

Avanços Tecnológicos Aplicados à Pesquisa na Produção Vegetal



EDITORES

Prof^ª. Dr^ª. Liliane Evangelista Visotto

Prof. Dr. Flávio Lemes Fernandes

Prof. Dr. Alberto Carvalho Filho

Prof. Dr. Everaldo Antônio Lopes

Prof. Dr. Leonardo Angelo de Aquino

Prof^ª. Dr^ª. Maria Elisa de Sena Fernandes

Prof. Dr. Pedro Ivo Vieira Good God

Prof. Dr. Renato Adriane Alves Ruas

José Márcio de Sousa Júnior



Avanços Tecnológicos Aplicados à Pesquisa na Produção Vegetal

© 2015 by Direitos de edição reservado aos editores

Capa: Antônio Sérgio de Souza

Diagramação: Hélder Alves dos Reis

ISBN: 978.85.8179.099-2

Não é permitida a reprodução total ou parcial deste livro sem a autorização expressa dos editores.

Os capítulos apresentados nessa edição são de inteira responsabilidade dos respectivos autores. As informações e opiniões aqui contidas não implicam na sua recomendação por parte dos editores.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFV, à Direção Geral e de Pesquisa do Campus de Rio Paranaíba, ao Instituto de Ciências Agrárias e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal pelo apoio institucional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG e à Fundação Arthur Bernardes – FUNARBE, pelo apoio financeiro.

Aos autores, que disponibilizaram seu tempo e empenharam-se para que a conclusão de cada capítulo fosse ao montante se transformar em um livro.

Os Editores

APRESENTAÇÃO

O Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal da Universidade Federal de Viçosa/ *Campus* Rio Paranaíba tem se dedicado a estudos em três linhas de pesquisas. Estas linhas englobam as áreas de fitossanidade, produção vegetal, máquinas/ irrigação e de tecnologia de alimentos. Os docentes do programa possuem aptidão para as pesquisas das ciências básicas e aplicadas. Características estas que tornam o corpo docente um instrumento de contribuição ao conhecimento inicial e a aplicação no agronegócio. Além disso, a UFV/ CRP situa-se em uma região privilegiada, no que se refere as diversas atividades do setor agrícola, com clima e solo adequados ao desenvolvimento de várias culturas. Com o objetivo de expandir as pesquisas científicas desenvolvidas nesse *Campus* é que surgiu a ideia de confeccionar um livro para ser utilizado como fonte de conhecimento e como um material compilado sobre os assuntos abordadas no II Simpósio do Mestrado Acadêmico Agronomia - Produção Vegetal. Este evento tem estimulado estudantes, técnicos e professores da região do Alto Paranaíba/ MG. O livro foi dividido em capítulos referentes aos resultados de pesquisas do programa e das diversas áreas do saber. Indo do filosófico ao tecnológico, do minucioso ao robusto e dos dados mais clássicos aos obtidos através de tecnologias avançadas. Constituindo assim, uma obra para consulta nas diversas áreas: ciências agrárias, biológicas, humanas e sociais.

Prof^a. Liliane Evangelista Visôto
Coordenadora geral do evento

COMISSÃO ORGANIZADORA

Coordenadora Geral:

Prof^a. Liliane Evangelista Visôto

Comissão de Programação:

Prof. Renato Adriane Alves Ruas

Prof. Everaldo Antônio Lopes

Prof^a. Liliane Evangelista Visôto

Prof. Pedro Ivo Vieira GoodGod

Comissão Científica:

Prof. Flávio Lemes Fernandes

Prof. Renato Adriane Alves Ruas

Comissão de Logística:

Prof. Flávio Lemes Fernandes

Prof^a. Maria Elisa de Sena Fernandes

Prof. Pedro Ivo Vieira GoodGod

Sr^a. Lais Barbosa Vieira

Sr^a. Sinara Guimarães

Comissão de Divulgação e Patrocínio:

Prof. Flávio Lemes Fernandes

Prof. Leonardo Angelo Aquino

Prof^a. Maria Elisa Sena Fernandes

Mestrando José Márcio de Souza Júnior

Graduando em Agronomia Antônio Sérgio Souza

Sr^a. Kerly Cristina de Oliveira

Sr^a. Thamires Souza Martins

INFOALTO

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	3
APRESENTAÇÃO.....	5
Rochagem: aliando a geodiversidade à melhoria da sustentabilidade agrícola.....	9
Resistência de plantas a insetos: contextualização e inserção no MIP.....	31
Déficit Hídrico em Plantas Cultivadas.....	73
Metabolômica na produção vegetal.....	99
Resistência de tomateiros <i>Solanum</i> spp. aos principais insetos pragas.....	121
Podridão-branca do alho e da cebola.....	139
Genômica aplicada à produção vegetal.....	161
Potencial de revestimento de extrato de própolis na conservação de frutas pós-colheita.....	189
Inseticidas botânicos: extração, identificação de metabólitos secundários e aplicação no controle de pragas.....	219
Inovações tecnológicas para o manejo de mosca branca.....	253
Manejo integrado de pragas: aspectos teóricos e práticos.....	273
Avanços da pesquisa para o manejo eficiente de nutrientes em hortaliças.....	295

Avanços Tecnológicos Aplicados à Pesquisa na Produção Vegetal

Mecanismos celulares da resposta da folha de <i>coffea arabica</i> a stress/defesa: análise proteômica do apoplasto.....	321
Inovação aplicada à fertilidade do solo uma experiência de vida.....	337
Melhoramento genético da soja para qualidade do óleo.....	365
Impactos da colheita na lavoura cafeeira.....	391
Inspeção de pulverizadores na região do Alto Paranaíba-MG.....	413
Estrutura e organização de artigo científico.....	435
Ferramentas moleculares utilizadas na identificação de fitopatógenos.....	477
Biorreguladores, bioestimulantes e bioativadores na agricultura tropical.....	505
Publicação científica de qualidade.....	531

Rochagem: aliando a geodiversidade à melhoria da sustentabilidade agrícola

Pedro Henrique de Castro Borges¹,
Waner Gleider Barbosa²,
Laene de Fátima Tavares¹,
André Mundstock Xavier de Carvalho³

INTRODUÇÃO

Adotar práticas mais sustentáveis de produção agrícola está entre os desafios que a humanidade precisa enfrentar neste século visando conciliar melhor a produção com aspectos ambientais, sociais e políticos que conduzam à um estilo de desenvolvimento mais equânime e humano (Veiga, 2006; Schutter, 2011). Os princípios que norteiam a escolha destas práticas incluem a compatibilidade

1. Estudantes de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba. Rodovia MG230, km7, s/n. 38810-000. Rio Paranaíba – MG. E-mails: pedrin_006@hotmail.com, laenetavares@gmail.com.
2. Estudante de graduação em agronomia da Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba. Rodovia MG230, km7, s/n. 38810-000. Rio Paranaíba – MG. E-mail: waner.barbosa@ufv.br
3. Professor Adjunto da Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba. Rodovia MG230, km7, s/n. 38810-000. Rio Paranaíba – MG. E-mail: andre.carvalho@ufv.br.

com arranjos produtivos locais, a acessibilidade e compatibilidade com aspectos socioculturais dos agricultores, a responsabilidade na utilização de recursos naturais não-renováveis, a valoração dos serviços culturais e ambientais, entre outros (Tschardt et al., 2012).

Nesta perspectiva e incentivados por novos valores dos consumidores urbanos, agricultores de diversas partes do mundo vem buscando outros indicadores de eficiência produtiva, que não apenas a produtividade, baseados na necessidade de redução dos riscos e da dependência tecnológica para obtenção de insumos (Silva et al., 2015). Neste contexto, a prática da rochagem tem sido recentemente valorizada no Brasil, tanto por agricultores quanto por setores do governo, com incentivos à pesquisa e com a regularização do seu uso pela lei dos remineralizadores Nº 12.890 de 10/12/2013.

As rochas silicatadas apresentam potencial de uso agrícola como alternativa aos fertilizantes convencionais. Estas rochas são fontes multinutrientes de liberação lenta, e pela prática da rochagem é possível utilizá-las na promoção de efeitos benéficos sobre características químicas do solo e sobre a disponibilização de nutrientes às plantas. Em sua maioria, estas fontes são derivadas dos subprodutos finos resultantes da moagem de rochas para construção civil (britas e ornamentais) e representam uma oportunidade de redução da dependência externa brasileira por fertilizantes. Rochagem, portanto, é o nome de uma tecnologia que prevê a aplicação direta de pós de rochas, ou de seus subprodutos resultantes da moagem de rochas, como fonte de nutrientes na agricultura. Apesar das rochas calcárias e fosfóricas serem também aplicadas *in natura* na agricultura, o termo rochagem é mais empregado quando se trata da utilização de rochas silicatadas.

POTENCIAIS DA ROCHAGEM

A agricultura brasileira é atualmente fortemente dependente de fertilizantes, insumos que representam a maior parcela do custo de produção. Em 2014, a importação brasileira de fertilizantes atingiu o recorde de 24 milhões de toneladas (ANDA, 2015). Estas importações correspondem a uma dependência externa de cerca de 75 % do N, 50 % do P e 90 % do K utilizados como fertilizantes (Rodrigues et al., 2010). Tal situação representa uma grande vulnerabilidade na agricultura que, associada à dependência crescente por tecnologias como agrotóxicos e transgênicos, aponta problemas de soberania e de segurança alimentar no Brasil. Além dos elevados custos e riscos, os fertilizantes de alta solubilidade estão associados à problemas ambientais como eutrofização de águas e liberação de gases de efeito estufa, além de necessitarem de fontes não renováveis e escassas de energia e de recursos naturais na sua síntese (Foley et al., 2005; Fixen e Johnston, 2012).

Além de serem fontes de nutrientes essenciais, as rochas silicatadas apresentam elementos benéficos ao metabolismo de plantas e elementos tóxicos (Tabela 1). Dentre estes, destaca-se o silício (Si) como constituinte mais abundante nessas rochas. Os benefícios deste elemento estão relacionados à indução de resistência em plantas, ativando genes responsáveis pela síntese de metabólitos secundários, produzidos como mecanismo de defesa. Além disso, o Si aumenta a resistência física de plantas ao ataque de pragas pela deposição de sílica na epiderme das folhas, formando uma camada espessa sobre esta, conferindo-a um aspecto mais coriáceo, o que reduz injúrias causadas por insetos herbívoros (Reynolds et al., 2009). O suprimento com Si também reduz a severidade de doenças em plantas (Santos et al., 2014; Anjos et al., 2014). Rochas silicatadas apresentam ainda teores variáveis de elementos

essenciais e benéficos à nutrição humana e animal, e que não são levados em consideração na adubação por não serem essenciais às plantas, como o Se, Co, V, La, Li, I e outros. Os vegetais demandam apenas 14 elementos essenciais, em contraposição aos humanos, que demandam 22 elementos essenciais e, ou benéficos (Graham et al., 2007; Stein, 2010).

Além disso, o Si liberado no solo por rochas silicatadas pode competir pelos sítios de adsorção de fosfato e aumentar a disponibilidade de fósforo no solo, como já demonstrado por Tokura et al. (2011), Castro & Crusciol (2013) e Carvalho (2014). Por fim, vários trabalhos têm demonstrado também que a utilização de rochas silicatadas na agricultura contribui para a correção da acidez do solo (Bader et al., 2006; Bigham et al., 2001; Calvaruso et al., 2006) e para a elevação da CTC do solo (Anda et al., 2013; Shamsuddin e Anda, 2012), embora este último benefício ainda precise ser melhor avaliado. No entanto, as rochas silicatadas, como fontes de nutrientes, apresentam uma dinâmica de ação mais lenta quando comparada a dos fertilizantes e corretivos convencionais. Isso implica, evidentemente, em vantagens e desvantagens em relação às fontes convencionais. As principais desvantagens são a baixa concentração de nutrientes e a menor taxa de liberação de nutrientes no curto prazo. Entre as vantagens estão a adequabilidade às diretrizes dos sistemas de agricultura de baixo carbono, o menor efeito salino, a elevação gradual do pH do solo, a menor lixiviação de elementos, a formação de novos minerais secundários no solo e o suprimento prolongado de nutrientes às plantas (maior efeito residual).

Tabela 1. Teores totais de macro, micro e elementos tóxicos em rochas silicatadas com potencial de uso como fontes de nutrientes na agricultura

Elementos principais	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	K ₂ O	Na ₂ O	P ₂ O ₅	MnO
 % (dag kg ⁻¹)								
Basalto	49,60	13,49	15,77	7,81	5,26	1,42	2,51	0,37	0,19
Tufito	45,80	5,29	19,69	7,04	12,32	3,25	0,16	0,94	0,22
Verdete	67,20	13,47	6,10	0,18	2,72	7,75	0,15	0,09	0,08
Gnaisse	76,60	10,01	1,64	1,27	0,20	5,00	3,42	0,07	0,01
Microgabro	51,10	14,0	13,50	10,8	6,70	0,51	2,10	0,12	0,19
Fonolito	54,00	9,60	3,40	1,50	0,20	8,69	6,74	0,05	0,22
Serpentinito	45,75	7,35	11,03	3,45	22,71	0,67	1,12	0,12	0,15
Granito	65,28	15,71	3,68	1,58	1,00	5,21	2,89	0,43	0,036
Biotita xisto	52,08	17,88	4,96	0,98	9,59	5,78	3,19	0,50	0,02
Ultramáfica Alcalina	35,52	7,83	11,77	12,49	18,92	3,44	1,74	0,69	1,74
Elementos benéficos ^a	Cu	Zn	Mo	Li	Se	Co	V	Ni	La
 mg kg ⁻¹								
Basalto	200	102	<3	11	<20	37	370	55	26
Tufito	153	87	<3	45	<20	49	210	77	245
Verdete	45	132	<3	58	<20	14	461	38	28
Gnaisse	3	43	<3	12	<20	<8	11	<3	40
Microgabro	181	92	-	-	-	-	139	89	22
Fonolito	14	125	65	28	<20	<8	67	<3	108
Serpentinito	10	80	-	-	-	-	-	1360	-
Granito	<10	50	<2	-	-	6	46	<20	114
Biotita xisto	160	30	<2	-	48	25	269	260	299
Ultramáfica Alcalina	84	124	-	-	-	170	175	499	-
Elementos tóxicos ^b	Hg	Cd	Pb	Be	Ag	Cr	As	Ba	Sr
 mg kg ⁻¹								
Basalto	0	<3	<8	3	<3	37	<10	399	454
Tufito	0	<3	<8	12	<3	16	<10	2815	1052
Verdete	0	<3	10	3	<3	54	17	383	26
Gnaisse	0	<3	25	<3	<3	8	<10	594	98
Serpentinito	0	-	-	-	-	4695	-	-	160
Granito	-	-	57	4	3,6	50	<5	1005	228
Biotita xisto	-	-	17	7	0,7	150	6	467	24
Ultramáfica Alcalina	-	-	-	2	-	683	-	2510	1126

*a: elementos nutrientes às plantas ou benéficos à outros organismos. *b: elementos tóxicos ou potencialmente tóxicos. Fonte: adaptado de Borges et al. (2013), Carvalho (2012), Anda (2012), Ferreira (2013), Pal et al. (2011).

Independentemente deste paralelo, dentro de uma perspectiva de crescimento da agricultura orgânica no país, o uso de rochas silicatadas representa uma importante opção às práticas de fertilização permitidas, uma vez que o uso de fertilizantes sintéticos e de maior solubilidade é restrito conforme a Lei dos Orgânicos (Lei 10.831/03). Estes sistemas orgânicos representam uma crescente demanda por novas fontes fertilizantes pois estão em grande expansão, atingindo aumento médio de 45% ao ano e ocupando, em 2013, 43 milhões de hectares em nível mundial (Willer e Lernoud, 2015).

A magnitude dos efeitos associados à aplicação de pós de rochas silicatadas depende de alguns fatores, tais quais: condições químicas do solo, granulometria do pó, composição química e mineralógica da rocha, tamanho e qualidade dos cristais, entre outros. De modo geral, a disponibilização dos elementos ocorre de médio a longo prazo e em função do intemperismo do material, podendo ser acelerada pela remoção dos produtos solúveis das fontes. Tal remoção poderá ser ainda aumentada por fatores biológicos, como exemplo a extração e absorção destes produtos pelos vegetais e pela microbiota do solo (Harley e Gilkes, 2000).

As limitações quanto ao uso de rochas silicatadas na agricultura são, além da menor reatividade, as mesmas relacionadas a outros insumos utilizados em grandes quantidades, como o calcário e o gesso agrícola. Por serem rochas com baixa concentração de nutrientes há uma restrição na viabilidade destas fontes para regiões distantes dos locais de produção. Essa limitação, no entanto, pode ser encarada como um estímulo ao desenvolvimento de arranjos produtivos locais (APLs), descentralizando o mercado de insumos. Cadeias curtas de produção ou APLs são uma tendência mundial, uma vez que são menos dispendiosas em energia e promovem melhor o desenvolvimento regional (Costa, 2010).

Apesar de suas potencialidades, o uso de pós de rochas ainda é pequeno, estando concentrado em alguns poucos materiais geológicos, destacando-se algumas misturas de rochas (como a farinha de rocha MB-4), os pós de basaltos e outras rochas associadas à Formação Serra Geral e o pó de fonolito do maciço de Poços de Caldas. Outros materiais potenciais, como algumas rochas graníticas, gnaisses e serpentinitos ainda possuem uso bastante restrito e seus potenciais ainda carecem de maiores investimentos em pesquisa.

USO DE BASALTOS NA AGRICULTURA

As rochas ígneas extrusivas da Formação Serra Geral são genericamente conhecidas no Brasil como basaltos, embora incluam basalto-latitos, gabros, basalto-andesitos, basaltos amigdaloidais, entre outras. Em geral, são rochas básicas com maiores teores de minerais ferro-magnesianos, cores escuras e de textura afanítica (cristais de minerais não perceptíveis a olho nu). Tais características estão frequentemente associadas à maior reatividade e riqueza em Ca, Mg e micronutrientes destas rochas em relação às ígneas intrusivas ou em relação às metamórficas mais comuns, embora também estejam associadas à menor riqueza em K.

Uma quantidade expressiva de trabalhos na literatura aponta benefícios da utilização de pós de basaltos na agricultura. Nunes et al. (2014), por exemplo, demonstraram incrementos na CTC, disponibilização de macronutrientes (P, K e S) e micronutrientes (Cu, Mn e Zn). Além disso, estes e outros autores observaram neutralização do alumínio trocável, disponibilização de Si e aumento do pH em diferentes tipos de solos. Os efeitos do uso do pó de basalto são diversos, sendo relatados em diversos trabalhos da literatura (Tabela 2). No entanto, alguns trabalhos também demonstraram

nenhum ou reduzido efeito dessa rocha (Kudla et al., 1996; Boniao et al., 2002; Ramezani et al., 2013), o que evidencia a necessidade de compreensão das diversas condições que controlam a magnitude dos efeitos desejáveis.

Em síntese, os benefícios proporcionados pelo pó de basalto estão relacionados à correção da acidez, liberação de Si, elevação da CTC e liberação de cátions básicos no solo (Tabela 2). Grande parte dos trabalhos contidos na literatura é de curta duração, entretanto mostram claramente respostas das plantas ao uso desta fonte como promotora de crescimento e outros benefícios proporcionados ao solo ou ao metabolismo vegetal. Apesar disso, a ampliação na utilização desta fonte de nutrientes ainda é dependente de políticas de incentivo e pesquisas visando compreender melhor as condições que possam favorecer a liberação de nutrientes e os demais efeitos benéficos a fim de gerar recomendações mais precisas para utilização desta fonte.

USO DE FONOLITO NA AGRICULTURA

Fonolitos são rochas vulcânicas que possuem em sua composição mineralógica o predomínio de feldspatos potássicos e feldspatóides. Estes minerais são considerados potenciais fontes alternativas de potássio, tanto para fabricação de fertilizantes de maior solubilidade, quanto para aplicação direta ao solo. Embora sua distribuição e abundância no Brasil seja restrita, ela é especialmente abundante no maciço de Poços de Caldas (MG), onde apresenta teores de K_2O de até 8,5% (Teixeira et al., 2012).

Resultados de pesquisa promissores foram observados em pesquisas realizadas com fonolitos (Tabela 3), embora a escassez de trabalhos ainda dificulte conclusões mais generalizadas sobre esta rocha. Mancuso et al. (2014), por exemplo, verificou que o fonolito elevou a produtividade de café, com incrementos semelhantes aos proporcionados pelo KCl.

Avanços Tecnológicos Aplicados à Pesquisa na Produção Vegetal

Tabela 2. Efeitos da utilização de pós de basaltos sobre solos e plantas em alguns trabalhos da literatura científica

Cultura/Solo	Ambiente	Duração	Principais resultados	Referência
Cacau	Campo	24 meses	Aumento da CTC, redução do Al e aumento no crescimento das plantas.	Anda et al. (2013)
Arroz	Vaso	120 dias	Redução do Al, incremento de Ca trocável, aumentos na massa de grãos e no crescimento das plantas.	Shazana et al. (2014)
Cacau	Campo	27 meses	Aumento do pH, CTC, Ca, Mg, K e P, redução do Al trocável e aumento no crescimento da planta.	Shamshuddin e Anda (2012)
Feijão	Campo	1 safra	Aumento do teor de P e redução nos níveis de fitatos nos grãos.	Silva et al. (2011)
Pessegueiro-bravo	Vaso	145 dias	Elevação do pH, redução do Al e aumento na disponibilização de Ca, Mg, B, Cu e Fe para as plantas.	Knapik e Angelo (2007)
Latossolo Amarelo Distrófico	Vaso	6 meses	Aumento de pH, redução do Al trocável e incremento de Ca, Mg, Zn, Fe e Cu no solo.	Melo et al. (2012)
Gonçalo	Vaso	165 dias	Aumento de pH e incremento de K, Ca e Mg no solo.	Silva et al. (2008)
Latossolo Vermelho	Vaso	90 dias	Incremento de K no solo.	Lopes et al. (2014)
Neossolo Quartzarênico	Vaso	90 dias	Aumento do pH e incremento de Ca, Mg e K no solo.	Lopes et al. (2014)
Eucalipto	Vaso	180 dias	Aumento no crescimento das plantas.	Ehlers e Arruda (2014)
Camu-Camu/ Caçari	Vaso	6 meses	Aumento no crescimento das plantas, com média de 80% de incremento em altura e 9% em diâmetro.	Welter et al. (2011)

Tabela 3. Efeitos da utilização de pós de fonolitos sobre solos e plantas em alguns trabalhos da literatura científica

Cultura/Solo	Ambiente	Duração	Principais resultados	Referências
Soja e trigo	Campo	1 ano	Plantas de sojas adubadas com Fonolito e rochas alcalinas apresentaram sementes com maior massa e menor permeabilidade de membrana comparadas à testemunha com KCl.	Toledo et al. (2011)
Solo sob Pinus	Campo	4 anos	Pó de fonolito foi uma alternativa operacional para a calagem convencional em regiões onde o risco da mobilização de nitrato era alta.	von Wilpert e Lukes (2003)
Café arábica	Campo	2 anos	Aumento na produtividade de café em relação à testemunha e equivalência com o tratamento fertilizado com KCl.	Mancuso et al. (2014)
Braquiária	Casa de vegetação	45 dias	Aumento da matéria seca e melhoria de parâmetros químicos do solo.	Martins et al. (2015)
Meio de cultura	Laboratório	1 mês	<i>Aspergillus niger</i> atuou positivamente na solubilização de elementos contidos no fonolito, sendo observado um aumento significativo na quantidade de K solúvel.	Brandão et al. (2014)
Arroz, feijão, milho e soja	Campo	3 a 4 meses	Produtividade com fonolito foi superior ao controle e igual ao tratamento com KCl	Crusciol e Soratto (2013)
Cana-de-açúcar	Campo	1 ano	Produtividade com fonolito foi maior que o controle absoluto, mas semelhante à testemunha com KCl. No entanto, quando o fonolito foi primeiramente adicionado à torta de filtro (obtendo um fertilizante organomineral) e depois aplicado na cana houve um ganho de 15 % na produtividade em relação ao organomineral enriquecido com KCl.	Luz et al. (2013)
Latossolo Vermelho-Amarelo	Laboratório	6 meses	Elevação expressiva do pH do solo e liberação de Si e P no solo	Carvalho et al. (2015)

Dos trabalhos nacionais com fonolitos, a quase totalidade deles utilizaram fonolitos do maciço de Poços de Caldas (MG). Os resultados de pesquisa com o pó de fonolito do maciço de Poços de Caldas sugerem uma superioridade desta fonte em relação à outras fontes de K silicatadas naturais. Isto pode estar ligado, além dos maiores teores de K se comparados à outras rochas, à particular condição de formação destes fonolitos, que permitiram maior presença de materiais vítreos ou mal cristalizados como apontado por Teixeira et al. (2012).

A maior liberação de Si e o maior poder corretivo de acidez do pó de fonolito em relação às outras rochas silicatadas também evidencia sua maior reatividade (Figuras 1 e 2). As reações de hidrólise dos minerais primários das rochas consomem H^+ do solo, liberando ânions silicatos em diferentes níveis de protonação. A elevação do pH é, portanto, um indicador da reatividade da rocha e é, necessariamente, acompanhada pela liberação dos produtos da reação, que são os cátions básicos e metálicos do mineral, os ânions silicato e os minerais secundários "residuais". No caso do fonolito, aos 180 dias de incubação esta elevação do pH se equiparou aos tratamentos controle com calcário ou escória de siderurgia (Figura 1). No caso do fonolito, a maior parte deste efeito foi observada mesmo após apenas 60 dias de incubação.

Os dados disponíveis até o momento, no entanto, não permitem conhecer a extensão do efeito residual, a susceptibilidade à lixiviação e a percentagem de liberação do K aplicado em diferentes condições de solo e planta de modo a facilitar a definição de doses e de estratégias de adubação com esta fonte. Como outras fontes silicatadas utilizadas in natura, o fonolito também passa por restrições ligadas aos baixos teores, à granulometria em pó e à falta de incentivo aos produtores para utilização de fontes nacionais e potencialmente menos danosas ao meio ambiente.

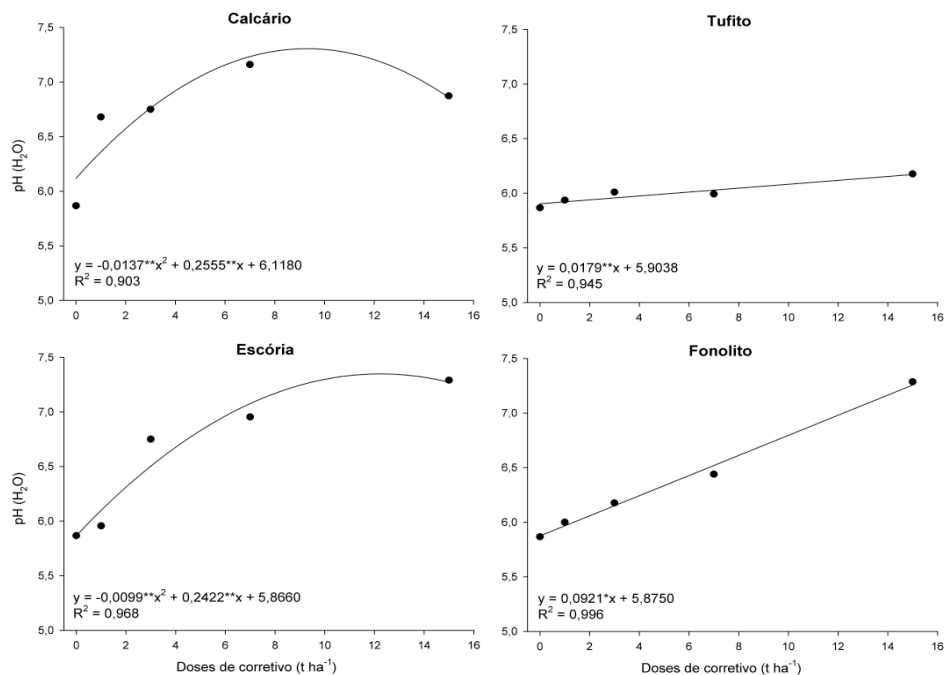


Figura 1. Correção do pH de um Latossolo Vermelho-Amarelo por diferentes pós de rochas silicatadas em comparação com o calcário, nas doses de 0, 1, 3, 7 e 15 t ha⁻¹ após um período de 180 dias de incubação. **, * parâmetros dependentes significativos a 1 e 5% de probabilidade respectivamente, pelo teste F. Fonte: os autores (dados não-publicados).

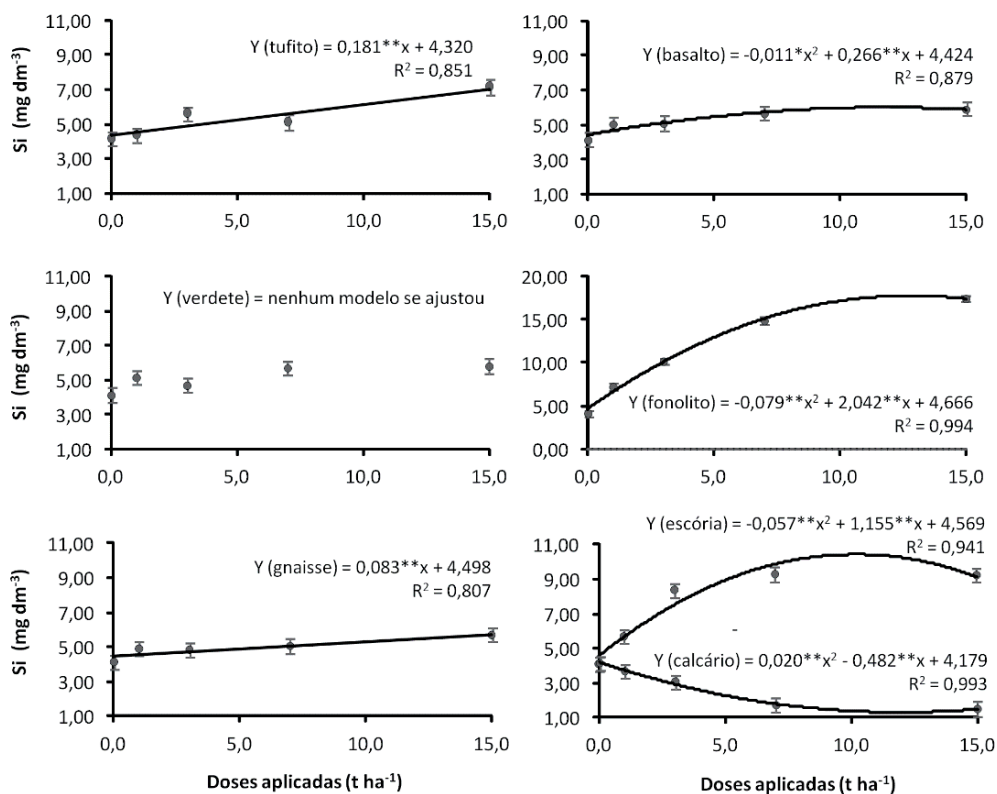


Figura 2. Disponibilização de Si em um Latossolo Vermelho-Amarelo (mg dm^{-3}) por diferentes pós de rochas silicatadas em comparação com o calcário e escória, nas doses de 0, 1, 3, 7 e 15 t ha^{-1} após um período de 180 dias de incubação. **, * parâmetros dependentes significativos a 1 e 5% de probabilidade respectivamente, pelo teste F. Fonte: Carvalho et al. (2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante de um cenário mundial de ampliação das preocupações socioambientais na agricultura, as questões do acesso aos fertilizantes pelos pequenos agricultores e da busca por fontes alternativas às

atuais fontes dispendiosas assumem especial importância. Dessa forma, incentivos à utilização dos pós de rochas poderão ser incluídos nos planos de mitigação e de adaptação às mudanças climáticas num contexto de valoração de tecnologias agrícolas promissoras quando avaliadas sob uma gama mais ampla e complexa de critérios sociais, econômicos e ambientais.

Pós de rochas silicatadas são fontes multinutrientes de liberação lenta recentemente incorporados à legislação brasileira como insumos destinados à agricultura. Entre os remineralizadores destaca-se pela maior utilização o fonolito e o basalto, fontes que apresentam suficiente evidência científica de seu potencial de uso agrícola. A distribuição relativamente restrita dessas rochas, no entanto, demanda maior volume de pesquisas e incentivos governamentais à produção e à utilização de outras fontes potenciais que compõe a grande geodiversidade brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDA, M. Cation imbalance and heavy metal content of seven Indonesian soils as affected by elemental compositions of parent rocks. **Geoderma**, v.189, p.388-396, 2012.

ANDA – Associação Nacional para Difusão de Adubos. Principais indicadores do setor de fertilizantes. Disponível em: <http://www.anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00>. Acessado em 02 de fevereiro de 2015.

ANDA, M.; SHAMSHUDDIN, J.; FAUZIAH, C.I. Increasing negative charge and nutrient contents of a highly weathered soil using basalt and rice husk to promote cocoa growth under field conditions. **Soil and Tillage Research**, v.132, p.1-11, 2013.

ANJOS, T.V.; TEBALDI, N.D.; MOTA, L.C.B.M.; COELHO, L. Fontes de silício no controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas spp.*) do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.40, p.365-367, 2014.

BADER, M.A.; SHAFEI, A.M.; EL-DEEN, S.H.S. The dissolution of K and P-bearing minerals by silicate dissolving bacteria and their effect on sorghum growth. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v.21, p.511-521, 2006.

BIGHAM, J.M.; BHATTI, T.M.; VUORINEN, A.; TUOVINEN, O.H. Dissolution and structural alteration of phlogopite mediated by proton attack and bacterial oxidation of ferrous iron. **Hydrometallurgy**, v.59, p.301-309, 2001.

BONIAO, R.D.; SHAMSHUDDIN, J.; RANST, E.V.; ZAUZYAH, S.; OMAR, S.R.S. Changes in chemical properties and growth of corn in volcanic soils treated with peat, ground basalt pyroclastics, and calcium silicate. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.33, p.1219-1233, 2002.

BORGES, P.H.C.; CASTELARI, L.H.L.; SAMPAIO, C.C.V.; TAVARES, L.F.; BARBOSA, W.G.; PEDRON, L.G.; CARVALHO, A.M.X. Rochas com potencial de uso para rochagem na região do Alto Paranaíba (MG) e entorno. **Cadernos de Agroecologia**, v.8, p.01-06, 2013.

BRANDÃO, J.A.V; LOPES -ASSAD, M.L.R.C; CECCATO-ANTONINI, S.R. Solubilization of diabase and phonolite dust by filamentous fungus. **Revista Ceres**, v.61, p.740-745, 2014.

CALVARUSO, C.; TURPAULT, M.P.; FREY-KLETT, P. Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.1258-1266, 2006.

CARVALHO, A.M.X. Rochagem e suas interações no ambiente solo: contribuições para aplicação em agroecossistemas sob manejo agroecológico. 2012. 116p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

CARVALHO, A.M.X.; BARBOSA, W.G.; CARVALHO, B.G.; CASTELARI, L.H.; CARDOSO, I. Pós de rochas silicatadas promovem a liberação de silício e fósforo no solo. **Cadernos de Agroecologia**, v.10, p.01 – 05, 2015.

CARVALHO, B.G. Interação entre fósforo, silício e enxofre em um latossolo e biodisponibilização de fósforo de fontes de baixa solubilidade por processos de compostagem. 2014. 57p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa – Campus de Rio Paranaíba, Rio Paranaíba, 2014.

CASTRO, G.S.A.; CRUSCIOL, C.A.C. Effects of superficial liming and silicate application on soil fertility and crop yield under rotation. **Geoderma**, v.195-196, p.234-242. 2013.

COSTA, E.J.M. **Arranjos Produtivos Locais, Políticas Públicas e Desenvolvimento Regional**. Brasília: Mais Gráfica Editora, 2010. 210p.

CRUSCIOL, C.A.C.; SORATTO, R.P. Eficiência de rocha fonolito moída como fonte de potássio para as culturas de arroz, feijão, milho e soja. In: Anais do Congresso Brasileiro de Rochagem, II. Poços de Caldas-MG, 12 a 17 de maio de 2013. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013, 399p.

EHLERS, T.; DE ARRUDA, G.O.S.F. Utilização do Pó de Basalto em Substratos para Mudanças de *Eucalyptus grandis*. **Floresta e Ambiente**, v.21, p.37-44, 2014.

FERREIRA, J.A.S. Caracterização do granito do Pedregal. Condicionantes da sua aplicação. Tese de Doutorado. Universidade do Porto, 2013.

FIXEN, P.E.; JOHNSTON, A.M. World fertilizer nutrient reserves: a view to the future. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, p.1001-1005, 2012.

FOLEY, A.F.; DEFRIES, R.; ASNER, G.P. [et al.]. Global Consequences of Land Use. **Science**, v.309, p.570-575, 2005.

GRAHAM, R.D.; WELCH, R.M.; SAUNDERS, D.A.; ORTIZ MONASTERIO, I.; BOUIS, H.E.; BONIERBALE, M.; TWOMLOW, S. Nutritious subsistence food systems. **Advances in Agronomy**, v.92, p.1-74, 2007.

HARLEY, A.D.; GILKES, R.J. Factors influencing the release of plant nutrient elements from silicate rock powders: a geochemical overview. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.56, p.11-36, 2000.

KNAPIK, J.G.; ANGELO, A.C. Pó de basalto e esterco equino na produção de mudas de *Prunus sellowii* Koehne. **Floresta**, v.37, p.427-437, 2007.

KUDLA, A.P.; MOTTA, A.C.V.; KUDLA, M.E. Efeito do uso do pó de basalto aplicado em um Cambissolo Álico sobre o solo e crescimento do trigo. **Agrárias**, v.15, p.187-195, 1996.

LOPES, O.M.M.; CARRILHO, E.N.V.M.; LOPES-ASSAD, M.L.R.C. Effect of rock powder and vinasse on two types of soils. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.38, p.1547-1557, 2014.

LUZ, P.H.C.; PERES, C.E.B.; YASUDA, M.; FERRAZ, M.R.; CASADEI, R.A.; LUNARDI, L. Avaliação do desempenho do fonolito via mineral

e no enriquecimento da torta de filtro em soqueira de cana-de-açúcar. In: Anais do Congresso Brasileiro de Rochagem, II. Poços de Caldas-MG, 12 a 17 de maio de 2013. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013, 399p.

MANCUSO, M.A.C; SORATTO, R.P; CRUSCIOL, C.A.C; CASTRO, G.S.A. Effect of potassium sources and rates on arabica coffee yield, nutrition, and macronutrient export. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.38, p.1448-1456, 2014.

MARTINS, V; SILVA, D.R.G; MARCHI, G; LEITE, M.C.A; MARTINS, E.S; GONÇALVES, A.S.F; GUILHERME, L.R.G. Effect of alternative multinutrient sources on soil chemical properties. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.39, p.194-204, 2015.

MELO, V.F.; UCHÔA, S.C.P.; DIAS, F.O.; BARBOSA, G.F. Doses de basalto moído nas propriedades químicas de um Latossolo Amarelo distrófico da savana de Roraima. **Acta Amazônica**, v.42, p.471-476, 2012.

NUNES, J. M. G.; KAUTZMANN, R. M.; OLIVEIRA, C. Evaluation of the natural fertilizing potential of basalt dust wastes from the mining district of Nova Prata (Brazil). **Journal of Cleaner Production**, v.84, p.649-656, 2014.

PAL, D.C.; CHAUDHURI, T.; MCFARLANE, C.; MUKHERJEE, A.; SARANGI, A.K. Mineral chemistry and in situ dating of allanite, and geochemistry of its host rocks in the Bagjata Uranium Mine, Singhbhum Shear Zone, India—implications for the chemical evolution of REE mineralization and mobilization. **Economic Geology**, v.106, p.1155-1171, 2011.

RAMEZANIAN, A.; DAHLIN, A.S.; CAMPBELL, C.D; HILLIER, S.; MANNERSTEDT-FOGELFORS, B.; OBORN, I. Addition of a volcanic rockdust to soils has no observable effects on plant yield and nutrient status or on soil microbial activity. **Plant and Soil**, v.367, p.419-436, 2013.

REYNOLDS, O.L.; KEEPING, M.G.; MEYER, J.H. Silicon□augmented resistance of plants to herbivorous insects: a review. **Annals of Applied Biology**, v.155, p. 171-186, 2009.

RODRIGUES, A.F.S.; FONSECA, D.S.; HIDER, M. Agrominerais: recursos e reservas. In: FERNANDES, F.R.; LUZ, A.B.; CASTILHOS, Z.C. (Eds). **Agrominerais para o Brasil**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010. 380p.

SANTOS, G.R.; RODRIGUES, A.C.; BONIFACIO, A.; JUNIOR, A.F.C.; TSCHOEKE, P.H. Severidade de antracnose em folhas de sorgo submetido a doses crescentes de silício. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p.403-408, 2014.

SCHUTTER, O. 2011. **Report on the Right to Food**. UN Human Rights Council. Disponível em: <http://rs.resalliance.org/?p=4612>>. Acesso em: 02 ago. 2015.

SHAMSHUDDI, N.J.; ANDA, M. Enhancing the productivity of Ultisols and Oxisols in Malaysia using basalt and/or compost. **Pedologist**, v.55, p.382-391, 2012.

SHAZANA, M.A.R.; SHAMSHUDDIN, J.; FAUZIAH, C.I.; PANHWAR, Q.A.; NAHER, U.A. Effects of Applying Ground Basalt with or without Organic Fertilizer on the Fertility of an Acid Sulfate Soil and Growth of Rice. **Malaysian Journal of Soil Science**, v.18, p.87-102, 2014.

SILVA, A.; PEREIRA, T.; COELHO, C.M.M.; ALMEIDA, J.A.; SCHMITT, C. Teor de fitato e proteína em grãos de feijão em função da aplicação de pó de basalto. **Acta Scientiarum: Agronomy**, v.33, p.147-152, 2011.

SILVA, E.D.; CASSIOLATO, A.M.R.; MALTONI, K.L.; SCABORA, M.H. Efeitos da rochagem e de resíduos orgânicos sobre aspectos químicos e microbiológicos de um subsolo exposto e sobre o crescimento de *Astronium fraxinifolium* Schott. **Revista Árvore**, v.32, p.323-333, 2008.

SILVA, F.J.P.; CARVALHO, A.M.X.; PETERSEN, P. Rochagem no manejo da fertilidade dos solos: experiências no centro sul do Paraná e no planalto norte catarinense. **Agriculturas**, v.12, p.30-36, 2015.

STEIN, A.J. Global impacts of human mineral malnutrition. **Plant and Soil**, v.335, p.133-154, 2010.

TEIXEIRA, A.M.S.; SAMPAIO, J.A.; GARRIDO, F.M.S.; MEDEIROS, M.E. Avaliação da rocha fonolito como fertilizante alternativo de potássio. **Holos**, v.28, p.21-34, 2012.

TOLEDO, M.Z.; CASTRO, G.S.A.; CRUSCIOL, C.A.C.; SORATTO, R.P.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C. Physiological quality of soybean and wheat seeds produced with alternative potassium sources. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, p.363-371, 2011.

TOKURA, A.M.; FURTINI NETO, A.E.; CARNEIRO, L.F.; CURI, N.; SANTOS, J.Z.L.; ALOIVISI, A.A. Dinâmica das formas de fósforo em solos de textura e mineralogia contrastantes cultivados com arroz. **Acta Scientiarum: Agronomy**, v.33, p.171-179, 2011.

TSCHARNTKE, T.; CLOUGH, Y.; WANGER, T.C.; JACKSON, L.; MOTZKE, I.; PERFECTO, I.; VANDERMEER, J.; WHITBREAD, A. Global

food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. **Biological Conservation**, v.151, p.53-59, 2012.

VEIGA, J.E. **Meio Ambiente e Desenvolvimento**. São Paulo: Editora Senac, 2006. 182p.

von WILPERT, K.; LUKES, M. Ecochemical effects of phonolite rock powder, dolomite and potassium sulfate in a spruce stand on an acidified glacial loam. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.65, p.115–127, 2003.

WELTER, M.K.; MELO, V.F.; BRUCKNER, C.H.; GOES, H.; CHAGAS, E.A.; UCHÔA, S.C.P. Efeito da aplicação de pó de basalto no desenvolvimento inicial de mudas de camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.922-931, 2011.

WILLER, H.; LERNOUD, J. **The world of organic agriculture 2015: summary**. The world of organic agriculture: statistics and emerging trends. IFOAM: Berlim, 2015. 212p.

