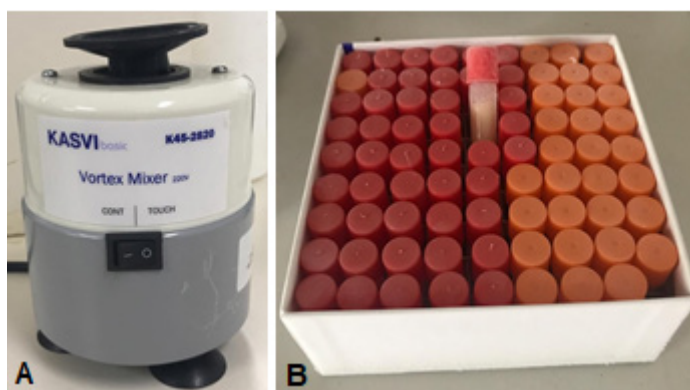


Figura 4. Conservação das amostras em criotubos. A. Equipamento vórtex utilizado para incorporação das amostras no meio de criopreservação. B. Estoque das amostras em criotubos com identificação, em caixas apropriadas para conservação em baixas temperaturas.

Em seguida, esses criotubos são mantidos em freezer (-20°C) por 2 dias, e posteriormente armazenados em ultra freezer (-80°C), conforme Figura 5. Os crioprotetores usados no Laboratório de Biotecnologia do CEPGM são: o *Skim Milk* com glicerol (10%) e Caldo Infusão Cérebro-Coração (BHI) com glicerol (15%).



Figura 5. Equipamento ultra freezer -80°C do CEPGM da PESAGRO-RIO.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A periodicidade da reativação das cepas da CMPAP depende da demanda dos pesquisadores, da mão de obra laboratorial disponível e da aquisição do material de consumo necessário para os repiques.

Até 2010, as cepas eram mantidas à -20°C, sem crioprotetores. Porém, em 2011, após a aquisição do ultra freezer -80°C, 595 cepas que estavam congeladas à -20°C foram reativadas, e avaliadas quanto à viabilidade, identidade e pureza. Dessas, apenas 64 (10,76%) estavam viáveis.

Desde então, segue-se o protocolo de criopreservação à -80°C, utilizando o *Skim Milk* com adição de 10% (p/v) de glicerol. Esse meio pode ser adquirido comercialmente, ou preparado com leite em pó desnatado. Para o meio comercial a autoclavação recomendada pelo fabricante é de 121°C durante 15 minutos. Já para o preparo com o leite em pó desnatado é de 115°C durante 8 minutos.

Do total de 632 cepas bacterianas isoladas de 2011 a 2018, 442 cepas (69,93%) estão preservadas à -80°C em *Skim Milk* com glicerol, e 190 (30,07%) à -20°C em BHI com glicerol, para futuras pesquisas.

Entre 2016 e 2017 foram reativadas 427 cepas que haviam sido isoladas nos anos de 2013 a 2015, e que estavam mantidas à -80°C. Destas, 100% apresentaram-se viáveis.

Os principais gêneros de microrganismos patogênicos provenientes de animais de produção, e as cepas de referência que compõem a CMPAP, estão preservados nas Subcoleções: Bactérias Gram-negativas; Bactérias Gram-positivas e Fastidiosas (Tabela 1). As cepas servem para utilização em projetos de PD&I, teses e monografias, estudos epidemiológicos, pesquisa de genes de virulência, determinação de resistência à antimicrobianos, estudos moleculares, protocolos para bioprospecção, e estudos das ciências ômicas, e, ainda, para o diagnóstico diferencial de doenças emergentes

e zoonoses.

Caracterização das cepas	Subcoleção		
	Gram-negativas	Gram-positivas	Fastidiosas
Cepas de pesquisa e diagnóstico	94	291	42
Cepas de referência	8	7	0
Total	102	298	42
Total Geral	442		

Tabela 1. Relação de cepas bacterianas provenientes de projetos de pesquisa, diagnóstico e referência.