Resistência de plantas a insetos: contextualização e inserção no MIP

Cristina Schetino Bastos¹, Arthur Vieira Ribeiro²,
Fábio Akiyoshi Suinaga³, Sanderson Melo Brito¹,
Andrea Aparecida Santos Oliveira¹, Tais Morais Barbosa¹,
Patrícia de Jesus dos Santos¹,
Danylo Vieira Vasconcelos Oliveira¹,
Yann Schmidt Krieger Teichmann¹

INTRODUÇÃO

Desde o surgimento da agricultura, há cerca de 10.000 a.C. até os dias de hoje, o homem teve necessidade de selecionar plantas mais adaptadas à competição imposta por agentes bióticos e abióticos de mortalidade. Nesse aspecto, a constatação de que as

¹ Universidade de Brasília (UnB), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Instituto Central de Ciências Ala Sul (ICC-Sul), Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília, DF, e-mails: cschetino@unb.br, sanderssonmelo@gmail.com, andrea_9516@hotmail.com, taismbarbosa@hotmail.com, patriciajesusdossantos@gmail.com, danylo_vieira@hotmail.com, yannstkrieger@gmail.com;

² Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Entomologia, Avenida PH Rolfs s/no., Campus Universitário, 36570-000, Viçosa, MG, e-mail: arthurvieira3@gmail.com;

³ Embrapa Hortaliças, Rodovia BR-060, Km 09 (Brasília/Anápolis), Fazenda Tamanduá, Caixa Postal 218, : 70351-970, Brasília/DF, e-mail: fabio.suinaga@embrapa.br.

plantas apresentavam diferenças quanto à suscetibilidade ao ataque de pragas data do século III a.C. a partir das observações feitas por Teophrastus. Os primeiros documentos que tratavam da resistência hospedeira ao ataque de pragas antecedem inclusive o surgimento da entomologia agrícola e da fitopatologia. Em 1782, Havens publicou um artigo onde relatava a resistência de uma cultivar de trigo (Winter Majetin) dos Estados Unidos à *Mayetiola destructor* (Say) (Diptera: Cecidomyiidae). Todavia, durante um grande período que se estendeu até o fim do século XIX as ações no sentido de buscar plantas que fossem resistentes ao ataque de insetos se restringiam à seleção das mais adaptadas à competição dentro das raças locais ou linhas puras. A partir do século XX, com a redescoberta das Leis de hereditariedade de Mendel, a resistência de plantas adquiriu nova dinâmica e passou a explorar a possibilidade das hibridações intra e interespecíficas para introgressão de genes de resistência em cultivares suscetíveis. Todavia, as reais possibilidades da resistência de plantas a insetos não foram totalmente exploradas antes da década de 60, principalmente devido à dependência excessiva do controle químico como ferramenta exclusiva do manejo de pragas (Panda & Khush, 1995). O surgimento do Manejo Integrado de Pragas (MIP) como filosofia que incorporava, entre outras coisas, a necessidade de adoção de múltiplas táticas de controle para o convívio com pragas também é um evento do século XX e pós década de 60 (Pedigo, 2002). Desta forma, a resistência de plantas adquiriu especial importância nesse contexto e as iniciativas nesse sentido, cresceram consideravelmente em importância nessa conjuntura.

Uma planta resistente a insetos possui atributos, geneticamente herdáveis, que fazem com que uma cultivar ou espécie seja menos danificada, que uma outra planta suscetível, não possuidora de tais atributos (Smith, 2005). Desta forma, a resistência é relativa, sendo o grau de resistência baseado na comparação com outras plantas

que são mais (suscetíveis) ou menos (resistentes) severamente danificadas ou mortas, sob condições experimentais similares. Nesse sentido, espécies ou cultivares que se comportem como altamente ou medianamente resistentes em um dado ensaio podem ter seu enquadramento alterado em função do comparativo estabelecido. Essa situação é muito comum quando se comparam, por exemplo, genótipos de algodão herbáceo entre si e genótipos herbáceos com genótipos cujos genitores se aproximem mais dos ancestrais selvagens (de hábito arbóreo). Nesse contexto, mesmo aqueles genótipos herbáceos que se comportem como resistentes nos testes onde a comparação é feita somente com outros genótipos herbáceos, podem se comportar como suscetíveis quando a comparação inclui genótipos cujos genitores se aproximem mais dos ancestrais selvagens (de hábito arbóreo).

Para que a planta manifeste essa resistência, ela emprega defesas que podem ser “estáticas ou constitutivas” e “ativas ou induzidas”, apesar de muitas formas de defesa envolvidas, em ambos os casos, poderem ser as mesmas. Enquanto a defesa induzida possui aspectos comuns a todas as plantas, o acúmulo de defesas constitutivas é espécie-específica (Gatehouse, 2002).

A obtenção de cultivares resistentes a insetos compreende várias etapas sumarizadas no organograma apresentado na Figura 1.

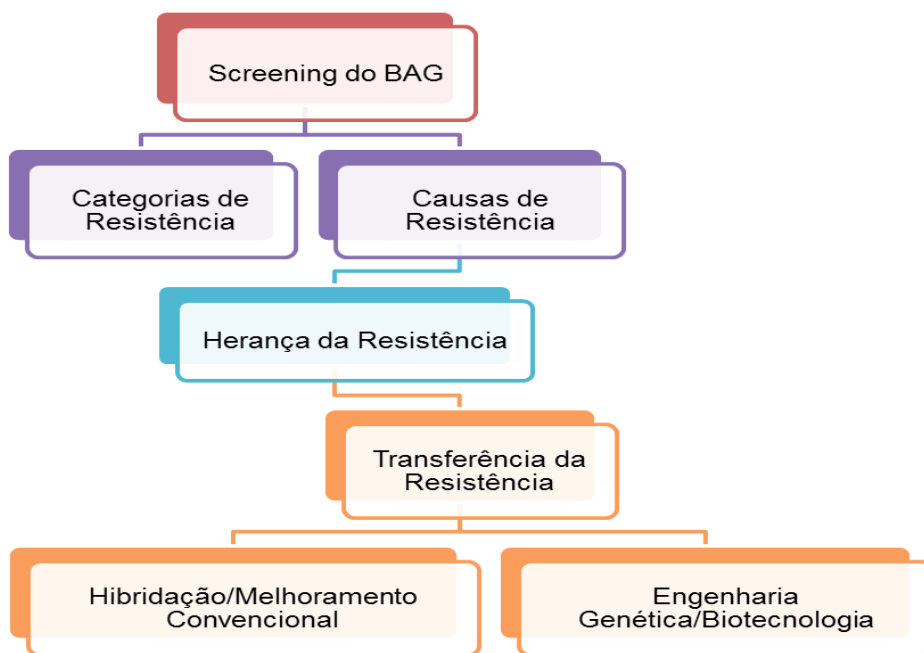


Figura 1. Etapas que compreendem a obtenção de cultivares resistentes a artrópodes.

Desta forma, cada um dos componentes desse organograma será abordado brevemente abaixo, iniciando-se com a formação ou busca das fontes de resistência em bancos ativos de germoplasma (BAGs), descrição das categorias e causas da resistência e possibilidades de incorporação de genes de resistência via melhoramento convencional ou através da biologia molecular. As plantas geneticamente modificadas incorporando genes provenientes de espécies não pertencentes ao reino vegetal não serão enfocadas nesse capítulo.

FONTES DE RESISTÊNCIA E OS BAGS

A pesquisa com resistência de plantas a insetos, bem como qualquer ação que envolva a busca e transferência de características adaptativas, depende do acesso às fontes de variação a fim de prospectar a característica de interesse. Muitas dessas características de interesse, incluindo a resistência às pragas, seca, salinidade, bem como outras que facultam a tolerância a estresses ou aquelas relacionadas à qualidade (micronutrientes essenciais, vitaminas) são encontradas ou buscadas nas variedades locais ou nos materiais selvagens. Outra forma de se ter acesso a essa variabilidade é através do intercâmbio de germoplasma existente em outros países e regiões. De uma forma ou de outra, uma vez adquirido o germoplasma (variedades locais, materiais selvagens ou germoplasma proveniente de intercâmbio) esses precisam ser conservados nos bancos ativos de germoplasma (BAGs) (*ex situ*), nas fazendas ou em seus habitats selvagens (*in situ*) (Dulloo et al., 2013).

A conservação *in situ* consiste na preservação da espécie e de populações de organismos vivos em um estado natural, no habitat onde eles ocorrem naturalmente. Esse método preserva tanto a população quanto os processos evolucionários que permitem que a população se adapte, através do manejo dos organismos no seu estado natural ou dentro da sua faixa normal de ocorrência (Negri & Tiranti, 2010). Pela própria natureza do método é menos comumente empregado por instituições que possuem programas de melhoramento genético.

A conservação *ex situ* consiste na preservação e propagação de espécies, de linhagens obtidas a partir de células germinativas ou somáticas fora do habitat onde elas ocorrem. Esse método mantém a diversidade genética no estado em que foi coletada, tornando as

amostras do material preservado prontamente disponíveis. Essa preservação pode se dar em jardins botânicos, casas-de-vegetação, *in vitro*, bem como através da manutenção de sementes e outros materiais propagativos em bancos de germoplasma sob condições apropriadas de armazenamento, em longo prazo. Nesse tipo de conservação, os acessos obtidos frequentemente precisam ser multiplicados antes do armazenamento nos BAGs e devem ser periodicamente regenerados a fim de aumentar a quantidade do material propagativo e de possibilitar seu rejuvenescimento. Durante a multiplicação ou a regeneração, um certo nível de erosão genética pode ser observado e a integridade genética e a estrutura de um acesso pode ser modificada devido a cruzamentos ocasionais com outros acessos, deriva genética e/ou efeitos seletivos relacionados ao ambiente de multiplicação (Negri & Tiranti, 2010). Desta forma, deve-se empregar um certo rigor e controle na condução dessas etapas. Essa normalmente é a forma mais usada para conservação e manutenção das fontes de variabilidade empregadas para introgressão de genes de interesse nos materiais comerciais pelas empresas envolvidas nesse segmento. Além da manutenção dessas fontes de variabilidade uma boa caracterização do germoplasma faz-se necessário.

Alguns autores afirmam que mais de 50% das características de interesse buscadas nos acessos mantidos nos BAGs são para alcançar resistência a doenças e insetos, seguida da busca por características que conferem tolerância a estresses abióticos, da ordem de 10-15%, com a busca por produtividade alcançando patamares da ordem de 20%. Outras estatísticas, focadas no melhoramento com seleção assistida por marcadores moleculares, destacam que a busca de variabilidade para introgressão de genes que conferem resistência a doenças representa 74% dos esforços, com os demais esforços sendo focados na tolerância a estresses

abióticos e produtividade e no hábito de crescimento (Warschefsky et al., 2014). De todo modo, sem a manutenção dessas fontes de resistência para introgressão de genes de resistência, não há como se pensar em melhoramento direcionado para a seleção de plantas incorporando resistência a insetos.

Apesar dos ganhos obtidos até o momento terem sido alcançados à custa dos inúmeros cruzamentos realizados pelos profissionais envolvidos no melhoramento de plantas, essas iniciativas ainda são limitadas tendo em vista a ampla variação existente nos BAGs e que não é explorada. Muitos programas de melhoramento são mantidos com estreita base genética tendo em vista o hábito dos melhoristas de utilizarem como parentais apenas as cultivares elite. No caso da incorporação da resistência a insetos nos materiais comerciais, faz-se necessário explorar toda essa variabilidade existente em busca das características condicionantes dessa resistência. Isso porque um dos exemplos mais recentes e notáveis de aquisição de resistência a um inseto-praga (isto é o bruquídeo que se alimenta de sementes pertencente ao gênero *Apion*) e a um patógeno (*Fusarium*) foi alcançado através da introgressão de genes provenientes de ancestrais selvagens de *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae). Adicionalmente, foram transferidas características que contribuíram para incremento dos teores de nitrogênio, ferro e cálcio nos grãos. Mesmo que esses ganhos tenham sido significativos, muita da variabilidade existente no gênero *Phaseolus* ainda não foi completamente explorada ou mapeada. Essa situação pode limitar a prospecção de alelos de interesse tais como aqueles relacionados às proteínas acrelina que possuem ação inseticida e cuja ocorrência nas populações naturais de ancestrais selvagens se dá em baixa frequência (Warschefsky et al., 2014).

CATEGORIAS DE RESISTÊNCIA

Três tipos de categorias (Smith, 2005) de resistência de plantas a insetos são mencionadas na literatura, tendo sido inicialmente denominadas como mecanismos de resistência por Painter (1951) e estas se encontram representadas na Figura 2.

Entretanto, a resistência induzida (Figura 3), apesar de ter sido originalmente enquadrada como pseudo-resistência, tendo em vista acreditar-se que as defesas de plantas eram somente expressas constitutivamente, também pode ser considerada no contexto da resistência de plantas, uma vez que ocorre reorientação da expressão gênica das atividades de manutenção celular para as de defesa. Essa reorientação ocorre mediante produção de elicitores que ativam os genes de defesa e são produzidos em resposta ao ataque ou oviposição de insetos. Esses elicitores também podem ser artificialmente aplicados, induzindo as mesmas respostas de defesa, como se a planta estivesse sob ataque (Mahmoud, 2013; Paudel et al., 2014). Muitos autores consideram a inclusão da resistência induzida no contexto da resistência de plantas apenas quando se comprove que as mudanças induzidas na preferência, desempenho ou sucesso reprodutivo da praga estejam associadas à característica de interesse (que foi alterada) e sempre que essa característica contribua para o incremento do *fitness* do hospedeiro e possa ser geneticamente herdável (Howe e Schaller, 2008). Acredita-se que o custo energético associado às defesas de plantas tenha sido a força motriz para a existência das defesas induzidas, tendo em vista que há economia de energia quando as defesas não são acionadas. Outras razões incluem a atração de predadores e parasitoides dos herbívoros e a redução da atratividade dos hospedeiros aos herbívoros especialistas quando as plantas não estejam induzidas (Agrawal, 1998). Desta forma, acredita-se que as defesas induzidas

comprometam menos o *fitness* do hospedeiro e sejam mais duráveis do que as defesas constitutivas (Mahmoud, 2013).

Outra classificação acerca dos tipos de defesa que implicam na manifestação de resistência ao ataque de insetos é àquela relacionada às defesas diretas e às indiretas. Na defesa direta a resposta constitutiva ou induzida afeta diretamente a interação do herbívoro com seu hospedeiro. Os fatores condicionantes desse tipo de resistência incluem características que isoladamente ou em conjunto alteram a preferência dos herbívoros durante a seleção do hospedeiro (antixenose) ou o desempenho do inseto (antibiose), além de permitirem aos hospedeiros se comportarem como tolerantes ao ataque. Na resistência indireta as defesas das plantas são direcionadas aos inimigos naturais dos herbívoros que as atacam, sendo, em muitas ocasiões consideradas sob a abordagem da interação tritrófica (Heil, 2014; Howe e Schaller, 2008).

Além disso, outros termos que guardam estreita relação com o contexto da resistência de plantas a insetos são pseudo-resistência e resistência associativa. A pseudo-resistência ocorre quando plantas suscetíveis se comportam como resistentes por inúmeras razões, incluindo variações temporais ou no metabolismo interno da planta em virtude das condições ambientais e escape do ataque ou do pico de infestação e de ocorrência da praga. A resistência associativa, por sua vez, ocorre quando plantas suscetíveis cultivadas em associação com plantas ou espécies resistentes se beneficiam da proteção conferida pela associação de ambas (Smith, 2005). Os diferentes tipos passarão a ser abordados, na sequência.

Antibiose

A categoria antibiose se manifesta quando os efeitos negativos de uma planta resistente afetam a biologia de um artrópode que

tenta utilizar essa planta como hospedeiro. Os efeitos antibióticos de uma planta resistente variam de medianos a letais e podem ser atribuídos a fatores de defesa químicos e morfológicos. Os efeitos letais em decorrência da antibiose podem ser agudos, condição na qual afetam larvas jovens e ovos e crônicos, quando levam à mortalidade de larvas mais velhas e pré-pupas que falham em se tornar pupas e pupas que não se transformam em adultos. Os indivíduos que sobrevivem aos efeitos diretos da antibiose podem também sofrer com os efeitos debilitantes de um tamanho corpóreo e peso reduzidos, períodos prolongados dos estágios imaturos e fecundidade reduzida (Smith, 2005).

Não Preferência ou Antixenose

Antixenose é um termo derivado da palavra grega xeno que significa convidado e descreve a inaptidão da planta em servir como hospedeiro para um artrópode, impedindo ou reduzindo a colonização. Quando essa situação ocorre na interação inseto-planta uma praga em potencial escolhe uma planta hospedeira alternativa. Tanto o termo antixenose como não-preferência denotam a presença de características da planta que afetam adversamente o comportamento do artrópode, resultando na seleção de um hospedeiro alternativo. Os comportamentos afetados são os de alimentação, oviposição e/ou abrigo, que podem ser interrompidos, parcialmente comprometidos ou inviabilizados. Desta forma, o artrópode pode até entrar em contato com a planta, mas esta não será utilizada ou a colonização será impedida. Em alguns casos, a causa da antixenose é tão efetiva que os insetos que estão tentando colonizar o hospedeiro, morrem por ausência de alimentação (Smith, 2005).

Plantas que exibem resistência por antixenose devem apresentar um número inicial reduzido de colonizadores no início do

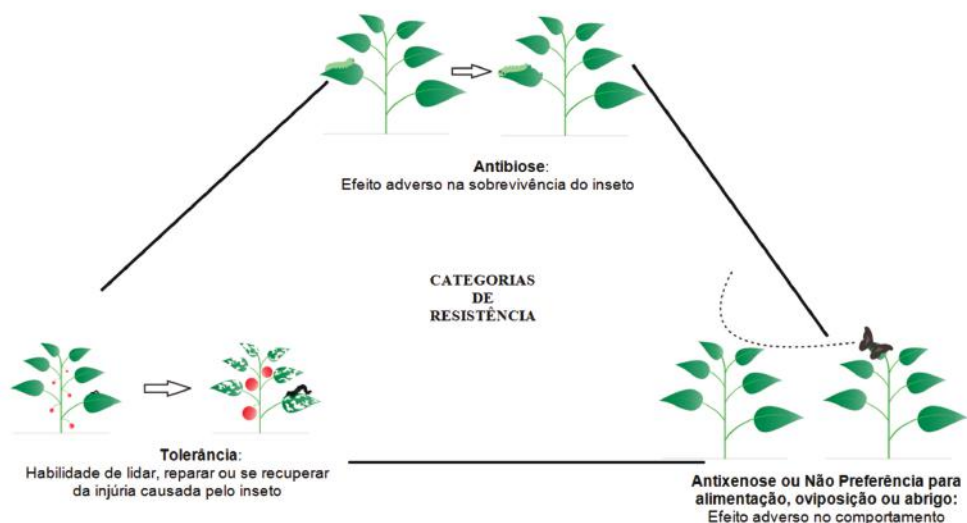


Figura 2. Categorias (originalmente descritas como mecanismos) de resistência de plantas a insetos.

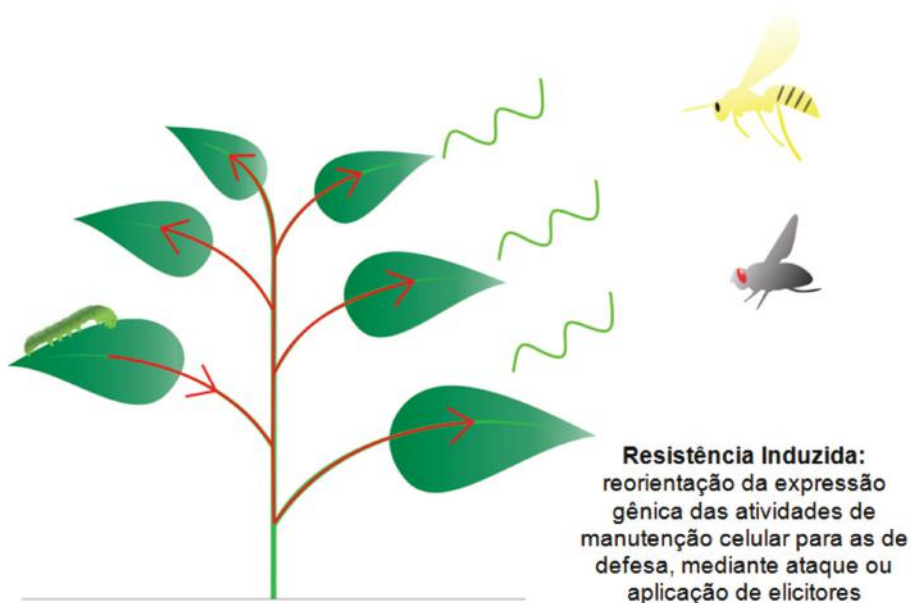


Figura 3. Representação esquemática da resistência induzida.

Tolerância

A tolerância compreende a habilidade do hospedeiro em lidar ou se recuperar do ataque causado por populações de artrópodes-praga de mesma magnitude do ataque causado às plantas suscetíveis. Os mecanismos que permitem às plantas se recuperarem incluem compensação do crescimento (incremento no acúmulo de biomassa), aumento da taxa fotossintética líquida, da taxa relativa de crescimento, aumento na ramificação ou no perfilhamento, altos níveis pré-existentes de carbono armazenados nas raízes e habilidade em redirecionar as reservas de carbono estocadas nas raízes para a parte aérea. Da perspectiva de um melhorista isso significa selecionar genótipos com intenso crescimento e vigor a fim de sobreviver à infestação por artrópodes. Apesar do que ocorre com a antixenose e a antibiose, a tolerância consiste na adaptação das características do hospedeiro e, desta forma não implica em pressão de seleção sobre a população da praga, não contribuindo para geração de indivíduos resistentes. Desta forma, a população de artrópodes-praga não é reduzida mediante a exposição a plantas tolerantes, algo que contribui para incrementar a ação de inimigos naturais. Adicionalmente insetos benéficos não são expostos aos efeitos adversos dos fatores de fatores morfológicos ou químicos de defesa (Smith, 2005).

Resistência Induzida

Até recentemente, assumia-se que as defesas das plantas eram constitutivamente expressas, isto é, não dependiam do ataque de herbívoros. Essa visão mudou quando foi demonstrado que o ataque do besouro do Colorado causava rápido acúmulo de inibidores de proteinases (IPs) em folhas de tomate e batata. Tendo em vista

que esses compostos interferem no sistema digestivo dos insetos que consomem as folhas, sugeriu-se que eles foram produzidos para defender as plantas do ataque de herbívoros. Após essa descoberta inicial, várias outras características foram identificadas e associadas à indução de resistência por dano ou herbivoria. Todavia, os maiores avanços foram obtidos com o advento das novas técnicas para análise de transcriptoma, revelando que existiam mudanças em larga escala na expressão gênica em resposta à herbivoria. Entretanto, a simples indução de certos genes (ou de certas características) não é evidência suficiente para associação com resistência ou defesa de plantas. Nesse aspecto, o termo resistência induzida se refere às mudanças induzidas na preferência, desempenho ou sucesso reprodutivo do invasor, sendo, portanto focada no herbívoro sem necessariamente beneficiar o hospedeiro. Isso equivale a dizer que, em muitas ocasiões, o investimento na resistência induzida pode ser maior que o benefício obtido a partir da redução no ataque do herbívoro ou que a resistência pode tornar o hospedeiro mais suscetível a outros estresses. Desta forma, para testar a funcionalidade dessas características na resistência de plantas faz-se necessário comparar a preferência e/ou desempenho do artrópode em plantas que diferem em relação à característica de interesse e avaliar o ganho em *fitness* do hospedeiro, sob ataque. Adicionalmente, a habilidade em induzir a defesa sob ataque deve ser herdável (Howe e Schaller, 2008).

As respostas induzidas das plantas à herbivoria equivalem às respostas do sistema imunológico e já foram relatados para mais de 100 sistemas plantas-herbívoros (Agrawal, 1998). A indução de características de defesa não é restrita ao local de ataque, podendo se manifestar em partes não atacadas das plantas. A natureza sistêmica da resposta do hospedeiro ao ataque de herbívoros necessita de um sistema de sinalização a longa distância capaz de

gerar, transportar e interpretar os sinais de alarme produzidos na interface planta-herbívoros (Howe e Schaller, 2008).

A grande maioria dos estudos realizados com indução direta de defesa usou como modelo plantas solanáceas (tomate principalmente) que empregam o peptídeo sistemina e seu precursor, pró-sistemina, no local ou próximo ao local de ataque para amplificar a produção de ácido jasmônico ou seus metabólitos que funcionam como sinais de longa distância (elicitores), sendo translocados pelo floema, e induzindo a expressão de genes de defesa nas partes distais das plantas (Li et al., 2002). Uma variedade de hormônios vegetais, tanto naturais quanto sintéticos, e de proteínas de fitopatógenos também podem funcionar como elicitores (Thaler e Bostock, 2004; Paudel et al., 2014). De todo modo, muitas respostas de defesa das plantas ao ataque de insetos são ativadas através de rotas de transmissão de sinal mediadas pelo ácido jasmônico, ácido salicílico, etileno e ácido abscísico (Thaler & Bostock, 2004; War et al., 2012; Wu et al., 2015).

Além desse papel na resistência ao ataque de herbívoros, muitos dos compostos induzidos sob ataque são compostos orgânicos voláteis induzidos pela herbivoria que servem como atrativos aos inimigos naturais dos herbívoros, funcionando ainda como defesas induzidas indiretas. Muitos parasitóides e predadores utilizam compostos voláteis orgânicos (que usualmente, porém nem sempre, são emitidos em maior magnitude após a herbivoria) para localizar a sua presa ou hospedeiro ou são atraídos por compostos orgânicos voláteis induzidos pelo ataque de herbívoros tais como metil salicilato, linalool ou β -cariofileno. Esses efeitos já foram descritos para ácaros, joaninhas e percevejos predadores, além de parasitoides e hiperparasitoides. A presença desses organismos pode incrementar as taxas de predação e parasitismo dos herbívoros, reduzindo sua densidade sobre as plantas (War et al., 2012; Heil, 2014).

Outra forma de obter os benefícios provenientes das defesas induzidas com consequente aquisição de resistência ao ataque de insetos-praga é através da pulverização dos elicitores sobre as plantas de tal forma a forçar o acionamento do sistema de defesa natural contra o ataque dos herbívoros. Essa situação já foi obtida a partir da aplicação de ácido salicílico em gergelim proporcionando controle de *Nezara viridula* (Linnaeus) (Hemiptera: Pentatomidae), *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), *Creontiades* sp. (Hemiptera: Miridae), *Empoasca lybica* (de Berg.) (Hemiptera: Cicadellidae) e *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae), além de maior produtividade de semente por planta (Mahmoud, 2013) e através do tratamento de sementes de tomate com metil jasmonato objetivando o controle de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) (Paudel et al., 2014).

Resistência associativa e pseudo-resistência

A resistência associativa ocorre através da prática da associação ou policultivo ou consórcio realizado entre plantas suscetíveis e resistentes, permitindo que as primeiras sejam menos atacadas devido à proteção conferida pelas últimas. Existem vários mecanismos pelos quais as plantas podem se beneficiar desse tipo de associação, todavia, em geral, os surtos populacionais são adiados, bem como existe menor pressão de seleção para sobrevivência de indivíduos resistentes ou biótipos mais agressivos (Smith, 2005).

A associação pode se dar entre plantas de diferentes famílias botânicas conferindo redução no ataque de alguns herbívoros [especializados tais como a cigarrinha *Empoasca krameri* Ross e Moore (Hemiptera: Cicadellidae) no feijão cultivado em associação com o milho e *Dalbulus maidis* (De long e Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) no feijão cultivado exclusivamente] (Tabela 1) e, ao

mesmo tempo, aumento na suscetibilidade ao ataque de outros herbívoros.

Tabela 1. Densidade média de *Dalbulus maidis* e de *Empoasca kraemeri* na cultura do feijão em função das fases da planta e do sistema de cultivo (isolado ou consorciado com o milho). Adaptado de Bastos et al. (2003).

Estádio das plantas	Feijão	Feijão com Milho	Feijão	Feijão com Milho
	<i>(Dalbulus maidis/10 plantas)^{1/}</i>		<i>(Empoasca kraemeri/10 plantas)^{1/}</i>	
Pré-floração	0,00 ± 0,00 aA	0,00 ± 0,00 aC	27,50 ± 14,36 aB	0,00 ± 0,00 bA
Formação de vagens	15,00 ± 5,00 aA	27,50 ± 10,31 aB	240,00 ± 77,57 aA	27,50 ± 15,48 bA
Enchimento de vagens	7,50 ± 4,79 bA	55,00 ± 5,00 aA	182,50 ± 36,60 aA	70,00 ± 17,79 bA

^{1/}Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Pode ocorrer ainda, associação entre plantas pertencentes à mesma família botânica e mesmo gênero em que seja conhecido, de antemão, a resistência de uma dada variedade, cultivar ou ancestral botânico ao organismo que se deseja obter controle. Isso foi testado e comprovado para o algodoeiro em relação ao bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* Bohemann (Coleoptera: Curculionidae), empregando-se a variedade que se comportou como mais resistente à praga (BRS Aroeira) nas bordas e a suscetível (BRS Rubi), no centro, simulando o que é feito na estratégia de *push and pull*. Observou-se que quando as variedades suscetíveis foram cultivadas com as resistentes nas bordas, houve redução em quase 50% das estruturas atacadas pela praga (Figura 4). Desta forma, quando não for possível a introgressão dos genes de resistência a insetos nas variedades comerciais, ainda assim existem ganhos para o manejo de pragas advindos do cultivo associado de ambas, com pequeno comprometimento da área cultivada e ganhos consideráveis

em termos de redução de frequência de intervenções com controle químico para contenção dos surtos populacionais.

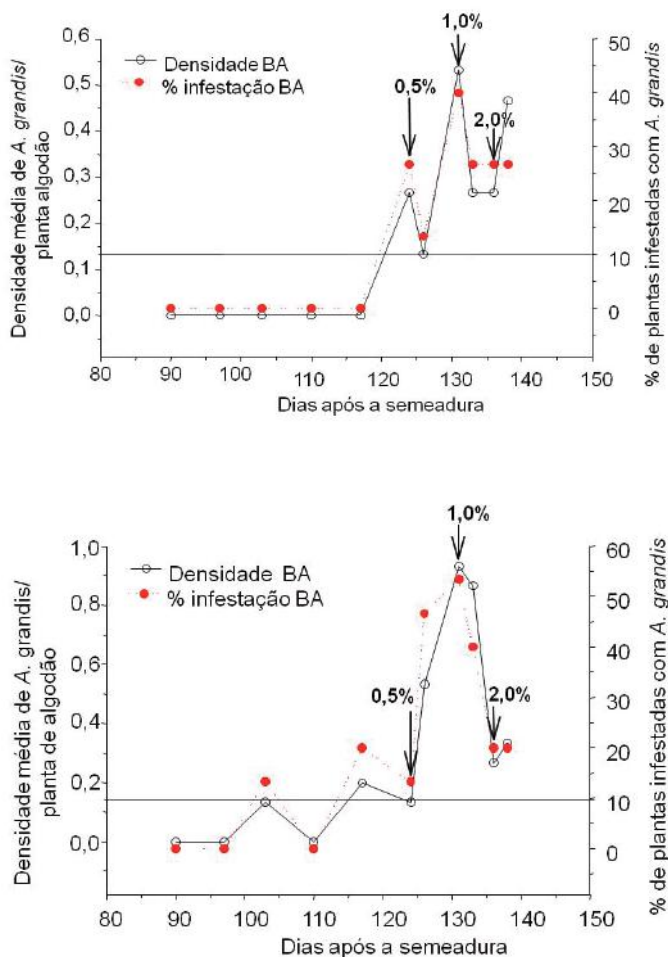


Figura 4. Densidade média e porcentagem de plantas infestadas pelo bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Bohemann, Coleoptera: Curculionidae) em diferentes datas de avaliação, em ensaios empregando a cultivar de algodoeiro colorida (bege) BRS Topázio cultivada isoladamente ou em associação com a cultivar de fibra

branca (BRS Aroeira) e sujeitas a pulverizações com inseticida a base de neem (Natuneem) sempre que houve atingimento do nível de controle (demarcado com a linha horizontal). (A) BRS Topázio/Neem/Aroeira, (B) BRS Topázio/Neem. Obs.: 0,5, 1,0 e 2,0% representam as concentrações v/v empregadas da formulação à base de neem para o controle da praga e BA – bicudo-do-algodoeiro.

A pseudo-resistência ocorre quando plantas suscetíveis se comportam como resistentes por diferentes razões: as plantas evitam o ataque devido à antecipação do desenvolvimento fenológico (plantas de ciclo precoce), se tornando não adequadas para o desenvolvimento de artrópodes, ou ainda devido a alterações temporárias na temperatura, comprimento do dia, fertilidade do solo, teor de umidade do solo ou da planta e no metabolismo interno da planta. Adicionalmente, a pseudo-resistência pode se manifestar devido ao simples escape em razão das infestações serem insuficientes, em magnitude, para causar a injúria (Smith, 2005).

CAUSAS DE RESISTÊNCIA

Causas químicas

Os aleloquímicos vegetais possuem grande influência no comportamento e na fisiologia de insetos, sendo, portanto, muito importantes em conferir resistência ou suscetibilidade dos hospedeiros ao ataque. Normalmente os ensaios realizados para determinar as causas químicas de resistência são conduzidos com extratos brutos (de composição bastante variável) em um primeiro momento, seguidos de ensaios com compostos isolados e purificados

para se atestar a atividade biológica dos mesmos. Nesse aspecto, as causas químicas de resistência podem determinar a resistência por antixenose ou antibiose.

A seleção de um hospedeiro para oviposição ou alimentação não é um ato fortuito e envolve uma série de atividades comportamentais tais como procura, aterrissagem e contato com a superfície do hospedeiro empregando pistas de natureza diversa, incluindo as pistas químicas. É reconhecido que a orientação a longa distância de muitos insetos para seus hospedeiros emprega os compostos voláteis que são emanados desses hospedeiros. Desta forma, em termos de aplicabilidade dos aleloquímicos no sentido de conferir resistência do tipo não preferência, eles podem funcionar repelindo os insetos durante a orientação olfativa em direção ao hospedeiro ou como deterrentes ou inibidores de alimentação e/ou oviposição, na fase de aceitação do hospedeiro. A resistência pode se dar ainda devido a não percepção de aleloquímicos voláteis que funcionem como atraentes. Ou seja, a resistência pode ser devida tanto à ausência de estímulos químicos indutores ou pela presença de estímulos inibidores do comportamento de orientação, oviposição e alimentação (Panda e Khush, 1995; Smith, 2005).

Em termos da aplicabilidade dos aleloquímicos condicionando resistência por antibiose é reconhecido que os compostos produzidos pelos vegetais podem causar toxicidade aguda ou crônica aos herbívoros que se alimentam deles manifestada através da mortalidade ou de alterações em características do seu ciclo de vida. Esses efeitos podem se dar tanto pela presença de substâncias tóxicas quanto pela ausência ou redução nos teores dos nutrientes que os herbívoros necessitam que estejam presente em um alimento adequado. Muitos compostos são reconhecidos como causadores de antibiose, incluindo alcaloides, glucosinolatos, flavonóides,

aminoácidos não proteicos, terpenóides, cetonas, ácidos orgânicos, dentre outros (Smith et al., 1994; Smith, 2005).

Em soja, por exemplo, verificou-se que as cultivares que causaram maior mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), influenciando negativamente o peso larval e pupal inicial e alongando o ciclo de vida, possuíam maiores concentrações de dois flavonoides – rutina e genistina. A cultivar suscetível, por sua vez, não continha tais compostos. Esses resultados demonstraram que esses flavonoides são importantes na manifestação da resistência à *A. gemmatalis* e que após sucessivos cruzamentos visando a seleção de genótipos produtivos, esses compostos de resistência foram perdidos nas cultivares comerciais (Piubelli et al., 2005). Semelhante ao que foi obtido nesse trabalho, espécies selvagens de amendoim (*Arachis kempff-mercadoi* Krapov. Fabaceae) que apresentam alta resistência por antibiose ao ataque da praga polífaga *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), são enriquecidas em flavonóides, com destaque para o efeito da quercetina (Mallikarjuna et al., 2004).

Similarmente, em um trabalho realizado para determinar as bases da resistência de variedades de batata-doce ao ataque de *Cylas puncticollis* Bohemann (Coleoptera: Curculionidae), uma praga que ataca as raízes tuberosas, verificou-se, através de análises realizadas na superfície e no látex da raiz, que existiam diferenças quantitativas e qualitativas no perfil químico das cultivares suscetíveis e resistentes, com incremento nos teores de alguns ácidos orgânicos (ésteres de ácidos hidroxicinâmicos – octa e hexadecil) nessas últimas. Os compostos foram então sintetizados a fim de confirmar sua identidade e foram incorporados em dietas artificiais, verificando-se altos níveis de mortalidade das larvas do inseto e inibição do seu desenvolvimento (Stevenson et al., 2009).

Korada et al. (2013) estudaram o papel de compostos orgânicos voláteis emitidos por raízes tuberosas de batata-doce na manifestação da resistência ao curculionídeo *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae). Os autores observaram que os genótipos menos preferidos pela praga produziam o composto 9,12-(Z,Z) Ácido Octadecadienóico, um precursor da produção de muitos compostos aromáticos de cadeia curta, através da rota da lipoxigenase. Desta forma, propuseram que os ésteres de ácidos graxos ciclopropanos sejam usados como “marcador químico” diagnóstico da resistência de batata-doce por não preferência ao ataque do besouro.

Todavia, um dos exemplos mais clássicos desse tipo de causa de resistência, é àquele relacionado à presença de glucosinolatos em espécies da família Brassicaceae ou Cruciferae. Esses compostos são reconhecidos como sendo causadores de deterrência em herbívoros generalistas ao mesmo tempo em que são usados como pista para reconhecimento, durante a seleção do hospedeiro, por herbívoros especialistas. Alguns autores verificaram algo nesse sentido ao estudar o sistema glucosinato-mirosinase em plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Brassicaceae. Desta forma, plantas que continham altos níveis de glucosinolatos apresentaram alta taxa de deterrência do herbívoro generalista *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Em contraste, o ataque do herbívoro especialista *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) não se correlacionou com variações no sistema glucosinato-mirosinase (Kliebenstein et al., 2002). Todavia, estudos mais recentes demonstraram que plantas que continham altas concentrações de glucosinolatos de cadeia curta apresentavam menor diversidade de herbívoros do que as plantas que eram mais enriquecidas com glucosinolatos de cadeia longa. Além disso, tanto a praga especialista *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) quanto a generalista

Mamestra brassicae (L.) (Lepidoptera: Noctuidae) evitaram ovipositar e apresentaram pior performance em plantas enriquecidas com glucosinolatos de cadeia curta (glucoiberina) (Poelman et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos alterando-se a expressão de genes que conferem modificações na estrutura da cadeia de glucosinolatos produzidos por *A. thaliana*, concluindo-se que a expressão de determinados glucosinolatos (metilsulfinil) conferiu resistência indistinta tanto a herbívoros especialistas (*Pieris brassicae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae)) quanto a generalistas (*Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)). Além disso, o grau de resistência conferido foi maior nestas linhagens do que naquelas que expressavam hidroxipropil glucosinolatos como principais constituintes (Rohr et al., 2009). Desta forma, conclusões acerca de aplicabilidade desses compostos devem ser tiradas apenas após análise minuciosa e exaustiva.

Causas morfológicas

Existem evidências que sugerem que características morfológicas das plantas tais como dureza do tecido, pubescência, espinhos ou cerdas agem como barreiras à alimentação e oviposição por insetos. De maneira similar, fatores tais como lignificação das paredes celulares, presença de sílica, esclerotização do tecido, arranjo e número de feixes vasculares, forma das estruturas sob ataque, dentre outros, afetam a alimentação e o estabelecimento dos insetos nas plantas (Smith et al., 1994). Essas diferentes características podem ser as causadoras tanto de antixenose quanto de antibiose.

Os tricomas foliares, por exemplo, quando presentes, são as primeiras estruturas com as quais os artrópodes entram em contato após terem tomado a decisão de aterrisar ou caminhar sobre a

superfície foliar. Existem vários exemplos que comprovam o papel dos tricomas na manifestação da resistência por antixenose ou por antibiose em diversas espécies de plantas. Os tipos de tricomas encontrados são variáveis e podem ser simples e ter forma ereta ou de gancho ou complexo, multi-celulares, tais como os tricomas glandulares. Os tricomas eretos limitam a habilidade dos artrópodes em se manter sobre a superfície do hospedeiro a fim de iniciar e reter a alimentação enquanto os tricomas em formato de gancho ou glandulares capturam ou prendem o artrópode levando-o à dessecação ou morte. Os tricomas glandulares podem ainda secretar substâncias tóxicas que causam antibiose (Smith, 2005).

Um dos casos mais extensamente explorado do papel dos tricomas na manifestação da resistência de plantas a insetos envolve a mosca branca. Nesse aspecto, Torres et al. (2007) avaliando a biologia e preferência para oviposição por *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em cultivares de algodoeiro constataram, ao confrontar os resultados obtidos nos testes de não-preferência para oviposição com chance de escolha e o número de tricomas/cm², que, em geral, as cultivares com maior número de tricomas (BRS 200-Marrom, BRS Cedro, BRS 186-Precoce 3 e BRS Acala) também foram as que apresentaram maior oviposição. Por sua vez, a cultivar Ita 90-2, completamente glabra, e as cultivares BRS Aroeira e BRS Verde, com menor densidade de tricomas, receberam um número menor de ovos em relação às demais. Resultados semelhantes foram encontrados por Boiça Jr. et al. (2007) e por Toscano et al. (2003), com as cultivares glabras contendo menor número de ovos, apesar de algumas cultivares pubescentes, no caso do primeiro trabalho, também terem sido pouco ovipositadas, algo que sugere que não só essa característica estivesse governando a escolha por um dado genótipo. Por outro lado, Puentes e Agren (2013) não detectaram correlação entre a produção de tricomas

por plantas de *Arabidopsis lyrata* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz (Brassicaceae) e alteração na preferência para alimentação ou oviposição de *P. xylostella* indicando que a resistência provavelmente estaria associada a outras características do hospedeiro.

Já Freitas et al. (2002) observaram que plantas de tomate contendo tricomas glandulares do tipo IV apenas aumentaram a mortalidade de adultos e ninfas de mosca branca quando carregavam compostos causadores de antibiose no inseto (acil-açúcares).

Uma vez que os artrópodes tenham sobrepujado a barreira representada pelos tricomas, eles passam a ter que lidar com a superfície foliar propriamente dita que são recobertas por ceras que revestem a epicutícula foliar e impedem a dessecação, bem como evitam o ataque de pragas. As ceras foliares possuem uma ampla variedade morfológica e são formadas pela ligação de um ácido graxo de cadeia longa e um álcool alifático. Desta forma, genótipos contendo superfícies foliares recobertas com ceras que as tornam cerosas, brilhantes, escorregadias ou vitrificadas apresentam efeitos variados sobre o comportamento (antixenose) ou o desenvolvimento (antibiose) do inseto (Smith, 2005).

Nesse sentido, Daoust et al. (2010) verificaram que a remoção da camada de cera enriquecida com monoterpênos de plantas de *Picea glauca* (Moench) Voss (Pinaceae) que se comportavam como resistentes ao ataque de *Choristoneura fumiferana* (Clemens) (Lepidoptera: Tortricidae) resultava em aumento do número de indivíduos que transitavam da fase de picada de prova para a de manutenção da alimentação. De maneira semelhante, Salatino et al. (1998) verificaram que o principal componente da cera de *Didymopanax vinosum* (Cham. & Schltdl.) Seem. (Apiaceae), o lupeol, apresentava atividade deterrente sobre formigas desfolhadoras (*Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae)). Todavia, Cramer et al. (2014) observaram que plantas de alho que

foram menos atrativas a *Thrips tabaci* (Lindeman) (Thysanoptera: Thripidae) possuíam folhas de coloração verde-clara a verde e uma pequena quantidade de cera epicuticular.

Modificações na estrutura física da planta também são responsáveis por conferir resistência ao ataque de artrópodes e a dureza e espessura de órgãos dos hospedeiros determinam o grau de resistência em algumas cultivares (Smith, 2005). Nesse aspecto, Bergvinson et al. (1994) verificaram uma correlação significativa e negativa entre a dureza foliar de genótipos de milho e a escala de danos aplicada ao ataque causado por *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). Similarmente, a dureza da parede celular das vagens de genótipos de guandu, dentre outras características, foi significativamente e negativamente correlacionada com o ataque de *Melanagromyza obtusa* (Malloch) (Diptera: Agromyzidae).

Outros exemplos de alteração morfológico no formato das estruturas sob ataque que interferem na seleção e aceitação do hospedeiro são aqueles relativos à alteração no formato das brácteas que revestem as maçãs do algodoeiro (Figura 5) e nas folhas das plantas (Figura 6), ambos exercendo efeito sobre o bicudo-do-algodoeiro [*A. grandis*].



Figura 5. Maçã de algodoeiro roxa e contendo bráctea frego. Foto: Cristina S. Bastos

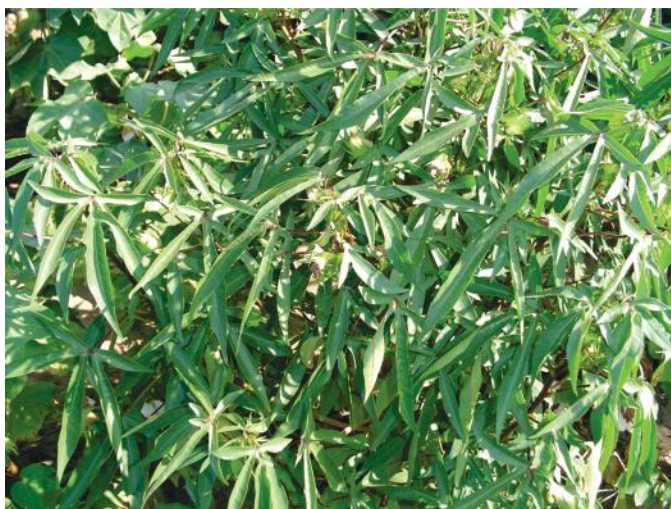


Figura 6. Folha de algodoeiro okra. Foto: Cristina Schetino Bastos.

Causas físicas

Apesar de muitos autores incluírem as alterações na cor do hospedeiro que interferem no ataque de pragas como causas morfológicas de resistência, elas serão consideradas aqui sob a abordagem de causas físicas.

A visão dos insetos herbívoros é governada tanto pela sua percepção da qualidade do espectro quanto do estímulo obtido da luz (brilho, matiz, saturação, comprimento de onda) e da dimensão e formato dos objetos vistos. Durante a orientação, a um hospedeiro potencial, os insetos percebem tanto os estímulos químicos quanto os visuais. O contato final com a superfície do hospedeiro potencial é devido à respostas positivas a pigmentos amarelos ou amarelo-esverdeados que ocorrem na faixa espectral de 500-580 nm (Smith, 2005). Desta forma, alterações na coloração das plantas podem alterar o ataque de pragas, conforme já constatado em relação à não-preferência do bicudo-do-algodoeiro por estruturas de coloração roxa (Figura 4).

INCORPORAÇÃO DA RESISTÊNCIA ATRAVÉS DO MELHORAMENTO CONVENCIONAL OU VIA SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES

Os métodos de melhoramento genético visando resistência a artrópodes não diferem fundamentalmente daqueles preconizados para o aumento da produtividade, dentre outros caracteres. Assim, as técnicas mais adequadas a serem utilizadas em um programa com este objetivo, dependem basicamente do sistema de acasalamento/reprodução da espécie vegetal, isto é, se a espécie em questão é autógama, alógama ou de propagação vegetativa. Além disto, para este caso específico, torna-se fundamental o conhecimento de uma

série de informações a respeito das fontes de resistência à praga alvo; da biologia do artrópode e da interação entre o artrópode e a espécie vegetal.

Além destas considerações, os procedimentos na seleção de genótipos resistentes a artrópodes muitas vezes são similares entre as espécies alógamas, autóginas e de reprodução assexuada. A condução destas populações difere significativamente, uma vez que a maioria das espécies de reprodução cruzada (alógamas) possuem quedas no vigor e na produtividade quando submetidas a autofecundação, devido aos efeitos da autoincompatibilidade e da depressão pela endogamia. Desta maneira, plantas individuais que exibam resistência não podem constituir por si só uma variedade resistente, com exceção às espécies que podem ser propagadas vegetativamente em larga escala. Por outro lado, em espécies autóginas, obviamente não são observados os fenômenos da autoincompatibilidade e/ou da depressão pela endogamia na produtividade ou vigor. Desta maneira, plantas individuais que exibam resistência podem ser a base de uma nova variedade.

Outro fator fundamental para o desenvolvimento de variedades resistentes a artrópodes consiste na elucidação da genética dos caracteres envolvidos na resistência. Neste contexto, esta resistência pode ser do tipo qualitativa ou quantitativa. Para o caso da resistência qualitativa ou vertical, esta característica é normalmente governada por um ou poucos genes, resultando em classes distintas de fenótipos sem estágios intermediários. Por outro lado, a resistência quantitativa ou horizontal é controlada por vários genes, apresentando distribuição contínua dos fenótipos, isto é, observam-se vários tipos de graduações entre o máximo e o mínimo na expressão da resistência.

A seguir serão descritos brevemente os principais métodos de melhoramento de plantas visando resistência a artrópodes. Maiores

detalhamentos sobre estes métodos podem ser obtidos em Borém e Miranda (2013).

Espécies autógamas

Os principais métodos de melhoramento visando resistência a artrópodes são a seleção massal, o genealógico, o da população (*bulk*), o descendente de uma única semente (SSD) e o do retrocruzamento. Cada um destes métodos conduz para o aumento da homozigose, almejando-se no final linhagens elite homogêneas e com grau de resistência elevado ao(s) artrópode(s) em questão.

Seleção Massal

Nesta metodologia, é efetuada a seleção com base no fenótipo dos indivíduos resistentes a partir da geração F_2 . A eficiência deste método está vinculada a habilidade do avaliador em selecionar através da análise visual os indivíduos genotipicamente resistentes. Desta maneira, a eficiência deste método está associada às características de resistência com alta herdabilidade, onde existem uma alta correlação entre o fenótipo e o genótipo e uma pequena influência do ambiente.

Método Genealógico

O método genealógico (*pedigree*) tem sido o mais utilizado nos programas de melhoramento de espécies autógamas. O princípio deste método consiste na seleção de plantas individuais a partir da geração F_2 , sendo estas colhidas de forma individual e posteriormente plantadas em linhas isoladas na geração F_3 . A partir desta geração, realiza-se a seleção entre e dentro das famílias. Este processo é repetido nas gerações subsequentes até o atingimento da

homozigose desejada. A partir deste ponto, as melhores linhagens são submetidas aos ensaios preliminares, intermediários, finais e regionais de avaliação. A seleção dos indivíduos superiores é baseada na avaliação visual e desta maneira a eficiência deste método está condicionada a características de resistência a artrópodes de alta herdabilidade.

Método da População

De maneira distinta ao método genealógico, a execução do método da população ou *bulk*, compreende duas fases operacionais distintas, isto é, a primeira de elevação da homozigose e a segunda de seleção para as características de resistência. Neste interim, a partir da geração F_2 as plantas são colhidas em conjunto, ou seja, em *bulk*. Após a colheita, toma-se uma amostra de sementes para a formação da geração F_3 . Estas ações são repetidas nas gerações subsequentes e uma vez atingido o grau de homozigose desejado, as sementes são plantadas sob maior espaçamento, permitindo assim, uma maior praticidade na seleção de plantas individuais. As plantas selecionadas darão origem às linhagens iniciais, que serão submetidas às avaliações agrônômicas em procedimentos similares ao descrito no método genealógico. Os principais questionamentos que podem comprometer a eficiência deste método, consiste na perda de alelos favoráveis através da amostragem. O segundo entrave consiste na definição do melhor momento para iniciar o processo de seleção de plantas individuais.

Método Descendente de Uma Única Semente

O método descendente de uma única semente ou SSD possui correspondência com o método da população quanto a separação

das fases de elevação da homozigose e de seleção. Neste método, na geração F_2 são colhidas aleatoriamente, uma semente de cada um dos indivíduos. Esta operação é repetida até que o nível de homozigose seja alcançado. Posteriormente, estas sementes são plantadas em espaçamento maior, com o intuito de selecionar plantas individuais que serão posteriormente submetidas ao teste de progênie. As principais vantagens deste método são a rapidez no atingimento da homozigose e a facilidade na condução das operações. Por outro lado, a perda da variabilidade intrínseca às famílias e a possível perda de indivíduos durante a fase de endogamia são as principais desvantagens associadas a este método.

Retrocruzamento

O método do retrocruzamento é recomendado para a transferência de características de resistência controladas por um (monogênica) ou poucos genes maiores (oligogênica). Este método tem sido largamente utilizado na incorporação de genes de resistência presentes em variedades obsoletas ou espécies silvestres em variedades modernas ou linhagens elite. Um detalhe importante a ser considerado quando da utilização deste método consiste no controle genético da resistência se dominante ou recessivo.

Espécies alógamas

O principal método para a obtenção de genótipos com resistência a artrópodes é a seleção recorrente. Mais precisamente a seleção recorrente consiste em um sistema composto por diversos métodos, sendo que estes podem ser divididos em duas classes: intrapopulacionais e interpopulacionais. Assim, quando se almeja a melhoria na resistência a artrópodes de uma determinada população

os métodos intrapopulacionais são os mais adequados. Por sua vez, se o objetivo final consiste no desenvolvimento de híbridos, os métodos de seleção recorrente interpopulacionais são os mais indicados. É importante salientar que este sistema permite elevar gradativamente a frequência de alelos de resistência a artrópodes em uma dada população sendo particularmente útil para os casos de resistência horizontal ou poligênica.

Seleção Assistida por Marcadores Moleculares

A identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência, ou se possível dentro do gene, pode ser utilizada com o intuito de substituir ou reduzir o número de *screenings* nos programas de melhoramento visando resistência a artrópodes, reduzindo assim o tempo necessário para o desenvolvimento de novas cultivares. Neste panorama, os marcadores moleculares podem ser utilizados na detecção de indivíduos portadores do gene de resistência, eliminando assim a necessidade dos ensaios com infestação. Além disto, estes marcadores podem também ser úteis na piramidação de vários genes de resistência (Rubiales et al., 2015).

Para identificar marcadores moleculares ligados a genes maiores, que tipicamente conferem resistência do tipo vertical, não é necessário o desenvolvimento de um mapa genético completo da espécie em questão. Nesta situação, pode-se utilizar uma técnica simples denominada de *Bulked Segregant Analysis* (BSA). De forma simplificada, inicialmente deve-se obter um *bulk* de DNA de indivíduos homocigóticos resistentes a determinado artrópode e o correspondente *bulk* suscetível. Posteriormente realiza-se a identificação dos marcadores moleculares polimórficos entre estes *bulks* (Michelmore et al., 1991).

Para o caso de resistência do tipo horizontal, comumente controlada por muitos genes menores, a principal técnica molecular utilizada é a análise das QTL's (*Quantitative Trait Loci*) responsáveis por esta característica. Através desta técnica é possível caracterizar a herança da resistência, permitindo assim a identificação de regiões genômicas e a contribuição destas na manifestação fenotípica deste caráter. Esta análise permite a identificação de marcadores moleculares ligados a resistência servindo como base para o desenvolvimento de sistemas de seleção assistida. Neste contexto, a eficiência de um marcador em sistemas de seleção assistida depende fundamentalmente da distância entre este marcador e o gene alvo. Cabe salientar que para uma série de culturas agrícolas, esta distância ainda é muito grande, fato que compromete a aplicação da seleção assistida nos programas de melhoramento visando resistência a artrópodes (Rubiales et al., 2015).

A acurácia na análise de QTL's é altamente influenciada pelo número de indivíduos que compuseram a população segregante, a precisão na avaliação das características de resistência e a disponibilidade de mapas genéticos saturados. Neste contexto, os primeiros mapas foram obtidos com base em marcadores morfológicos, isoenzimas e marcadores de baixa repetibilidade tais como os RAPD's e RFLP's (Rubeena et al., 2003). O uso de marcadores moleculares mais robustos, tais como os SSR's e os SNP's tem aumentado a qualidade destas informações, permitindo assim a comparação entre os mapas existentes. Entretanto, para a maioria das culturas agrícolas ainda é necessário o aumento na saturação destes mapas a fim de se localizar marcadores moleculares confiáveis visando utilização posterior nos programas de melhoramento. Este intento pode ser atingido com a utilização das técnicas de sequenciamento de alto desempenho permitindo assim, a identificação de uma série de marcadores SSR's e SNP's

dentro dos genes de resistência a artrópodes. O próximo passo seria a inclusão destes marcadores nos mapas genéticos das espécies agrícolas, possibilitando assim a saturação dos mesmos (Yang et al., 2012).

Outra estratégia interessante na localização de um marcador ligado a uma característica de resistência e não a uma dada população segregante consiste no mapeamento por associação. Nesta técnica, um determinado banco de germoplasma é genotipado com marcadores localizados em todos os cromossomos, sendo este germoplasma também caracterizado fenotipicamente quanto a resistência a artrópodes. Analisando o perfil dos marcadores e os fenótipos, torna-se possível localizar os marcadores moleculares associados às características de resistência. Entretanto, para evitar falsos positivos, torna-se fundamental o conhecimento da estrutura da população em estudo (Prioul-Gervais et al., 2007).

O avanço das técnicas de genotipagem de alto desempenho visando a obtenção de marcadores do tipo SNP's e DArT's, bem como o desenvolvimento de coleções nucleares (*core collections*) de germoplasma fomentará o mapeamento genômico por associação. Estas informações serão importantes não somente no estudo da correlação entre os polimorfismos do DNA e a manifestação das características de resistência a artrópodes mas também será útil na elucidação da origem das correlações genéticas entre os caracteres que controlam esta resistência, isto é, desvendando assim a possível diferença entre os efeitos da pleiotropia e da ligação gênica envolvidos na manifestação da resistência a artrópodes (Zhao et al., 2011).

RESISTÊNCIA DE PLANTAS E O MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS

Tendo em vista o conceito mais empregado para o Manejo Integrado de Pragas (MIP) como sendo uma filosofia de controle que emprega múltiplas táticas que sejam compatíveis entre si e contribuam para manutenção das densidades da praga abaixo do limiar de dano econômico e para a sustentabilidade ambiental (Pedigo, 2002), a resistência de plantas a insetos se enquadra como uma, dentre essas várias táticas, que contribuirá para que esse objetivo seja alcançado.

Nesse contexto, uma das compatibilidades mais exploradas diz respeito àquela entre o controle proporcionado por uma planta resistente e o controle biológico, priorizando-se a seleção de plantas que sejam, ao mesmo tempo, resistentes à praga e mais atrativas aos inimigos naturais da praga. Normalmente essa abordagem é explorada no contexto da interação tri-trófica.

As plantas resistentes podem influenciar o comportamento e a performance de inimigos naturais através da liberação ou acúmulo de compostos químicos ou da presença de características que atuem diretamente sobre o inimigo natural, ou indiretamente afetando seus hospedeiros ou presas. Os efeitos podem ser positivos, favorecendo o inimigo natural, ou negativos, reduzindo sua sobrevivência, efetividade e *fitness*. Apesar das diferentes espécies de plantas hospedeiras produzirem uma grande variabilidade nas respostas, cultivares das mesmas espécies também podem afetar os inimigos naturais de maneira diferenciada. Uma estratégia potencial para aumentar a efetividade dos inimigos naturais é incorporar características nas plantas resistentes que favoreçam a ocorrência desses organismos, reduzindo a necessidade de obtenção de altos níveis de resistência à praga. Nesse aspecto, níveis moderados

de resistência seriam desejáveis tendo em vista que a pressão de seleção sobre a praga seria reduzida, atrasando a taxa de adaptação às plantas resistentes. Além disso, nessa condição, os inimigos naturais encontrariam mais hospedeiros ou presas do que em plantas altamente resistentes, reduzindo as taxas de emigração e aumentando seu potencial reprodutivo no caso de permanência no agroecossistema (Bottrell e Barbosa, 1998). A Figura 7 ilustra a expectativa de como o uso de plantas que se comportem somente como resistentes ao ataque de pragas ou que sejam, ao mesmo tempo, resistentes ao ataque e mais atrativas aos inimigos naturais operaria na conjuntura da contenção dos surtos populacionais, visualizada através da frequência de atingimento do nível de controle.

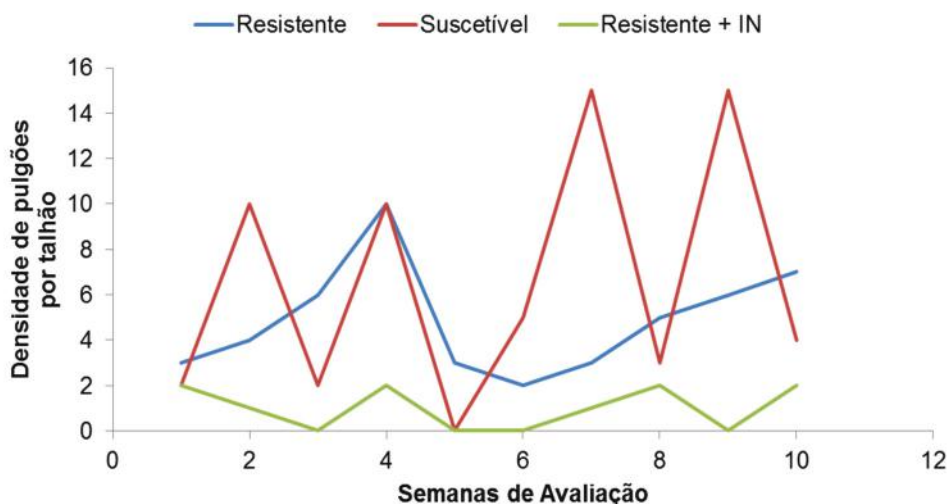


Figura 7. Comportamento hipotético esperado de plantas resistentes e suscetíveis ao ataque de pulgões e de plantas resistentes e atrativas aos inimigos naturais (IN) da praga em relação à frequência de atingimento do nível de controle (NC) [marcado com asterisco] ao longo das semanas de monitoramento.

Desta forma, mesmo considerando que a busca por cultivares resistentes a artrópodes dependa do esforço conjunto e coordenado de vários profissionais, tendo em vista tratar-se de área de interface do conhecimento, considerando os inúmeros benefícios que sua geração pode trazer ao MIP, ela sempre deverá ser buscada. Atualmente a grande maioria dos esforços nesse sentido tem se restringido àqueles realizados por empresas interessadas na incorporação de toxinas *Bt* em plantas geneticamente modificadas. Todavia, a introgressão de genes obtidos de fontes de resistência pertencentes à mesma espécie ou às espécies próximas àquela sob exploração comercial, ainda representa uma grande oportunidade a ser explorada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, A.A. Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science*, v.279, p.1201-1202, 1998.

BASTOS, C.S.; GALVÃO, J.C.C.; PICANÇO, M.C.; CECON, P.R.; PEREIRA, P.R.G. Incidência de insetos fitófagos e de predadores no milho e no feijão cultivados em sistema exclusivo e consorciado. *Ciência Rural*, v.33, p.391-397, 2003.

BERGVINSON, D.J.; ARNASON, J.T.; HAMILTON, R.I.; MIHM, J.A.; JEWELL, D.C. Determining leaf toughness and its role in maize resistance to the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, v.87, p.1743-1748, 1994.

BOIÇA JR., A.L.; CAMPOS, Z.R.; LOURENÇÃO, A.L.; CAMPOS, A.R. Adult attractiveness and oviposition preference of *Bemisia tabaci* (GENN.) (Homoptera: Aleyrodidae) b-biotype in cotton genotypes. *Scientia Agricola*, v.64, p.147-151, 2007.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. Melhoramento de plantas. Viçosa: Editora UFV, 2013. 523p.

BOTTRELL, D.G.; BARBOSA, P. Manipulating natural enemies by plant variety selection and modification: a realistic strategy? *Annual Review of Entomology*, v.43, p.347-367, 1998.

CRAMER, C.S.; SINGH, N.; KAMAL, N.; PAPPU, H.R. Screening onion plant introduction accessions for tolerance to onion thrips and iris yellow spot. *HortScience*, v.49, p.1253-1261, 2014.

DAOUST, S.P.; MADER, B.J.; BAUCE, E.; DESPLAND, E.; DUSSUTOUR, A.; ALBERT, P.J. Influence of epicuticular-wax composition on the feeding pattern of a phytophagous insect: implications for host resistance.

DULLOO, M.E.; THORMANN, I.; FIORINO, E.; DE FELICE, S.; RAO, V.R.; SNOOK, L. Trends in research using plant genetic resources from germplasm collections: from 1996 to 2006. *Crop Science*, v.53, p.1217-1227, 2013.

FREITAS, J.A. de; NONATO, M.F.B.; SOUZA, V.S.; MALUF, W.R.; CICIOLA JR., A.I.; LEITE, G.L.D. Relações entre acilaçúcares, tricoma glandular e resistência do tomateiro à mosca branca. *Acta Scientiarum*, v.24, p.1313-1316, 2002.

GATEHOUSE, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*, v.156, p.145-169, 2002.

HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles: targets, perception and unanswered questions. *New Phytologist*, v.204, p.297-306, 2014.

HOWE, G.A.; SCHALLER, A. Direct defenses in plants and their induction by wounding and insect herbivores. In: Schaller, A. (Ed.) *Induced plant resistance to herbivory*, Stuttgart: Springer, 2008. p.7-29.

KLIEBENSTEIN, D.; PEDERSEN, D.; BARKER, B.; Mitchell-Olds, T. Comparative analysis of quantitative trait loci controlling glucosinolates, myrosinase and insect resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, v.161, p.325-332, 2002.

KORADA, R.R.; MISRA, S.; NASKAR, S.K.; BHAKTAVATSALAM, N.; PRASAD, A.R.; SINHA, K.; JAYAPRAKAS, C.A.; MUKHERJEE, A. Plant volatile organic compounds as chemical markers to identify resistance in sweet potato against weevil *Cylas formicarius*. *Current Science*, v.105, p.1247-1253, 2013.

LI, L.; CHUANYOU, L.; LEE, G.I.; HOWE, G.A. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.99, p.6416-6421.

MAHMOUD, M.F. Induced plant resistance as a pest management tactic on piercing sucking insects of sesame crop. *Arthropods*, v.2, p.137-149, 2013.

MALLIKARJUNA, N.; KRANTHI, K.R.; JADHAV, D.R.; KRANTHI, S.; CHANDRA, S. Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. *Journal of Applied Entomology*, v.128, p.321-328, 2004.

MICHELMORE, R.; PARAN, I.; KESELLI, V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proceedings of National Academy of Science of United States of America*, v.88, p.9828-9832, 1991.

NEGRI, V.; TIRANTI, B. Effectiveness of in situ and ex situ conservation of crop diversity. What a *Phaseolus vulgaris* L. landrace case study can tell us. *Genetica*, v.138, p.985-998, 2010.

PAINTER, R.H. Insect resistance in crop plants. New York: MacMillan, 1951. 520p.

PANDA, N.; KHUSH, G.S. Host plant resistance to insects. Wallingford: CAB International, 1995. 431p.

PAUDEL, S.; RAJOTTE, E.G.; FELTON, G.W. Benefits and costs of tomato seed treatment with plant defense elicitors for insect resistance. *Arthropod-Plant Interactions*, v.8, p.539-545, 2014.

PEDIGO, L.P. Entomology and pest management. 4.ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2002. 742p.

PIUBELLI, G.C.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S.H.; OLIVEIRA, M.C.N. de. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*? *Journal of Chemical Ecology*, v.31, p.1509-1524, 2005.

POELMAN, E.H.; van DAM, N.M.; van LOON, J.J.A.; VET, L.E.M.; DICKE, M. Chemical diversity in *Brassica oleracea* affects biodiversity of insect herbivores. *Ecology*, v.90, p.1863-1877, 2009.

PRIOUL-GERVAIS, S.; DENIOT, G.; RECEVEUR, E. M.; FRANKEWITZ, A.; FOURMANN, M.; RAMEAU, C.; PILET-NAYEL, M. L.; BARANGER, A. Candidate genes for quantitative resistance to *Mycosphaerella pinodes* in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, v.114, p. 971-984, 2007.

PUNTES, A.; AGREN, J. Trichome production and variation in young plant resistance to the specialist insect herbivore *Plutella xylostella* among natural populations of *Arabidopsis lyrata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.149, p.166-176, 2013.

ROHR, F.; ULRICHS, CH.; MEWIS, I. Variability of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* (L.) - impact on glucosinolate

profile and insect resistance. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, v.82, p.131-135, 2009.

RUBEENA, T.; TAYLOR, P.W.J.; ADES, P.K.; FORD, R. QTL mapping of resistance in lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*) to ascochyta blight (*Ascochyta lentis*). *Plant Breeding*, v.125, p.506–512, 2006.

RUBIALES, D.; FONDEVILLA, S.; CHEN, W.; GENTZBITTEL, L.; HIGGINS, T.J.V.; CASTILLEJO, M.A.; SINGH, K.B.; RISPAIL, N. Achievements and challenges in legume breeding for pest and disease resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.34, p.195-236, 2015.

SALATINO, A.; SUGAYAMA, R.L.; NEGRI, G.; VILEGAS, W. Effect of constituents of the foliar wax of *Didymopanax vinosum* on the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.86, p.261-266, 1998.

SMITH, C.M.; KHAN, Z.R.; PATHAA, M.D. Techniques for evaluating insect resistance in crop plants. Boca Raton: Lewis, 1994. 320p.

SMITH, M. Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches. Berlin: Springer, 2005. 423p.

STEVENSON, P.C.; MUYINZA, H.; HALL, D.R.; PORTER, E.A.; FARMAN, D.I.; TALWANA, H.; MWANGA, R.O. Chemical basis for resistance in sweetpotato *Ipomoea batatas* to the sweetpotato weevil *Cylas puncticollis*. *Pure and Applied Chemistry*, v.81, p.141–151, 2009

THALER, J.S.; BOSTOCK, R.M. Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. *Ecology*, v.85, p.48-58, 2004.

TORRES, L.C.; SOUZA, B.; AMARAL, B.B.; TANQUE, R.L. Biologia e não-preferência para oviposição por *Bemisia tabaci* (Gennadius)

biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em cultivares de algodoeiro. *Neotropical Entomology*, v.36, p.445-453, 2007.

TOSCANO, L.C.; SANTOS, T.M. dos; BOIÇA JR., A.L. Preferência de *Bemisia tabaci* biótipo B para oviposição em cultivares de algodoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, p.155-160, 2003.

WAR, A.R.; PAURAJ, M.G.; AHMAD, T.; BUHROO, A.A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H.C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, v.7, p.1306-1320, 2012.

WARSCHEFSKY, E.; PENMETSÁ, V.; COOK, D.R.; VON WETTBERG, E.J.B. Back to the wilds: tapping evolutionary adaptations for resilient crops through systematic hybridization with crop wild relatives. *American Journal of Botany*, v.10, p.1791-1800, 2014.

WU, C.; AVILA, C.A.; GOGGIN, F.L. The ethylene response factor Pti5 contributes to potato aphid resistance in tomato independent of ethylene signaling. *Journal of Experimental Botany*, v.66, p. 559–570, 2015.

YANG, T.; BAO, S.Y.; FORD, R.; JIA, T.J.; GUAN, J.P.; HE, J.H.; SUN, S.L.; JIANG, J.Y.; HAO, J.J.; ZHANG, X.Y.; ZONG, X.X. High-throughput novel microsatellite marker of faba bean via next generation sequencing. *BMC Genomics*, v.13, p.602, 2012.

ZHAO, G.; ABLETT, G.R.; ANDERSON, T.R.; RAJCAN, I.; SCHAAFSMA, A.W. Inheritance and genetic mapping of resistance to rhizoctonia root and hypocotyl rot in soybean. *Crop Science*, v.45, p.1441–1447, 2005.

Déficit Hídrico em Plantas Cultivadas

Daniela Silva Souza¹,
Samarina Gabrielle de Fátima Pereira²,
Liliane Evangelista Visôto³

INTRODUÇÃO

Estima-se que até o ano 2025 será necessária a produção de 3,0 bilhões de toneladas de cereais para alimentar cerca de 8,0 bilhões de pessoas, sem contabilizar a demanda por outros tipos de alimentos, tais como fibras, verduras, frutos e óleos, além de energia e madeira. Diante desta perspectiva, acredita-se que o aumento da produtividade das culturas já seja uma obrigatoriedade. Uma das principais formas de obter cultivares mais produtivas é através do desenvolvimento de variedades tolerantes aos diferentes tipos de estresse.

¹ Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Agrárias, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba, MG. E-mail: daniela.s.souza@ufv.br

² Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Agrárias, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba, MG. E-mail: samarina.pereira@ufv.br

³ Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba, MG. E-mail: lvisotto@ufv.br

É considerado estresse, uma condição que inviabiliza as condições vitais primordiais dos seres vivos. As plantas frequentemente se deparam com estressores, os quais são considerados como condições adversas que afetam o crescimento, desenvolvimento e a produtividade. A duração, severidade e o número de exposições na qual o estresse é imposto influenciam diretamente na resposta da planta. A irreversibilidade das alterações provocadas pelo estresse dependerá, além dos fatores mencionados, do genótipo, do tipo de órgão afetado e do estágio de desenvolvimento da planta, conforme representado na Figura 1 (Buchanan et al., 2000).

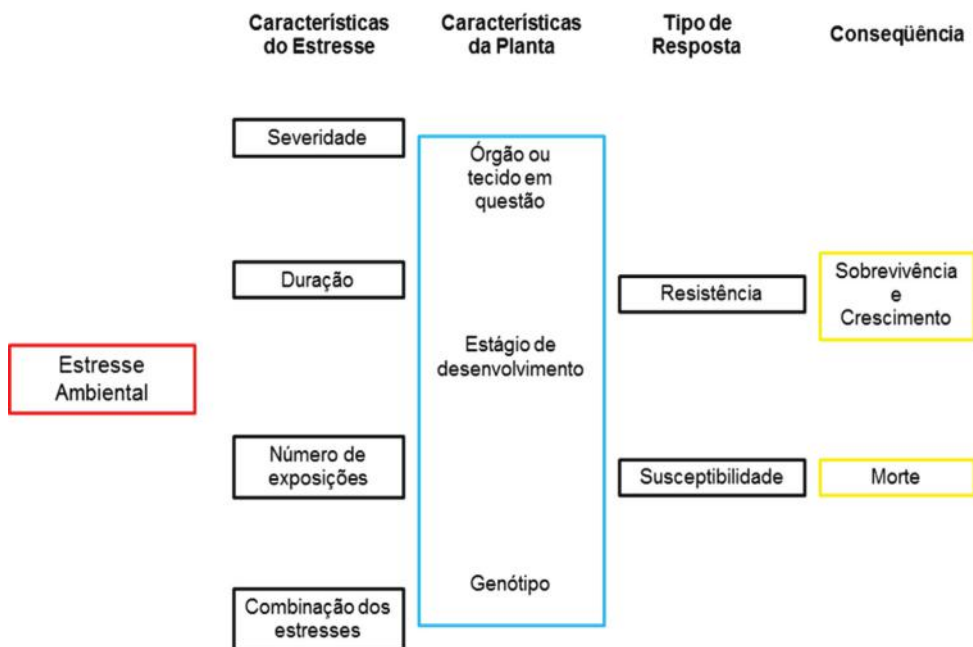


Figura 1. Fatores que determinam como as plantas respondem ao estresse ambiental.

Fonte: adaptação Buchanan et al., 2000.

A planta responde de duas formas ao estresse, através da adaptação ou da aclimação. A adaptação é decorrente da resistência determinada geneticamente ou adquirida, através de um processo de seleção natural ao longo de gerações. Enquanto, a planta aclimatada apresenta tolerância quando submetida à exposição ao agente estressor. Tal capacidade permite que ela suporte um ambiente hostil e sobreviva.

Existem vários tipos de agentes estressores, dentre eles os bióticos e abióticos. É considerado fator biótico aquele provocado por microrganismos (fungos, bactérias, vírus e nematóides), animais (por ex. insetos-praga), outras plantas e de origem antropogênica. Condições ambientais que reduzem o crescimento vegetal e a produtividade abaixo dos níveis ideais são classificadas como fatores abióticos. Dentre as condições ambientais que causam danos as plantas estão a seca, inundação, altas ou baixas temperaturas, salinidade excessiva do solo, solos com deficiência mineral, alta ou baixa incidência de luz e compostos fitotóxicos como espécies químicas reativas.

Os fatores abióticos afetam a bioquímica, fisiologia e o desenvolvimento vegetal. No entanto, existem inúmeros mecanismos de resposta, os quais permitem que as plantas se tornem aptas a sobreviver em circunstâncias adversas. Alterações na expressão gênica e no metabolismo celular são exemplos desses mecanismos (Figura 2).

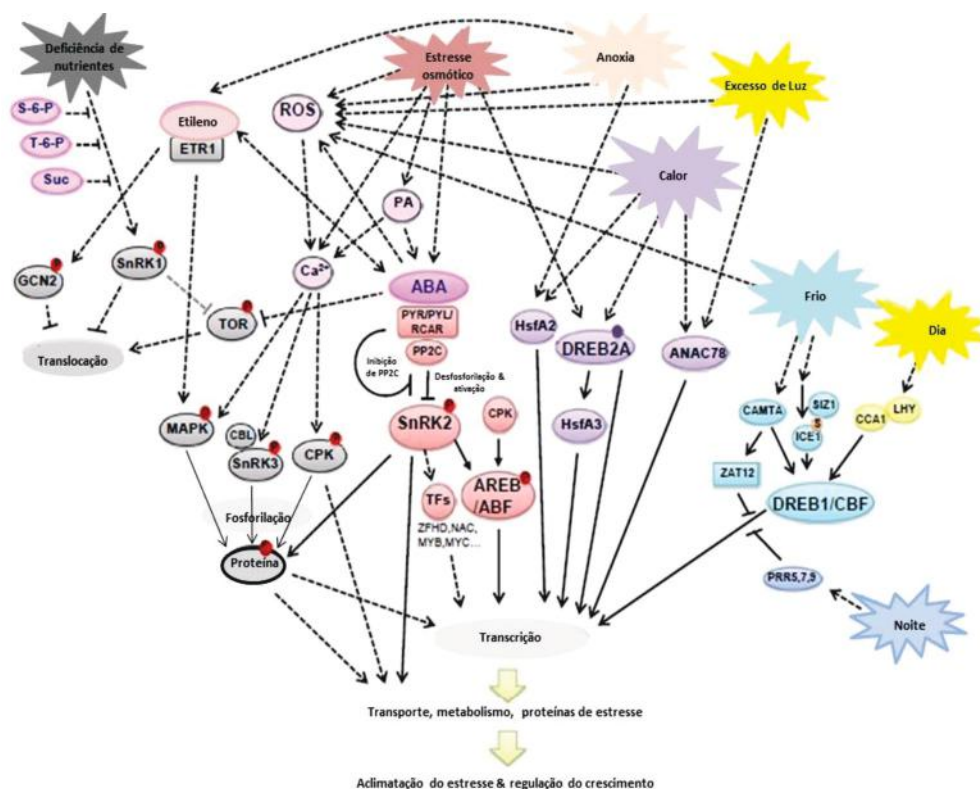


Figura 2. Diferentes estressores abióticos ativam uma rede de sinalização de respostas das plantas. Proteínas fosforiladas têm círculos vermelhos com um P em seu interior. Linhas sólidas representam conexões diretas; linhas pontilhadas representam conexões indiretas (por intermédio de alguma molécula intermediária). Abreviaturas: ABA (ácido abscísico), ANAC (proteína contendo o domínio NAC de Arabidopsis), CAMTA (ativador de transcrição associado à calmodulina), CBL (proteínas sensoras de cálcio do tipo *calcineurina* B), CCA (proteína relacionada ao ciclo circadiano), CPK (proteína quinase dependente de cálcio), DREB / CBF (fator de ligação responsivo à desidratação / fator de

ligação repetição C), ETR1 (resposta ao etileno 1), GCN2 (controle geral não reprimível 2), HSF (fator de choque térmico), ICE (indutor de expressão CBF), MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), LHY (hipocótilo alongado tardiamente), PA (ácido fosfatídico), PP2C (proteína fosfatase 2C), PRR (regulador de pseudo resposta), PIR / PYL / RCAR (receptores de ABA), RNS (espécies reativas de nitrogênio), ROS (espécies reativas de oxigênio), SIZ (SAP e proteína de domínio Miz), SnRKs (sacarose relacionadas a quinase não-fermentadoras-1), TFs (fatores de transcrição), TOR (alvo da rapamicina), ZAT (proteína dedo de zinco).

Fonte: adaptação Cramer et al., 2011.

Apesar da dificuldade em se obter estimativas precisas, quanto aos efeitos dos estresses abióticos sobre a agricultura, é perceptível que estes impactam significativamente a produtividade e por consequência a economia mundial. A porcentagem da área mundial afetada, da área cultivável e o número de publicações científicas relacionadas a tais impactos podem ser observadas na Tabela1.

Tabela 1. Estimativas dos impactos causados por fatores abióticos na produção agrícola

Tipo de estresse	Área terrestre mundialmente afetada* (%)	Área cultivável mundialmente afetada (%)	Número de publicações relacionadas**
Estresse Abiótico		96,5	35.363
Água			4.819
Déficit ou seca	64	16	4.137
Inundações ou anóxia	13	10	682
Temperatura			9.715
Frio	57	26	3.798
Refrigeração	-	-	187
Congelamento	-	-	350
Calor	-	-	5.380
Luz			7.659
Baixa	-	-	3.081
Alta	-	-	4.578
Nutrição do Solo		50	12.391
Sal ou Salinidade	6	6	3.498
Deficiência Mineral ou Baixa Fertilidade	9	39	222
Toxicidade mineral	-	-	437
Acidez do solo	15	-	3.646
Poluição do ar	-	-	-
Ozônio	-	-	1.369
Dióxido de Enxofre	-	-	378
Óxidos de Nitrogênio	-	-	2.001
Elevação de CO ₂	-	-	840
Outros (p. ex. vento, ferimento mecânico)			779

*FAO Relatório de Recursos Mundiais do Solo de 2000 <ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/wsr.pdf>

**Pesquisas no PubMed entre 2001 e 2011

Fonte: adaptação Cramer et al., 2011

Chuvas fortes, grandes secas e ondas intensas de calor ou frio são algumas das consequências das mudanças climáticas. Esses eventos extremos afetam a oferta de água no mundo, o que repercute diretamente no setor agrícola. A água é um recurso essencial e ao

mesmo tempo limitante para a agricultura. Ela constitui grande parte da composição das plantas, cerca de 90% e participa de praticamente todos os processos bioquímicos e fisiológicos. Desempenha o papel de solvente, facilitando o transporte de minerais, gases e outros solutos, além de desempenhar uma função na regulação térmica da planta.

O déficit hídrico é um dos fatores cruciais que afetam o crescimento das plantas e produtividade das culturas em geral. É considerado estado de estresse por escassez hídrica, quando todo o conteúdo de água no tecido ou na célula vegetal está abaixo do conteúdo de máxima hidratação, e após longo tempo, a água não é recuperada.

A ocorrência de veranicos e de previsões ambientais que indicam elevação do aquecimento global nas próximas décadas, onde certamente períodos de seca acompanharão este fenômeno, aumentam a necessidade de desenvolvimento de estratégias que permitam contornar ou condicionar as plantas a tolerar a escassez de água, para que ocorra a manutenção da produção agrícola mundial.

DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS

Desde os antigos povos sumérios, o homem tem procurado uma alternativa mais efetiva do aproveitamento da água para superar os efeitos do déficit hídrico nas plantas. A baixa disponibilidade hídrica é um dos fatores climáticos mais limitantes que afeta o crescimento vegetal e a produtividade agrícola em todo o mundo. No Brasil, parte considerável do território compreende regiões áridas ou semiáridas, as quais possuem um suprimento hídrico relativamente baixo e inadequado para muitas espécies cultiváveis. O cenário atual é caracterizado pelo aquecimento global e aumento dos períodos de seca, comprometendo assim, a produção agrícola.

O suprimento de água para uma determinada cultura resulta de interações que se estabelecem ao longo do sistema solo-planta-atmosfera. As influências recíprocas entre esses componentes básicos tornam o sistema dinâmico e fortemente interligado, de tal forma que a condição hídrica da cultura dependerá sempre da combinação desses três segmentos. À medida que o solo seca, torna-se mais difícil a absorção de água pelas plantas, devido ao aumento da força de retenção e diminuição da disponibilidade de água. Por outro lado, quanto maior for a demanda evaporativa da atmosfera mais elevada será a necessidade do fluxo de água no sistema solo-planta-atmosfera (Santos e Carlesso, 1998). Muitos trabalhos têm procurado definir o limite crítico de água no solo, a partir do qual o desenvolvimento da planta e a produção da cultura são afetados significativamente.

A limitação na área foliar pode ser considerada como a primeira reação das plantas ao déficit hídrico. Ela é um fator essencial à produção por participar diretamente da fotossíntese e determinar o uso da água pelas plantas. A redução do tamanho e número de folhas ocorre em circunstâncias de restrição hídrica, devido à perda de água sofrida pelas mesmas. Já a murcha e/ou enrolamento ocorre devido à redução de turgescência das células.

As raízes também sofrem alterações quando submetidas a um período de restrição de água. Em geral, as plantas investem no desenvolvimento de pêlos radiculares, visando aumentar sua superfície de contato, de modo a tentar absorver mais água das partículas do solo. Além disso, pode ocorrer a indução da expansão do sistema radicular, possibilitando o mesmo atingir regiões mais profundas e úmidas do solo.

A redução da produtividade devido à estiagem tem sido relatada em várias culturas como a soja, o milho, trigo, cevada, arroz, feijão comum e batata. A soja, em comparação a outras

leguminosas, é uma cultura sensível à seca, especialmente durante o período crítico de seu desenvolvimento (Hossain et al.,2014). Os estágios reprodutivos, tais como o início do florescimento (R1), o início do enchimento da vagem (R5), o pleno enchimento da vagem (R6) e a fase de germinação, são extremamente afetados pelo déficit hídrico. A falta de água na fase de florescimento provoca aborto das flores e impede a antese, enquanto durante o período de produção e desenvolvimento das sementes, ela reduz o número e o tamanho das mesmas, devido ao encurtamento da duração desses estágios. A semente de soja deve absorver, no mínimo, 50 % do seu peso em água para uma boa germinação e o conteúdo de água no solo não deve exceder a 85 % do total máximo disponível. Assim, para apresentar um bom desempenho, a cultura da soja necessita de um volume de água adequado e de boa distribuição das chuvas ao longo do ciclo de produção, principalmente durante os períodos mais críticos.

Hossain et al. (2014) estudaram o comportamento de três genótipos de soja, sendo dois considerados tolerantes e um suscetível à seca. Foram avaliadas variáveis fisiológicas dos genótipos e para simular as condições de campo, foi imposta uma secagem progressiva e uma reidratação do solo. Observou-se, com base nos resultados que, os genótipos considerados tolerantes conservaram maiores taxas de expansão foliar, de fotossíntese líquida, de teor relativo de água, de clorofila, além de maior eficiência no uso da água durante a progressiva secagem do solo e subsequente reidratação, quando comparados ao genótipo suscetível. Em contrapartida, a condutância estomática e a taxa de transpiração das plantas tolerantes declinaram mais rapidamente devido à desidratação e recuperaram de forma mais acentuada após a reidratação do que na suscetível. Verificou-se também redução do tamanho das raízes, exceto em um dos genótipos tolerantes. Com base nessas respostas,

sugere-se que cultivares mais tolerantes são capazes de acionar mecanismos que auxiliam as mesmas a passar por uma condição não favorável, nesse caso a seca. Essas regulam a abertura estomática através de sinais químicos, mantendo um maior teor relativo de água nas folhas, taxa fotossintética e ainda são capazes de aumentar o comprimento das raízes.

Em outro trabalho, Faghani et al. (2015) avaliaram possíveis alterações fisiológicas de dois genótipos de trigo submetidos a duas condições de irrigação, 80% e 20% da capacidade de campo. Verificou-se uma redução no conteúdo relativo de água, no comprimento das raízes, na matéria seca das raízes e da parte aérea. Tais resultados comprovaram que a baixa disponibilidade de água afetou diretamente os parâmetros fisiológicos das plantas testadas, (Figura 3).

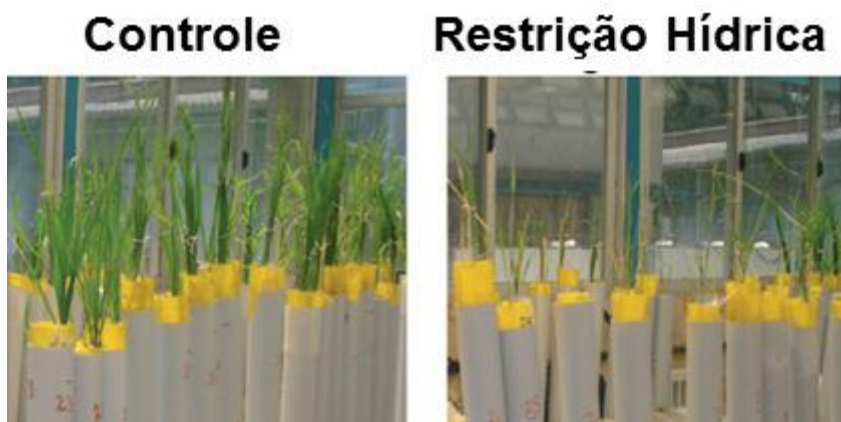


Figura 3. Efeito do déficit hídrico em plantas de trigo irrigadas e não-irrigadas.