Os resultados obtidos indicaram que o uso de crioprotetores adequados favoreceram a preservação e a estabilidade das cepas, tanto no congelamento à -20°C (Tabela 2) como à -80°C (Tabela 3).

Subcoleção	Grupos			Total
	I	II	III	
Gram-Negativas	Entéricas: <i>E. coli</i> = 57 <i>Salmonella</i> spp. = 2	<i>Vibrionaceae</i> e <i>Aeromonadaceae</i> = 0	Não Entéricas = 37	96
Gram-Positivas	<i>Streptococcaceae</i> = 7	<i>Staphylococcaceae</i> = 50	Bastonetes = 16	73
Fastidiosas	Anaeróbios: <i>Clostridium chauvoei</i> = 2 <i>Clostridium septicum</i> = 1 <i>Clostridium</i> sp. = 4	Outros: <i>Archanobacterium pyogenes</i> = 14		21
Total				190

Tabela 2. Relação do número de cepas bacterianas mantidas à -20°C em BHI com glicerol e/ou *Skim Milk* com glicerol.

Gram-negativas	Subcoleção				
	Gram-negativas	Gram-positivas	Fastidiosas		
<i>Salmonella</i> sp.	1	<i>Streptococcus</i> sp.	20	<i>Haemophilus somnus</i>	6
<i>Escherichia coli</i>	47	<i>S. aureus</i>	147	<i>Archanobacterium pyogenes</i>	36

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	<i>Staphylococcus</i> sp.	57
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	<i>Enterococcus faecalis</i>	1
<i>Pasteurella multocida</i>	20	<i>Enterococcus</i> sp.	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	<i>S. epidermidis</i>	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	<i>Corynebacterium</i> sp.	10
<i>Serratia marcescens</i>	5	<i>Rhodococcus equi</i>	47
<i>Serratia liquefaciens</i>	5		
<i>Citrobacter freundii</i>	3		
<i>Serratia</i> sp.	1		
<i>Klebsiella</i> sp.	1		
Total = 94		Total = 291	
Total Geral = 427			
		Total = 42	

Tabela 3. Relação do número de cepas bacterianas mantidas à -80°C.

De acordo com a literatura, a utilização de aditivos crioprotetores tem como objetivo contornar problemas relacionados com a instabilidade dos microrganismos frente aos processos de preservação (WESSMAN *et al*, 2011),

O glicerol é quimicamente compatível com as estruturas celulares, permitindo a manutenção e a recuperação dessas estruturas após o descongelamento (ABREU & TUTUNJI, 2003), e vem se destacando como o aditivo crioprotetor mais utilizado em microbiologia (HUBÁLEK, 2003).

Essa característica vem sendo comprovada nas nossas pesquisas, onde após 4 anos de congelamento utilizando-se o glicerol, as amostras criopreservadas se mantiveram viáveis. Resultado que está de acordo com o trabalho publicado por SAEKI e colaboradores (2015), onde após 1 ano e 3 meses de congelamento, as amostras também se mantiveram viáveis.

Em trabalho realizado por MEDEIROS e colaboradores (2009), foi avaliado a conservação das amostras bacterianas em *Skim Milk* e TSB (Tríplice Soja Broth) com glicerol 20%, e após 1 ano as amostras foram ativadas e se apresentaram viáveis, com exceção das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, mantidas no TSB com glicerol 20%.

OPLUSTIL e colaboradores (2010), destacaram que, para a uma melhor manutenção das amostras, as bactérias Gram-positivas devem ser armazenadas em glicerol ou no leite desnatado durante 1 a 3 anos, e as Gram-negativas devem ser conservadas em sacarose e lactose por 1 a 2 anos, ambas em temperaturas entre -20°C e -80°C.