Fonte: adaptação Faghani et al., 2015.

Em contrapartida, o déficit hídrico, quando aplicado propositalmente e no momento correto, pode ser benéfico, como

ocorre como café arábica (*Coffea arabica*). Nesta cultura, um dos principais fatores responsáveis pela maturação desuniforme dos frutos são as várias floradas que podem ocorrer ao longo do desenvolvimento. A disponibilidade de água exerce papel fundamental na abertura floral destas plantas, pois elas são estimuladas à antese quando irrigadas. Dessa forma, quando plantas de café arábica são submetidas a um período de déficit imposto de forma controlada, elas apresentam uma intensa florada e por consequência uma uniformidade na maturação dos frutos. Tal procedimento reduz perdas e aumenta a qualidade dos grãos.

RESPOSTAS DAS PLANTAS AO DÉFICIT HÍDRICO

As plantas submetidas à limitação hídrica apresentam alterações em seus processos genéticos, bioquímicos, morfológicos e fisiológicos, que podem ser observados em todos os estados fenológicos e que variam de acordo com a intensidade e a duração do estresse. Características comuns desse estado são redução fotossintética e da transpiração; aumento da respiração; perda do turgor; ajustamento osmótico através do acúmulo de açúcares solúveis e aminoácidos livres; diminuição do alongamento e crescimento celular; diminuição da condutância e fechamento estomático; redução da expansão foliar; aceleração da senescência e da abscisão das folhas (Faghani et al., 2015).

A perda do turgor e o ajustamento osmótico diminuem o potencial hídrico da folha, o que induz o fechamento dos estômatos. Consequentemente, há redução das trocas gasosas o que acarreta a diminuição da transpiração e da fotossíntese, limitando o crescimento e desenvolvimento da planta. O fechamento estomático é mediado pelo ácido abscísico (ABA), um hormônio vegetal, produzido nas raízes da planta estressada, o qual é transportado através do

xilema para as outras partes vegetais (Figura 2). Sua sinalização pode ser rápida, como ocorre no controle da abertura estomática, a qual é mediada pela translocação de íons e transporte de água. Há também uma resposta mais lenta, onde o aumento da síntese de ABA ativa os processos de transcrição, responsáveis por regular o crescimento, a germinação e os mecanismos de proteção vegetal (Faghani et al., 2015).

O ajustamento osmótico é utilizado como critério seletivo para tolerância ao estresse hídrico em espécies de eucalipto, café conilon, citros e cacau. Este ajustamento permite a adaptação das plantas diante a um estresse moderado, possibilitando a manutenção do turgor celular e crescimento, mesmo com reduzido potencial hídrico foliar. A perda do turgor pode ser minimizada pela redução na elasticidade das paredes celulares e diminuição do potencial osmótico resultante do acúmulo de diferentes solutos no simplasma da célula.

O etileno é produzido em vários tecidos vegetais, em especial aqueles que sofrem o processo de envelhecimento ou amadurecimento, exercendo o papel de mediador no processo de senescência. Há relatos que associam o aumento da degradação da clorofila com a produção do etileno. Sua síntese também está relacionada com a resposta a algum fator estressante, como alta temperatura, congelamento, seca, inundação, exposição a produtos químicos e ataque de insetos e patógenos.

A diminuição do processo fotossintético somado ao excesso de excitação de energia no fotosistema II leva ao acúmulo de ROS, causando danos oxidativos a planta. ROS, tais como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e radical OH podem oxidar lipídeos de membrana, inativar enzimas e danificar a estrutura do DNA, ocasionando em muitos casos, a morte celular (Dias et al., 2014). Para minimizar o dano oxidativo, as plantas desenvolveram um sistema antioxidativo altamente eficiente, constituído por enzimas (p. ex. superóxido dismutase, peroxidase e

catalase) e por metabólitos (p. ex. ácido ascórbico, glutatona) que neutralizam os radicais livres e reduzem os danos causados pelas ROS. Além da dissipação de energia e proteção metabólica contra as ROS, as plantas também reduzem o crescimento da parte aérea antes do radicular, incrementando a relação entre raízes e folhas. O déficit hídrico moderado reduz o crescimento foliar antes mesmo de reduzir a taxa fotossintética, de forma a reduzir carboidratos para o sistema radicular.

Muitas rotas metabólicas de resposta ao estresse hídrico estão relacionadas ao aumento da produção de osmólitos, como açúcares solúveis (trealose, sacarose e frutose), açúcares alcoóis, aminoácidos (prolina), ácidos orgânicos, compostos de amônio (poliaminas e glicina betaína) e íons (Ca^{++} , K^+ e Cl^-). O acúmulo de osmoprotetores no interior da planta é considerado um dos principais mecanismos adaptativos de tolerância vegetal ao estresse hídrico e salino. O ajustamento osmótico é um processo de manutenção do potencial hídrico nas células vegetais, durante a limitação de água (Cvikrová et al., 2013).

Akitha & Giridhar (2015) avaliaram a atividade de enzimas antioxidantes, os teores de prolina e o crescimento de duas cultivares de soja sob déficit hídrico. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, sendo todas bem irrigadas até o início do florescimento. Nessa fase, o experimento foi dividido em dois grupos para a imposição do estresse. No grupo 1, as plantas no início do florescimento foram submetidas ao déficit hídrico por cinco dias, em seguida, foi restabelecido o fornecimento de água por dois dias. No grupo 2, as plantas foram bem irrigadas até o estágio R6 (início do enchimento dos grãos), onde a partir desse estágio as plantas foram novamente divididas, em uma parcela cortou-se a irrigação e em outra manteve-se a irrigação. Os resultados demonstraram que, tanto o peso fresco e seco das raízes e da parte aérea de

ambas cultivares, foram reduzidos após cinco dias de estresse e que ao restabelecer a irrigação todas as plantas recuperaram-se parcialmente. Foi observado um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase e glutathiona redutase, nas plantas estressadas de ambas as variedades. Também houve aumento no teor de prolina após cinco dias de estresse e posterior redução após o restabelecimento de água (Figura 4).

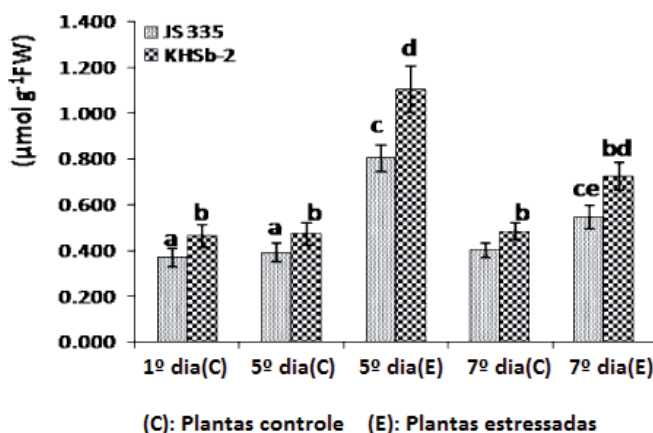


Figura 4. Efeito do déficit hídrico e da sua recuperação sobre o conteúdo de prolina em duas variedades de soja (JS335 e KHSb-2).

Fonte: adaptação Akitha e Giridhar, 2015

As proteínas de membrana são de fundamental importância para manter o funcionamento da célula e a homeostase iônica dos seres-vivos. Há uma diversidade de proteínas que ajudam a manter o gradiente iônico entre o meio intra e extracelular, entre as quais, a H^+ -ATPase e a H^+ -pirofosfatase (H^+ -PPase) tem um

importante destaque. A H^+ -PPase está presente na membrana do vacúolo das células vegetais e sua principal função é transportar H^+ para o lúmem, criando uma força elétron-motriz que impulsiona o transporte secundário de íons e compostos orgânicos. Esta enzima é diferencialmente regulada em condições de estresse conferindo uma maior tolerância das plantas aos fatores bióticos e abióticos (Siqueira et al., 2008).

Estudos observaram que o gene AVP1, codificador da H^+ -PPase, quando super-expresso, estimula o crescimento vegetal via um maior desenvolvimento radicular e, conseqüentemente, maior absorção de água e nutrientes. Park et al. (2005) realizaram estudos de super-expressão do AVP1 vacuolar em um cultivo de tomate. Dados bioquímicos e de transporte confirmaram a expressão funcional da proteína recombinante na linhagem dos tomates transgênicos. Mensurações da atividade hidrolítica da H^+ -PPase do tonoplasto de raízes de duas linhagens representativas (transgênica e controle) mostraram que os transgênicos tiveram em média 56 % de aumento de sua atividade em relação às plantas controle, enquanto a ATPase do tipo V, não sofreu modificações significativas. Em seguida, as plantas foram submetidas ao déficit hídrico, durante um período de 13 dias. Ao final desse período ambas as linhagens foram afetadas pela seca, no entanto, as plantas transgênicas demonstraram recuperação após o alívio do estresse hídrico (Park et al. 2005; Siqueira et al., 2008).

Outras pesquisas relatam que o déficit hídrico é responsável pela ativação de vias de sinalização que culminam na expressão de chaperones moleculares relacionadas à manutenção da homeostase do retículo endoplasmático (RE). Dentre os estudos sobre o papel destas proteínas durante a resposta ao estresse hídrico, foi verificado que a chaperone molecular BiP (binding protein), residente no retículo endoplasmático, determina uma maior tolerância à seca

quando expressa constitutivamente em *Nicotiana tabacum* (Alvim et al., 2001). Valente et al. (2009) descobriram que a superexpressão de BiP em soja (*Glycine max*), assim como em tabaco, também determina uma maior tolerância ao estresse causado por déficit hídrico. Os autores sugeriram que possivelmente, BiP atuaria atrasando o processo de senescência foliar causada por este estresse.

Existem espécies vegetais que são naturalmente adaptadas à seca, como é o caso do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). Essa oleaginosa é capaz de se desenvolver em várias condições edafoclimáticas, incluindo regiões semiáridas, onde é baixo o índice de pluviosidade. No entanto, pouco se sabe sobre as estratégias de tolerância do pinhão manso ao déficit hídrico. Alguns poucos trabalhos relatam que essa espécie diminui a taxa respiratória mantendo a hidratação dos tecidos através da água armazenada no caule suculento, retardando assim o processo de desidratação (Matos et al., 2014). Outro estudo sugere que o déficit hídrico imposto a esta planta limitou a carboxilação e a assimilação de CO₂, devido o fechamento estomático e aumentou o conteúdo dos açúcares redutores e sacarose. O que era de se esperar, já que os carboidratos desempenham papel fundamental na regulação osmótica na planta, quando em situação de estresse por déficit hídrico (Silva et al., 2012).

ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAR O EFEITO DO DÉFICIT HÍDRICO E OBTER PLANTAS TOLERANTES

O déficit hídrico é um dos principais fatores ambientais que afetam negativamente o desenvolvimento da planta e a produtividade. Infelizmente, o cenário atual prevê longos períodos de estiagem e seca, fatores que afetarão diretamente a produção de alimentos a nível mundial. Estima-se que 45% das terras agricultáveis serão

expostas a contínuos períodos de ausência de chuva e é esperado que esse cenário aumente até o final desse século (DIAS et al, 2014).

Alguns procedimentos e técnicas tradicionais são utilizados para reduzir o efeito do estresse hídrico na agricultura, dentre eles:

Uso de telas de sombreamento: podem auxiliar na redução dos efeitos causados pela deficiência hídrica.

Nutrição adequada: sabe-se que plantas com uma nutrição balanceada respondem melhor a qualquer tipo de adversidade. Alguns nutrientes, como o potássio, podem auxiliar na regulação da transpiração vegetal, reduzindo perdas de água.

Uso de biorreguladores: substâncias que alteraram o desenvolvimento e a fisiologia das plantas, como a citocinina, a giberelina e a auxina, em combinações e doses ajustadas, podem prevenir e/ou diminuir as implicações da deficiência hídrica sobre as culturas, reduzindo as perdas na produtividade.

Manejo: em regiões que tenham um histórico de pouca chuva pode-se utilizar a irrigação para minimizar os danos, já em regiões muito quentes, com elevada luminosidade, deve-se usar um espaçamento mais adensado, aumentando o auto-sombreamento da cultura, podendo reduzir a perda de água por evaporação.

Escolha da cultivar: o conhecimento das características de cada variedade é essencial, já que existem cultivares mais resistentes e outras mais suscetíveis à seca.

Embora esses procedimentos minimizem os danos causados

pelo déficit hídrico e auxiliem na manutenção do índice de produtividade da cultura, várias estratégias avançadas de mitigação estão sendo desenvolvidas a fim de driblar esse problema e obter plantas mais tolerantes ao déficit hídrico.

Irrigação

Áreas onde a água é considerada o principal fator restritivo é necessário que haja a máxima produção por unidade de água aplicada. Uma das maneiras de se alcançar tal recomendação é adequar a irrigação aos períodos críticos de déficit hídrico. A maioria dos métodos se baseia na evapotranspiração e na transpiração vegetal. Estas podem ser estimadas por meio dos parâmetros fisiológicos, como diferença de concentração de CO₂ e vapor de água e pelo fluxo de seiva no xilema.

Neste cenário, técnicas de irrigação denominadas irrigação com déficit controlado (*Regulated deficit irrigation* – RDI) e irrigação com secagem parcial da zona radicular (*Partial Rootzone Drying* - PRD) podem ser destacados. A técnica de RDI foi inicialmente aplicada em pomares de pessegueiros e pereiras para controlar crescimento vegetativo e reprodutivo através do estresse hídrico nas fases essenciais do desenvolvimento dos frutos. RDI é uma técnica de manejo de irrigação que consiste na aplicação de irrigação com déficit em fases de desenvolvimento da planta em que o crescimento e a qualidade dos frutos têm baixa sensibilidade ao déficit hídrico, ou seja, a irrigação é realizada a taxas menores do que a evapotranspiração (DeJonge et al., 2015).

O monitoramento do estresse hídrico é essencial para otimizar o rendimento da cultura sob RDI e muitas vezes exige um elevado número de sensores, para que este seja contínuo e preciso a despeito do estado da água do solo e da cultura. Um método não destrutivo ideal para monitorar o estresse hídrico é a termometria

infravermelha. Esta técnica é escalonável a plantas individuais a campos inteiros, podendo ser mensurada de forma contínua, além de apresentar como vantagem o custo em relação à muitos métodos alternativos (DeJonge et al., 2015).

A irrigação lateralmente alternada (PRD), referida no Brasil como irrigação com secamento parcial do sistema radicular ou irrigação com secagem parcial da zona radicular consiste na irrigação alternada de lados diferentes de uma planta em frequências que dependem do sistema solo-planta-atmosfera. Esta técnica permite que haja heterogeneidade hídrica no solo, independente das distintas partes do sistema radicular, havendo uma conservação de maior quantidade de água nas camadas mais profundas do perfil do solo. A PRD é uma alternativa promissora por ser econômica quanto ao uso da água e atender aos requisitos do mercado atual.

Engenharia genética

Genes ativados por fatores ambientais, como a seca, induzem respostas moleculares, metabólicas e fisiológicas nas plantas. Pesquisas sobre seleção de plantas tolerantes ao estresse hídrico vêm sendo realizadas, com o intuito de adaptar as culturas ao cenário atual de mudanças climáticas. Esta seleção é embasada em estudos de fenotipagem, que têm por objetivo validar caracteres morfológicos, bioquímicos e moleculares relacionados com a resistência à seca em materiais disponíveis em bancos de germoplasma; avaliar a expressão desses caracteres nas coleções de germoplasma; identificar as melhores fontes e proporcionar subsídio para estudos genômicos. Outro enfoque é o mapeamento genético para tolerância ao estresse por déficit hídrico, que pode ser utilizado em estratégias de seleção assistida por marcadores. O seqüenciamento completo do genoma de várias espécies, a compreensão da função de um gene específico e sua interação com

outros tem permitido aos pesquisadores entender a complexa malha de respostas que as plantas utilizam para se proteger dos estresses ambientais (Nepomuceno et al., 2010).

Foram identificadas em *Arabidopsis thaliana* proteínas de ligação ao elemento responsivo à desidratação (*Dehydration responsive element binding proteins* – DREB), uma ampla família de fatores de transcrição que induzem a expressão de inúmeros genes que aumentam a resistência das plantas ao estresse. As proteínas DREB atuam no topo da cascata de eventos moleculares, induzindo respostas de defesa contra a desidratação celular. Genes homólogos a essa família já foram identificados em outras espécies, como canola, cevada, trigo, arroz, soja e milho. A proteína DREB1A atua como um fator de transcrição e possui em sua estrutura o domínio ERF/ AP2 (*ethylene responsive factor* – fator responsivo ao etileno/ APETALA) que interage especificamente com uma região conservada denominada DRE (*Dehydration Responsive Element* – elemento responsivo à desidratação), um elemento *cis*-atuante presente na região promotora de vários genes ativados durante condições de seca (Nepomuceno et al., 2010).

A Embrapa conseguiu um resultado extremamente promissor para a cotonicultura no Brasil: a obtenção de plantas geneticamente modificadas (GM) de algodão com maior capacidade de tolerar os longos períodos de veranico e seca a que são submetidas no bioma Cerrado, principal região produtora do país. A conquista é decorrente da introdução de um gene denominado *dreb* em plantas de algodão. O gene *dreb* está diretamente ligado à expressão de proteínas e a sua principal vantagem é a capacidade de ativar outros genes responsáveis pela proteção das estruturas celulares durante o déficit hídrico. Nos testes, as plantas foram submetidas à retenção de água nas casas de vegetação e mostraram maior desenvolvimento de parte aérea e raiz, assim como aumento de 26 % na manutenção

de suas estruturas reprodutivas (botões florais, flores e frutos) em relação às plantas não transgênicas sujeitas às mesmas condições de estresse hídrico. As raízes das plantas GM alcançaram o dobro da profundidade, comparadas às plantas convencionais, aumentando a absorção e retenção de água para enfrentar o estresse hídrico. Essa característica é extremamente vantajosa para as condições dos solos de Cerrado, que são do tipo latossolos profundos, com boa capacidade de armazenamento de água, o que favorece a seleção de plantas com sistema radicular mais desenvolvido. O próximo passo será solicitar à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança autorização para testar a variedade no campo (EMBRAPA, 2015)

A manipulação de genes associados à produção de osmoprotetores também tem sido utilizada como uma alternativa para aumentar a tolerância ao estresse em plantas cultivadas. A elevação da concentração de prolina ocorre naturalmente, através da síntese *de novo* e da supressão da oxidação desse aminoácido. Outra forma de obter plantas com elevado nível de prolina é através da superexpressão do gene Δ^1 -*pirrolina-5-carboxilato sintetase(s)* (P5CS). No entanto, a proteína nativa P5CS sofre retroinibição pelo seu produto (prolina). Essa inibição pode ser contornada por mutagênese sítio dirigida. Tal objetivo foi alcançado na proteína P5CS de *Vigna aconitifolia*, onde um resíduo de fenilalanina na posição 129 foi substituído por uma alanina. Utilizando esse constructo, plantas de tabaco com altos níveis de prolina foram obtidas (Cvikrová et al., 2013).

Outro grupo de substâncias osmoticamente ativas no processo de tolerância a seca é o das poliaminas (PAs). As PAs atuam no ajuste osmótico, na manutenção da estabilidade da membrana e na eliminação de radicais livres (Cvikrová et al., 2013). A expressão de diversos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo das PAs tem sido analisadas sob várias condições de estresse. A

biossíntese das três principais PAs – putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) é iniciada pela descarboxilação da ornitina, pela enzima ornitina descarboxilase ou pela descarboxilação da arginina pela arginina descarboxilase. Outra enzima essencial na síntese das PAs é a S-adenosilmetionina descarboxilase, responsável pela produção do grupo aminopropilo, encontrado na Spd e Spm. Há relatos de que plantas tolerantes ao estresse são capazes de aumentar os níveis endógenos das PAs em resposta as condições adversas, duas a três vezes mais, quando comparadas a plantas susceptíveis (Cvikrová et al., 2013).

Análise proteômica

Análises proteômicas têm sido utilizadas para obter conhecimentos mais aprofundados acerca dos processos biológicos que ocorrem em plantas submetidas a estresses bióticos e abióticos. Dos inúmeros fatores de estresse, o déficit hídrico é o segundo mais estudado a nível proteômico e dentre as proteínas expressas diferencialmente em resposta aos estresses, aquelas envolvidas com a tolerância ao estresse oxidativo são as mais abundantes.

A proteômica tem por objetivo avaliar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e mecanismos regulatórios. O estudo da expressão proteica global é a abordagem proteômica mais comumente aplicada e envolve a criação de mapas quantitativos das proteínas expressas de extratos de células ou tecidos em resposta a um determinado fator ambiental. Estes perfis proteicos, expressos sob diferentes condições fisiológicas, são então comparados.

Para a realização da mesma, é utilizada a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), a qual separa as proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico e peso molecular; a espectrometria de massa (MS) para *fingerprinting* e sequenciamento

parcial de proteínas. A espectrometria de massa permite a identificação das proteínas diferenciais, as quais são comparadas em um banco de dados de massas de fragmentos de proteínas, conhecidas *à priori*, de um mesmo organismo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estresses abióticos são motivos de grande preocupação para a agricultura, devido ao comprometimento da produtividade das culturas e lucratividade. Dentre eles se destaca o estresse hídrico. A seca é um problema real, que pode ser contornada através do desenvolvimento e uso de estratégias que minimizem os seus efeitos. Vários procedimentos devem ser considerados visando capacitar as plantas a tolerar períodos de imposição de déficit hídrico.

Deve-se ressaltar que para contornar condições ambientais adversas, como a seca, várias práticas agronômicas devem ser utilizadas em conjunto. Ao agricultor, maior beneficiário das tecnologias desenvolvidas com a manipulação genética, recomenda-se o uso de variedades mais tolerantes, aliado ao correto manejo das lavouras, através de práticas agrícolas sustentáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKITHA, M.K.; GIRIDHAR, P. Variations in physiological response, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities, proline and isoflavones content in soybean varieties subjected to drought stress. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.85, p.35-44, 2015.

ALVIM, F.C.; CAROLINO, S.M.B.; CASCARDO J.C.M.; NUNES, C.C.; MARTINEZ, C.A.; OTONI, W.C.; FONTES, E.P.B. Enhanced

accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiology*, v.126, p.1042-1054, 2001.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*

ASPP, 2000, 1367p.

CRAMER, G.R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, v.11(163), p.1-14, 2011.

CVIKROVÁ, M.; GEMPERLOVÁ, L.; MARTINCOVÁ, O.; VANKOVÁ, R. Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.73, p.7-15, 2013.

DEJONGE, K.C.; TAGHVAEIAN, S.; TROUT, T.J.; COMAS, L.H. Comparison of canopy temperature-based water stress indices for maize. *Agricultural Water Management*, v.156, p. 51-62, 2015.

DIAS, M.C.; OLIVEIRA, H.; COSTA, A.; SANTOS, C. Improving elms performance under drought stress: The pretreatment with abscisic acid. *Environmental and Experimental Botany*, v.100, p.64-73, 2014.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. EMBRAPA começa a testar um novo algodão tolerante a seca. Notícias 11/08/15. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/4350457/embrapa-comeca-a-testar-novo-algodao-tolerante-a-seca>. Acesso em: 28 set. 2015.

FAGHANI, E.; GHARECHAH, J.; KOMATSU, S.; MIRZAEI, M.; KHAVARINEJAD, R.A.; NAJAFI, F.; FARSA, L.K.; SALEKDEH, G.H. Comparative physiology and proteomic analysis of two wheat

genotypes contrasting in drought tolerance. *Journal of Proteomics*, v.114, p.1-15, 2015.

HOSSAIN, M.; LIU, X.; QI, X.; LAM, H.; ZHANG, J. Differences between soybean genotypes in physiological response to sequential soil drying and rewetting. *The Crop Journal*, v.2, p.366-380, 2014.

MATOS, F.S.; JUNIOR, H.D.T.; ROSA, V.R.; SANTOS, P.G.F.; BORGES, L.F.O.; RIBEIRO, R.P.; NEVES, T.G.; CRUVINEL, C.K.L. Estratégia morfofisiológica de tolerância ao déficit hídrico de mudas de pinhão manso. *Magistra*, v.26, p.19-27, 2014.

NEPOMUCENO, A.L.; FUGANTI, L.; KANAMORI, N.; PEREIRA, S.S.; RODRIGUES, F.A.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.B.; MARCELINO, F.C. Estratégias de engenharia genética para tolerância à seca em plantas através da expressão de fatores de transcrição. In: SIMPÓSIO SOBRE TOLERÂNCIA À DEFICIÊNCIA HÍDRICA EM PLANTAS, 2010, Goiânia. Anais. Goiânia: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Arroz e Feijão Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2010, p.103-109.

PARK, S.; PITTMAN, J.K.; BERKOWITZ, G.A.; YANG, H.; UNDURRAGA, S.; MORRIS, J.; HIRSCHI, K.D.; GAXIOLA, R.A. Up-regulation of H⁺-pyrophosphatase (H⁺-Ppase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.102, p.18830-18835, 2005.

SANTOS, R.F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.2, p.287-294, 1998.

SILVA, E.N.; RIBEIRO, R.V.; FERREIRA-SILVA, S.L.; VIEIRA, S.A.; PONTE, L.F.A.; SILVEIRA, J.A.G. Coordinate changes in photosynthesis, sugar accumulation and antioxidative enzymes

improve the performance of *Jatropha curcas* plants under drought stress. Biomass and Bioenergy. v.45, p.270-279, 2012.

SIQUEIRA, A.F.; CRUZ, Z.M.A.; QUEIROZ, S.; ROCHA, O.J.A.M.; SOARES, D.N.E.S.; RAMOS, A.C. Desvendando a H⁺-Pirofosfatase vacuolar e seu papel na biotecnologia vegetal. Natureza on line, v.6(1), p.9-15, 2008.

VALENTE, M.A.S.; FARIA, J.A.Q.A.; RAMOS, J.R.L.S.; REIS, P.A.B.; PINHEIRO, G.L.; PIOVESAN, N.D.; MORAIS, A.T.; MENEZES, C.C.; CANO, M.A.O.; FIETTO, L.G.; LOUREIRO, M.E.; ARAGÃO, F.J.L.; FONTES, E.P.B. The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. Journal of Experimental Botany, v.60, p.533-546, 2009.

Metabolômica na produção vegetal

Danilo C. Centeno¹ e João Paulo Naldi Silva¹

METABOLÔMICA: HISTÓRICO, DEFINIÇÃO E APLICAÇÕES

Durante o processo evolutivo e de diversificação vegetal, uma série de perdas e aquisições de mecanismos de sobrevivência ocorreram, dependendo do local e, portanto, das condições ambientais em que os organismos se encontravam. Desta forma, a seleção natural apontada por Darwin acabou por levar ao cenário encontrado hoje na natureza. Neste contexto, algumas moléculas (metabólitos) presentes nos organismos vegetais foram mantidas ao longo de todo o processo evolutivo por serem essenciais para que estes organismos completem seu ciclo de vida. Estes são os chamados metabólitos primários e incluem açúcares, amino ácidos, ácidos orgânicos, nucleotídeos, lipídeos entre outros. Estes metabólitos contribuem, entretanto, para uma pequena parte da variedade de metabólitos encontrados em plantas. A maior fatia das cerca de 200.000 moléculas estimadas em plantas está relacionada

¹ Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC (UFABC), Rua Arcturus 03, CEP 09606-070, São Bernardo do Campo, SP, Brasil.

à presença de outros metabólitos, que não estão obrigatoriamente presentes em todos os organismos, mas tem papel importante também na propagação das espécies. Estes são ditos metabólitos secundários, ou especiais, e compreendem compostos nitrogenados, fenólicos e terpenos. Embora classificados mais por uma questão didática, é difícil as vezes separar estas duas classes, principalmente considerando uma visão mais ampla do metabolismo, onde todas as vias metabólicas estão de certa forma conectadas.

Entretanto, considerando o surgimento da agricultura, há cerca de 10.000 anos, o processo seletivo foi direcionado para características de interesse humano. Dentre estes interesses podemos ressaltar alguns deles que serão abordados neste capítulo, como aspectos morfológicos e estruturais das espécies hoje cultivadas, alterações fisiológicas, que possam resultar em aumento de produtividade, ou ainda bioquímicas, que em última instância modificam não somente o comportamento no campo, mas também podem influenciar no sucesso das espécies em ambientes inicialmente adversos. Neste último ponto é que se enquadra mais precisamente a metabolômica.

A metabolômica pode ser definida como uma ferramenta analítica voltada para a compreensão das variações qualitativas e quantitativas de metabólitos em tecidos, órgãos ou organismos como um todo (Hall 2011). Em plantas, tem sido estudada em diversos aspectos dependendo da pergunta formulada inicialmente. Embora esta técnica tenha sido idealizada e usada de forma a diminuir o viés das análises, os modos para se alcançar os resultados e, posteriormente, a interpretação dos mesmos são bastante complexos.

Se tomarmos a definição descrita por Hall (2011), a metabolômica em uma visão mais simplista vem sendo já considerada há milênios. Ainda que inconscientemente, as espécies eram selecionadas pelo homem de acordo com a sua composição química.

Por exemplo, dentre as espécies vegetais conhecidas, algumas eram consideradas plantas tóxicas e sua alimentação era evitada. Por outro lado, outras espécies eram usadas como remédios, curativos ou até mesmo veneno. A preocupação com o entendimento, ainda que inconsciente, da metabolômica, data, portanto, desde o princípio da identificação das plantas.

No contexto mais aplicado dos últimos anos, tanto no sentido de pesquisa científica para geração de conhecimento básico, como para a produção vegetal, a metabolômica em “larga escala” assume maior importância. As novas tecnologias de sequenciamento que surgiram nas últimas décadas permitiram avançar no sentido de compreender as diferenças genéticas entre as espécies (genômica). Da mesma forma o avanço da tecnologia permite hoje análises em larga escala dos transcritos originados a partir de genes contidos nas diferentes espécies (transcriptômica), assim como da tradução destes transcritos em proteínas, as quais são também passíveis de serem analisadas em larga escala (proteômica). A relação destas análises com a metabolômica se dá pelo fato de que proteínas incluem enzimas, as quais usam em última instância alguns metabólitos (substratos), produzindo outros metabólitos (produtos). Considerando ainda que metabólitos são responsáveis em muitas vezes pela acidez, doçura, coloração ou aroma de um tecido ou órgão vegetal, estes estão em uma das extremidades do processo de desenvolvimento, quando abordamos estes eventos de uma forma sistêmica. Além disso, eventos externos à natureza dos organismos, como variações no ambiente em que se encontram, acabam resultando também em alterações no metaboloma (conjunto de metabólitos da planta). Desta maneira, podemos considerar a metabolômica como sendo o tipo de análise mais próxima do fenótipo propriamente dito (Figura 1).

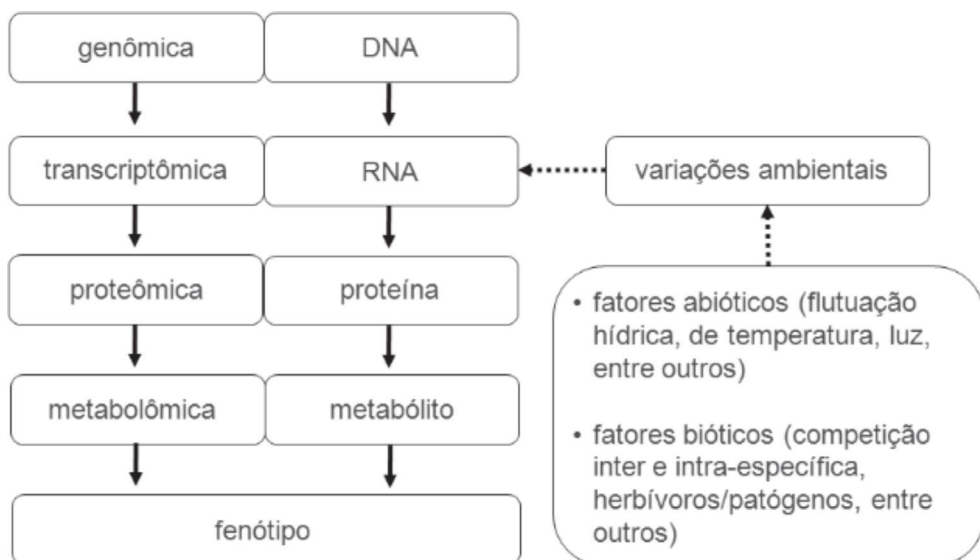


Figura 1. Fluxograma das plataformas analíticas e respectivos eventos moleculares.

O primeiro trabalho descrito utilizando de fato a ferramenta metabolômica em larga escala foi descrito pelo grupo de Linus Pauling, na década de 70. Embora o nome ainda não tivesse sido cunhado na ocasião, o trabalho focou na análise de metabólitos em larga escala na urina e sangue humano. Entretanto, a primeira abordagem sobre metaboloma, aparecendo como uma analogia às análises de genoma, transcriptoma e proteoma, foi colocada por Oliver et al. (1998), onde a ideia era justamente uma análise funcional e sistemática do genoma de leveduras.

A partir de então, o uso da ferramenta passou a ser utilizada em diferentes aspectos, e não apenas na análise funcional de genes. Dentro desta ideia, o termo metaboloma de plantas englobaria todos metabólitos de baixo peso molecular encontrados em uma determinada espécie vegetal que faça parte do seu desenvolvimento natural ou ainda que tenha sido induzido por fatores externos. Estes

metabólitos estão, entretanto, restritos a tamanhos de até 1500 Da, embora algumas técnicas sejam ainda mais restritivas. Dentre eles se encontram tanto metabólitos primários quanto secundários.

Embora a ideia de metabolômica envolva uma análise imparcial dos metabólitos, os chamados *fingerprints* metabólicos (análise qualitativa dos metabólitos) e perfis metabólicos (análise qualitativa e quantitativa) são de certa forma direcionados durante o processo de preparo das amostras e nas técnicas utilizadas para obtenção dos resultados. Uma análise geral de todos os metabólitos acaba sendo uma tarefa complexa, uma vez que estes possuem características diferentes, como estabilidade, polaridade e peso molecular, o que requer para sua extração métodos e solventes mais específicos. Pode-se dizer com isso que o aumento da cobertura de metabólitos analisados resulta em diminuição da exatidão dos resultados. Desta maneira, ao final acaba-se tendo, na maioria dos casos, uma análise mais voltada para determinados grupos de metabólitos. Por isso, diferentes técnicas podem ser complementares para se ter uma ideia mais global a respeito do metaboloma de plantas.

TÉCNICAS EMPREGADAS NA METABOLÔMICA DE PLANTAS

Alguns dos métodos mais utilizados para a detecção de metabólitos envolvem basicamente a separação por cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida (CL) e subsequente espectrometria de massas (EM) das moléculas separadas. Estas técnicas colocadas neste texto de forma simples podem ainda ter algumas especificidades, dependendo dos grupos de substâncias que se pretende analisar. A espectrometria de massas, de uma forma geral, permite a obtenção de informações estruturais de partes das moléculas ou ainda a respeito do peso molecular, o que facilita a identificação mais precisa, sem que seja necessário um

padrão conhecido (comercial) do metabólito analisado. Entretanto, nem sempre estas técnicas são suficientes para identificação dos metabólitos, principalmente se tratando de substâncias desconhecidas. Desta maneira, a técnica de ressonância magnética nuclear (NMR) é de grande importância, devido à capacidade de determinar a estrutura molecular dos metabólitos presentes numa amostra sem que estes sejam quebrados por métodos destrutivos como EM.

Experimentos de metabolômica baseados em espectrometria de massa utilizando as técnicas em separado podem ser realizados por três abordagens: 1) não-alvo, o perfil metabólico em que a identidade e a quantidade relativa são obtidos de tantos metabólitos quanto possível; 2) criação de perfis alvo onde a quantidade absoluta de um conjunto menor de metabólitos pré-selecionados, tipicamente relacionados por semelhança química ou biológica, são obtidos usando padrões internos e compostos de referência; e 3) *fingerprint* metabólico, onde uma fotografia global do metabolismo é adquirido e comparado sem realizar a quantificação e identificação química.

Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

A espectrometria de massa acoplada à cromatografia gasosa (CG-EM) tem sido amplamente aplicada no campo da metabolômica. O sucesso dessa aplicação se dá pela obtenção de fragmentos de metabólitos durante o processo de análise, com informações importantes a respeito da estrutura química, gerados pela fragmentação dos metabólitos. Ela consiste em uma técnica robusta e reproduzível, permitindo com que os espectros de massa gerados possam ser comparados e identificados com espectros de moléculas presentes em bibliotecas. No entanto, esse método

é menos compatível com compostos não voláteis e termo lábeis. Como resultado, métodos de derivatização foram desenvolvidos para tornar os metabólitos menos polares, mais voláteis termicamente estáveis. Ainda, devido à grande energia aplicada na técnica para a fragmentação dos metabólitos, o íon molecular, correspondente à massa molecular, não é identificado na maioria das vezes.

Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM)

Uma alternativa às desvantagens do método de CG-EM é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM). A CL-EM permite a identificação e quantificação de compostos de alta polaridade e baixa volatilidade. A análise do metaboloma baseada em CL-EM é, geralmente, realizada utilizando técnicas de ionização mais brandas, não causando fragmentação como pela técnica de CG-EM, sendo possível a identificação da massa molecular que, a depender do equipamento, pode ter baixa ou alta resolução (massa molecular exata). Isso é de especial importância para análise de substâncias mais complexas e desconhecidas. LC-MS combina alta sensibilidade e uma abordagem não direcionada para proporcionar um processo ideal para análise de grandes variedades de metabólitos não-voláteis.

Ressonância Magnética Nuclear (MNR)

Ressonância magnética nuclear é uma técnica analítica baseada em um forte campo magnético, em que os átomos com o momento magnético não nulo absorvem e re-emitem radiação eletromagnética. A radiação é caracterizada pela sua frequência (ressonância) e depende não apenas da intensidade do campo magnético, mas também dos isótopos dos átomos analisados. No entanto, NMR é menos sensível do que as abordagens baseadas em

EM, porém de bastante importância para conhecimento estrutural, principalmente de novos compostos.

APLICAÇÕES NA PRODUÇÃO VEGETAL

O uso da metabolômica tem sido voltado para espécies cultivadas, seja para aumento da qualidade do produto final ou para aumento da produtividade como um todo. Entretanto, ultimamente tem-se dado especial atenção para outras espécies, as quais produzem metabólitos de interesse cosmético e farmacêutico, ainda que em menor escala.

A metabolômica aplicada à produção vegetal pode ter um aspecto bastante prático. Moléculas associadas ao metabolismo primário de frutos, por exemplo, possuem correlações significativas com aspectos não apenas relacionados à produção de tomates, como peso, comprimento e largura do fruto, mas também à qualidade dos frutos, como °Brix e número de sementes por fruto/planta (Schauer et al., 2006). Isso é de especial importância quando considerado o fato de terem sido observadas alterações nestes metabólitos em várias linhagens obtidas por método de introgressão nos tomates. Considerando este aspecto, a busca destes marcadores pode direcionar o tipo de cruzamento a ser feito para melhoria da qualidade de frutos.

Outro ponto que merece destaque é a busca pelo aumento de biomassa de plantas, que tem recebido bastante atenção nos últimos anos devido à crescente demanda energética mundial. Com este propósito, Meyer et al. (2007) analisou o perfil metabólico de populações de linhagens recombinantes da espécie modelo *Arabidopsisthaliana*, que mostrou forte correlação entre o acúmulo de biomassa e alguns metabólitos primários. Isso aponta que, apesar de não ser encontrado um marcador único específico para o

crescimento de organismos vegetais, o padrão de variação de um conjunto de metabólitos pode ser tomado para prever alterações na biomassa final.

Ainda dentro deste contexto alguns trabalhos iniciais estão sendo focados no metaboloma de gramíneas, especialmente aquelas com metabolismo fotossintético C₄, como a cana-de-açúcar. Trabalhos preliminares em nosso grupo, mostram que os perfis metabólicos de diferentes variedades de cana-de-açúcar, por exemplo, são bastante distintos entre elas. Isso é ainda mais interessante pelo fato de estas variedades possuírem tempo de colheita diferentes, sendo algumas mais tardias e outras precoces. As variações no metaboloma neste caso, não ficam restritas apenas ao metabólito chave para o melhoramento da cana (i.e., sacarose), mas as alterações são relacionadas, novamente, a um conjunto de metabólitos.

Desta maneira, independente do foco, um programa de melhoramento pode ser "assistido metabolicamente", de modo a identificar possíveis marcadores ou padrões de mudanças metabólicas relacionadas ao alvo que se deseja atingir. No sentido de facilitar a identificação e comparação dos metabólitos presentes em diferentes espécies, bancos de dados vem sendo alimentados com informações sobre o metaboloma e rotas metabólicas de diferentes espécies, como o MetaCyc, MetaCrop, KEGG, entre outros (Fiehn et al., 2011).

A importância da análise sistêmica na genética funcional também tem sido evidenciada em plantas nos últimos anos. Logo após a introdução desta abordagem em leveduras, trabalhos com o mesmo enfoque, porém considerando culturas de grande importância econômica, foram iniciados. Em tomate, Carrari et al. (2006) mostraram correlações positivas entre o metaboloma e o transcriptoma de frutos durante a maturação. Entretanto, este tipo de análise permitiu identificar ainda grupos de metabólitos

que não possuem esta correlação, indicando uma regulação pós-transcricional. Este tipo de análise permite, por exemplo, distinguir os potenciais alvos para a manipulação genética do tomateiro daqueles que não teriam efeito direto pela alteração da expressão de genes específicos. O metaboloma, sendo considerado mais próximo do fenótipo do que o próprio transcriptoma, pode ser, portanto, uma técnica marcadora para possíveis aplicações biotecnológicas.

DIAGNÓSTICOS DO DESENVOLVIMENTO VEGETAL A PARTIR DOS METABÓLITOS

O desenvolvimento de frutos e sementes, assim como o amadurecimento, a vida útil pós colheita e a longevidade, são todos definidos por mudanças coordenadas e programadas na composição de metabólitos. Isso torna promissor o emprego da metabolômica nestes processos para plantas cultivadas, pois é durante o desenvolvimento que diversas características importantes como o valor nutricional, sabor, coloração e a resistência a estresse biótico e abiótico, são adquiridas.

Apesar de ser bem estabelecido o conhecimento dos fatores genéticos e hormonais que estariam por trás do desenvolvimento de frutos carnosos, as mudanças metabólicas que levam ao amadurecimento eram pouco compreendidas até o uso da metabolômica. A cultura do tomate (*Solanumlycopersicum*) foi uma das primeiras a ter sido avaliada utilizando esta ferramenta. Sua importância como parte na dieta humana levou a intensas buscas de como se estabeleceria o controle metabólico do amadurecimento desses frutos.

Os resultados destes trabalhos evidenciaram que este controle estaria em alterações no fluxo metabólico em etapas particulares do desenvolvimento, como a redução geral da atividade do metabolismo

primário durante o amadurecimento do fruto. Metabólitos como componentes do ciclo do ácido cítrico (malato, citrato, fumarato), açúcares fosfato e alguns pigmentos apresentaram fortes correlações com esse período do desenvolvimento (Carrari et al. 2006). Sendo evidenciado mais tarde, que modificações no fluxo do ciclo do ácido cítrico durante o amadurecimento, como alterações no conteúdo de malato, resultam também em mudanças no conteúdo de amido transitório e de açúcares solúveis, com efeitos observados ainda sobre as propriedades pós colheita desses frutos, como uma menor resistência a patógenos. Esses resultados levaram a sugerir que alterações em alguns metabólitos chaves, podem também ter consequências profundas e de extenso alcance no desenvolvimento vegetal (Centeno et al. 2011).

A procura por metabólitos de controle não se limitou apenas a metabólitos primários, mas também por metabólitos secundários e em como seria a regulação entre ambos durante o desenvolvimento. Nesse sentido, Fait et al. (2008) analisaram simultaneamente a composição de metabólitos primários e secundários do receptáculo e aquênios de morango (*Fragaria x ananassa*), utilizando análises de redes. Elevados valores de conectividade possibilitaram a construção de módulos metabólicos que são específicos para cada órgão, principalmente na metade inicial do desenvolvimento. Estes módulos evidenciaram que existe uma ação coordenada entre os metabolismos de aquênios e do receptáculo que se configuraria em um mecanismo de controle do desenvolvimento dos aquênios antes do amadurecimento completo do fruto, ressaltado a participação de metabólitos precursores de hormônios vegetais. É interessante observar esse mecanismo pode ter especial importância se considerado o controle da viviparidade de sementes.

A análise de metaboloma de receptáculos do morango permitiu ainda comparar a regulação metabólica do desenvolvimento de

frutos climatéricos e não-climatéricos, como o tomate e morango, respectivamente. A relativa semelhança de metabolismos observados, principalmente em relação ao metabolismo de açúcares, levou inicialmente a sugestão de que haveria um mecanismo metabólico regulatório em comum entre ambos os comportamentos de frutos (Fait et al. 2008). Tal hipótese conduziu a busca por padrões conservados de mudanças metabólicas entre frutos climatéricos e não climatéricos. Com esse objetivo, Klie et al. (2014) realizaram uma meta-análise de dados obtidos do metaboloma de frutos de tomate e pêsego (frutos climatéricos) e de pimentão e morango (frutos não climatéricos), durante o desenvolvimento. Surpreendentemente, foi possível distinguir cada comportamento fisiológico, climatérico ou não, pelo padrão de alteração do conteúdo de poucos metabólitos, como malato, serina, treonina e aspartato. Isso aponta que, apesar de serem encontrados metabólitos em comum entre espécies, o conjunto de fluxos metabólicos divergentes formariam a identidade do metabolismo durante o desenvolvimento de cada fruto.

A ferramenta da metabolômica também tem sido aplicada na procura de características comercialmente importantes, como na qualidade do amido da batata (*Solanum tuberosum*). Na produção de tubérculos, o grau de fosforilação do amido influencia suas características físico-químicas, com consequências nos diferentes usos do amido de batata na indústria de alimentos. Ao procurar por fatores que estariam regulando o metabolismo primário nos tubérculos de batata, Carreno-Quintero et al. (2012) combinaram análises de QTLs (Locos de Caracteres Quantitativos, em português) e de metabolômica para mapear uma população derivada de *S. tuberosum* outras linhagens selvagens. Elevadas correlações evidenciaram a co-localização de QTLs da fosforilação de amido com a de aminoácidos, como β -Ala. Esse resultado é bastante interessante, já que existem evidências que alanina participaria

de reações de fosforilação, entretanto, há poucas informações na literatura acerca da síntese da β -Ala em plantas. Uma consequência da proximidade de duas QTLs de características diferentes seria a de uma provável regulação em comum, o que levou os pesquisadores a sugerir esse amino ácido como um importante indicador do grau de fosforilação do amido, e também uma diretriz importante para futuras pesquisas.

O METABOLOMA DE SEMENTES E FOLHAS E A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE ABIÓTICO

Apesar de haver hoje relativa informação das mudanças dos metabólitos durante o desenvolvimento de frutos, o uso da metabolômica para o estudo da biologia de sementes está ainda em seu princípio. Sementes são a base para a maior parte das estratégias de produção de plantas cultivadas e uma importante fonte de alimentos. Exatamente por essas características, a maior parte dos esforços voltados para a produção vegetal estiveram em otimizar a obtenção dos principais compostos de reservas como amido, oligossacarídeos, óleo e proteínas. Com o conhecimento de que o desenvolvimento de sementes passa por etapas de alterações fisiológicas distintas e bem marcadas, o uso da metabolômica pode fornecer informações chaves sobre metabólitos que levam a regulação de vias de síntese de interesse comercial ou ainda relacionadas à qualidade da semente.

Um dos primeiros passos para o maior entendimento da regulação metabólica em sementes começou com a aplicação da metabolômica para analisar as etapas do desenvolvimento de sementes da planta modelo *Arabidopsisthaliana*. Fait et al. (2006) observaram durante a etapa de acúmulo de reservas uma grande redução do metabolismo primário, fortemente correlacionada com

compostos como amino ácidos, ácidos orgânicos, açúcares e polióis. Esse comportamento sugere a incorporação desses metabólitos na biossíntese de ácidos graxos e amino ácidos, que resultariam na produção de triglicerídeos e proteínas de reserva no amadurecimento do embrião. Curiosamente, a transição entre esta etapa e a de dessecação foi caracterizada pelo decréscimo contínuo de açúcares fosfato, indicando interrupção da via glicolítica, ao passo que elevadas correlações indicaram o significativo acúmulo de diversos amino ácidos como asparagina, arginina, lisina, GABA, triptofano, fenilalanina e tirosina no mesmo período.

Esse resultado é interessante pois a etapa de dessecação de sementes ortodoxas sempre foi entendida como a de "desligamento metabólico", em um sentido amplo. Tal observação levou os autores a sugerir que a etapa de dessecação teria também um papel fundamental em tornar disponíveis metabólitos para a rápida recuperação do metabolismo da semente após a reentrada de água, antes mesmo de ocorrer a degradação e mobilização de reservas. De fato, um metabolismo aparentemente ativo foi observado durante a embebição das sementes, correlacionados ao acúmulo de açúcares fosfato e componentes do ciclo do ácido cítrico (como 2-oxoglutarato e isocitrato), evidenciando a ativação da via glicolítica e a retomada da respiração mitocondrial, respectivamente. Ao final da embebição, no processo de germinação propriamente dito, um aumento considerável de diversos metabólitos está correlacionado com várias vias de biossíntese, o que reflete o uso desses metabólitos para o crescimento e desenvolvimento do embrião.

A relação entre sementes e tolerância a perda de água ao final do desenvolvimento sempre foi bastante discutida, principalmente devido as sementes intolerantes à dessecação. Estas não possuem a etapa natural de dessecação ao final do desenvolvimento como em sementes ortodoxas, sendo dispersas ainda úmidas, e sensíveis

a perda de água se desidratadas artificialmente, o que resulta em sementes predispostas a ataque de patógenos e de baixa longevidade. Com o objetivo de compreender as mudanças metabólicas que estariam envolvidas no desenvolvimento de sementes intolerantes à dessecação, nosso grupo analisou o metaboloma de sementes de *Inga vera*, espécie que apresenta uma das sementes mais sensíveis a dessecação (Caccere et al. 2013). Nos eixos embrionários de *I. vera* foi observado um aumento de ácidos orgânicos do ciclo do ácido cítrico, como malato e citrato, indicando elevada atividade respiratória durante toda a maturação. Além disso, não foram observadas alterações metabólicas que corresponderem com a etapa de dessecação vista em sementes ortodoxas. Ao contrário, análises ultraestruturais realizadas em conjunto com a metabolômica apontaram organelas sub celulares bem estruturadas, como mitocôndrias bem desenvolvidas, em estádios do desenvolvimento próximas à dispersão. Esses resultados sugerem que o fluxo metabólico da maturação dessas sementes estaria direcionado diretamente para o de germinação como consequência de um metabolismo global ainda ativo ao final do desenvolvimento.

As alterações do metabolismo vegetal frente à estresses abióticos é de enorme interesse para a produção vegetal, principalmente quando se observa a necessidade de compreender os diversos mecanismos que as plantas possuem para resistir à falta de água em um horizonte cada vez mais desafiador, com uma crescente população, com demanda cada vez maior por alimentos em um futuro de mudanças climáticas no globo.

Nesse sentido, Sanchez et al. (2012) compararam as alterações do metaboloma de seis espécies de *Lotus* após privação de água. Essas espécies variavam de acordo com sua habilidade em se desenvolver em solos e ambientes desfavoráveis (solo salino

ou seco, por exemplo). Os autores observaram que as mudanças dos metabólicos estavam em sintonia com o nível de desidratação foliar. Metabólitos como açúcares, ácidos orgânicos e prolina apresentaram elevadas proporções durante a desidratação, o que estariam relacionados a um aumento do potencial de água celular, considerado uma resposta de aclimação frente ao estresse hídrico. Entretanto, apenas alguns desses metabólitos foram encontrados simultaneamente nos diferentes níveis de desidratação em todas as espécies, indicando que diferentes metabólitos teriam o mesmo papel de osmoregulação entre as espécies de *Lotus*. Essa inferência ressalta que o mecanismo de aclimação em *Lotus* não é conservado, e como consequência, indica a necessidade de uma ampla observação de mecanismos metabólicos supostamente de proteção para a confirmação de que estejam proporcionando de fato a tolerância ao estresse, previamente ao uso de ferramentas como engenharia genética ou o selecionamento de novas cultivares, já que tais mecanismos poderiam representar apenas variações naturais das espécies. Ou ainda, utilizar as informações obtidas na metabolômica para selecionar os mecanismos mais eficientes para a proteção contra estresse abiótico e para maior facilidade de compreensão da via biossintética.

Uma interessante fonte de mecanismos de tolerância a estresses abióticos potencialmente úteis para a produção vegetal está na própria biodiversidade brasileira. Devido à enorme extensão do país sob uma zona tropical, diversos ecossistemas nativos foram formados, sendo que os vegetais se estabeleceram em ambientes muitas vezes desafiadores. Este é o caso de plantas que colonizam as regiões de campos rupestres e/ou campos de altitude, como áreas da Serra do Cipó em Minas Gerais. Essas regiões são caracterizadas por condições limitantes ao desenvolvimento vegetal, como elevada amplitude térmica, alta irradiância, seca e escassez de solo, o que

exige das plantas mecanismos de proteção particulares, como a tolerância à dessecação vegetativa.

Semelhante ao observado em sementes, a tolerância à dessecação é definida pela capacidade de um organismo em resistir ao déficit hídrico extremo (perda de 95% de sua água celular) permanecendo viável por longos períodos no estado seco, e depois retornar o metabolismo celular quando reidratado. Algumas plantas vasculares de campos rupestres brasileiros apresentam a tolerância à dessecação vegetativa, conhecidas também por "plantas revivescentes", como *Barbaceniapurpurea*, da família Velloziaceae (Sugiyama et al. 2014). Um estudo realizado pelo nosso grupo, associando o metaboloma de folhas as respostas fisiológicas à desidratação de *B. purpurea*, sugere que as mudanças metabólicas nesses tecidos seriam dependentes do tempo e da intensidade da perda de água. Ou seja, no início da desidratação (entre 98% e 70% de teor relativo de água) ocorreria a ativação do sistema antioxidante, evidenciado pelo aumento nos níveis de metabólitos antioxidantes como derivados do ácido cafeoilquínico, para em seguida, ser iniciado um ajuste osmótico indicado pelo aumento nos níveis de alguns amino ácidos (como asparagina, tirosina, valina e prolina), considerado uma estratégia para evitar maior desidratação dos tecidos. Entretanto, com a continuação da desidratação das folhas (teores relativos de água abaixo de 70%), o aumento nos níveis de açúcares hidrofílicos como rafinose e estaquiose estariam correlacionados com a manutenção da osmoregulação. Mais ainda, por estes metabólitos estarem também relacionados com a proteção de compartimentos celulares, como membranas celulares e organelas, esse acúmulo evidencia que a planta estaria se preparando para uma perda de água ainda mais severa. O que finalmente ocorre após 15-20 dias sob privação de água, quando o teor relativo de água das folhas atinge cerca de 20% e há total perda

de clorofila *a* e *b* (Suguiyama et al. 2014). Olhando em conjunto, fica evidenciado que os mecanismos de tolerância à dessecação estão refletidos nos perfis metabólitos e condicionados a quantidade de água nos tecidos.

METABOLÔMICA E BIOLOGIA DE SISTEMAS

Embora tenha sido exemplificado anteriormente o uso da metabolômica em diversos aspectos da produção vegetal, explorar esta ferramenta em conjunto com outras abordagens moleculares torna a metabolômica um recurso ainda mais interessante. Esta ideia integrativa, levando em consideração análises moleculares de larga escala, foi colocada de modo bastante claro por Baginsky e Fernie (2007). A associação dos diferentes níveis de estudos (genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma) de forma teórica, experimental, ou ainda de modelagem, possibilita uma visão mais ampla do organismo como um todo e é denominada biologia de sistemas ou biologia sistêmica. Porém, embora estes estudos tenham trazido resultados interessantes, tanto do ponto de vista de ciência básica, como de ciência aplicada, ainda não abordam um ponto fundamental de ordem prática: o fenótipo.

Recentemente, a análise de fenótipos em larga escala (“fenômica” em analogia às outras ferramentas “ômicas”) vem ganhando força no sentido de complementar as técnicas usadas na biologia de sistemas. Essa abordagem, assim como descrito para metabolômica, é ainda complexa devido às padronizações de cultivo de plantas (variações ambientais) e de seus estádios fenológicos. Assim, a reprodutibilidade de resultados seria de certa forma menos estável que as análises de genoma, por exemplo.

Alguns dos pontos abordados na análise de fenótipos em larga escala descrevem principalmente caracteres relacionados

à produtividade e, portanto, acúmulo de biomassa. Dentre eles estão dados fisiológicos, como fotossíntese e fluorescência, e dados morfológicos, como área foliar e arquitetura da planta, que se combinados resultam em bons marcadores para fins de produção vegetal. A aplicação destes dados, por revelar o panorama real das plantas, podem auxiliar desde a elucidação da função de genes, como também a interação entre plantas e outros organismos ou ainda na compreensão de respostas das plantas a mudanças ambientais locais ou globais.

Alguns projetos vêm sendo desenvolvidos no sentido de gerar plataformas para melhorar as análises fenômicas, como o *International Plant Phenomics Network* (IPPN). Embora o investimento inicial de uma plataforma de fenômica seja bastante elevado, esta é uma alternativa importante a ser incluída na visão sistêmica desejada, embora, por se tratar de estudos ainda recentes, não tenha uma aplicação comercial extensa.

DESAFIOS FUTUROS

Como destacado anteriormente, a metabolômica em plantas é uma técnica ainda bastante nova, com pouco mais de uma década, e não tem sido ainda usada comercialmente em programas de melhoramento. Por se tratar de uma ferramenta bastante sensível, flutuações nas condições ambientais e variações experimentais também fazem com que a aplicação desta técnica não seja bem difundida na busca de novas variedades. Entretanto, os primeiros estudos já vêm mostrando o potencial uso da metabolômica em diferentes espécies sob diferentes aspectos. Um dos desafios fica, portanto, na busca de desenhos experimentais adequados de modo a diminuir as variações entre os perfis metabólicos analisados sob diferentes situações e momentos. Um outro desafio está em criar

métodos de forma a avaliar a compartimentação subcelular de metabólitos, que poderiam fornecer informações cruciais da regulação do metabolismo intracelular com possibilidades promissoras do uso para a produção vegetal.

A tentativa de uma visão sistêmica envolve ainda esforços multi-disciplinares onde a metabolômica pode fazer a conexão entre o fenótipo e as variações de resultados das outras "ômicas". Alimentar bancos de dados com dados provenientes de metabolômica poderá facilitar no futuro o trabalho com modelagem bioquímica e prever perfis metabólicos a serem buscados para aumento de produtividade.

Além disso, plantas sob condições naturais de crescimento sujeitas à interação com outros organismos, sejam competidores vegetais ou herbívoros/patógenos, é um tema de extrema importância, porém ainda pouco coberto dentro da metabolômica e deve ser foco de estudo futuro, dada a relevância destas interações do ponto de vista econômico.

REFERÊNCIAS

BAGINSKY, S.; FERNIE, A.R. Plant system biology. Basel: Birkhäuser Verlag, 2007. 357p.

CACCERE, R.; TEIXEIRA, S.P.; CENTENO, D.C; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; BRAGA, M.R. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. Journal of Plant Physiology, v.170, p.791-800, 2013.

CARRARI, F.; BAXTER, C.; USADEL, B.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; ZANOR, M-I.; NUNES-NESE, A.; NIKIFOROVA, V.; CENTENO, D.;

RATZKA, A.; PAULY, M.; SWEETLOVE, L.J.; FERNIE, A.R. Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects. *Plant Physiology*, v.142, p.1380-1396, 2006.

CARRENO-QUINTERO, N.; ACHARJEE, A.; MALIEPAARD, C.; BACHEM, C.W.B.; MUMM, R.; BOUWMEESTER, H.; VISSER, R.G.F.; KEURENTJES, J.J.B. Untargeted metabolic quantitative trait loci analyses reveal a relationship between primary metabolism and potato tuber quality. *Plant Physiology*, v.158, p.1306-1318, 2012.

CENTENO, D.C.; OSORIO, S.; NUNES-NESE, A.; BERTOLO, A.L.F.; CARNEIRO, R.T.; ARAÚJO, W.L.; STEINHAUSER, M-C.; MICHALSKA, J.; ROHRMANN, J.; GEIGENBERGER, P.; OLIVER, S.N.; STITT, M.; CARRARI, F.; ROSE, J.K.C.; FERNIE, A.R. Malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening. *The Plant Cell*, v.23, p.162-184, 2011.

FAIT, A.; ANGELOVICI, R.; LESS, H.; OHAD, I.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; FERNIE, A.R.; GALILI, G. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology*, v.142, p.839-854, 2006.

FAIT, A.; HANHINEVA, K.; BELEGGIA, R.; DAI, N.; ROGACHEV, I.; NIKIFOROVA, V.J.; FERNIE, A.R.; AHARONI, A. Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. *Plant Physiology*, v.148, p.730-750, 2008.

FIEHN, O.; KIND, T.; BARUPAL, D.K. Data processing, metabolomic databases and pathway analysis. In: HALL, R.D. (Ed.). *Biology of plant metabolomics*. West Sussex: Blackwell Publishing, 2011. p.367-406.

HALL, R.D. Plant Metabolomics in a nutshell: Potential and future challenges. In: HALL, R.D. (Ed.). Biology of plant metabolomics. West Sussex: Blackwell Publishing, 2011. p.1-24.

KLIE, S.; OSORIO, S.; TOHGE, T.; DRINCOVICH, M.F.; FAIT, A.; GIOVANNONI, J.J.; FERNIE, A.R.; NIKOLOSKI, Z. Conserved changes in the dynamics of metabolic processes during fruit development and ripening across species. *Plant Physiology*, v.164, p.55-68, 2013.

MEYER, R.C.; STEINFATH, M.; LISEC, J.; BECHER, M.; WITUCKA-WALL, H.; TÖRJÉK, O.; FIEHN, O.; ECKARDT, Ä.; WILLMITZER, L.; SELBIG, J.; ALTMANN, T. The metabolic signature related to high plant growth rate in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.104, p.4759-4764, 2007.

OLIVER, S.G.; WINSON, M.K.; KELL, D.B. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, v.16, p.373-378, 1998.

SANCHEZ, D.H.; SCHWABE, F.; ERBAN, A.; UDVARDI, M.K.; KOPKA, J. Comparative metabolomics of drought acclimation in model and forage legumes. *Plant, Cell and Environment*, v.35, p.136-149, 2012.

SCHAUER, N.; SEMEL, Y.; ROESSNER, U.; GUR, A.; BALBO, I.; CARRARI, F.; PLEBAN, T.; PEREZ-MELIS, A.; BRUEDIGAM, C.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology*, v.24, p.447-454, 2006.

SUGUIYAMA, V.F.; SILVA, E.A.; MEIRELLES, S.T.; CENTENO, D.C.; BRAGA, M.R. Leaf metabolite profile of the Brazilian resurrection plant *Barbaceniapurpurea* Hook. (Velloziaceae) shows two time-dependent responses during desiccation and recovering. *Frontiers in Plant Science*, v.5, 2014.

Resistência de tomateiros *Solanum* spp. aos principais insetos pragas

Maria Elisa de Sena Fernandes¹
Flávio Lemes Fernandes¹
Natalia Oliveira Silva¹
Natalia Silva Assunção¹
Rafaela Corrêa da Veiga¹
Jean Carlos de Oliveira¹

INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill.) é uma hortaliça de grande importância econômica e social, presente em várias regiões do Brasil e do mundo. A sua demanda no mercado tende a aumentar cada vez mais, gerando alto volume de produção e a gerando empregos, uma vez que o cultivo do tomate requer o uso intenso de mão-de-obra para executar diversas atividades como capina, desbrota e colheita, elevando ainda mais a sua importância.

¹ Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), MG 230, KM08, *Campus* Universitário, CEP.: 38810-000, Rio Paranaíba, MG; maria.sena@ufv.br; flaviofernandes@ufv.br; natalia.o.silva@ufv.br; natalia.assuncao@ufv.br; rafaela.veiga@ufv.br; jean.c.oliveira@ufv.br

Um dos fatores que reduz a produtividade nesta hortaliça são as pragas, que tem como principal controle o químico. Esse método nem sempre é eficiente e possui alguns pontos negativos, como a poluição do ambiente, danos à saúde do trabalhador rural e do consumidor, reduz a população de inimigos naturais e seleciona os biótipos resistentes às pragas. Uma das alternativas ao controle químico está o uso de cultivares resistentes, desenvolvidos por meio de melhoramento genético.

No processo de obtenção de variedades resistentes às pragas é de fundamental importância o estudo dos mecanismos e de causas da resistência. São três os mecanismos que podem estar envolvidos na resistência de *Solanum* spp. aos artrópodes praga: antixenose, antibiose e tolerância. A antibiose é caracterizada por causar qualquer efeito negativo sobre a biologia do inseto, alterando, por exemplo, o ciclo de vida e a taxa de mortalidade do inseto. Na antixenose, o mecanismo de resistência é dado pelos estímulos que conferem aos insetos uma menor preferência para oviposição, alimentação ou abrigo. Os fatores genéticos podem provocar diferentes respostas em cada tipo de inseto. E na tolerância, a planta por meio de mecanismos compensatórios como aumento da área foliar e perfilhos, tolera maior ataque de pragas, assim não causa uma redução significativa na produção quando atacadas por insetos-pragas.

Cada mecanismo de resistência pode ser desencadeado por inúmeras causas. Estas causas podem ser morfológicas, químicas e/ou físicas. Raramente um único fator é responsável pela resistência de uma planta a pragas. As características morfológicas consistem em barreiras mecânicas que influenciam na atração e repelência dos insetos. Várias características morfológicas têm sido relacionadas com a incidência de insetos, entre as quais se incluem a dureza dos tecidos, espessura da cutícula e tricomas presentes na superfície foliar das plantas, os quais podem interferir na oviposição, fixação e

alimentação. As plantas produzem metabólitos secundários que estão relacionados com a proteção do organismo ou sistema biológico. Os metabólitos podem agir de duas formas sobre o inseto: influenciar o comportamento ou alterar sua fisiologia. Dentre os fatores físicos considera-se principalmente a radiação luminosa. Poucos estudos têm sido feitos visando esta causa.

Para o desenvolvimento de variedades resistentes à pragas torna-se necessário a busca alternativa de variabilidade genética. Desta forma, os bancos de germoplasma são importantes para a obtenção de variabilidade genética em acessos com genes que conferem resistência à pragas. Diante da importância do melhoramento do tomateiro visando a resistência a insetos praga, abaixo será relatado a resistência a mosca-branca (*Bemisia tabaci* biótipo B), ácaro (*Tetranychus evansi*), mosca minadora (*Liriomyza trifolii*) e traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*).

RESISTÊNCIA DE TOMATEIRO A MOSCA-BRANCA

A mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) constitui importante agente praga no tomateiro. Tanto os adultos como as ninfas de mosca-branca possuem aparelho bucal picador-sugador e as colônias se alimentam de forma gregária na face inferior da folha, podendo causar diversos danos.

Os danos podem ser desde a sucção de seiva da planta e injeção de toxinas, até à transmissão de fitoviroses.

Diante da importância desta praga chave no tomateiro, o Grupo de Pesquisa em Horticultura (GPH) do campus de Rio Paranaíba avaliou 103 acessos de tomateiro do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV (BGH-UFV) mais a cultivar Santa Clara. Avaliaram a intensidade de adultos/planta, ovos/planta e ninfas/planta. Detectaram-se diferenças significativas para todos os parâmetros

avaliados entre os acessos testados do BGH-UFV. Por exemplo, para a característica de número de ovos, o acesso com maior número de ovos/planta de mosca-branca foi o BGH-981, enquanto que os acessos com menor número de ovos/planta foram os BGHs-24, 161, 168, 186, 216, 224, 225, 279, 327, 349, 351, 468, 606, 630, 773, 813, 984, 985, 987, 991, 992, 996, 1019, 1287, 1991, 2009, 2010, 2013, 2018, 2025, 2029, 2030, 2032, 2034, 2038, 2041, 2048, 2055, 2057, 2060, 2062, 2064, 2065, 2068, 2071, 2073, 2075, 2097, 2112, 2113, 2116, 2119, 2124, 2127 e 2128 (Tabela 1).

Usando-se o Índice de Resistência para Ovos/Planta (IROv/PI) segundo Baldin et al., 2000, verificou-se que os BGHs-225, 327, 468, 606, 630, 984, 985, 1019, 1287, 1991, 2009, 2010, 2030, 2034, 2041, 2048, 2060, 2062, 2073, 2075 e 2097 foram resistentes a mosca branca enquanto que os BGHs-981, 1254, 1497 e 2098 foram altamente suscetíveis e 79 acessos foram suscetíveis a *B. tabaci* (Figura 1A). Para o Índice de Resistência para Ovos/Adulto (IROv/Ad) verificou-se que os BGHs-1287 e 2062 foram resistentes enquanto que BGHs-216, 2054, 2096 e 2098 foram altamente suscetíveis e 97 acessos foram suscetíveis a *B. tabaci* (Figura 1B).

Tabela 1. Número (média ± erro padrão) de ovos por planta do biótipo B de *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) em acessos de tomateiro do BGH-UFV.

Acesso	Ovos/planta*	Acesso	Ovos/planta*	Acesso	Ovos/planta*
BGH-981	100,00 ± 45,61 a	BGH-2130	16,33 ± 13,45 c	BGH-2055	7,33 ± 2,19 d
BGH-2098	63,33 ± 2,19 b	BGH-2017	16,33 ± 0,67 c	BGH-2032	7,00 ± 0,58 d
BGH-1254	57,67 ± 12,77 b	BGH-2122	16,00 ± 2,31 c	BGH-2065	7,00 ± 0,58 d
BGH-1497	55,00 ± 4,73 b	BGH-2027	15,67 ± 6,12 c	BGH-161	7,00 ± 0,58 d
BGH-2121	43,33 ± 19,92 b	BGH-603	15,00 ± 10,07 c	BGH-351	6,67 ± 3,18 d
BGH-1989	42,67 ± 16,46 b	BGH-970	15,00 ± 7,55 c	BGH-773	6,33 ± 3,33 d
BGH-2011	41,00 ± 10,69 b	BGH-1498	15,00 ± 1,73 c	BGH-2113	6,33 ± 6,33 d
BGH-2095	32,33 ± 3,18 c	BGH-994	15,00 ± 1,73 c	BGH-987	6,33 ± 2,91 d
BGH-1258	30,00 ± 4,62 c	BGH-2020	14,67 ± 5,49 c	BGH-813	6,33 ± 5,36 d
BGH-2088	28,67 ± 15,76 c	BGH-2035	14,33 ± 4,91 c	BGH-2127	6,00 ± 1,73 d
BGH-2021	26,67 ± 8,57 c	BGH-2117	14,00 ± 2,31 c	BGH-2013	5,33 ± 1,20 d
BGH-2008	26,67 ± 6,39 c	BGH-1706	13,67 ± 8,09 c	BGH-279	5,33 ± 4,37 d
BGH-2096	26,33 ± 1,45 c	BGH-2129	13,67 ± 3,18 c	BGH-2124	5,00 ± 2,89 d
BGH-121	26,33 ± 3,76 c	BGH-988	13,33 ± 9,35 c	BGH-2075	4,33 ± 4,33 d
BGH-2083	24,67 ± 6,64 c	BGH-2112	13,00 ± 1,53 d	BGH-2048	4,33 ± 4,33 d
BGH-1490	24,33 ± 2,91 c	BGH-186	12,33 ± 12,33 d	BGH-2097	4,33 ± 4,33 d
BGH-2100	23,67 ± 8,41 c	BGH-2025	12,00 ± 2,08 d	BGH-1019	4,33 ± 4,33 d
BGH-378	22,67 ± 2,40 c	BGH-2119	12,00 ± 1,73 d	BGH-225	4,33 ± 2,19 d
BGH-2089	22,33 ± 1,20 c	BGH-216	11,33 ± 5,93 d	BGH-985	4,33 ± 2,60 d
BGH-700	21,67 ± 3,53 c	BGH-349	10,67 ± 4,70 d	BGH-630	4,33 ± 2,33 d
BGH-993	20,67 ± 9,49 c	BGH-992	10,33 ± 4,18 d	BGH-2034	4,00 ± 4,00 d
BGH-971	20,33 ± 3,76 c	BGH-996	10,33 ± 10,33 d	BGH-606	4,00 ± 1,15 d
BGH-2014	20,33 ± 7,22 c	BGH-2057	9,00 ± 6,66 d	BGH-2010	3,67 ± 2,03 d
BGH-1532	20,00 ± 1,15 c	BGH-991	8,67 ± 0,33 d	BGH-468	3,33 ± 1,76 d
BGH-2039	19,67 ± 2,60 c	BGH-24	8,67 ± 0,33 d	BGH-2060	3,33 ± 2,40 d
BGH-1985	18,67 ± 7,75 c	BGH-2068	8,33 ± 2,60 d	BGH-1991	3,33 ± 3,33 d
BGH-83	18,33 ± 3,18 c	BGH-2064	8,33 ± 2,73 d	BGH-2073	3,00 ± 1,53 d
BGH-2040	18,33 ± 2,03 c	BGH-2029	8,33 ± 8,33 d	BGH-2030	3,00 ± 3,00 d
BGH-2054	18,33 ± 11,67 c	BGH-2071	8,00 ± 8,00 d	BGH-2041	2,67 ± 2,67 d
BGH-978	18,33 ± 16,37 c	BGH-2018	8,00 ± 1,15 d	BGH-984	2,67 ± 2,19 d
BGH-2049	18,00 ± 4,62 c	BGH-2038	7,67 ± 7,67 d	BGH-2009	1,67 ± 0,88 d
BGH-989	18,00 ± 9,87 c	BGH-224	7,67 ± 3,28 d	BGH-1287	1,00 ± 0,58 d
BGH-2004	16,67 ± 4,33 c	BGH-168	7,33 ± 7,33 d	BGH-327	1,00 ± 1,00 d
BGH-2123	16,67 ± 7,80 c	BGH-2128	7,33 ± 4,33 d	BGH-2062	0,00 ± 0,00 d
Santa Clara	16,33 ± 3,18 c	BGH-2116	7,33 ± 3,18 d	-	-

*As médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a $p < 0,05$. Fonte: Fernandes et al., 2011.

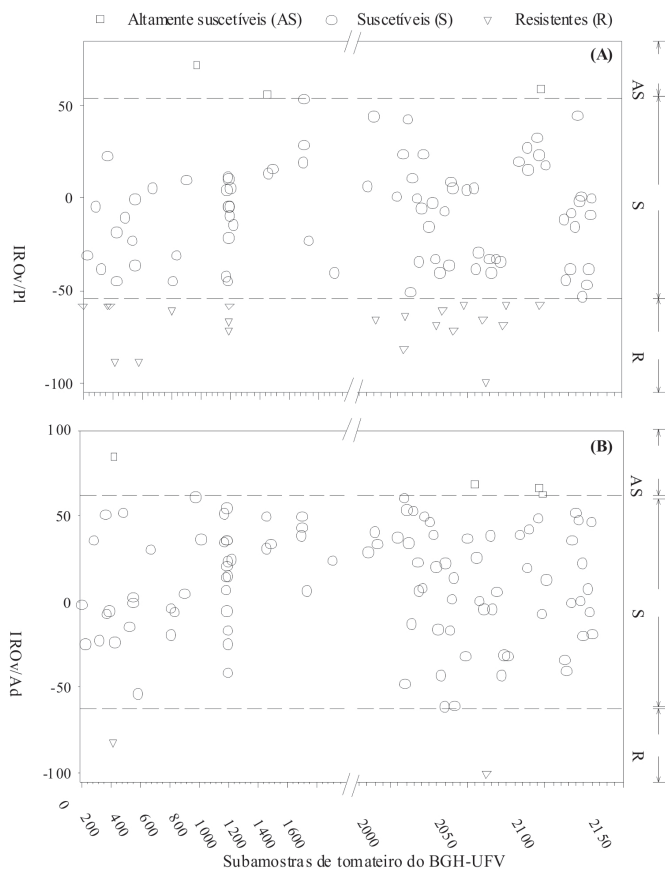


Figura 1. Índice de resistência dos acessos (subamostras) de tomateiro do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (BGH-UFV) ao biótipo B de *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) em termos de (A) ovos/planta (IROv/PI) e (B) ovos/adulto (IROv/Ad). As linhas descontínuas horizontais delimitam regiões do gráfico contendo os acessos altamente suscetíveis, suscetíveis e resistentes a praga. Fonte: Fernandes et al., 2011.

Em relação à causa morfológica, a densidade de tricomas foram diferentes entre os acessos testados e influenciou diretamente a quantidade de ovos/planta. Sendo que, os acessos de tomateiro com maior densidade de tricomas foram os mais ovipositados por *B. tabaci*.

Assim, a resistência dos BGHS-UFV a *B. tabaci* é governada por fatores genéticos dos acessos. Diante disso, diante dos testes com 104 acessos do BGH-UFV resistentes ao biótipo B de *B. tabaci* a resistência envolve os mecanismos de antibiose e antixenose. Além dos mecanismos foram identificadas as possíveis causas dessa resistência que foram morfológicas e químicas. E os acessos BGHS-225, 327, 630, 813, 985, 2029, 2030, 2055, 2057, 2060, 2062 e 2068 foram selecionados como fontes de resistência ao biótipo B de *B. tabaci*.

RESISTÊNCIA DE TOMATEIRO A MOSCA MINADORA

A mosca minadora *Lyriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae) é considerada também uma praga chave no tomateiro. Este é um inseto de metamorfose completa, com fases de ovo, larva, pupa e adulto.

As larvas causam danos, por abertura de galerias em formas serpenteadas entre a epiderme adaxial e a epiderme abaxial, formam lesões esbranquiçadas, penetrando até nas nervuras. Quando o índice populacional é alto, a área fotossintética é reduzida drasticamente, causa murcha e queda prematura das folhas.

Tendo em vista a importância desta praga, realizamos a avaliação de 42 acessos de tomateiro de acordo com o número de folíolos minados, mas a densidade de tricomas e a produção de hidrocarbonetos.

Neste caso, houve diferença significativa no número de folíolos minados por *L. trifolii* nos acessos do BGH-UFV. Cerca de 77% dos acessos tiveram baixa densidade de folíolos minados. Entre estas com menor densidade de folíolos minados foram BGHs-2055, 2057, 2127. Houve também, diferença significativa no número de minas confeccionadas por *L. trifolii*. Foram 35 acessos que apresentaram menor número de minas. Dentre esses acessos com menor número de minas confeccionadas foi a BGH-2127.

Assim, a baixa densidade de insetos para as características número de folíolos minados e minas/folha podem estar associados ao mecanismo de antixenose.

Observaram-se diferenças significativas no número de tricomas por 0,04cm² do limbo foliar entre os acessos. A densidade de tricomas está diretamente ligado a resistência de pragas em tomateiro. Tendo em vista que oviposição vai depender diretamente da densidade de tricomas. Assim uma menor densidade facilita a performance do adulto.

Apesar de não existir trabalhos em tomateiro relacionando a hidrocarbonetos com o ataque de *L. trifolii*, os hidrocarbonetos identificados neste trabalho são de baixo peso molecular e são compostos da camada lipídica da cutícula, cutícula esta que tem função de ser barreira química ao ataque de insetos. Assim, foi possível observar que alguns compostos explicam a suscetibilidade em alguns acessos, que pode ser um novo foco para programas de melhoramento.

Nos 43 acessos foram identificados 20 hidrocarbonetos, e destes vinte hidrocarbonetos identificados, apenas nonano (C9), decano (C10) e nonacosano (C29) estiveram correlacionados significativamente com o número de folíolos minados após a infestação, enquanto isso o nonano (C9), docosano (C22) e nonacosano (C29) apresentaram correlações positivas e significativas com o número de minas após a infestação com *L. trifolii*/planta (Tabela 2).

Tabela 2. Correlações de Pearson entre características avaliadas de *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) em subamostras de tomateiro do Banco de Germoplasma da UFV com as concentrações dos hidrocarbonetos obtidos nos extratos hexânicos foliares.

Pico	Hidrocarbonetos	Resposta	Características avaliadas	Correlações
1	C9 (nonano)	Suscetibilidade	Número de folíolos minados após a infestação	0,32096*
2	C10 (decano)	Suscetibilidade	Número de folíolos minados após a infestação	0,31630*
19	C29 (nonacosano)	Suscetibilidade	Número de folíolos minados após a infestação	0,30952*
1	C9 (nonano)	Suscetibilidade	Número minas após a infestação	0,31218*
14	C22 (docosano)	Suscetibilidade	Número minas após a infestação	0,39675*
19	C29 (nonacosano)	Suscetibilidade	Número minas após a infestação	0,37517*

* Correlação significativa a $p < 0,05$ pelo teste t. Fonte: Adaptado de Fernandes et al., 2012.

RESISTÊNCIA DE TOMATEIRO A ÁCARO VERMELHO

O ácaro vermelho *Tetranychus evansi* (Baker & Pritchard) (Acari: Tetranychidae) compromete seriamente a produtividade devido à sua alta capacidade destrutiva, por ocasionar seca das folhas, seguida de desfolha, diminuição no tamanho e número de frutos, além de indução à maturação precoce do tomateiro.

Diante da importância desta praga chave, desenvolvemos testes para verificar a resistência por antixenose, foram testados 84 acessos de tomateiro do BGH-UFV, no qual foram comparadas com cultivar 'Santa Clara' que é considerada como padrão de suscetibilidade mostrou que os acessos BGHs-83, 1490 e 2040 apresentaram maior número de adultos *T. evansi*/disco foliar, enquanto que 94% dos acessos apresentaram baixas densidades deste ácaro praga por disco foliar (Tabela 3). Portanto os acessos BGHs-161, 186, 468, 700, 970, 1258, 1989, 2004, 2048, 2054, 2055, 2096, 2097, 2098, 2100, 2113, 2122, 2123 e 2129 destacaram-se

pelo fato de não apresentarem infestação de *T. evansi*/disco foliar. A não preferência dos artrópodes pragas por determinado acesso pode ser explicada pelo mecanismo de resistência, antixenose.

Tabela 3. Número (média ± erro padrão) de adultos/disco foliar do *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) em acessos de tomateiro do Banco de Germoplasma de Hortaliças (BGH) da Universidade Federal de Viçosa.

Acesso	Ácaro/ disco foliar *	Acesso	Ácaro/disco foliar*	
BGH 2040	20,00 ± 4,62 a	BGH 2075	1,33 ±	0,33 c
BGH 83	20,00 ± 4,62 a	BGH 2119	1,33 ±	1,33 c
BGH 1490	17,33 ± 12,33 a	BGH 1254	1,00 ±	1,00 c
BGH 2064	11,00 ± 9,50 b	BGH 2014	1,00 ±	0,58 c
BGH 2116	10,00 ± 9,02 b	BGH 2068	1,00 ±	0,58 c
Santa Clara	7,33 ± 1,20 c	BGH 2089	1,00 ±	0,58 c
BGH 216	7,33 ± 4,33 c	BGH 2010	0,67 ±	0,33 c
BGH 121	6,33 ± 4,48 c	BGH 2013	0,67 ±	0,67 c
BGH 2035	5,67 ± 4,70 c	BGH 2017	0,67 ±	0,67 c
BGH 971	5,00 ± 0,00 c	BGH 2034	0,67 ±	0,33 c
BGH 1706	5,00 ± 4,51 c	BGH 2038	0,67 ±	0,67 c
BGH 2083	5,00 ± 3,51 c	BGH 2041	0,67 ±	0,33 c
BGH 773	4,33 ± 2,85 c	BGH 2088	0,67 ±	0,67 c
BGH 993	4,33 ± 4,33 c	BGH 2117	0,67 ±	0,67 c
BGH 24	4,00 ± 2,31 c	BGH 2130	0,67 ±	0,33 c
BGH 988	3,67 ± 0,88 c	BGH 984	0,33 ±	0,33 c
BGH 2025	3,67 ± 3,18 c	BGH 2009	0,33 ±	0,33 c
BGH 987	3,33 ± 1,67 c	BGH 2011	0,33 ±	0,33 c
BGH 1532	3,33 ± 3,33 c	BGH 2021	0,33 ±	0,33 c
BGH 2049	3,00 ± 1,53 c	BGH 2039	0,33 ±	0,33 c
BGH 813	2,67 ± 2,67 c	BGH 2095	0,33 ±	0,33 c
BGH 996	2,67 ± 2,67 c	BGH 2112	0,33 ±	0,33 c
BGH 1991	2,67 ± 1,20 c	BGH 2124	0,33 ±	0,33 c
BGH 2008	2,67 ± 2,67 c	BGH 161	0,00 ±	0,00 c
BGH 2020	2,67 ± 1,45 c	BGH 186	0,00 ±	0,00 c
BGH 978	2,33 ± 1,20 c	BGH 468	0,00 ±	0,00 c

Avanços Tecnológicos Aplicados à Pesquisa na Produção Vegetal

BGH 981	2,33 ± 1,45 c	BGH 700	0,00 ±	0,00 c
BGH 985	2,33 ± 1,20 c	BGH 970	0,00 ±	0,00 c
BGH 989	2,33 ± 2,33 c	BGH 1258	0,00 ±	0,00 c
BGH 1497	2,33 ± 1,20 c	BGH 1989	0,00 ±	0,00 c
BGH 2073	2,33 ± 2,33 c	BGH 2004	0,00 ±	0,00 c
BGH 2121	2,33 ± 1,33 c	BGH 2048	0,00 ±	0,00 c
BGH 991	2,00 ± 2,00 c	BGH 2054	0,00 ±	0,00 c
BGH 992	2,00 ± 2,00 c	BGH 2055	0,00 ±	0,00 c
BGH 606	1,67 ± 1,67 c	BGH 2096	0,00 ±	0,00 c
BGH 1019	1,67 ± 1,67 c	BGH 2097	0,00 ±	0,00 c
BGH 2057	1,67 ± 0,33 c	BGH 2098	0,00 ±	0,00 c
BGH 2060	1,67 ± 1,67 c	BGH 2100	0,00 ±	0,00 c
BGH 2127	1,67 ± 0,88 c	BGH 2113	0,00 ±	0,00 c
BGH 2128	1,67 ± 1,67 c	BGH 2122	0,00 ±	0,00 c
BGH 1985	1,33 ± 0,88 c	BGH 2123	0,00 ±	0,00 c
BGH 2018	1,33 ± 1,33 c	BGH 2129	0,00 ±	0,00 c
BGH 2065	1,33 ± 0,67 c	-	-	-

*As médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a $p < 0,05$. Fonte: Fernandes et al., 2015.

Em relação as características morfológicas e químicas que são consideradas possíveis causas da resistência das plantas por antixenose também foram estudadas. Detectou-se que 14% dos acessos apresentaram maiores densidades de tricomas/0,04 cm² de área foliar (Tabela 4). Os acessos BGHs-2004, 2098 e 2100 apresentaram maiores densidades de tricomas e zero adultos/disco foliar de *T. evansi*. As características químicas dos acessos também foram estudadas, portanto não foi encontrada nenhuma relação entre cada infestação de ácaro e a composição química da planta.

A partir deste trabalho foi possível concluir que os acessos BGHs- 2004, 2098 e 2100 foram selecionadas como fontes de resistência a *T. evansi*. O mecanismo de resistência associado a esses acessos foi a antixenose. Além disso, a alta densidade de tricomas e compostos químicos presentes nos acessos avaliados podem ser

uma das possíveis causas da resistência a praga, o que pode ser de grande importância em programas de melhoramento, uma vez que estas características podem ser utilizadas como marcadores no estudo da resistência do tomateiro a *T. evansi*.

Tabela 4. Número (média ± erro padrão) de tricomas por 0,04 cm² do limbo foliar dos acessos de tomateiro do Banco de Germoplasma de Hortaliças (BGH) da Universidade Federal de Viçosa.