4 | CONCLUSÃO

As coleções de cultura são essenciais para a preservação das espécies microbiológicas, e para garantir que as pesquisas não sejam prejudicadas com o

passar do tempo. É necessária uma maior visibilidade dos bancos de germoplasma, com o intuito de suprir a demanda de material biológico para profissionais, empresas e universidades.

A literatura relata que a utilização de variadas técnicas de preservação, podem não ser plenamente eficazes e dependem muitas vezes da espécie a ser preservada. Por vezes, é necessária a utilização de técnicas associadas para uma melhor recuperação da cepa, garantindo-se a sua futura utilização.

No campo da criopreservação muitos estudos ainda são necessários para um melhor entendimento em relação ao processo, aos crioprotetores mais adequados, à temperatura e ao tempo ideal de armazenamento. Todos esses parâmetros influenciam na qualidade da amostra a ser estocada e por isso destacamos a necessidade de investimentos em estudos específicos, para cada Família e Gênero bacteriano, de importância para aplicação em PD&I.

AGRADECIMENTO

FAPERJ, PESAGRO-RIO, UFF e CAPES.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. M. V. & TUTUNJI, V. L. **Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB**. Universitas Ciênc. Saúde. 2003; 2 (2):236-251.

BRILHANTE, R. S. N.; CAVALCANTE, C. S. P.; SOARES-JUNIOR, F. A.; MONTEIRO, A. J.; BRITO, E. H. S.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Evaluation of Microsporum canis in different methods of storage**. Medical Mycology. 2004; 42:499-504.

COSTA, E. C. **Conservação de amostras do vírus da Raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará. 2010; 115p.

DAY, J. G. & MCLELLAN, M. R. **Cryopreservacion and Freezing-Drying Protocols**. New Jersey: Humana Press. 1995.

FIGUEIREDO, M. B. **Métodos de preservação de fungos patogênicos**. Biológico. 2001; 63 (1/2):73-82.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Viabilidade de cepas de Malassezia pachydermatis mantidas em diferentes métodos de conservação**. Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37 (3):229- 233.

HOLLAND, N. T.; SMITH, M. T.; ESKENAZI, B.; BASTAKI, M. **Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies**. Mutat Res. 2003; 543:217-234.

HUBÁLEK, Z. **Protectants used in the cryopreservation of microorganisms**. Cryobiol. 2003; 46(3):205-29.

KEITH, S. C. **Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water.** Science 1913; 37(962): 877–879. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/37/962/877/tab-article-info>. Acesso em: 05 de junho de 2019.

LIBERAL, M. H. T.; SOUZA, R. de M.; MAGALHÃES, H. Aplicação da legislação brasileira de acesso e repartição de benefícios para o diagnóstico e a pesquisa epidemiológica de recursos genéticos microbianos de origem animal. *In*: FERREIRA, S. N.; SAMPAIO, M. J. A. M. (Org.). **Biodiversidade e conhecimentos tradicionais associados: implementação da legislação de acesso e repartição de benefícios no Brasil.** 2013. SBPC São Paulo, 153-168.

MEDEIROS, A. W.; BECKER, A. P.; PICOLI, S. **Acompanhamento de Métodos de Congelamento de Bactérias.** 2009. NewsLab - edição 95.

MYAMOTO-SHINOHARA, Y.; IMAIZUMI, T.; SUKENOBE, J.; MURAKAMI, Y.; KAWAMURA, S.; KOMATSU, Y. **Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage.** Cryobiol. 2000; 41:251-255.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Divisão de Recursos Microbianos. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).** Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2006; p.1-19.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica.** 2004; 2.ed. São Paulo, SP: Sarvier, 340 p.

PAOLI, P. **Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research.** FEMS Microbiol Rev. 2005; 29:897-910.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia e Doenças Infecciosas,** Porto Alegre, Artmed. 2005; 512p.

SAEKI E. K.; FARHAT L. P.; PONTES, E. A. **Eficiência dos crioprotetores glicerol e leite desnatado para o congelamento de micro-organismos.** Acta Veterinaria Brasilica. 2015; v.9, n.2, p. 195-198.

SILVA, A. M. M.; BORBA, C. M.; OLIVEIRA, P. C. **Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time.** Mycoses. 1994; 37:165-169.

SIMIONE, F. P. **Cryopreservation Manual.** Nalge International Coop, 1998. Disponível em: <http://www.nalgenelabware.com/techdata/technical/cryo.pdf> Acesso em 05 de junho de 2019.

WESSMAN P.; MAHLIN, D.; AKHTAR, S.; RUBINO, S.; LEIFER, K.; KESSLER, V.; HAKANSSON, S. **Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria.** J Sci Food Agric. 2011; 91(14):2518-28.

SOBRE O ORGANIZADOR

BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia (Universidade Candido Mendes - RJ). Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática (2014). O segundo Pós doutoramento foi realizado pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com o projeto Análise Global da Genômica Funcional do Fungo *Trichoderma Harzianum* e período de aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany. Seu terceiro Pós-Doutorado foi concluído em 2018 na linha de bioinformática aplicada à descoberta de novos agentes antifúngicos para fungos patogênicos de interesse médico.

Palestrante internacional com experiência nas áreas de Genética e Biologia Molecular aplicada à Microbiologia, atuando principalmente com os seguintes temas: Micologia Médica, Biotecnologia, Bioinformática Estrutural e Funcional, Proteômica, Bioquímica, interação Patógeno-Hospedeiro.

Sócio fundador da Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente, desde 2016, no centro-oeste do país.

Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Atuou como Professor Doutor de Tutoria e Habilidades Profissionais da Faculdade de Medicina Alfredo Nasser (FAMED-UNIFAN); Microbiologia, Biotecnologia, Fisiologia Humana, Biologia Celular, Biologia Molecular, Micologia e Bacteriologia nos cursos de Biomedicina, Fisioterapia e Enfermagem na Sociedade Goiana de Educação e Cultura (Faculdade Padrão). Professor substituto de Microbiologia/Micologia junto ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e Coordenador do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Atualmente o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais. Contato: dr.neto@ufg.br ou neto@doctor.com

ÍNDICE REMISSIVO

A

Abelha sem ferrão 58
Amarílis 11, 13, 15, 16

B

Bulbos 11, 13, 14, 15, 16

C

Cerrado 17, 26, 27, 28, 34, 35, 37, 38, 39, 45, 58, 59
Criopreservação 68, 69, 70, 73, 74, 77

D

Descritores 3, 11, 15, 33
Diversidade Genética 1, 2, 6, 9, 16, 26, 28, 29, 34, 36, 38, 40, 41, 43, 44, 46, 48, 51, 53, 55, 57

F

Fruteiras Nativas 26, 35

G

Gabirobeira 26, 27
Gargalo 36, 40, 42, 43
Glicerol 21, 67, 68, 73, 74, 75, 76, 78

I

Inovação 18, 67, 71

M

Manihot Esculenta 1, 4
Migração 18, 23, 58, 62, 63, 64

P

Populações 12, 14, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 57, 59
Produtividade 2, 5, 26, 27, 29, 32, 33, 48, 58, 60, 63, 71
Proteômica 18, 79
Protocolo 18, 21, 22, 36, 39, 67, 74

R

Reserva 36, 38, 41, 42, 43

S

Seleção 5, 7, 9, 28, 32, 33, 44, 46, 49, 52, 53, 54, 55

Skim Milk 67, 68, 73, 74, 75, 76

V

Variabilidade 1, 4, 5, 7, 9, 12, 26, 29, 30, 32, 33, 35, 38, 47, 48, 51, 52, 55, 56

Variedade Genética 46

Variedades Tradicionais 5, 7

Vigna Unguiculata 5, 6, 10

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-628-7