Acesso	Tricomas/0,04 cm ² *		Acesso	Tricomas/0,04 cm ² *	
BGH 2011	365,67	± 55,14 a	BGH 984	152,00	± 25,40 c
BGH 1490	364,00	± 98,73 a	BGH 2039	146,00	± 0,58 c
BGH 2121	337,67	± 11,26 a	BGH 2089	145,33	± 2,91 c c
BGH 2098	320,00	± 11,02 a	BGH 2096	144,00	± 0,58 c
BGH 2009	316,67	± 21,07 a	BGH 2073	138,67	± 0,88 c
BGH 2004	303,00	± 59,47 a	BGH 996	138,00	± 0,58 c
BGH 2020	303,00 ± 6,93 a		BGH 1532	137,67	± 40,19 c
BGH 2122	296,33	± 62,96 a	BGH 2097	137,00	± 0,58 c
BGH 2100	288,33	± 10,93 a	BGH 2038	134,00	± 0,58 c
BGH 2013	283,67	± 19,92 a	BGH 2112	134,00	± 40,45 c
BGH 2130	280,00	± 90,84 a	BGH 1989	133,67	± 40,70 c
BGH 2017	275,67	± 53,98 a	BGH 1991	133,00	± 40,82 c
BGH 1497	264,67 ± 1,20 b		BGH 2088	133,00	± 40,82 c
BGH 2127	255,00	± 33,49 b	BGH 2065	131,33	± 23,17 c
BGH 2021	252,00	± 45,90 b	BGH 970	128,33	± 24,55 c
BGH 1985	250,67	± 35,51 b	BGH 83	126,67	± 0,67 c
BGH 2008	249,67	± 25,69 b	BGH 216	124,00	± 13,00 c
BGH 1706	242,33	± 65,89 b	BGH 971	124,00	± 0,58 c
BGH 978	226,67	± 8,82 b	BGH 2123	124,00	± 0,58 c
BGH 2116	224,50	± 21,98 b	BGH 813	120,00	± 25,12 c
BGH 186	223,00	± 0,00 b	BGH 2040	120,00	± 0,58 c
BGH 2054	220,67	± 26,19 b	BGH 985	119,33	± 8,57 c
BGH 2083	217,67	± 36,66 b	BGH 981	117,67	± 1,45 c
BGH 2128	217,67	± 14,72 c	BGH 2048	115,00	± 0,58 c
BGH 2129	201,67	± 42,46 c	BGH 161	113,33	± 10,40 c

Avanços Tecnológicos Aplicados à Pesquisa na Produção Vegetal

BGH 2018	200,67	± 2,33 c	BGH 700	113,00	± 13,00 c
BGH 2010	200,00	± 50,81 c	BGH 121	110,00	± 0,58 c
BGH 2057	196,67	± 38,27 c	BGH 2113	109,00	± 0,58 c
BGH 2014	193,00	± 23,09 c	BGH 991	105,67	± 0,67 c
BGH 1254	189,00	± 39,84 c	BGH 987	103,67	± 11,57 c
BGH 992	187,00	± 1,53 c	BGH 2064	101,33	± 3,28 c
BGH 468	180,67	± 36,66 c	BGH 24	99,33	± 6,64 c
BGH 993	176,33	± 16,22 c	BGH 1258	98,67	± 0,33 c
BGH 2025	175,67	± 2,33 c	BGH 2117	98,00	± 0,58 c
BGH 2119	171,67	± 37,24 c	BGH 2055	96,33	± 5,93 c
BGH 2124	169,33	± 0,67 c	BGH 2075	94,00	± 0,58 c
Santa Clara	168,67	± 30,85 c	BGH 2041	91,00	± 0,58 c
BGH 606	161,67	± 37,82 c	BGH 2049	91,00	± 0,58 c
BGH 989	160,67	± 47,05 c	BGH 2095	87,00	± 0,58 c
BGH 1019	160,00	± 0,58 c	BGH 988	86,00	± 3,06 c
BGH 2034	157,67	± 0,33 c	BGH 773	81,67	± 5,21 c
BGH 2068	157,67	± 36,38 c	BGH 2060	74,00	± 6,66 c
BGH 2035	157,00	± 0,58 c	-	-	-

*As médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a $p < 0,05$. Fonte: Fernandes et al., 2015.

RESISTÊNCIA DE TOMATEIRO A TRAÇA DO TOMATEIRO

A traça do tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) apresenta metamorfose completa, com fases de ovo, larva, pupa e adulto. As larvas desse inseto-praga afetam a produtividade por reduzir a área fotossintética ao se alimentarem do mesófilo foliar, por afetar o crescimento vertical ao broquear o ponteiro e por broquear os botões florais, as flores e principalmente os frutos.

Diante a importância deste inseto praga, trabalhamos com onze acessos de tomateiro para a obtenção de híbridos a partir do esquema de dialelo parcial. Os genitores foram divididos em dois grupos contrastantes em relação à resistência a *T. absoluta*. O

primeiro grupo foi composto por cinco acessos de tomateiro com características agronômicas desejáveis e o segundo grupo com seis acessos de tomateiro com características de resistência a *T. absoluta*. O grupo I (características agronômicas desejáveis) foi composto pela cultivar 'Santa Clara' e pelos acessos do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (BGH-UFV) BGH-985, 2119, 2214, 2064. O grupo II foi composto pelos acessos I (características de resistência) BGH-1497, 4309, 674, LA 716, PI 127826 e PI 134417.

Para o teste do mecanismo de resistência por antixenose foram realizadas avaliações em relação a preferência de oviposição na face abaxial e adaxial e conseqüentemente foi realizado o cálculo do Índice de resistência. Foi observado diferenças significativas entre a oviposição dos adultos tanto na face abaxial, quanto adaxial. De uma forma geral, dentre os 30 híbridos de tomateiro testados e comparados com a cultivar 'Santa Clara', em 11 foi observado menor índice de resistência (IR) para oviposição na face adaxial, sendo que os híbridos mais resistentes foram BGH 2119 x BGH 4309, BGH 2219 x BGH 674, BGH 2119 x PI 127826, BGH 2119 x PI 134417, BGH 2214 x BGH 1497, BGH 2214 x BGH 4309, BGH 2214 x LA 716, BGH 985 x BGH 4309, BGH 985 x LA 716, St Cl x LA 716 e St Cl x PI 127826 (Figura 2A). Já para o IR na face abaxial diversos híbridos que foram destacados quanto a resistência a *T. absoluta* como por exemplo BGH 2064 x BGH 1497, St Cl x PI 127826 e St Cl x PI 134417 (Figura 2B). Ao analisar o IR total, verificou-se que dos 30 híbridos de tomateiro testados 14 híbridos foram mais resistentes (Figura 2C).

Para a verificação do mecanismo de resistência por antibiose avaliaram-se diversos parâmetros biológicos como coorte inicial, peso de pupas macho e fêmea, mortalidade lagartas e pupas, oviposição em 'Santa Clara', razão sexual, fecundidade, taxa líquida

reprodutiva, número de ovos/fêmea depositados na cultivar padrão 'Santa Clara'. E para definir as causas de resistência, realizou-se o estudo dos tricomas glandular e não glandular na face abaxial e adaxial e teor de zingibereno.

Verificou-se diferença significativa para todas as características avaliadas. Dentre as características, os híbridos de tomateiro que ocasionaram maiores mortalidades em larvas e pupas de *T. absoluta* foram por exemplo o BGH 2064 x BGH 674, com média de $74,65 \pm 6,74$. Da mesma maneira, os híbridos BGH 2064 x BGH 1497, BGH 2064 x BGH 4309, BGH 2064 x PI 127826, BGH 2119 x BGH 4309, BGH 2214 x LA 716, BGH 2214 x PI 127826, BGH 985 x LA 716, St Cl x LA 716, St Cl x PI 134417 e BGH 2064 x PI 127826, BGH 2119 x BGH 4309, BGH 2119 x LA 716, BGH 2119 x PI 127826, BGH 2119 x PI 134417, BGH 2214 x PI 127826, St Cl x LA 716, St Cl x PI 134417 foram os que provocaram redução do peso de pupa macho e fêmeas. Assim, verificou-se que os híbridos selecionados como híbridos resistentes foram BGH 2119 x LA 716, BH 2119 x PI 127826, BGH 2214 x PI 127826, BGH 985 x LA 716 e St Cl x BGH 674. E os mecanismos de resistência envolvidos foram antixenose e antibiose.

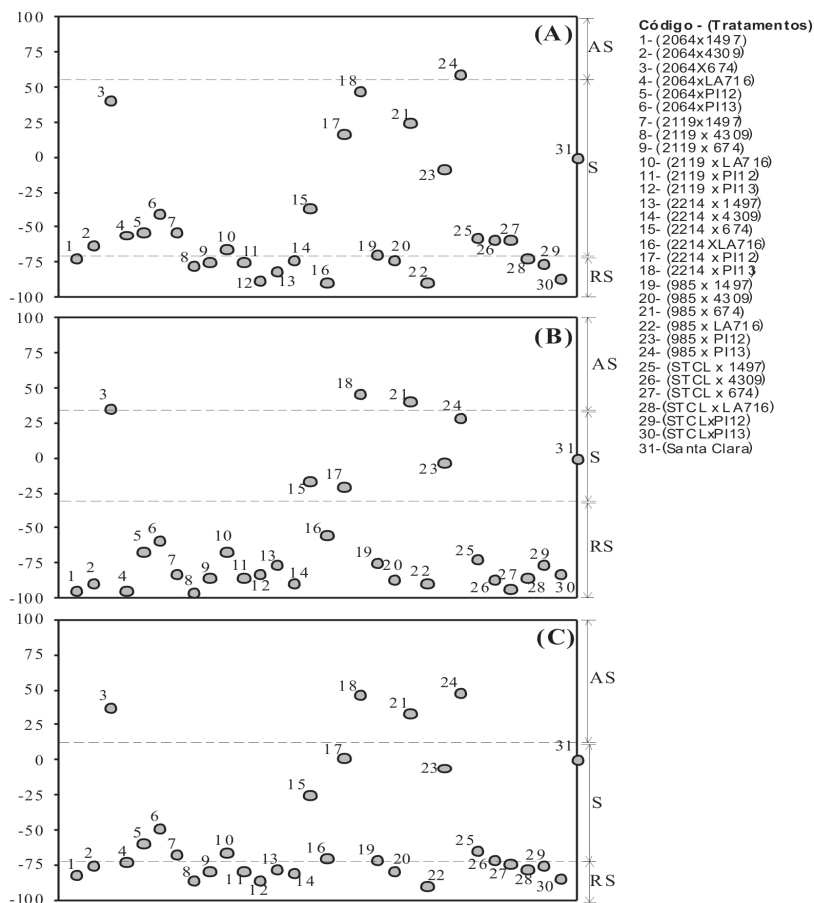


Figura 2. Índice de resistência (IR) nas faces foliares adaxial (A), abaxial (B) e total (C) de oviposição dos adultos de *T. absoluta* na cultivar 'Santa Clara' e em 30 híbridos F₁ de tomateiro. Rio Paranaíba, MG, 2010-2011. Linhas tracejadas horizontais no interior da figura delimitam regiões do gráfico contendo híbridos altamente suscetíveis (AS), suscetíveis (S) e resistentes a *T. absoluta* (RS). Os números indicados na figura representam códigos dos tratamentos, conforme a legenda. Fonte: Fernandes, M.E.S, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto acima, pode-se notar que o estudo para definir os mecanismos e causas da resistência de tomateiro ao complexo de pragas são de extrema importância para a continuidade do melhoramento de tomateiro visando a resistência de plantas a insetos pragas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDIN, E.L.L.; TOSCANO, L.C.; LIMA, A.C.S.; LARA, F.M.; BOIÇA JÚNIOR, A.L. Preferência para oviposição de *Bemisia tabaci* biótipo "B" por genótipos de *Curcubita moschata* e *Curcubita máxima*. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas, v.26, p.409-413, 2000.

FERNANDES, M.E.S.; Henriques da Silva, D.J.; PICANÇO, M.C.; FERNANDES, F.L.; Jham, G.N.; Souza Carneiro, P.C. Resistance of tomato subsamples to biotype B (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae). Agronomy Journal, v. 103, p.1849-1861, 2011.

FERNANDES, M.E.S. Capacidade combinatória entre fontes de resistência de *Solanum* sp. à *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FERNANDES, M.E.S.; FERNANDES, F.L.; SILVA, D.J.; PICANÇO, M.C.; JHAM, G.N.; Souza, P.C.C.; Queiroz, R.B. Trichomes and hydrocarbons associated with the tomato plant antixenosis to the leafminer. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.84, p.1-9, 2012.

FERNANDES, M.E.S.; FERNANDES, F.L.; SILVA, D.J.H.; PIKANÇO, M.C.; JHAM, G.N.; ALVES, F.M. Resistance of tomato accessions from the horticulture germplasm bank to red spider mites: exploring mite preference patterns and antixenosis mechanism. *International Journal of Pest Management*, v.1, p.1-8, 2015.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

LARA, F.M. *Princípios de resistência de plantas a insetos*. São Paulo: Ícone. 1991. 336p.

PANDA, N.; KRUSH, G.S. *Host plant resistance to pest*: Guildford: Biddles. 1995. 431p.

Podridão-branca do alho e da cebola

Luisa Bastos Domingos⁽¹⁾,

Amanda Bontempo⁽²⁾

Everaldo Antônio Lopes⁽³⁾

PANORAMA GERAL DA PODRIDÃO-BRANCA

A podridão-branca, causada pelo fungo *Sclerotium cepivorum*, é considerada a doença de solo mais importante para os cultivos comerciais de alho (*Allium sativum* L.) e cebola (*Allium cepa* L.). No Reino Unido e Canadá, as perdas em plantações de alho chegam a 65% (Entwistle, 1990; Earnshaw et al., 2000); enquanto no México e no Brasil perdas de até 100% já foram relatadas (Fuga et al., 2012).

Em áreas infestadas pode ocorrer redução considerável nos rendimentos dos agricultores e quatro anos sucessivos de infecção podem diminuir a produção para níveis totalmente não rentáveis. O risco do ressurgimento da doença em áreas previamente infestadas

¹ Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal de Viçosa – Campus de Rio Paranaíba, Rod. MG 230, Km 07, Caixa Postal 22, 38810-000, Rio Paranaíba, MG, Brasil. E-mail: luisa.domingos@ufv.br. ⁽²⁾Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal de Viçosa – Campus de Rio Paranaíba. E-mail: amanda.bontempo@ufv.br. ⁽³⁾Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal de Viçosa – Campus de Rio Paranaíba. E-mail: everaldolopes@ufv.br.

requer métodos de controle rigorosos, complexos e caros. Assim, a busca por áreas não infestadas é cada vez maior, dando caráter de nomadismo às principais aliáceas suscetíveis ao patógeno (Brewster, 2008).

O fungo pode atacar desde a fase de emergência das plântulas, resultando na morte antes da colheita, até durante o armazenamento (Figura 1), causando deterioração dos bulbos (Entwistle, 1990). O sintoma inicial da doença é o amarelecimento e 'dieback' das folhas, seguido de morte das folhas afetadas. Devido à morte das raízes, as plantas infectadas são facilmente arrancadas do solo. O bulbo apresenta podridão-mole nos tecidos e crescimento micelial esbranquiçado na base da planta, progredindo para a produção de massas de pequenos escleródios pretos, dando aspecto enegrecido aos bulbos (Nunes; Kimati, 2004).

A doença é disseminada quando escleródios ou material infectado são transportados durante o cultivo, o que pode ocorrer por meio de implementos agrícolas e sapatos contendo solo infestado aderido, enxurrada ou água de irrigação capaz de carrear solo. A disseminação da doença pode ainda ocorrer de planta para planta em culturas mais adensadas, resultado do contato entre os bulbos ou raízes. O foco inicial no primeiro ano de cultivo pode ser pequeno; porém, aumenta rapidamente na lavoura pelo movimento de máquinas e implementos e com o uso de irrigação (Entwistle, 1990).

O plantio em larga escala de alho e cebola ocorre principalmente em regiões com temperaturas sazonais entre 20°C e 25°C. Estas culturas são frequentemente cultivadas no inverno e com irrigação, de modo a permitir condições ótimas de temperatura e umidade para o desenvolvimento das plantas. Entretanto, a germinação dos escleródios e a infecção de *S. cepivorum* são favorecidas em ambientes úmidos e frios (Maude, 2006). O conhecimento sobre o patógeno e os possíveis métodos a serem adotados no manejo

da doença são fundamentais para evitar perdas no campo. Assim, pretende-se com esse capítulo abordar aspectos da biologia de *S. cepivorum* e discutir as principais estratégias recomendadas para o controle do fungo.



Figura 1. Formação de escleródios de *Sclerotium cepivorum* no interior do bulbo de alho, que seria utilizado como semente.

ETIOLOGIA, ECOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DA PODRIDÃO-BRANCA

A doença é causada pelo fungo filamentosso *Sclerotium cepivorum* Berk. (Sinônimo: *Stromatinia cepivora* (Berk.) Whetzel, 1945), um ascomiceto pertencente à ordem *Helotiales* e família *Sclerotiniaceae* (Kirk, et al., 2008), descrito na Inglaterra por Berkeley em 1841, com capacidade de infectar apenas espécies do gênero *Allium*.

Este patógeno não possui estágio telial (sexual) reconhecido e, por isso, sua reprodução é realizada a partir da formação de micélio estéril e pela produção de numerosos e pequenos escleródios, que servem tanto como propágulos como inóculo (Couch & Kohn, 2000).

Escleródios são estruturas multicelulares de sobrevivência, resistente às condições adversas, formados por alguns fungos filamentosos e há uma distinção fundamental entre escleródios produzidos por fungos patogênicos transportados pelo ar e os produzidos por fungos que infectam raízes (Chet & Henis, 1975), caso específico de *S. cepivorum*. Escleródios do primeiro grupo são variáveis em tamanho e podem atingir diâmetro máximo de 2 cm. Eles costumam produzir corpos de frutificação, como apotécio (espécies de *Sclerotinia*) ou peritécios (espécies de *Claviceps*). Em contraste, escleródios de fungos que infectam o sistema radicular são menores que 0-2 mm de diâmetro, mais uniformes em tamanho, e possuem forma regular (Coley-Smith & Cooke, 1971).

Os escleródios formados por *S. cepivorum* são pequenos, de 200 a 600 µm de diâmetro (Scott, 1956; Maude, 2006), com formato esférico, e sua coloração varia de marrom à preta, de acordo com o estágio de formação (Figura 2). Possuem casca composta por inúmeras camadas de células pigmentadas e espessadas. Não possuem córtex, como outras espécies do gênero, apenas uma medula interna composta por hifas espessadas e preenchidas com géis de polissacarídeos e corpos proteicos (Backhouse & Stewart, 1987). A cor escura da casca é devido à presença de melanina, que auxilia na defesa contra o dessecação (Willettts & Bullock, 1992).

Escleródios representam o inóculo primário para o desenvolvimento da doença e podem permanecer viáveis de 10 a 20 anos em condições de campo, sem a necessidade da presença do hospedeiro (Entwistle, 1990; Coventry et al., 2002). A porcentagem de sobrevivência e viabilidade dos escleródios irá variar de acordo com o tempo e a profundidade em que estiverem enterrados no solo.



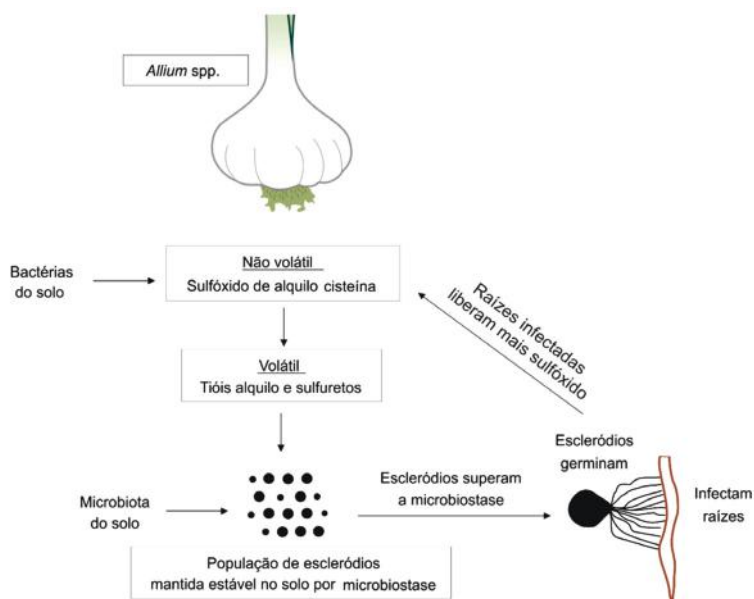
Figura 2. Escleródios esféricos e pretos de *Sclerotium cepivorum* na superfície de bulbilho de alho.

Os escleródios de *S. cepivorum* possuem um mecanismo denominado de latência constitutiva, que pode variar de 1 até 3 meses (Coley-Smith, 1990). A latência é um período de repouso em que há interrupção do desenvolvimento de um organismo (Lucas, 1998). Uma vez que a latência constitutiva é superada, os escleródios podem estar sujeitos à latência exógena, imposta por fatores como microbiostase, temperatura, luz e aeração (Coley-Smith & Cooke, 1971).

A germinação dos escleródios ocorre de forma miceliogênica (Coley-Smith, 1979). O primeiro sinal da germinação é o aparecimento de uma protuberância na superfície do escleródio.

Logo, a casca se rompe e um ou mais 'plugs' grandes e densos de hifas são exteriorizados. As hifas iniciam o crescimento e ramificam-se a partir de cada 'plug' radialmente, pela superfície das raízes do hospedeiro (Coley-Smith & Cooke, 1971).

O processo de germinação ocorre somente na presença de exsudatos radiculares das espécies do gênero *Allium*. Os exsudatos são constituídos por substâncias voláteis de sulfóxido de alquil e alquil-cisteína, que são metabolizados pela microbiota do solo, especialmente por bactérias presentes na rizosfera, para produzir compostos voláteis (sulfuretos e tióis alquil). Esses compostos ativam os escleródios latentes localizados a até 30 cm de distância (Figura 3) (Coley-Smith, 1987; Crowe & Hall, 1980; Crowe, 1995).



Adaptado de COLEY-SMITH, 1987, p. 165.

Figura 3. Exsudatos específicos das raízes de *Allium spp.* estimulam escleródios de *Sclerotium cepivorum* a germinar.

O escleródio germinado penetra nas raízes por meio do apressório, cresce intra e intercelularmente entre as células parenquimáticas, desintegrando as células do córtex e do tecido vascular. A maceração dos tecidos ocorre principalmente pela produção sequencial de enzimas que degradam a parede celular, principalmente através de endopoligalacturonases (EPGs) e pectinases. À medida que as hifas vão penetrando no tecido vegetal, há produção de ácido oxálico, que atua de forma sinérgica com as EPGs e quelatos de Ca^{2+} , reduzindo o pH perto do ótimo de funcionamento das enzimas, provocando a podridão característica do patógeno. O sistema enzima-ácido continua a degradar o tecido permitindo que o fungo penetre ainda mais e absorva os nutrientes liberados a partir dos tecidos vegetais. A temperatura e o pH ideais para o desenvolvimento do patógeno são de aproximadamente 15 °C e 6,1, respectivamente.

O patógeno coloniza rapidamente o sistema radicular. Em seguida, infecta o tecido dos bulbilhos, se estendendo para o exterior do tecido vegetal, na forma de micélio, que alcança raízes saudáveis localizadas até 2 cm de distância. Uma vez que o bulbo está infectado, a planta logo perde o vigor, as folhas amarelecem e murcham (Figura 4). O micélio branco formado no exterior dos bulbos irá produzir novos escleródios, resultando em novos ciclos de infecção (Maude, 2006).

Devido à longevidade dos escleródios dormentes no solo, campos infestados por *S. cepivorum* podem se tornar impróprios ao cultivo de *Allium* spp. por muitos anos.

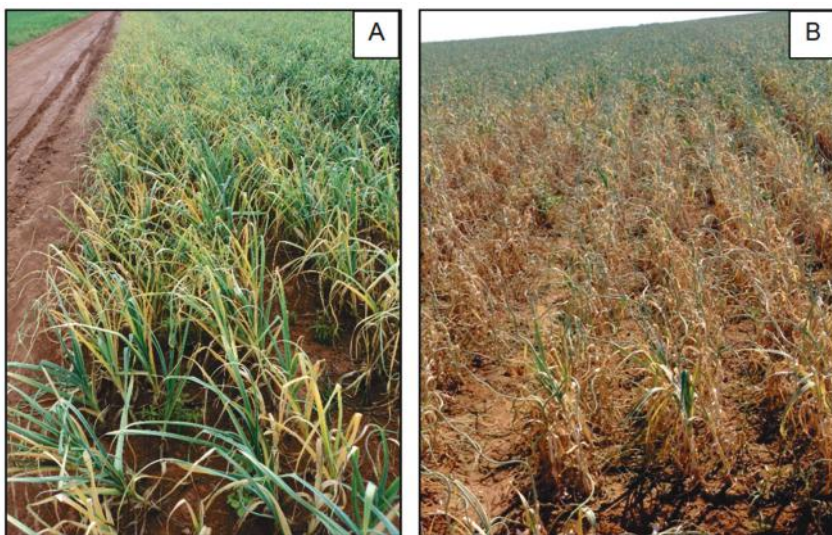


Figura 4. Áreas cultivadas com alho (*Allium sativum*), infestadas com *Sclerotium cepivorum* e sintomas foliares de amarelecimento (A), seguido de murcha das plantas (B).

A podridão-branca é uma doença monocíclica, com distribuição espacial agregada e disseminação passiva dos propágulos, principalmente por água de irrigação, movimento de maquinário e implementos agrícolas, animais e mesmo por ação humana (Crowe, 1995).

Existe alta correlação entre a densidade de escleródios no solo na ocasião do plantio, a incidência da podridão-branca em alho e a eficiência do controle adotado. Densidades de 2-10, 12-20, 22-30, 32-40, 42-60, 62-80 e mais de 80 escleródios por quilo de solo causaram incidências da doença em alho de 25, 31, 40, 46, 54, 60 e 69%, respectivamente (Trichelar, citado por Entwistle, 1986). Em outro estudo, as densidades de 1, 1-10, 10-100 e mais de 1000 escleródios por quilo de solo estiveram associadas com incidências de <10, 10-85, 85-100 e 100% da podridão nas culturas do alho

e cebola (Crowe et al., 1980). Assim, quanto maior a densidade do patógeno no solo, maiores serão as perdas e mais difícil será o controle.

MEDIDAS DE CONTROLE

O princípio mais eficiente de controle da podridão-branca é a exclusão, evitando que o patógeno seja introduzido na área de cultivo, visto que sua erradicação é praticamente inviável em termos práticos. O uso de apenas um método de controle é usualmente ineficaz, sendo requerido a integração de diferentes estratégias, como, por exemplo, controle químico, biológico, físico e cultural.

CONTROLE CULTURAL E FÍSICO

Um dos métodos de controle mais eficientes contra a podridão-branca é a limpeza de maquinários e implementos agrícolas, pois evita a disseminação dos escleródios para áreas ainda não contaminadas. Uma pequena porção de solo contendo escleródios pode dar origem a um foco da doença, que pode aumentar com o constante trânsito na área infestada em função das práticas agrícolas. O acompanhamento periódico de áreas cultivadas com plantas suscetíveis é importante para localizar possíveis focos da doença e isolar as áreas infestadas (reboleiras). O trânsito de máquinas, trabalhadores e o escoamento de água de irrigação nessas áreas devem ser evitados, para conter a dispersão do patógeno.

Detectado o foco da doença, o manejo da área deve ser diferenciado em relação aos locais não infestados, sendo necessário adotar medidas para reduzir a população do fungo. A solarização do solo é um desses métodos. A técnica consiste em cobrir o solo infestado com filme plástico transparente, principalmente durante os

períodos de maior radiação. A umidade do solo deve estar próxima da capacidade de campo. A energia solar passa pelo plástico e eleva a temperatura do solo entre 36 a 50 °C durante parte do dia, matando ou enfraquecendo propágulos de patógenos (Katan, 1981). Em locais quentes e com radiação solar elevada durante o dia, a viabilidade de escleródios de *S. cepivorum* pode ser reduzida em níveis superiores a 90% (Satour et al., 1989). Além do efeito nocivo direto do calor sobre o patógeno, parte da microbiota antagônica ao fungo é favorecida. Na Nova Zelândia, a solarização reduziu em 90% a população de *S. cepivorum* e favoreceu a colonização dos escleródios por espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus* e quatro espécies de bactérias não identificadas (McLean et al., 2001). No entanto, os elevados custos em revestir os campos infestados, a exigência de que o solo permaneça coberto com plástico por até 3 meses e a inviabilidade destas áreas com cultivos alternativos limita o uso da solarização apenas a pequenas áreas e regiões e épocas do ano onde o clima seja favorável (McLean et al., 2001).

A utilização de estimulantes de germinação também pode ser usada no manejo integrado da doença. A aplicação de substâncias no solo que mimetizem os compostos voláteis liberados pelas raízes de alho pode induzir a germinação de escleródios de *S. cepivorum*. Se tal aplicação ocorrer em condições favoráveis de temperatura (13-18 °C), umidade do solo (em torno da capacidade de campo) e na ausência de plantas hospedeiras, o fungo germinará, mas não encontrará hospedeiro para infectar, resultando em redução da viabilidade do escleródio ou mesmo a morte do propágulo. Isso porque as reservas do escleródio são usadas para germinar e o fungo não consegue sobreviver como saprófita. O produto artificial mais comumente pesquisado e aplicado em alguns países para estimular a germinação de escleródios de *S. cepivorum* é o dialil dissulfeto - DADS (Stewart & McLean, 2007). Extratos de alho também podem

ser usados em substituição ao DADS, requerendo apenas ajustar fatores para aumentar a eficiência da prática, como concentração de alho na calda, doses e números de aplicações.

Os estimulantes de germinação são mais eficazes quando a temperatura do solo permanece entre 13 e 18 °C durante várias semanas. No entanto, escleródios em dormência constitutiva não respondem ao estímulo de germinação, o que reduz a eficiência dessa prática (Coley-Smith & Parfitt, 1986).

A solarização e a aplicação de indutores de germinação usualmente não são viáveis em áreas maiores, o que reforça a importância do produtor evitar a dispersão do fungo. No entanto, podem ser medidas úteis no manejo da doença em reboleiras pequenas, principalmente para reduzir a densidade do patógeno na ausência de plantas suscetíveis, durante pousio de verão (solarização) e de inverno (indutores de germinação).

CONTROLE QUÍMICO

A aplicação de fungicidas não controla a podridão-branca com o mesmo nível de eficiência que outras doenças, principalmente se considerarmos doenças de parte aérea. Com isso, o controle químico deve ser encarado como estratégia adicional de manejo da doença.

Os primeiros produtos usados para o manejo da doença visavam principalmente a proteção das sementes e tinham benomyl, thiram e captan como ingredientes ativos (Zewide et al., 2007). Nos últimos anos, fungicidas do grupo dicarboximida passaram a ser usados no tratamento de sementes e em pulverizações foliares, principalmente a base de procimidona, iprodiona e vinclozolina (Fullerton & Stewart, 1991). No entanto, os resultados práticos da aplicação desses produtos são variáveis. Em alguns casos, a incidência da doença foi reduzida com o uso desses fungicidas,

enquanto em outros não houve controle (Fullerton & Stewart, 1991; Miñambres et al., 2010). Além dos fungicidas em geral não serem eficientes em condições de elevada pressão de inoculo, parte da ineficácia dos produtos do grupo das dicarboximidas ocorre pela degradação microbiana desses produtos no solo (Garcia-Cazorla & Xirau-Vayreda, 2005).

Fungicidas do grupo dos triazóis também são utilizados para o controle da doença (Fullerton et al., 1995; Zewide et al., 2007; Villalta et al., 2012), com aplicações direcionadas a base da planta e com eficiência superior as dicarboximidas (Duff et al., 2001) de até 85% (Fullerton et al., 1995). Tebuconazole e triadimenol são as principais moléculas usadas (Villalta et al., 2012).

Atualmente, não existem produtos registrados para o controle da podridão-branca em cebola no Brasil e poucas moléculas estão registradas para a cultura do alho (MAPA, 2015). As substâncias registradas para o controle da doença no alho pertencem aos grupos químicos dicarboximida (iprodone – Rovral®; procimidone – Sialex®, Sumilex® e Sumiguard®, todos recomendados para tratamento de bulbilhos) e benzimidazol (tiofanato metílico – Metiltiofam® e Viper®, recomendados para aplicação foliar). Algumas fungicidas registrados para outras doenças do alho, com relativa eficiência de manejo da doença na Austrália e na Nova Zelândia e que poderiam ser avaliadas no Brasil, são o tebuconazole, o triadimenol e a boscalida (Villalta et al., 2012).

A aplicação dos fungicidas direcionada a região da raiz é fundamental para otimizar a ação dos produtos. Após o plantio, pulverizações foliares seguidas de irrigação tem sido o método mais adequado para facilitar a chegada do ingrediente ativo até o sistema radicular das plantas. Se não forem dadas condições para o fungicida infiltrar no perfil do solo, o produto ficará aderido aos tecidos foliares ou sobre a superfície do solo, reduzindo consideravelmente

a eficiência do ingrediente ativo aplicado (Pung, 2008). Além disso, a eficiência desses produtos depende da presença de micélio do patógeno, uma vez que a ação sobre os escleródios é limitada. É importante salientar que a eficácia dos fungicidas para o controle de *S. cepivorum* depende em grande parte da densidade de escleródios presentes no solo. Assim, torna-se essencial o conhecimento do nível de inóculo no campo para o planejamento da frequência de aplicação dos fungicidas (Sánchez et al., 2002).

CONTROLE BIOLÓGICO

Algumas espécies de fungos e bactérias são antagonistas de *S. cepivorum* e também podem ser usados no manejo da doença no campo (Clarkson et al., 2002; Mello et al., 2007). Fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de atuar como agentes de controle de várias fitopatógenos, inclusive *S. cepivorum* (Figura 5). Esses fungos inibem fitopatógenos por meio de competição, produção de metabólitos secundários e hiperparasitismo de estruturas de resistência de patógenos, como, por exemplo, os escleródios. No Reino Unido, dois isolados de *Trichoderma viride* e um isolado de *T. pseudokoningii* degradaram até 80% de escleródios de quatro isolados de *S. cepivorum* em solo argiloso (Clarkson et al., 2004). No México, a cepa C4 de *T. harzianum*, aplicado na forma de farelo de trigo colonizado, no sulco antes do plantio (25 g m⁻¹) atrasou o aparecimento da doença por 40 dias em relação ao tratamento controle, fornecendo proteção temporária contra a podridão-branca do alho (Avila-Miranda et al., 2006). A aplicação de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *T. flavus*, via tratamento de sementes, também foram eficientes no manejo da doença em campo (Mahdizadehnaraghi et al., 2015).

Na UFV – Campus de Rio Paranaíba, dez isolados de *Trichoderma* spp. (GF 424, GF 426, GF 420, GF 417-1, GF 425- 1, GF 423, GF 39, GF 427-2, GF 371 e GF 337) foram selecionados quanto à capacidade de crescimento a 11 °C e, destes, cinco (GF 424, GF 420, GF 426, GF 417-1 e GF 425-1) colonizaram e reduziram a germinação de escleródios de *S. cepivorum* em laboratório. Em razão disso, tais isolados estão sendo avaliados em condição de campo, com o objetivo de desenvolver um biofungicida para o manejo da podridão-branca.



Figura 5. Colonização de bulbo de alho por *Trichoderma* sp. (micélio verde) infectado com *Sclerotium cepivorum* (micélio branco).

A eficiência dos agentes de controle biológico também é dependente da densidade do patógeno no solo (Stewart & McLean, 2007). Além disso, as condições ambientais podem afetar as a sobrevivência e a ação dos antagonistas. A aplicação conjunta com fungicidas também deve ser devidamente planejada, pois alguns agentes de controle biológico são sensíveis aos mesmos fungicidas que o patógeno. Por exemplo, o isolado *T. harzianum* C52, controla *S. cepivorum*, mas é altamente sensível à tebuconazole, thiran e mancozeb (Stewart & McLean, 2007). Assim, ao considerar a integração de medidas e a inclusão de agentes de biocontrole, torna-se importante saber o momento correto de aplicar o microrganismo benéfico e evitar que ele tenha sua viabilidade reduzida

MELHORAMENTO GENÉTICO

Ate o momento, não se conhece nenhum cultivar de *Allium* spp. resistente a *S. cepivorum*. É possível que a resistência/suscetibilidade ao fungo esteja correlacionada com a quantidade de exsudatos radiculares voláteis liberados pelas raízes (Brix & Zinkernagel, 1992). Alguns cultivares de aliáceas produzem níveis inferiores de compostos voláteis ou mesmo liberam exsudatos não estimulantes de escleródios, como sulfóxidos metilcisteína. Essas características poderiam ser exploradas no melhoramento. O tamanho das raízes também poderia afetar diretamente a incidência da doença, tanto por aumentar a probabilidade de contato com os escleródios, quanto pela propagação da doença planta a planta (Brix & Zinkernagel, 1992). Isto significa que espécies de *Allium* com raízes menores e que explorem menor volume de solo possam estar sujeitas ao ataque do patógeno. No entanto, essa característica depende diretamente das condições ambientais, como disponibilidade de água e aeração do solo, e tais plantas não seriam muito produtivas (Brix & Zinkernagel, 1992).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A podridão-branca ameaça toda a cadeia produtiva de alho e cebola e ainda nenhum método de controle oferece proteção total contra a doença (Zewide et al., 2007). É de suma importância que os agricultores evitem introduzir o patógeno em áreas indenes e, para isso, usem materiais sadios e adotem a limpeza dos implementos como rotina operacional. As áreas infestadas devem ser isoladas e a densidade de inóculo nas áreas deve ser mensurada, para direcionamento das estratégias de manejo.

A integração de diversas medidas de controle é a melhor opção para minimizar o efeito da doença em áreas infestadas. Durante pousio de verão, recomenda-se a adoção de solarização, biofumigação com brássicas ou fumigação com produtos químicos, como, por exemplo, o metam sódium. Durante o pousio de inverno, a aplicação de indutores de germinação e agentes de controle biológico adaptados a temperaturas entre 13-18 °C ajudará a reduzir o inóculo do patógeno. Essas estratégias durante o pousio podem ser repetidas algumas vezes, até que a densidade do patógeno seja reduzida a níveis próximos de zero. Estudos epidemiológicos sobre níveis de dano no Brasil ainda precisam ser feitos, mas, de forma geral, o patógeno é capaz de causar doença mesmo sob condições de baixa densidade populacional no solo (Fuga et al., 2012; Villalta et al., 2012). No entanto, em áreas infestadas com poucos escleródios viáveis do fungo, é possível cultivar plantas suscetíveis e manejar a doença com a aplicação de fungicidas e agentes de controle biológico (Villalta et al., 2005). Assim, quanto maior for o esforço dos produtores em minimizar a densidade do patógeno, maior será a chance de conviver com a doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVILA-MIRANDA, M.E.; HERRERA-ESTRELL, A.; PEÑA CABRIALES, J.J. Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 1823-1830, 2006.

BACKHOUSE, D.; STEWART, A. Anatomy and histochemistry of resting and germinating sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 89, p. 561-567, 1987.

BREWSTER, J.L. **Onions and Other Vegetable Alliums**. 2 ed. Wallingford: CAB International, 2008. 432 p.

BRIX, H.D.; ZINKERNAGEL, V. Screening for resistance of *Allium* species to *Sclerotium cepivorum* with special reference to non-stimulator resistance. **Plant Pathology**, v. 41, p. 308-316, 1992.

CHET, I.; HENIS, Y. Sclerotial morphogenesis in fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 13, p.169-192, 1975.

CLARKSON, J.P.; PAYNE, T.; MEAD, A.; WHIPPS, J.M. Selection of fungal biological control agents of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. **Plant Pathology**, v. 51, p. 735-745, 2002.

CLARKSON, J.P.; MEAD, A.; PAYNE, T.; WHIPPS, J.M. Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. **Plant Pathology**, v. 53, p. 353-362, 2004.

COLEY-SMITH, J.R. Survival of plant pathogenic fungi in soil in the absence of host plant. In: SCHIPPERS, B.; GAMS, W. (Eds). **Soilborne Plant Pathogens**. New York: Academic Press, 1979. p. 39-57.

COLEY-SMITH, J.R. Alternative methods of controlling white rot disease of *Allium*. In: CHET, I. (Ed). **Innovative Approaches to Plant Disease Control**. New York: John Wiley and Sons, New York, 1987. p.161-177.

COLEY-SMITH, J.R.; COOKE, R.C. Survival and germination of fungal sclerotia. **Annual Review of Phytopathology**, v. 09, p. 65-92, 1971.

COLEY-SMITH, J.R.; PARFITT, D. Some effects of diallyl disulphide on sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and possible novel control method for white rot disease of onions. **Pesticide Science**, v. 37, p. 587-594, 1986.

COLEY-SMITH J.R.; MITCHELL C.M.; SANSFORD C.E. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. **Plant Pathology**, v.39, p. 58-69, 1990.

COUCH, B.C.; KOHN, L.M. Clonal spread of *Sclerotium cepivorum* in onion production with evidence of past recombination events. **Phytopathology**, v. 90, p. 514-521, 2000.

COVENTRY, E.; NOBLE, R., MEAD, A.; WHIPPS, J.M. Control of *Allium* white rot (*Sclerotium cepivorum*) with composted onion waste. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 34, p. 1037-1045, 2002.

CROWE, F.J. White rot. In: SCHWARTZ, H.F.; MOHAN, S.K. (Eds). **Compendium of Onion and Garlic Diseases**. St Paul: APS Press, 1995. p. 14-16.

CROWE, F.J.; HALL, D.H. Soil temperature and moisture effects on sclerotium germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. **Phytopathology**, v. 70, p. 74-80, 1980.

CROWE, F.J.; HALL, D.H.; GREATHEAD, A.S.; BAGHOTT, K.G. Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. **Phytopathology**, v. 70, p. 64-9, 1980.

DUFF, A.A.; JACKSON, K.J.; O'DONNELL, W.E. Tebuconazole (Folicur®) shows potential in the control of white rot (*Sclerotium cepivorum*) in garlic in subtropical Queensland, Australia. **Proceedings of the 2nd International Symposium on Edible Alliaceae**, 2001. p. 247-250.

EARNSHAW, D.; MCDONALD, M.R.; BOLAND, G.J. Interaction among isolates and mycelial compatibility groups of *Sclerotium cepivorum* and cultivars of onion (*Allium cepa*). **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 22, p. 387-391, 2000.

ENTWISTLE, A.R. Relationships between soil sclerotial population of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of *Allium* white rot. In: **Proceedings Of The Third International Workshop On Allium White Rot**. Wellesbourne, UK, 1986. p. 21-24.

ENTWISTLE, A.R. *Allium* white rot and its control. **Soil Use and Management**, v. 6, p. 201-209, 1990.

FUGA, C.A.G.; LOPES, E.A.; VIEIRA, B.S. Etiologia, epidemiologia e controle de doenças causadas por *Sclerotium rolfsii* e *S. cepivorum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 20, p. 278-322, 2012.

FULLERTON, R.A; STEWART, A. Chemical control of onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) in the Pukekohe district of New Zealand. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural**

Science, v. 19, p. 121-127, 1991.

GARCIA-CAZORLA, J.; XIRAU-VAYREDA, M. Cross enhanced degradation of dicarboximide fungicide residues in soils. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56, p. 77-80, 2005.

HUNGER, S.A.; MCLEAN, K.L.; EADY C.C.; STEWART, A. Seedling infection assay for resistance to *Sclerotium cepivorum* in *Allium* species. **New Zealand Plant Protection**, v. 55, p.193-196, 2002.

KATAN, J. Soil Solarization. In: CHET, I. (Ed). **Innovative Approaches to Plant Disease Control**. New York: John Wiley and Sons, New York, 1987. p.77-106.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. 10th Ed. **Dictionary of the Fungi**. Wallingford: CABI Publishing, 2008. 784p.

LUCAS, J.A. **Plant Pathology and Plant Pathogens**. 3rd Ed. Oxford: Blackwell Science: Oxford, 1998. 274p.

MAHDIZADEHNARAGHI, R.; HEYDARI, A.; ZAMANIZADEH, H. R.; REZAEI, S.; NIKAN, J. Biological control of garlic (*Allium*) white rot disease using antagonistic fungi-based bioformulations. **Journal of Plant Protection Research**, v. 55, p. 136-141, 2015.

MAUDE, R.B. Onion Diseases. In: COOKE, B.M.; JONES, D.G.; KAYE, B. (Eds.). **The Epidemiology of Plant Diseases**. Dordrecht: Springer, 2006. p.506-509.

. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - AGROFIT, 2015. Acesso: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>.

MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; BRAÚNA, L.M.; PÁDUA, R.R.; GOMES,

D. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v. 11, p. 3-9, 2007.

McLEAN, K.L.; SWAMINATHAN, J.; STEWART, A. Increasing soil temperature to reduce sclerotial viability of *Sclerotium cepivorum* in New Zealand soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 137-143, 2001.

MIÑAMBRES, G.G.; CONLES, M.Y.; LUCINI, E.I.; VERDENELLI, R.A.; MERILES, J.M.; ZYGADLO, J.A. Application of thymol and iprodione to control garlic white rot (*Sclerotium cepivorum*) and its effect on soil microbial communities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 161-170, 2010.

NUNES, M.E.T.; KIMATI, H. Doenças do alho e cebola. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 4 ed. Piracicaba: Ceres, 2004. p. 49-64.

PUNG, H. **Investigations on the efficacy of folicur in lime super carrier and the development of alternative carriers for white rot control in onions**. Sydney: Horticulture Australia (Final Report), 2008. 44p.

SATOUR, M.M.; ABDEL-RAHIM, M.F.; EL-YAMANI, T.; RADWAN, A. Soil solarisation in onion fields in Egypt and Israel: Short - and long-term effects. **Acta Horticulturae**, v. 255, p. 151-159, 1989.

SCOTT, M.R. Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. I. Growth of the mycelium in soil. **Annals of Applied Biology**, v. 44, p. 576-583, 1956.

STEWART, A.; McLEAN, K.L. Biological control of onion white rot. In: CHINCHOLKAR, S.B.; MUKERJI, K.G. (Eds). **Biological Control of**

Plant Diseases. New York: The Haworth Press, 2007. p.123-148.

VILLALTA, O.; PORTER, I.J.; STEWART, A.; McLEAN, K. **Stop the rot – Improving the management of onion white rot on spring onions.** Sydney: Horticulture Australia (Final Report), 2005. 84p.

VILLALTA, O.; WITE, D.; PORTER, I.J.; McLEAN, K.L.; STEWART, A.; HUNT, J. Integrated control of onion white rot on spring onions using diallyl disulphide, fungicides and biocontrols. **Acta Horticulturae**, v. 944, p. 63-71, 2012.

ZEWIDE, T.; FININSA, C.; SAKHUJA, P.K. Management of white rot (*Sclerotium cepivorum*) of garlic using fungicides in Ethiopia. **Crop Protection**, v. 26, p. 856-866, 2007.

WHETZEL, H.H. A synopsis of the genera and species of the *Sclerotiniaceae*, a family of stromatic inoperculate discomycetes. **Mycologia**, v. 37, p. 648-714, 1945.

WILLETS, H.J.; BULLOCK, S. Developmental biology of sclerotia. **Mycological Research**, v. 96, p. 801-816, 1992.

Genômica aplicada à produção vegetal

Fabio Nascimento da Silva¹

Amauri Bogo¹

Giselle Camargo Mendes²

Danielle Ribeiro de Barros³

Ricardo Trezzi Casa¹

INTRODUÇÃO

A ampla biodiversidade encontrada no mundo se caracteriza por uma infinidade de variedades de formas, tamanhos, pigmentação e nichos ecológicos. Os seres vivos, embora apresentem ampla variação fenotípica, são molecularmente muito parecidos e constituídos de precursores moleculares idênticos. Outro aspecto interessante dos seres vivos, é que quase a totalidade da informação biológica está armazenada no ácido desoxirribonucleico (DNA – “*deoxyribonucleic acid*”), que é constituído por apenas quatro tipos de

¹ Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, Departamento de Agronomia, Av. Luiz de Camões, 2090 - 88.520-000, Lages – SC. E-mail: fabionascimento88@hotmail.com; amauri.bogo@udesc.br²Instituto Federal Goiano- Câmpus Rio Verde, Rod. Sul Goiana Km 01, Zona Rural, CEP 75.901-970, Rio Verde – GO., E-mail: giselle.mendes@ifgoiano.edu.br;³Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Fitossanidade, Campus Capão do Leão-96.010-610, Pelotas – RS. E-mail: danrbarros@hotmail.com

bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina). Portanto, é basicamente na variação de número e de sequência nucleotídica que se gera os diferentes genes nos diferentes organismos. A sequência completa de regiões codificadoras (genes) e não codificadoras de um determinado ser vivo corresponde ao genoma.

Com o avanço científico e tecnológico na área da biologia molecular, surgiu um novo campo dedicado a determinação da sequência completa do DNA de organismos ou apenas o mapeamento de uma escala genética menor, como a obtenção de sequências de genes ou partes destes, denominado de Genômica. A genômica não pode ser vista apenas como uma ciência que trata do sequenciamento e dos estudos da informação gerada, pois a genômica também descreve a função específica de genes e proteínas, que neste caso, é denominada de genômica funcional. A genômica funcional inclui a transcriptômica (expressão gênica), proteômica (expressão de proteínas) e a metabolômica (presença e abundância de metabólitos). Em síntese, a genômica pode ser dividida em duas categorias: (i) a genômica estrutural, que trata dos aspectos populacionais com embasamento genético e evolutivo; e (ii) a genômica funcional, que trata dos aspectos fisiológicos com embasamento molecular, bioquímico e celular.

Neste capítulo serão apresentados os embasamentos teóricos da genômica estrutural e funcional, as principais metodologias empregadas na obtenção de sequências de nucleotídeos e exemplos da aplicação prática da genômica na área vegetal.

GENÔMICA

GENÔMICA ESTRUTURAL

Ácido desoxirribonucleico (DNA): Molécula portadora da informação genética

O ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid* - DNA) é portador das informações genéticas que coordenam o desenvolvimento e funcionamento das células de todos os seres vivos (incluindo alguns vírus, cujo material genômico é o DNA). No caso de vírus constituído de ácido ribonucleico (*ribonucleic acid* - RNA), é esta molécula que carrega a informação genética. As informações genéticas existentes no DNA e RNA podem ser transmitidas de uma geração para outra (características hereditárias). Adicionalmente, para que estas informações sejam expressas é necessário que a molécula de DNA seja transcrita em ácido ribonucleico mensageiro (RNA mensageiro), que serve de molde para a tradução em proteínas (cadeias de aminoácidos). A principal função do DNA é a de armazenar as informações necessárias para a síntese dos RNAs mensageiros e consequente síntese das proteínas nos ribossomos.

As partes da molécula de DNA que contêm a informação genética são denominadas de genes, sendo que as partes não codificadoras apresentam importância estrutural ou estão envolvidas na regulação gênica (indução ou inibição da expressão de determinado gene). Os genes podem ser definidos como toda a sequência nucleotídica necessária para a síntese de uma molécula de RNA estável ou uma proteína.

A estrutura da molécula de DNA foi descoberta conjuntamente pelo norte-americano James Watson e pelo britânico Francis Crick em 1953, e desde então inúmeros avanços tem sido obtidos

no entendimento do funcionamento das diferentes células dos organismos vivos. Quimicamente, o DNA é um longo polímero de unidades simples (monômeros) de nucleotídeos, cuja cadeia principal é formada por moléculas de açúcares e fosfato intercalados unidos por ligações fosfodiéster. Ligadas às moléculas de açúcares estão uma de quatro bases nitrogenadas Adenina, Timina, Citosina ou Guanina. As diferentes sequências de bases observadas em diferentes seres vivos ao longo da molécula de DNA representa a informação genética. As sequências de nucleotídeos lidas em “trincas” (três nucleotídeos) especificam a sequência linear dos aminoácidos das proteínas. Esta leitura é chamada de transcrição e é feita por uma enzima denominada de RNA polimerase dependente de DNA. A partir da molécula de DNA (mais precisamente a região que contém o gene) é gerada uma molécula de RNA, denominada de RNA mensageiro. A informação contida no RNA mensageiro é “traduzida” em proteínas pela maquinaria de tradução. Embora a maioria do RNA produzido nas células seja usado na síntese de proteínas, alguns RNAs apresentam outras funções, como o RNA ribossômico, que faz parte da constituição dos ribossomos e o RNA transportador, envolvido no transporte dos aminoácidos para os ribossomos durante a síntese das proteínas.

As moléculas de DNA são geralmente enormes e, caso não estivessem compactadas dentro do núcleo, não caberiam dentro das células. O DNA pode ser observado em estruturas chamadas de cromossomas, que possuem proteínas da cromatina tipo histonas, que são responsáveis pela compactação e organização do DNA. Estas estruturas compactas condicionam as interações entre o DNA e outras proteínas envolvidas no processo de transcrição das regiões codificadoras, ajudando a controlar quais partes do DNA devem ser transcritas em um determinado momento celular. Em células eucarióticas o DNA encontra-se delimitado por uma membrana

nuclear, ao contrário dos procaríotos, onde o DNA cromossomal encontra-se disperso no citoplasma. Os genes eucarióticos apresentam sequências nucleotídicas intercaladas (íntrons) que interrompem as regiões codificadoras. Os processos de transcrição e tradução de uma célula eucariótica são apresentados na Figura 1.

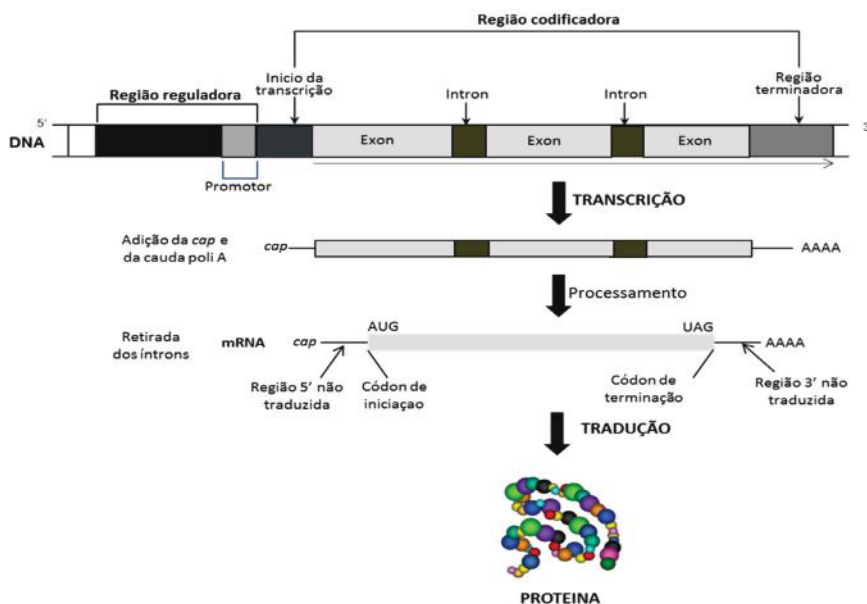


Figura 1. Representação esquemática das regiões de um gene de célula eucariótica e dos processos de transcrição e tradução. Na primeira etapa a RNA polimerase se liga à região promotora para fazer a leitura do DNA no sentido 5' - 3'. Posteriormente é formado um pré-mRNA, que recebe um nucleotídeo modificado (7-metil-guanosina trifosfato, m7GpppNp, denominado "cap") na extremidade 5' e uma sequência de bases adenina (cauda poli-A) na extremidade 3'. O pré-mRNA é processado pela retirada dos íntrons, posteriormente, transportado do núcleo para o citoplasma que será traduzido, formando a cadeia polipeptídica correspondente. (Reproduzido de Zerbini et al., 2013).

Variabilidade genética e genoma

Diversos mecanismos implicam na grande variabilidade genética encontrada na maioria dos organismos vivos. O material genético pode sofrer variação devido à mutação, recombinação, deleção, inserção, duplicação, inversão e transposição. Esta variabilidade genética gerada pelos diferentes mecanismos é o ponto de partida para a atuação de mecanismos de seleção como a “deriva genética” (efeitos aleatórios são responsáveis pela transmissão das características genéticas para as novas gerações) e a “seleção natural” (variantes mais adaptados aumentam a sua frequência na população, enquanto que variantes menos adaptados irão diminuir a sua frequência na população). Evidentemente, indivíduos (células ou unidades replicativas) mais adaptados, serão mantidos com maior frequência na população e contribuirão com a carga genética das próximas gerações. É a ampla variabilidade genética entre espécies ou mesmo entre indivíduos da mesma espécie que condiciona as diferentes características fenotípicas observadas na natureza. As diferenças fenotípicas ocorrem pela interação de dois componentes: a genética e o ambiente. O ambiente é representado pelos mais diversos nichos habitados pelos diferentes seres vivos. Já a genética, é representada essencialmente pela sequência de nucleotídeos, representada pelo código genético, que cada ser vivo carrega.

Como verificado no item 2.2.1, o código genético é composto por moléculas de DNA que representam os diferentes cromossomos de um organismo. Ao conjunto de cromossomos de determinado organismo dá-se o nome de genoma, o qual inclui regiões codificadoras (genes) e regiões não codificadoras. Mais precisamente, o genoma de um organismo é uma sequência de DNA completa do conjunto de cromossomos. Foi a partir da utilização da tecnologia de manipulação do DNA que houve a expansão do conceito básico

de mapeamento genético que impulsionou o estudo de genomas completos. Com a construção de mapas genéticos completos dos cromossomos, foi possível atingir genes individuais, e mesmo todo o conjunto de genes de um determinado organismo. Esta abordagem contribuiu para o sequenciamento de genes inteiros e posteriormente genomas completos.

O gene que causa a doença de Huntington (distúrbio neurológico hereditário) foi mapeado em 1983, contribuindo significativamente para a genética médica, tanto no entendimento desta doença, como no mapeamento de milhares de outros genes associados com doenças em humanos. Em 1995, foi sequenciado o primeiro genoma completo de um procaríoto, a bactéria *Haemophilus influenzae*. Atualmente, vários genomas de procaríotos já foram sequenciados, além de alguns genomas de eucariotos, tais como: (i) *Arabidopsis thaliana*; (ii) *Oryza sativa*; (iii) *Caenorhabditis elegans*; (iv) *Cucumis sativus*; (v) *Fragaria vesca*; (vi) *Drosophila melanogaster*; (vii) *Eucalyptus grandis*; (viii) *Homo sapiens*; e (ix) *Saccharomyces cerevisiae*.

Tecnologias para o sequenciamento do DNA

No início da década de 1990, grandes avanços foram alcançados com o desenvolvimento de métodos de sequenciamento automatizado, os quais utilizavam moléculas fluorescentes para terminação da cadeia de desoxiribonucleotídeos (métodos automatizados utilizando como base o sequenciamento de "Sanger"). A partir de 2005, novas tecnologias de sequenciamento de "nova geração" começaram a ser comercializadas e revolucionaram a quantidade de informação gerada, alcançando a casa de milhões de pares de bases em uma única corrida.

A seguir serão apresentadas as informações básicas sobre o funcionamento de cada tecnologia para obtenção das sequências de nucleotídeos.

a) Sequenciamento de "Sanger"

O método consiste na síntese de cadeias de nucleotídeos a partir do "fragmento molde" de DNA a ser sequenciado. Na primeira etapa ocorre à desnaturação do fragmento de DNA de fita dupla em cadeias molde de fita simples que serão utilizadas na síntese *in vitro* de DNA. Nessa etapa são utilizados oligonucleotídeos denominados de "primers" (pequenas sequências de nucleotídeos) que são responsáveis pelo início da reação de polimerização por meio da enzima DNA polimerase. Os primers também definem qual a cadeia que será usada como molde. Nessas reações de polimerização são utilizadas baixas concentrações de didesoxinucleotídeos trifosfato (ddNTPs - não possuem o grupo hidroxila 3'-OH) e altas concentrações de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) normais. Uma vez que um didesoxinucleotídeo não tem hidroxila na extremidade 3', não é possível haver extensão a partir do nucleotídeo adicionado, parando a reação. Por isso, quando um ddNTP é incorporado aleatoriamente na posição do dNTP correspondente, provoca a terminação prematura da polimerização e gera cadeias de DNA truncadas. As cadeias de DNA geradas são separadas por eletroforese em um gel de sequenciamento para determinação de cada um dos nucleotídeos presentes na sequência de DNA.

O uso de marcadores fluorescentes com diferentes cores para cada tipo de ddNTP permite a distinção das cadeias truncadas pela respectiva fluorescência, além disso, permitem a automatização do sequenciamento. Por exemplo, todas as sequências truncadas que terminem com um ddTTP podem ter fluorescência de cor azul, as terminadas com ddATP com cor vermelha, independentemente dos seus tamanhos. Existem equipamentos que fazem detecção da fluorescência e que podem distinguir os 4 marcadores fluorescentes presentes nos diferentes ddNTPs (Adenina, Guanina, Timina ou

Citosina). A ordem em que os diferentes fragmentos são lidos pelo detector de fluorescência indica a sequência da cadeia de DNA.

b) Sequenciamento de nova geração

As novas plataformas de sequenciamento, representadas principalmente pelas plataformas 454 da Empresa Roche e a Solexa da Illumina, geram uma quantidade de informações muitas vezes maior que o sequenciamento de Sanger, com uma economia de tempo e custo por pares de bases para o sequenciamento. Essa maior eficiência advém do uso da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, não precisando mais do intenso trabalho laboratorial de produção de clones bacterianos, da montagem das placas de sequenciamento e da separação dos fragmentos em géis. A clonagem *in vitro* em suporte sólido permite que milhões de leituras possam ser produzidas de uma única vez com as plataformas 454 e Solexa. Nas figuras 2 e 3 são apresentadas as etapas para o sequenciamento nas duas plataformas supracitadas.

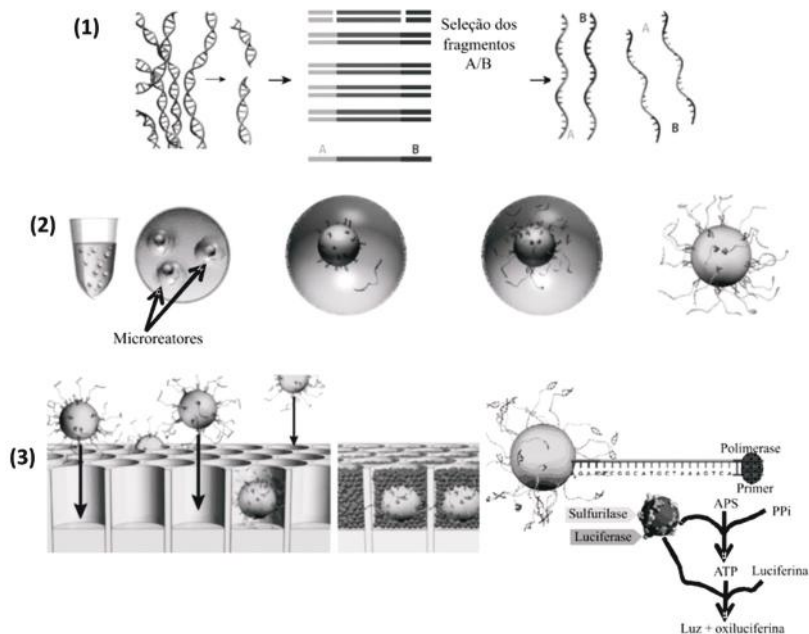


Figura 2. Representação das etapas do sequenciamento utilizando a plataforma 454 (Roche). **(1)** Na primeira etapa o DNA a ser analisado é fragmentado e, posteriormente, os adaptadores A e B são ligados às extremidades da molécula de DNA. **(2)** Cada fita única de DNA é ligada às microesferas magnéticas por pareamento com seqüências curtas complementares encontradas na superfície da microesfera. As microesferas são capturadas individualmente em gotículas oleosas onde a PCR (*"Polymerasechainreaction"*) em emulsão acontece. **(3)** As microesferas são depositadas em cavidades de uma placa. Cada fragmento único ligado a microesfera ocupa um espaço limitado na placa, permitindo assim a amplificação eficiente de cada fragmento. No final da PCR, cada microesfera estará coberta por cerca de 10 milhões de um mesmo fragmento de DNA. Durante o

sequenciamento, repetidos ciclos de cada nucleotídeo (A, C, G ou T) é passado pela placa. A adição de uma base libera um pirofosfato da fita crescente. O pirofosfato liberado é convertido em ATP pela enzima ATP sulfúrilase e, o ATP gerado juntamente com a enzima luciferase oxidam a luciferina gerando um sinal de luz. Os sinais de luz são registrados na forma de gráficos, os quais permitem a identificação da sequência do DNA em cada cavidade da placa (Reproduzido de Carvalho & Silva, 2010).

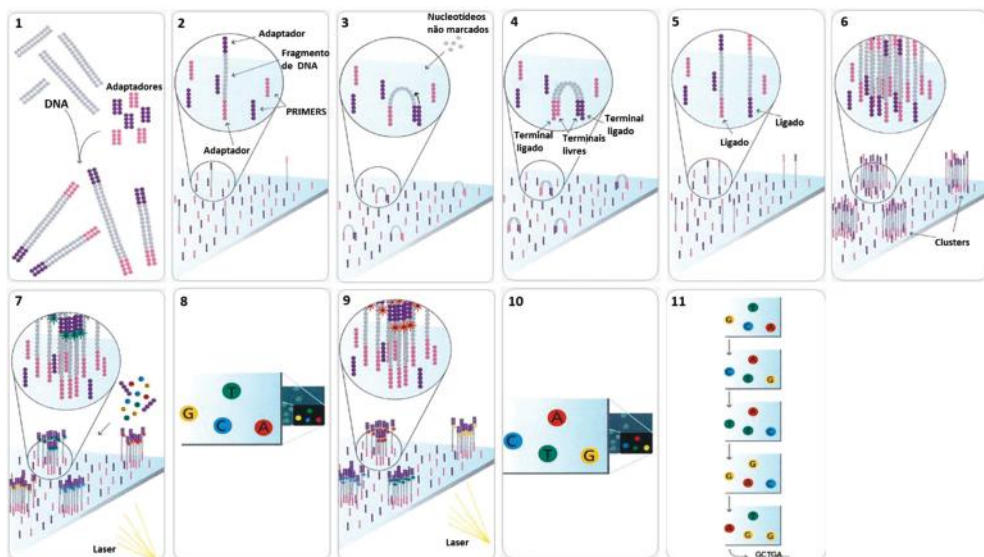


Figura 3. Representação das etapas do sequenciamento utilizando a plataforma Solexa (Illumina). **(1)** Na primeira etapa o DNA é fragmentado e ligado aos adaptadores nas duas extremidades. **(2)** As moléculas de DNA simples ligadas aos adaptadores são aderidas por afinidade ao suporte sólido. Oligonucleotídeos (primers) complementares aos adaptadores também ficam aderidos ao suporte

sólido. **(3)** e **(4)** No primeiro ciclo de amplificação da PCR em fase sólida, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra ooligonucleotídeo complementar no suporte, formando uma fita dupla. Após o fornecimento dos reagentes, a PCR é iniciada utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como iniciador da amplificação. **(5)** Após o primeiro ciclo de amplificação (síntese de novas fitas a partir do molde) ocorre a etapa de desnaturação. Nessa etapa as fitas duplas se separam devido à elevação da temperatura. **(6)** Novos ciclos de ligação dos oligonucleotídeos e de amplificação ocorrem, gerando milhares de moléculas de DNA idênticas ao molde (formando os clusters). **(7)** e **(8)** Na próxima etapa são adicionados nucleotídeos terminadores marcados (fluoróforos), os quais serão incorporados à cadeia de DNA. Após a excitação dos nucleotídeos marcados, com a utilização de laser, um sinal é gerado. Esse sinal é detectado por dispositivo eletrônico de leitura e interpretado como sendo um dos quatro possíveis nucleotídeos. **(9)** e **(10)** A incorporação do nucleotídeo marcado, excitação a laser e leitura são repetidas em um processo contínuo para cada nucleotídeo presente na cadeia de DNA. **(11)** As leituras são realizadas sequencialmente, permitindo a montagem da sequência completa para um determinado cluster (Adaptado de "Illumina's Solexa Sequencing Technology". Disponível em: <http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=21>).

Essas novas plataformas de sequenciamento geram uma grande quantidade de informações, representadas pelo sequenciamento de um grande número de fragmentos ("reads"). Essas plataformas apresentam a vantagem de permitir um sequenciamento representativo de genomas em uma única corrida, apresentando elevado potencial no estudo de transcriptomas (genômica funcional). No entanto, essas novas tecnologias de sequenciamento apresentam algumas limitações, sendo a principal na constituição da montagem dos genomas e/ou transcriptomas com pares de bases obtidos nos fragmentos curtos. Neste sentido, os avanços alcançados nos últimos anos relativos à bioinformática vêm fornecendo maior suporte a análise dos dados gerados nas diferentes plataformas de sequenciamento. Atualmente, existem vários softwares disponíveis para análise de genes e genomas, os quais contribuem significativamente para o melhor entendimento das informações básicas geradas no sequenciamento e também dão suporte a análises funcionais.

GENÔMICA FUNCIONAL

A genômica funcional é um campo da biologia molecular que se concentra na determinação da função de genes e de proteínas. Ao contrário da genômica estrutural, a qual se baseia na estrutura estática do genoma, a genômica funcional busca compreender o dinamismo dos processos de transcrição gênica, tradução, interação entre proteínas e alterações metabólicas. Os estudos na área de genômica funcional buscam identificar variações entre genes, transcritos e proteínas ao longo do tempo, levando em consideração o estágio de desenvolvimento do indivíduo, e o tipo de tecido ou célula. Como o próprio nome já diz, a genômica funcional está associada à função dos genes, como por exemplo, análises

de mutantes com perda de função. Inclui estudos relacionados à genômica propriamente dita, ao transcriptoma, a proteômica e a metabolômica. Essas abordagens são utilizadas para facilitar o melhoramento vegetal, objetivando entender a fisiologia do fenótipo que está associado aos mecanismos genéticos e epigenéticos.

O sequenciamento completo do genoma da planta modelo *Arabidopsis thaliana*, realizado em 2000, vinculado ao desenvolvimento de novas tecnologias para a análise funcional de genes, propiciou um avanço significativo no entendimento dos processos moleculares nas mais diferentes espécies de plantas. Os projetos de sequenciamento de genomas em larga escala utilizados atualmente tem modificado a visão da biologia, passando da era genômica para a era pós-genômica. A era pós-genômica está intimamente relacionada ao estudo da função gênica, baseada no grande volume de dados obtidos após o sequenciamento em larga escala de espécies vegetais de interesse. Os avanços nessa área e, conseqüentemente na biotecnologia vegetal dependem de avanços nas mais diversas áreas da ciência, como a biologia molecular, a biologia celular, a bioquímica, a fisiologia vegetal e a bioinformática.

O entendimento e a elucidação de aspectos relacionados à genômica (estrutural e funcional) abrem um leque de possibilidades na geração de novas tecnologias e ferramentas aplicadas à segurança alimentar, a produção de compostos a partir de plantas (biocombustível, bioplásticos e fármacos), além de possibilitar a geração de plantas mais tolerantes a estresses de ordem biótica e abiótica. Um exemplo claro na geração de uma ferramenta com amplas possibilidades de aplicação é a "transgenia", a qual foi desenvolvida e aplicada com o avanço da genômica.

EXEMPLOS DE APLICAÇÃO PRÁTICA

a) Estrutura genética de populações debegomovírus

A sequência de nucleotídeos obtida a partir de populações virais se constitui em dados de extrema importância nos estudos de variabilidade e diversidade genética, relacionamentos filogenéticos e a estrutura genética de populações virais. O entendimento destes aspectos permite entender os mecanismos evolutivos e também permite a predição de práticas de manejo adequadas no controle desses patógenos.

A família *Geminiviridae* engloba vírus com genoma composto por uma ou duas fitas simples de DNA circular, encapsidados em uma partícula icosaédrica geminada. A família é dividida em sete gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus*, *Topocuvirus*, *Eragrovirus*, *Turncurtovirus* e *Becurtovirus*), de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético (Varsaniet al., 2014).

Os primeiros estudos da estrutura genética dos begomovírus foram desenvolvidos a partir de populações infectando mandioca no continente Africano e na Índia. Esses estudos demonstraram um alto grau de variabilidade genética dos begomovírus em mandioca. A emergência de duas novas espécies de begomovírus resultantes de eventos de recombinação e pseudo-recombinação (troca de componentes genômicos) entre isolados de *African cassava mosaicvirus* (ACMV) e *EastAfrican cassava mosaicvirus* (EACMV) demonstraram a importância desses mecanismos na geração de variabilidade e no aumento da severidade das epidemias (Zhouet al., 1997; Fondong et al., 2000). Pita et al. (2001), demonstraram a formação de um pseudo-recombinante viável entre os isolados UG2 e UG3 de EACMV, e também que o pseudo-recombinante formado entre o DNA-A do EACMV-UG2 e o DNA-B do EACMV-UG3 era o

begomovírus predominante em plantios de mandioca em Uganda no início da década de 2000.

No Brasil, a cultura mais afetada pelos begomovírus é o tomateiro, sendo que a incidência destes vírus aumentou significativamente no início da década de 1990, provavelmente devido à introdução e disseminação da mosca-branca *Bemisia tabaci* Grupo MEAN 1 (antigo Biótipo B) (Marubayashi et al. 2013). Desde então, dezesseis espécies de begomovírus já foram descritas (Faria e Maxwell, 1999; Fernandes et al., 2006; Calegario et al., 2007; Ribeiro et al., 2007; Castillo-Urquiza et al., 2008; Albuquerque et al., 2012), indicando a grande diversidade de espécies de begomovírus infectando o tomateiro no Brasil. Algumas espécies, tais como o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) apresentam uma ampla distribuição geográfica, enquanto que outras encontram-se restritas a determinadas regiões.

Com o objetivo de analisar a estrutura genética de populações de begomovírus infectando plantas de tomateiro e plantas silvestres no sudeste do Brasil, Rocha et al (2013) obteve 126 sequências completas do DNA-A e 58 do DNA-B. Os isolados virais foram obtidos a partir de plantas de tomateiro e plantas silvestres no município de Paty do Alferes no Estado do Rio de Janeiro, e nos municípios de Carandaí, Coimbra, Florestal, Jaíba e Viçosa no Estado de Minas Gerais. As espécies virais detectadas com maior frequência em plantas de tomate foram o ToSRV, o *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) e o *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV). Nas plantas silvestres o vírus encontrado com maior frequência foi o *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV). A comparação das populações dessas cinco espécies virais indicou que a população de BIYSV apresenta maior grau de variabilidade genética comparada aos begomovírus encontrados em tomateiro, embora as outras populações também apresentem

variabilidade genética, principalmente devido a mutação.

Os begomovírus ToSRV e *Tomatorugosemosaicvirus* (ToRMV) apresentam uma característica interessante: a sequência completa dos DNAs-B apresenta identidade de 98%. Adicionalmente, a elevada identidade de sequência da região comum (região intergênica) do DNA-A (96,2 %) indica que os dois vírus provavelmente compartilham o mesmo DNA-B. A ocorrência de recombinação entre o ToRMV e o ToSRV foi proposta por Ribeiro et al. (2007) e confirmada por Silva et al. (2014). A região do genoma do ToSRV que foi transferida por recombinação para o ToRMV compreende praticamente toda a região codificadora da proteína associada à replicação (Rep) e parte da região comum, incluindo os elementos conservados indispensáveis para a replicação viral. Silva et al. (2014) demonstraram experimentalmente a formação de pseudo-recombinantes viáveis entre o ToRMV e o ToSRV. Em conjunto, esses resultados sugerem que após o evento de recombinação, o vírus recombinante (ToRMV) capturou o DNA-B do vírus parental (ToSRV). Portanto a emergência do ToRMV envolve tanto eventos de recombinação quanto de pseudo-recombinação.

De maneira geral, os trabalhos apresentados indicam um alto grau de variabilidade genética dos begomovírus (mutação, recombinação e pseudo-recombinação), o qual pode favorecer a adaptação a novas condições ambientais e a novos hospedeiros. Em termos práticos esses resultados indicam que a utilização isolada de variedades resistentes não é efetiva no controle destes vírus em longo prazo, uma vez que evoluem rapidamente e podem em um curto período de tempo suplantar a resistência conferida por determinado genótipo.

b) Genômica aplicada ao aumento da tolerância das plantas aos estresses biótico e abiótico

Segundo o órgão responsável pela previsão das mudanças climáticas (*Intergovernmental Panel on Climate Change* – IPCC), os setores agrícola e florestal estarão vulneráveis aos efeitos do aumento da concentração de CO₂ na atmosfera associado ao aumento médio da temperatura. Essas mudanças serão responsáveis por alterações consideráveis no clima, tais como: (i) ondas de calor; (ii) escassez hídrica; (iii) salinidade; (iv) inundações; e (v) alagamentos. Com isso, a demanda de recursos para a pesquisa na área de melhoramento genético para obtenção de culturas tolerantes aos estresses abióticos supracitados é prioridade nos grandes centros de pesquisa em todo o mundo.

A escassez de água é o fator ambiental que mais impacta negativamente na produtividade das plantas. Assim, as plantas têm desenvolvido diversas estratégias e mecanismos para sobreviverem à falta de água. Muitas destas plantas apresentam mecanismos de escape quando submetidas a estresse hídrico (falta de água), como por exemplo, a antecipação do florescimento ou uma baixa condutância estomática. No entanto, muitos aspectos moleculares envolvidos na tolerância das culturas a redução da disponibilidade hídrica são, ainda, pouco explorados. A identificação de genes candidatos que são responsáveis por conferir a tolerância hídrica representa um grande desafio na atualidade.

Os mecanismos que conferem à planta tolerância aos estresses biótico e abiótico são complexos e são dependentes da intensidade e duração do estresse e do estágio de desenvolvimento da planta. Em condições de estresse, uma série de respostas são observadas nas plantas, como por exemplo, variações nos níveis hormonais, produção de espécies reativas de oxigênio e a maior

expressão de fatores de transcrição (responsáveis pela indução da expressão de determinados genes). Muitas das respostas descritas aqui são compartilhadas tanto por estresse biótico quanto por estresse abiótico.

Uma estratégia utilizada para a maior tolerância das plantas à seca, à salinidade e ao frio é o acúmulo de compostos osmoprotetores como a glicina betaína dentre outros, a qual é encontrada em plantas, animais e microorganismos. Em condições de estresse abiótico, esses compostos acumulam em maior concentração (Ronteinet al. 2002). Esses compostos são sintetizados a partir da colina pelas enzimas betainaaldeído e colina desidrogenase (Sakamoto & Murata 2000). A betainaaldeído desidrogenase (BADH) é a enzima responsável por catalisar a aldeído betaina em glicina betaina. Assim, plantas transgênicas de batata carregando o transgene *BADH* de espinafre sobre o controle do promotor *rd29A* de *Arabidopsis thaliana* apresentaram alta atividade de BADH. Em consequência disso, as plantas apresentaram tolerância ao estresse hídrico e salino em condições de casa de vegetação. Os resultados apresentados por Zhang et al. (2011) demonstram que o produto do gene *BADH* foi responsável pela tolerância ao estresse hídrico e salino em plantas de batata.

Outro exemplo de agente osmoprotetor na tolerância ao estresse abiótico é a prolina. Plantas de batata transgênicas superexpressando o gene *pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS)* de *A. thaliana*, sob controle do promotor 35S, apresentaram maior acúmulo de prolina quando as plantas foram submetidas a 180 mM de NaCl (estresse salino). O aumento da biossíntese da prolina foi responsável pela tolerância à salinidade em plantas de batata (Gargouri-Bouzidet al. 2005).

As proteínas regulatórias denominadas de fatores de transcrição são utilizadas em muitos estudos de engenharia genética.

Estas proteínas regulam a expressão de vários genes por se ligarem, especificamente, a regiões de genes alvos (Ramanjulu 2002). A identificação e caracterização funcional de fatores de transcrição responsivos a seca, como os membros da família de fatores de transcrição chamados de *Drought-responsive element binding factors* (DREB) e *C-repeat binding factors* (CBF), já tem sido relatadas em *A. thaliana* (Pino et al. 2007). A superexpressão destes fatores pode aumentar a tolerância à seca. O gene *OsbZIP23* encontrado em arroz é homólogo a família de fatores de transcrição ABF/AREB em *A. thaliana*. Plantas de arroz que superexpressam o gene *OsbZIP23* apresentaram maior tolerância aos estresses hídrico e salino (Xiang et al., 2008). Plantas de tabaco superexpressando o gene da *Glutathione transferase* de *Citrus sinensis* (*CsGSTU1* e *CsGSTU2*) apresentaram uma maior tolerância aos estresses salino e a seca, além de uma maior tolerância ao herbicida fluorodifen (Lo Cicero et al., 2015).

Vários trabalhos têm descrito os aspectos moleculares dos mecanismos de resposta ao estresse abiótico e as possíveis comunicações existentes entre as vias de sinalização. Além disso, muitos estudos têm relatado a ocorrência de sobreposição na resposta aos estresses biótico e abiótico. A ativação de intermediários comuns a estas vias de sinalização indica esta comunicação e apontam possíveis alvos para a engenharia genética, visando à obtenção de plantas tolerantes aos dois tipos de estresse.

As doenças de plantas podem ser causadas por fungos, bactérias, nematoides, vírus, viroides e fitoplasmas. Após o contato inicial com a planta (estabelecido ou não o processo infeccioso), o patógeno pode ser reconhecido por proteínas presentes na superfície ou internamente nas células vegetais. Esta interação planta-patógeno ocorre de maneira específica, e nos últimos anos vários trabalhos vêm demonstrando esta via elaborada de reconhecimento e de

resposta de defesa da planta contra os patógenos. As informações geradas tanto em termos de genômica estrutural quanto funcional são de extrema importância no direcionamento de estudos que visem à obtenção de plantas resistentes aos patógenos, seja pelos métodos clássicos de melhoramento genético seja pela utilização de plantas transgênicas.

No estudo apresentado por Zhu et al. (2015), plantas de trigo superexpressando o gene *TaAGC1*, o qual codifica uma proteína serino/treonina cinase, apresentaram resistência ao fungo *Rhizoctoniacerealis*. Adicionalmente, as plantas silenciadas para o gene *TaAGC1* não apresentaram o fenótipo de resistência. A resistência das plantas transgênicas foi acompanhada pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio e expressão de genes relacionados à defesa.

Muitos patógenos codificam proteínas efetoras, as quais são candidatas para o melhoramento de plantas visando resistência a doenças. Por exemplo: plantas de *Nicotianabenthamiana* superexpressando o efector PsCRN115 de *Phytophthorasojae* apresentaram crescimento e desenvolvimento normais quando desafiadas por este patógeno. Além disso, estas plantas apresentaram tolerância aos estresses hídrico e salino. O efector PsCRN115 pode ser utilizado como uma importante ferramenta para o melhoramento de plantas aos estresses biótico e abiótico (Zhang et al. 2015).

Outro exemplo de plantas transgênicas que exibem resistência ao patógeno e tolerância a estresses abióticos pode ser constatado em plantas que superexpressam o gene *MIPS*. Este gene codifica a enzima *Myo-inositol-1-phosphate synthase* responsável pela biossíntese de mio-inositol. O envolvimento do produto deste gene na tolerância ao estresse abiótico não é novidade, uma vez que já tem sido relatado na literatura. Entretanto, o envolvimento

deste gene no estresse biótico ainda não havia sido relatado. Plantas de batata superexpressando o gene *IbMIPS1* apresentaram fenótipo de resistência ao nematoide *Ditylenchus destructor*, além disso apresentaram tolerância aos estresses hídrico e salino. Após a infecção por nematoide, as plantas superexpressando o gene *IbMIPS1* apresentaram uma maior expressão de proteínas reguladoras, deposição de calose e biossíntese de lignina. (Zhai et al., 2015).

Os resultados apresentados aqui demonstram a importância do conhecimento dos genes e genomas, bem como de suas funções no estabelecimento de estratégias que possibilitem as plantas uma maior adaptação frente a condições adversas, tais como os estresses biótico e abiótico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços na área da genômica tem sido de grande importância para o entendimento e estabelecimento de ferramentas moleculares que auxiliam na evolução da ciência e na solução de problemas práticos e recorrentes da sociedade. A genômica estrutural fornece a informação básica, constituída pela sequência de nucleotídeos, a qual é essencial para o desenvolvimento da genômica funcional. No decorrer do capítulo foi possível observar a grande quantidade de informações disponibilizadas, especialmente a partir de 1990. No entanto, ainda existe um grande número de informações básicas a serem geradas, estudadas e validadas, as quais certamente contribuíram para o desenvolvimento de diferentes áreas. A busca pela compreensão do funcionamento celular, das interações entre moléculas é contínua e deve ser buscada a todo o momento. Neste sentido a genômica estrutural e funcional tem papel central. Muitas das ferramentas biotecnológicas e de engenharia genética, hoje

corriqueiras em laboratórios de pesquisa e inovação, já tiveram caráter utópico na ótica de muitos pesquisadores e estudiosos. A ciência avança com o surgimento de novos questionamentos e, sem sombra de dúvidas, a genômica em todas as suas dimensões gera mais perguntas do que respostas, resultando em um avanço crescente e por que não dizer infinito de possibilidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque, L.C., Varsani, A., Fernandes, F.R., Pinheiro, B., Martin, D.P., Oliveira, P.D.T.F., Lemos, T.O., Inoue-Nagata, A.K. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 157: 747-752. 2012.

Calegario, R.F., Ferreira, S.S., Andrade, E.C., Zerbini, F.M. Characterization of Tomato yellow spot virus, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 1335-1343. 2007.

Carvalho, M.C.C.G. & Silva, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural* 40: 735-744. 2010.

Castillo-Urquiza, G.P., Beserra JR., J.E.A., Bruckner, F.P., Lima, A.T.M., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P., Zerbini, F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* 153: 1985-1989. 2008.

Cicero, L.L., Madesis, P., Tsiftaris, A., Lo Piero, A.R. Tobacco plants over-expressing the sweet orange tau glutathione transferases (CsGSTUs) acquire tolerance to the diphenyl ether herbicide fluorodifen and to salt and drought stresses. *Phytochemistry* 116: 69-77. 2015.

Faleiro, F. G., Andrade, S.R.M., Reis Junior, F.B. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF.:EmbrapaCerrados, 730p. 2011.

Faria, J.C.&Maxwell, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology*. 89: 262-268. 1999.

Fernandes, J.J.,Carvalho, M.G., Andrade, E.C., Brommonschenkel, S.H., Fontes, E.P.B., ZERBINI, F.M. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology* 55: 513-522. 2006.

Fondong, V.N., Pita, J.S., Rey, M.E.C., Kochko, A., Beachy, R.N., Fauquet, C.M. Evidence of synergism between *African cassava mosaic virus* and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *Journal of General Virology* 81: 287-297. 2000.

Gargouri-Bouزيد, R.,Savour, A., Bidani, A., Jaoua, S., Hmida-Sayari, A., Jaoua, L. Overexpression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. *Plant Science* 169: 746-752. 2005.

Hamilton, J.P. & Buell, R. Advances in plant genome sequencing. *The Plant Journal* 70: 177-190. 2012.

Marubayashi, J.M., Yuki, V.A., Rocha, K.C.G.,Mituti, T.,Pelegrinotti, F.M., Ferreira, F.Z.,Moura, M.F., Navas-Castillo, J.,Moriones, E., Pavan, M.A., KRAUSE-SAKATE, R.At least two indigenous species of the *Bemisiatabaci* complex are present in Brazil. *Journal of Applied Entomology* 137: 113-121. 2013.

Pino, M., Skinner, J., Park, E., Jeknic, Z., Hayes, P., Thomashow, M., Chen, T. Use of a stress inducible promoter to drive ectopic AtCBF expression improves potato freezing tolerance while minimizing

negative effects on tuber yield. *Plant Biotechnology* 5: 591–604. 2007.

Pita, J.S., Fondong, V.N., Sangare, A., Otim-Nape, G.W., Ogwal, S., Fauquet, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology* 82: 655-665. 2001.

Ramanjulu, S. & Bartels, D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environment* 25:141–151. 2002.

Ribeiro, S.G., Martin, D.P., Lacorte, C., Simões, I.C., Orlandini, D.R.S., Inoue-Nagata, A.K. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology*97: 702-711. 2007.

Rocha, C.S., Castillo-Urquiza, G.P., Lima, A.T.M., Silva, F.N., Xavier, C.A.D., Hora Junior, B.T., Beserra Junior, J.E.A., Malta, A.W.O., Martin, D.P., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P., MIZUBUTI, E.S.G., ZERBINI, F.M. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. *Journal of Virology* 87: 5784-5799. 2013.

Rontein, D., Basset, G., Hanson, A. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metabolic engineering*4: 49–56. 2002.

Sakamoto, A. & Murata, N. Genetic engineering of glycine betaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*51: 81–88. 2000.

Silva, F.N., Lima, A.T.M., Rocha, C.S., Castillo-Urquiza, G.P., Alves Junior, M., ZERBINI, F. M. Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV): two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B. *Virology Journal* 11: 66. 2014.

Varsani, A., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Brown, J. K., Zerbini, F. M., Martin, D. P. Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. *Archives of Virology* 159: 2193-2203. 2014.

Voet, D. & Voet, J. G. *Bioquímica*. 4. ed. Porto Alegre, Artmed, 1596 p. 2013.

Xiang, Y., Tang, N., Du, H., Ye, H., Xiong, L. Characterization of OsbZIP23 as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiology* 148: 1938–1952. 2008.

Zerbini, F.M., Silva, F.N., Castillo-Urquiza, G.P., Basso, M.F. *Plantastransgênicas*. In: Borém, A. & Fritsche-Neto, R. *Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas*. Rio Branco: Suprema, 336p. 2013.

Zhai, H., Wang, F., Si, Z., Huo, J., Xing, L., An, Y., He, S., Liu, Q. A myo-inositol-1-phosphate synthase gene, *IbMIPS1*, enhances salt and drought tolerance and stem nematode resistance in transgenic sweet potato *Plant Biotechnology Journal*, pp. 1–11. 2015.

Zhang, N., Si, H.J., Wen, G., Du, H.H., Liu, B.L., Wang, D. Enhanced drought and salinity tolerance in transgenic potato plants with a

BADH gene from spinach. *Plant Biotechnology Reports* 5: 71-77. 2011.

Zhang, M., Rajput, A. N., Shen, D., Sun, P., Zeng, W., Liu, T., Mafurah, J.J., Daolong Dou, D.A *Phytophthorasojae* cytoplasmic effector mediates disease resistance and abiotic stress tolerance in *Nicotianabenthamiana*. *Scientific Reports* 5: 10837. 2015.

Zhou, X., Liu, Y., Calvert, L., Munoz, C., Otim-Nape, G.W., Robinson, D.J., Harrison, B.D.Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology* 78: 2101-2111. 1997.

Zhu, X., Yang, K., Wei, X., Zhang, Q., Rong, W., Du, L., Ye, X., Qi, L., Zhang, Z. The wheat AGC kinase TaAGC1 is a positive contributor to host resistance to the necrotrophic pathogen *Rhizoctoniacerealis*. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/erv367.2015.

Potencial de revestimento de extrato de própolis na conservação de frutas pós-colheita

Flávia Regina Passos¹
Fabrícia Queiroz Mendes²
Isabela Costa Guimarães³

INTRODUÇÃO

O Brasil é um país cujas dimensões continentais e multiplicidade de climas permite a produção de frutas de praticamente todas as espécies comerciais existentes no mundo, contribuindo para o sucesso do setor frutícola, tanto no âmbito nacional, como regional. A fruticultura brasileira tem como um dos maiores desafios a minimização de perdas pós-colheita, ocasionadas pela elevada perecibilidade das frutas, que propicia descartes consideráveis, antes mesmo de alcançar o mercado consumidor. Para atender às exigências sempre crescentes dos mercados, faz-se necessário

¹ M.Sc. em Produção Vegetal - UFV *Campus* de Rio Paranaíba,
e-mail: flaviapassos1@yahoo.com.br.

² D.Sc. em Bioquímica Agrícola - UFV, Profa. da UFV *Campus* de Rio Paranaíba,
e-mail: fabricia.mendes@ufv.br.

³ M.Sc em Ciências dos Alimentos - UFLA, Profa. da UFV *Campus* de Rio Paranaíba,
e-mail: icostag@ufv.br

investir em tecnologias que mantenham um excelente padrão de qualidade, minimize as perdas pós-colheita e aumentam a rentabilidade dos produtores de frutas frescas. Dentre as diversas técnicas, está o uso de revestimentos. A utilização adequada de revestimentos reduz a migração de água para o ambiente, protege o fruto contra microrganismos, incrementa o brilho superficial e regula a transpiração ao proporcionar atmosfera modificada entre o fruto e o meio. Atualmente, a própolis tem sido utilizada na conservação pós-colheita de frutos na forma de revestimento, uma vez que é reconhecida como segura (GRAS = Generally Recognized As Safe) para o consumidor quando usada em substituição aos materiais sintéticos e também ao meio ambiente.

FRUTICULTURA NO BRASIL

A fruticultura é uma das atividades mais importantes da economia brasileira. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, posição que tem como ponto de partida as condições favoráveis de clima, solo e disponibilidade de área no País. A colheita de frutas excede 40 milhões de toneladas anuais, com grande potencial de produção e comercialização de frutas tropicais, subtropicais e temperadas (Anuário Brasileiro da Fruticultura, 2015). A produção de frutas no Brasil fica atrás apenas da China e da Índia, que, juntos, respondem por 44% do total mundial e tem suas produções destinadas principalmente aos seus mercados internos (IBRAF, 2013).

A base agrícola da cadeia produtiva das frutas abrange, aproximadamente, 2 milhões de hectares e apresenta valor bruto de produção superior a R\$ 23 bilhões (Anuário Brasileiro da Fruticultura, 2015). Conforme levantamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2013), as frutas que mais contribuíram no

volume total da produção brasileira em 2013 (último ano com dados oficiais disponíveis) foram laranja, banana, melancia, coco-da-baía e abacaxi. A laranja, a banana e a melancia responderam por 66,2% da produção obtida pela fruticultura brasileira. O mamão, a uva, a maçã, o limão e a manga completaram a dezena das principais frutas produzidas e, somadas às cinco primeiras, contabilizaram 91% das colheitas nos pomares brasileiros do referido ano.

A fruticultura participa diretamente na economia do País através do valor das exportações e mercado interno. O país participa com apenas 2% do comércio global do setor, o que demonstra o forte consumo interno (IBRAF, 2013). De acordo com o Anuário Brasileiro da Fruticultura (2015), as exportações brasileiras de frutas frescas em 2014 somaram 673 mil toneladas, volume 5,46% abaixo do negociado no ano anterior. Em receita, as vendas externas estimaram em US\$ 636,4 milhões em 2014, 3,21% a menos do que em 2013. As exportações recuaram devido ao baixo desempenho da maçã, que caiu quase 50% na comparação com 2013, em decorrência das condições climáticas desfavoráveis ocorridas na safra de 2014, quando o fruto não atingiu a qualidade necessária para cumprir as exigências internacionais. Outras frutas representativas que registraram quedas foram a banana e a uva. Já as mais exportadas foram o melão e a manga que ampliaram os embarques em 2,84% e 9,04%, respectivamente (Anuário Brasileiro da Fruticultura, 2015).

Os problemas com o clima não foram os únicos fatores que afetaram os negócios internacionais das frutas frescas brasileiras. O alto custo de produção e a perda de benefícios tarifários contribuíram para que a fruta nacional tornasse menos competitiva.

O Brasil importou 470 mil toneladas de frutas frescas em 2014, com acréscimo de 8,95%, impulsionado pela maior demanda de pêra, correspondendo quase 50% do total adquirido no mercado externo (Anuário Brasileiro da Fruticultura, 2015). Desembarcaram

em território brasileiro 208 mil toneladas da fruta, pelo valor de US\$ 200 milhões, com acréscimos de 2,25% em volume e de 9,83% em valor. Outras frutas com maiores volumes de exportação foram a maçã (117 mil toneladas) e a uva (34 mil toneladas). De uma lista de 19 frutas buscadas no mercado internacional, a ameixa e o kiwi ocuparam a quarta e a quinta posições, com os respectivos volumes de 32 mil toneladas e 22 mil toneladas em 2014 (Anuário Brasileiro da Fruticultura, 2015).

Apesar da diminuição das exportações no setor frutícola brasileiro, o Anuário Brasileiro da Fruticultura (2015), menciona que o mercado interno continua aquecido e, em algumas situações, tem sido mais viável a comercialização no mercado doméstico. Pode-se salientar a importância desse setor no caráter econômico-social, uma vez que está presente em todos os estados brasileiros, com maior concentração em cinco estados, que somados representam 71% da produção total. O estado de São Paulo é o maior produtor brasileiro, representando 43% do volume total, seguido por Bahia (12%), Rio Grande do Sul (6%), Minas Gerais (6%) e Pará (3,7%) (IBRAF, 2013). O setor frutícola é responsável pela geração de, aproximadamente, 5 milhões de empregos diretos, o equivalente a 27% do total da mão de obra agrícola do País (Anuário Brasileiro da Fruticultura, 2015), além de contribuir na geração de emprego e renda e de desenvolvimento rural do agronegócio nacional. A atividade frutícola possui elevado efeito multiplicador de renda e, portanto, com força suficiente para dinamizar economias locais estagnadas e com poucas alternativas de desenvolvimento.

Outro fator determinante para a sustentabilidade da fruticultura brasileira é a adesão dos produtores e agroindústrias a sistemas de gestão baseados em Boas Práticas Agrícolas (BPA's) e ou Boas Práticas de Fabricação (BPF's). Os protocolos destes sistemas permitem a obtenção de certificações atestando garantias

ao consumidor de que a produção respeita as normas de preservação do meio ambiente, produtos finais inócuos, respeito à legislação e condições de trabalho justo e seguro. A rastreabilidade também é garantida com este sistema, pois há um controle rígido sobre cada área de produção (IBRAF, 2013).

Para o melhor desenvolvimento da fruticultura no Brasil, um dos gargalos a serem trabalhados no mercado interno é o aumento do consumo de frutas. O consumo de frutas no país é da ordem de 33 kg/habitante/ano, ao passo que o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) seria ingerir próximo de 100 kg/habitante/ano (Anuário Brasileiro da Fruticultura, 2015). As principais frutas consumidas pela população brasileira são banana, laranja, maçã e mamão (IBRAF, 2013). A melhoria no poder aquisitivo da população, a disseminação de hábitos culturais saudáveis e, principalmente, a qualidade das frutas, tendem a incluir maior variedade e hábito de consumo de frutas no dia a dia do brasileiro.

QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE FRUTOS

A qualidade de frutos é realizada no campo. Os cuidados pós-colheita só conseguem manter a qualidade obtida na produção até o consumo. A maioria dos fatores de qualidade dos frutos está relacionada ao potencial genético da cultivar e ao processo de produção no pomar. Por outro lado, a principal característica dos frutos é sua condição de tecido vivo, submetido a constantes mudanças, que, geralmente, são irreversíveis, tanto na fase de produção no pomar quanto na fase de pós-colheita. Muitas dessas mudanças são desejáveis, pois contribuem para melhorar a apresentação, o sabor e o aroma dos frutos. Entretanto, outras são indesejáveis e contribuem para a redução da qualidade.

Segundo Chitarra & Chitarra (2005), os frutos passam por fases no ciclo vital correspondentes às de crescimento, maturação, amadurecimento e senescência, as quais ocorrem por processos fisiológicos e bioquímicos normais das células. O crescimento é marcado por um período de rápida divisão ou alongamento celular. Antecedendo a maturação dos frutos, ocorre a pré-maturação. Este período consiste a metade do período entre a floração e a colheita e é caracterizado por um aumento extensivo do volume, terminando quando o desenvolvimento do fruto é apenas aceitável, mas não ótimo para consumo. A maturação é caracterizada por mudanças físicas e químicas que afetam a qualidade sensorial do fruto. A maturação sobrepõe-se à parte do estágio de crescimento e culmina com o amadurecimento do fruto, período no qual o fruto se torna apto para o consumo, em virtude de alterações desejáveis na aparência, no sabor, no aroma e na textura. Em seguida, ocorre à predominância de reações degradativas que sinaliza o início da senescência, resultando na morte dos tecidos.

A pós-colheita de um fruto começa no momento de sua separação da fonte produtora (a planta) e se estende até que o mesmo atinge o consumidor final e seja consumido. No ponto de vista fisiológico, os frutos são organismos que continuam vivos depois de sua colheita, mantendo ativos todos os seus processos biológicos vitais. Com base nas diferenças fisiológicas dos processos de maturação, as espécies frutíferas são classificadas como climatéricas ou não-climatéricas.

Em frutos climatéricos, caso da banana, maçã e mamão, o amadurecimento é desencadeado pela síntese de etileno e resulta em aumento rápido e acentuado na atividade respiratória, ocorrendo amadurecimento imediato dos frutos. Nestes frutos, o amadurecimento pode ocorrer na planta ou fora dela, desde que

sejam colhidos maduros, ou seja, fisiologicamente desenvolvidos (Chitarra & Chitarra, 2005).

Nos frutos não-climatérios, exemplo dos citros, abacaxi e uva, não há elevação nos níveis de etileno ou da respiração durante o amadurecimento, mantendo-se baixa e constante, com ligeiro declínio após a colheita. Não são capazes de completar o processo de amadurecimento quando colhidos maduros, portanto devem permanecer na planta mãe até o final da maturação (Chitarra & Chitarra, 2005).

A fase de pós-colheita é uma das fases mais crítica dentro do processo produção-comercialização, uma vez que ela define, desde o momento que se colhe até o consumo, a qualidade e a capacidade de conservação da fruta. O estágio de maturação, em que os frutos são colhidos determina a qualidade do fruto a ser oferecido ao consumidor. Os frutos colhidos imaturos, além de pouca qualidade, têm alto índice de perda de água e são muito suscetíveis às desordens fisiológicas, por outro lado, quando colhidos muito maduros, entram rapidamente em senescência (Chitarra & Chitarra, 2005). A correta determinação do estágio de maturação em que um fruto se encontra é essencial para que a colheita garanta a satisfação do consumidor pela fruta e uma conservação pós-colheita adequada.

Ainda não se tem um método definitivo para a determinação do momento exato para colheita de todos os frutos. Na determinação do ponto de colheita, devem ser levados em consideração fatores como destino do fruto, meio de transporte, intervalo entre a colheita e o consumo e as características intrínsecas do produto. O potencial de vida útil e armazenamento dos frutos dependem do seu estágio de maturação no momento da colheita, além das condições de manuseio, transporte e do próprio armazenamento.

PERDAS PÓS-COLHEITA DE FRUTAS

A redução das perdas em pós-colheita na cadeia de comercialização das frutas representa um constante desafio, já que são altamente perecíveis por apresentarem alto teor de nutrientes, umidade excessiva, textura macias facilmente danificável e altas taxas respiratórias e de produção de calor. Essas características geram desvantagens quanto ao seu manuseio após a colheita, resultando em perdas decorrentes da falta de comercialização ou de consumo do produto em tempo hábil.

As perdas pós-colheita de todos os tipos de alimentos são geralmente maiores nos países em desenvolvimento ou emergentes como o Brasil, onde os índices estimados podem atingir 30% ou mais da produção (Chitarra & Chitarra, 2005). O estudo detalhado da Fundação João Pinheiro sobre o desperdício agrícola no Estado de Minas Gerais ficou demonstrado (Tabela 1) que é necessária a produção de 1,43 kg de frutas para que o consumidor tenha acesso a 1,0 kg de frutas em sua mesa, ou seja, mais que 30% da produção são desperdiçadas.

Este estudo é um dos mais relevantes e completos na área de agricultura, detalhando as perdas e suas causas no campo e na pós-colheita, por produto. Os valores médios para o percentual de perdas de frutas situou-se em 30%, com valores superiores para banana e morango.

Tabela 1. Estimativa dos valores de produção total e percentual de perdas de frutas no Estado de Minas Gerais.

Produto	Produção total (1000 t)	Perdas				Fator de perda (Kg)
		Propriedade (1000 t)	Atacado e varejo (1000 t)	Total (1000 t)	%	
Frutas	1400,82	110,13	311,05	421,18	30,07	1,43
Abacate	67,57	5,09	15,64	20,74	30,69	1,44
Abacaxi	285,46	21,49	46,27	67,76	23,74	1,31
Banana	506,25	39,19	163,52	202,70	40,04	1,62
Laranja	380,55	28,92	55,37	84,29	22,15	1,33
Limão Tahiti	12,15	0,95	2,03	2,97	24,47	1,32
Mamão	31,41	3,93	5,62	9,54	30,39	1,44
Manga	77,85	6,51	14,85	21,36	27,43	1,38
Maracujá	8,55	0,63	0,99	1,62	18,97	1,31
Melancia	23,92	2,37	5,11	7,49	31,30	1,46
Morango	6,84	1,03	1,61	2,63	38,51	1,62
Uva	0,28	0,02	0,05	0,07	26,00	1,33

Dados: Fundação João Pinheiro – Pesquisa de Campo

Fonte: Adaptado de Chitarra & Chitarra (2005).

As perdas colaboram para que haja aumento no custo da pós-colheita de frutos. Muitas vezes, esse custo representa o maior gasto ao longo da pós-colheita e comercialização, ou então o valor sobrepõe o custo de alguma etapa importante para a qualidade da fruta. As perdas significativas que ocorrem durante a produção, colheita, pós-colheita, armazenamento e transporte ao canal distribuidor também contribuem fortemente para a redução da oferta.

As perdas pós-colheita de frutos podem ser de causas primárias, que afetam diretamente o alimento, sendo classificadas como biológicas, microbiológicas, químicas, bioquímicas, mecânicas, físicas e fisiológicas, ou então ocorrer de causas secundárias, resultantes da intervenção humana (Chitarra & Chitarra, 2005). Segundo os

mesmos autores, são consideradas como causas secundárias de perdas condições inadequadas de colheita, embalagem, manuseio e armazenamento incorreto; falta de contêineres adequados para o transporte e manuseio no carregamento e descarga; transporte (veículos e rodovias) inadequado, para colocar o produto no comércio, antes que ele seja danificado; falta de uso da cadeia do frio no transporte e no armazenamento; sistemas de comercialização ou de processamento tradicionais deficientes, além da falta de legislação, em que a ausência de padrões legais de qualidade para classificação dos produtos ou a sua não utilização, pode causar a rejeição do produto.

O controle das perdas pós-colheita de frutas depende da tecnologia utilizada na cadeia de comercialização. A seleção dessa tecnologia está relacionada ao destino do produto, seja para o consumo *in natura* seja para a indústria. Logo que os frutos amadurecem, requerem comercialização rápida e manuseio cuidadoso para minimizar os danos como, por exemplo, o amassamento, ou o ataque de patógenos.

A conservação pós-colheita usualmente empregada para reduzir as perdas de frutas está, em quase sua totalidade, centrada na refrigeração. É uma técnica utilizada nos modernos sistemas de distribuição, uma vez que permite uma redução na velocidade dos processos fisiológicos e bioquímicos (Aghdam et al., 2013; Chitarra & Chitarra, 2005). Quando se utiliza a refrigeração, as frutas devem ser mantidas na temperatura mínima de segurança (TMS), até a sua comercialização no varejo. Porém, este tipo de armazenamento quando realizado de forma inadequada pode propiciar desordens fisiológicas em certos frutos, relacionadas à injúria pelo frio (Aghdam et al., 2013). O armazenamento a frio é um método de conservação pós-colheita pouco empregado no Brasil, principalmente, por ser um processo oneroso, sendo que a

quase totalidade de frutas comercializadas em nível de varejo no país encontra-se sem refrigeração.

A vida útil dos frutos pós-colheita pode ser aumentada, com manutenção da qualidade, pelo uso de tecnologias desenvolvidas com essa finalidade. Diferentes tecnologias com aditivos químicos, reguladores de crescimento, fitormônios, antagonistas do etileno ou ainda métodos físicos, como atmosfera modificada (AM) ou controlada (AC), irradiação e o uso de revestimentos e de ceras podem controlar as perdas pós-colheita. Estas tecnologias objetivam, primariamente, retardar o amadurecimento e a senescência, uniformizar os atributos de qualidade, controlar e prevenir as infecções patogênicas e infestações de insetos, e evitar ou controlar as desordens fisiológicas (Chitarra & Chitarra, 2005).

CONSERVAÇÃO DE FRUTAS POR REVESTIMENTO

A demanda crescente de consumidores por produtos com elevada qualidade e vida útil prolongada e a necessidade de reduzir o uso de embalagens descartáveis que não são biodegradáveis, além da melhoria no sistema das embalagens recicláveis faz com que ocorra um interesse crescente pelo desenvolvimento de formulações de filmes e revestimentos comestíveis aplicáveis à superfície de produtos perecíveis como frutas e hortaliças. Esses revestimentos não substituem as embalagens sintéticas não comestíveis por completo, mas podem atuar como coadjuvantes, reduzindo o uso de embalagens descartáveis (Chitarra & Chitarra, 2005).

Os revestimentos com polímeros biodegradáveis podem ser uma alternativa com boa relação custo-benefício para a conservação pós-colheita de frutos em atmosfera modificada. Com a aplicação de revestimentos em frutos, tem-se a formação de uma cobertura extremamente fina na superfície do fruto, o que leva a formação de

uma atmosfera modificada em torno dos mesmos, criando assim, uma barreira semipermeável às trocas gasosas (CO_2 e O_2) e ao vapor d'água, reduzindo, dessa forma, a respiração e a transferência de umidade (transpiração) (Chitarra & Chitarra, 2005; Ali et al., 2011), o que diminui consideravelmente a perda de massa e de compostos voláteis, contribuindo assim para o prolongamento da vida útil do fruto. O uso de revestimentos biodegradáveis também pode diminuir a incidência de patógenos, caso o revestimento utilizado tenha efeito bacteriostático (Torlak & Sert, 2013), além de melhorar as propriedades mecânicas durante o manuseio e o transporte, podendo também servir como um veículo de aditivos alimentares, como antimicrobianos, antioxidantes, entre outros (Moncayo et al, 2013).

O processo de maturação de frutos está estreitamente associado à taxa respiratória e ao aumento na produção de etileno, principalmente em frutos climatéricos. Considerando que o O_2 é necessário para a produção do etileno, a redução da permeação de O_2 e aumento dos níveis de CO_2 no interior do fruto, proporcionados pelo recobrimento, geram uma correspondente redução na produção do etileno (responsável pelo amadurecimento), o que permite, em princípio, reduzir o metabolismo e prolongar a vida útil do fruto. Os efeitos de altas concentrações de CO_2 e baixas de O_2 sobre a respiração e o amadurecimento são aditivos. Entretanto, níveis de CO_2 acima do limite de tolerância podem causar injúria e níveis de O_2 abaixo do limite de tolerância podem induzir a respiração anaeróbica, com conseqüente alteração do aroma e do sabor, devido ao acúmulo de acetaldeído e etanol (Chitarra & Chitarra, 2005), assim é de extrema importância a seleção apropriada do material a ser empregado na produção do revestimento, levando em consideração suas características e sua interação com o fruto que receberá este revestimento.

A intensidade das trocas gasosas através do revestimento utilizado depende de suas características, como espessura utilizada, tipo de revestimento e composição química. Melhores resultados são obtidos quando há um balanço adequado entre a permeabilidade do revestimento aos gases e a respiração do produto, que depende do tipo, da variedade, do peso, do estágio de maturação e da temperatura dos frutos (Chitarra & Chitarra, 2005). Os revestimentos não devem interferir na aparência natural dos frutos, devem possuir boa aderência, a fim de evitar sua remoção facilmente no manuseio e não podem promover alterações no sabor ou no odor original. Os materiais utilizados nas formulações dos revestimentos podem ser comestíveis ou não, podem ser de origem animal ou vegetal, ou formarem um composto com a combinação de ambas, sendo que o efeito sobre os vegetais vai depender do tipo de material com o qual os revestimentos são elaborados, tais como polissacáridos, proteínas e lipídeos, ou misturas destes, e a eficiência desses revestimentos não é a mesma para os diferentes produtos, devido às diferenças na composição química e de umidade entre os produtos (Bierhals et al., 2011).

O revestimento deve ser capaz de umedecer e espalhar-se uniformemente sobre a superfície do produto e, após a secagem, deve ter apropriada adesão, coesão e durabilidade para desempenhar seu papel de proteção corretamente sobre o vegetal revestido. O processo de revestir um fruto envolve o umedecimento do mesmo pela solução de revestimento, que pode penetrar a sua pele (Krochta & Mulder-Johnston, 1997), seguido de possível adesão entre estes dois produtos (Moncayo et al., 2013).

Os revestimentos podem ser classificados em hidrofílicos ou hidrofóbicos (Chitarra & Chitarra, 2005). Segundo Assis & Britto (2014), a estrutura dos revestimentos hidrofílicos predomina os grupos amino ou hidroxila e carboxila (OH, COO-, NH₃)

caracterizados por ligações covalentes polares. Essa característica da estrutura química favorece o acúmulo e o rearranjo de moléculas polares, e principalmente da água, em torno desses sítios. Alguns exemplos destes revestimentos são os polissacarídeos, como a celulose, a quitina, a goma xantana, a goma guar, a pectina, o amido e os polissacarídeos polieletrólitos, como a carboximetilcelulose, a quitosana, o alginato, etc. Os materiais hidrofílicos normalmente apresentam boa solubilidade em meio aquoso, favorecendo uma melhor dispersão do soluto e uma formação mais homogênea do revestimento. Dependendo da estrutura química, podem formar géis ou até mesmo requerer alterações químicas para uma completa solubilização.

A estrutura dos revestimentos hidrofóbicos tende a predominância de ligações eletricamente neutras, ou seja, não configuram regiões polares definidas. Incluem grupos alquilas (CH_3 , $\text{CH}_2\text{-CH}_3$, etc) e aromáticos (Assis & Britto, 2014). Na presença de água esses materiais tendem a se aglomerarem e excluir as moléculas polares de sua redondeza. Nesta categoria, encontram-se as proteínas hidrofóbicas, óleos e ácidos graxos, em que predominam substituintes de cadeia alifática, parafinas, ceras, resinas, álcoois de cadeia longa, etc. Para esta classe de revestimentos, os solventes adequados devem ser mais apolares, como o álcool, a acetona e o hexano (Chitarra & Chitarra, 2005).

A base dos revestimentos pode ser utilizada isoladamente ou combinada com um agente funcional (aromas, corantes, antioxidantes e agentes antimicrobianos), o que permite utilizar vantajosamente as distintas características funcionais de cada classe (Torlak & Sert, 2013). A adição de plastificantes pode ser importante na formação de revestimentos, indicada para conferir uma maior plasticidade e favorecer uma melhor adesão do revestimento no fruto. Os plastificantes mais usados são o glicerol e o sorbitol (Assis & Britto,

2014). Eles agem reduzindo as forças intermoleculares e aumentando a mobilidade das cadeias dos polímeros que compõe o revestimento, com diminuição de possíveis descontinuidades e zonas quebradiças, resultando assim em materiais com menores temperaturas de transição vítrea (T_g), favorecendo a transição do material de um estado vítreo, caracterizado por uma menor mobilidade molecular entre as cadeias do polímero e por uma maior rigidez, para um estado borrachento ou gomoso, de maior mobilidade molecular e, conseqüentemente, maior flexibilidade (Mali et al., 2010).

Comparativamente, a Tabela 2 apresenta algumas características associadas a cada tipo de revestimento aplicado em frutas.

Tabela 2. Comparativo das características associadas aos revestimentos

Categories	Tipos	Características
Polissacarídeos	Amido	Resistente às trocas gasosas e aos danos mecânicos
	Celulose	Manutenção da integridade da parede celular
	Alginato	Retenção de vitamina C
	Quitosana	Barreira à incorporação de solutos
		Propriedades fungicidas e fungistático
Lipídeos e resinas	Ceras naturais	
	Óleo mineral e vegetal	Redução na perda de massa
	Ceras de petróleo	Melhora o aspecto visual do fruto
	Acetoglicérides e ácido oléico	Redução da atividade respiratória
Proteínas	Gelatina	Resistente aos danos mecânicos
	Caseína	Redução na perda de massa
	Colágeno	Redução do escurecimento enzimático
	Zeína	Redução da perda do valor nutricional

Fonte: Chitarra & Chitarra (2005).

A aplicação de revestimento em frutos é um procedimento simples e passível em larga escala. Os frutos íntegros ou fatiados são diretamente mergulhados ou submetidos à nebulização com sistema de pressão manual (spray) do revestimento em condição líquida. Após o escoamento do excesso, a fração superficial passa por processo de polimerização por evaporação espontânea ou forçada do solvente, formando um revestimento (Assis & Brito, 2014).

As características estruturais, como o volume depositado e a textura dos revestimentos, estão relacionados com a concentração e/ou a massa molecular do polímero e/ou produto dissolvido. Os revestimentos finais formados por ambos os processos (imersão e spray) apresentam resultados similares quanto à proteção, embora estes também diferem ligeiramente quanto à microestrutura formada (Assis & Brito, 2014). Um aspecto importante a ser considerado no preparo do revestimento é o pH da solução. Alguns polímeros utilizados são solúveis somente em pHs ácidos ou básicos, o que pode gerar reações com a superfície do fruto a ser revestida, como alteração no aspecto e no sabor do fruto.

A sequência geral da preparação de revestimentos, bem como a deposição sobre os frutos está ilustrada na Figura 1.

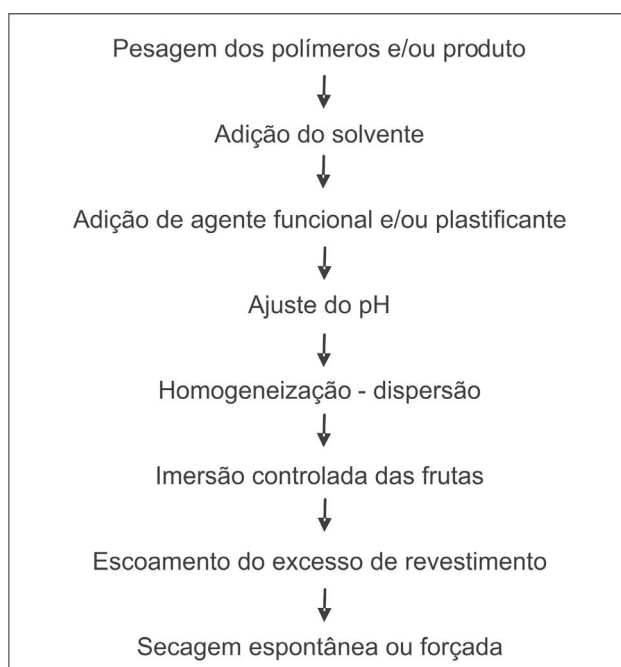


Figura 1. Sequência geral da preparação de revestimento e deposição sobre frutas.

Fonte: Elaboração dos autores.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não descreve uma legislação específica para revestimentos. Assim, estes revestimentos são considerados ingredientes, quando melhoram a qualidade nutricional do alimento, ou aditivos, quando não incrementam o seu valor nutricional. Segundo a Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997, da ANVISA, aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, porém, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento.

REVESTIMENTO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS EM FRUTAS

O extrato de própolis destaca-se dentre os revestimentos promissores ao armazenamento em atmosfera modificada de frutas (Zahid et al., 2013; Daiuto et al., 2012), uma vez que é reconhecida como segura (GRAS = Generally Recognized As Safe) para o consumidor quando usada em substituição aos materiais sintéticos (Burdock, 1998) e também ao meio ambiente. Dentre as vantagens da utilização do extrato de própolis como revestimento em frutas está na simplicidade de técnicas e materiais necessários para a preparação e custo mais acessível em relação aos demais tipos de revestimentos, tornando-o muito pertinente para o uso por pequenos produtores rurais. O revestimento de extrato de própolis também contribui para uma melhor utilização dos recursos e da biodiversidade das propriedades (Carvalho et al., 2013).

A própolis é uma substância resinosa produzida por abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. a partir de exsudados coletados em diferentes partes de plantas. É considerada uma substância de caráter lipofílica, rígida e quebradiça a baixas temperaturas, mas macia, maleável e viscosa quando levemente aquecida. Os sabores também podem se diversificar de suave balsâmico a forte, amargo e picante (Burdock, 1998). Segundo o mesmo autor, sua composição é de 50 – 60% de flavonóides e ácidos fenólicos, 30 – 40% de cera, 5 – 10% de óleos essenciais, 5% de pólen, além de pequenas quantidades de metais e vitaminas.

A composição química da própolis sofre variações conforme a biodiversidade da região visitada pelas abelhas, que varia dependendo do clima, do solo, da flora, da estação do ano, entre outros fatores. Portanto, a origem vegetal da própolis determina a sua composição química, influenciando também na coloração da própolis, tons que podem variar do amarelo-esverdeado, passando

pelo marrom-avermelhado ao negro (Burdock, 1998). No Brasil, alguns tipos de própolis já foram caracterizados e classificados pela coloração.

A própolis do arbusto alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), conhecida também como própolis verde, é produzida pelos exsudatos desta planta, dominante no Cerrado brasileiro, principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo. Muitas substâncias químicas presentes em *B. dracunculifolia* também estão presentes na própolis verde, tais como flavonóides, derivados de ácido cumárico e principalmente o composto bioativo Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (Lustosa et al., 2008).

A própolis silvestre é produzida pelas abelhas que coletam exsudatos de diferentes vegetais de regiões onde não há nenhuma vegetação específica e expressiva (Burdock, 1998). Essa própolis tem como característica a cor marrom e aroma forte.

A própolis vermelha é produzida pelas abelhas através da resina de uma planta nativa do nordeste brasileiro, conhecida popularmente como rabo-de-umbigo (*Dalbergia ecastophyllum* L.), responsável pela cor vermelha da própolis. É considerada uma importante fonte de compostos bioativos, principalmente isoflavonas, especificamente daidzeína, formononetina e biochanina A (Lustosa et al., 2008).

Encontra-se também o extrato aquoso de própolis. Este tipo de extrato preserva o sabor e o cheiro característico da própolis e não apresenta teor alcoólico. A viabilidade de produção deste extrato tem um menor custo, se comparado com os extratos hidroalcoólicos de própolis. Acredita-se que o extrato aquoso de própolis possui uma boa atividade antioxidante, associada ao alto teor de compostos fenólicos, semelhante ao extrato hidroalcoólico, resultando em um produto com boas características funcionais (Lustosa et al., 2008).

A própolis e seus extratos possuem papel importante pelas suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória, etc. (Torlak & Sert, 2013; Burdock, 1998). Segundo Burdock (1998), esse potencial biológico tem sido atribuído ao sinergismo que ocorre entre os diversos compostos fenólicos que compõem a própolis, sendo os flavonóides considerados os principais compostos, e encontram-se, ainda, alguns ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, álcoois e cetonas. Na obtenção dos extratos alcoólicos de própolis, o aumento na concentração de etanol favorece a extração de flavonóides (Burdock, 1998).

Alguns estudos relatam a eficiência dos revestimentos com extrato de própolis em frutas na conservação pós-colheita. Em vários estudos, verificou-se eficiência do extrato de própolis contra bactérias Gram-positivas e atividade limitada contra bactérias Gram-negativas (Torlak & Sert, 2013). Pesquisas realizadas por Zahid et al. (2013) em pitaita, apresentaram que o extrato etanólico de própolis (EEP) possui excelentes propriedades antifúngicas, proporcionando uma barreira eficiente para limitar o crescimento micelial e germinação de esporos de *Colletotrichum capsici*, fungo responsável pela antracnose.

O extrato de própolis, além de possuir amplo espectro de atividade antimicrobiana, possui compostos hidrofóbicos que contribuem para melhorar algumas propriedades de revestimentos biodegradáveis em frutas (Zahid et al., 2013), como a formação de barreira diminuindo a permeação do vapor de água e às trocas gasosas (Carvalho et al., 2013). O comportamento pode ser diferente para cada tipo de fruta, com características climatéricas ou não, ou em função do manejo dos frutos em pós-colheita, da temperatura e umidade local.

Foram realizados experimentos utilizando duas concentrações (2,5 % e 5 %) de extrato alcoólico de própolis silvestre, para mamão e laranja. Também foi avaliado o efeito do álcool (0 % de própolis) e da refrigeração. Nestes experimentos foi observado diferenças na redução da percentagem de perda de massa em função do fruto (Tabela 3) ao final do período de armazenamento. O revestimento com extrato alcoólico de própolis demonstrou ser mais eficiente em reduzir a perda de massa em frutos climatéricos (mamão). A película formada pelo extrato de própolis promoveu o aparecimento de uma atmosfera modificada, reduzindo as trocas gasosas e, conseqüentemente, a perda de massa. Como estes frutos possuem uma taxa respiratória maior (Chitarra & Chitarra, 2005), houve uma maior redução da perda de massa (Passos, 2014).

Tabela 3. Redução da perda de massa (%) de mamão Solo cv. 'Golden' (aos 12 dias de armazenamento) e laranja 'Pera' (aos 18 dias de armazenamento) durante o período de armazenamento, comparados ao tratamento controle.

Tratamentos	Mamão (12 dias)	Laranja (18 dias)
Controle	-	-
Álcool	2,46	_*
Própolis 2,5%	31,88	18,58
Própolis 5%	32,52	12,97
Refrigerado	56,01	38,17

* Houve aumento da perda de massa.

Fonte: Elaboração dos autores.

Também foram avaliados as variáveis firmeza da polpa, sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT), relação entre o teor de sólidos solúveis totais e acidez titulável (SST/AT) e potencial hidrogeniônico (pH).

Ao final do período de armazenamento avaliado (12 dias), os mamões revestidos com própolis na concentração de 5 % apresentaram uma firmeza de 26,04 % em relação à firmeza dos frutos no início do experimento (à 0 dia, firmeza = 10,52 N), enquanto que os frutos sem nenhum revestimento (tratamento controle) apresentaram uma firmeza de 15,78 % em relação à firmeza inicial. Para os frutos de laranja, ao final de 25 dias de armazenamento, todos os tratamentos apresentaram firmeza da polpa semelhante à encontrada no início do experimento (à 0 dia, firmeza = 8,05 N).

Realizou-se a análise sensorial dos mamões aos 4 dias de armazenamento, avaliados por provadores não treinados através do teste de aceitação e os mamões revestidos com extrato de própolis apresentaram aceitação sensorial semelhantes aos demais tratamentos pós-colheita (Passos, 2014).

O efeito de diferentes extratos de própolis foi avaliado em mamão, maracujá e banana (Cunha, 2014; Passos, 2014). Para avaliar o efeito de diferentes extratos de própolis na conservação de mamão e maracujá, foram realizados dois experimentos para avaliar perda de massa, firmeza da polpa, sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT), relação entre o teor de sólidos solúveis totais e acidez titulável (SST/AT) e potencial hidrogeniônico (pH). Os experimentos avaliaram cinco formas de conservação pós-colheita nos frutos: "controle" (sem revestimento, armazenados à temperatura ambiente), "verde" (recobertos com extrato etanólico de própolis verde alecrim 2,5 %), "silvestre" (recobertos com extrato etanólico de própolis silvestre a 2,5 %), "aquoso" (recobertos com extrato aquoso de própolis silvestre) e "refrigerado" (sem revestimento, armazenados sob refrigeração) (Cunha, 2014). Em banana, as variáveis descritas acima foram avaliadas para cinco tratamentos pós-colheita, com substituição do tratamento "refrigerado" pelo

tratamento “vermelho” recobertos com extrato etanólico de própolis vermelho a 2,5 %)

Ao final do período de armazenamento avaliado (12 dias para o mamão e 16 dias para o maracujá), os frutos revestidos com extratos etanólicos de própolis, independente da origem da própolis, tiveram uma redução média de perda de massa de 33,69 % (Tabela 4). Entretanto, o extrato aquoso na própolis não foi capaz de reduzir a perda de massa em mamão e reduziu 13,52 % em maracujá (Cunha, 2014).

Tabela 4. Redução da perda de massa (%) de mamão Solo cv. ‘Golden’ (aos 12 dias de armazenamento) e maracujá-amarelo (aos 16 dias de armazenamento) durante o período de armazenamento, comparados ao tratamento controle.

Tratamentos	Mamão (12 dias)	Maracujá (16 dias)
Controle	-	-
Verde	29,07	32,43
Silvestre	38,12	35,14
Aquoso	-*	13,52
Refrigerado	65,70	59,46

* Houve aumento da perda de massa.

Fonte: Elaboração dos autores.

Ao final do período de armazenamento avaliado (12 dias), os frutos revestidos com extrato etanólico de própolis verde alecrim foram os que apresentaram maior firmeza, sendo esta 51,79 % em relação à firmeza dos frutos no início de experimento (à 0 dia de armazenamento, firmeza = 6,70 N), enquanto que os frutos sem nenhum revestimento (tratamento controle) apresentaram uma firmeza de 16,42 % em relação à firmeza inicial (Cunha, 2014).

Para os frutos de maracujá, ao final de 16 dias de armazenamento, todos os tratamentos apresentaram firmeza semelhante à encontrada no início do experimento (à 0 dia de armazenamento, firmeza = 22,55 N) (Cunha, 2014).

Em bananas, observou-se uma menor redução da perda de massa (Tabela 5), sendo mais eficientes os tratamentos “aquoso” e “verde”. E os tratamentos que mais mantiveram a firmeza foram os revestidos com própolis silvestre (extratos aquoso e etanólico) (Passos, 2014).

Tabela 5. Redução da perda de massa (%) de banana ‘prata’ e % de firmeza em relação à firmeza inicial (4,16 N), aos 12 dias de armazenamento.

Tratamentos	Redução da perda de	
	massa (%)	% de firmeza
Controle	-	34,13
Aquoso	16,39	47,84
Silvestre	5,74	53,36
Verde	18,43	31,25
Vermelho	8,39	32,93

Fonte: Elaboração dos autores.

Realizou-se a análise sensorial dos mamões e bananas aos 3 e 6 dias de armazenamento, avaliados por provadores não treinados através do teste de aceitação e os mamões revestidos com extrato de própolis apresentaram aceitação sensorial semelhantes aos demais tratamentos pós-colheita (Cunha 2014; Passos, 2014).

Os revestimentos com extratos de própolis proporcionaram alterações de pequena magnitude nas variáveis SST, ATT, relação SST/ATT e pH (Cunha 2014; Passos, 2014).

Zahid et al. (2013) verificaram a eficiência do extrato etanólico de própolis (EEP) na redução da perda de massa e

melhor manutenção da firmeza em pitaia durante 20 dias de armazenamento. A perda de massa aumentou gradualmente com o aumento do tempo de armazenamento. No entanto, observou-se a perda de massa mínima (13,4%) nos frutos tratados com 0,50% de EEP durante 20 dias de armazenamento. A maior perda de massa foi observada no tratamento controle (31,61%). Pitaias tratadas com EEP apresentaram menor queda da firmeza do que os frutos do tratamento controle. Firmeza mais elevada (20,90 N) foi observada em frutos tratados com 0,50% EEP.

Daiuto et al. (2012) observaram menor perda de massa e produção de CO₂ em frutos de abacateiro submetidas a aplicação de extrato de própolis associada a cera vegetal. Ali et al. (2014), ao aplicarem em pimentas um revestimento de goma arábica adicionado de própolis verde e óleo de canela, verificaram que a própolis verde e o óleo de canela controlaram a antracnose, além de diminuir a perda de massa e manter a firmeza.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fruticultura é uma atividade bastante promissora para o desenvolvimento da agricultura brasileira. Apresenta um ambiente favorável ao crescimento, como o aumento da comercialização no mercado interno, possibilidade de incrementar as exportações e contribuição para geração de empregos e renda para as regiões produtoras. Para tanto, deverá superar as dificuldades ocasionados pelas perdas pós-colheita e adoção de novas tecnologias para a conservação pós-colheita de frutas. A redução das perdas na cadeia produtiva de frutas, desde o campo até o consumidor, pode beneficiar todos os envolvidos, com possibilidades reais de maximizar a renda dos produtores, minimizar os custos para os intermediários

e consumidores, além de propiciar a manutenção da qualidade do fruto até o consumidor.

A redução das perdas pós-colheita de frutos pode, ainda, reduzir os custos de produção, por ofertar uma maior quantidade de produtos. Desta forma, uma maior parcela da população poderá ter acesso a estes alimentos.

O uso de revestimentos em frutas contribui consideravelmente para controlar a migração de vapor de água e na permeabilidade às trocas gasosas, que resultam em perda de massa, além do controle na migração lipídica. Esta tecnologia ainda possui grande potencial para ser explorada na conservação pós-colheita de frutas, como carreador de aditivos (conservantes, flavorizantes, antioxidantes, etc.) e agentes antimicrobianos, minimização de danos durante o transporte e comercialização, otimização dos efeitos de outros métodos de conservação (como refrigeração), e ainda, redução de gastos com embalagens sintéticas.

O extrato de própolis tem sido frequentemente testado como matéria-prima em revestimentos. Trata-se de um produto biodegradável, de baixo custo e que não causa impacto ambiental, principalmente se comparada aos materiais sintéticos de uso corrente na conservação pós-colheita de frutas, como as embalagens de PVC e algumas ceras que, muitas vezes, apresentam polietileno em sua composição.

REFERÊNCIAS

AGHDAM, M.S.; SEVILLANO, L.; FLORES, F.B.; BODBODAK, S. Heat shock proteins as biochemical markers for postharvest chilling stress in fruits and vegetables. **Scientia Horticulturae**, v. 160, n. 1, p. 54–65, 2013.

ALI, A.; CHOW, W.L.; ZAHIG, N.; ONG, M.K. Efficacy of própolis and cinnamon oil coating in controlling post-harvest anthracnose and quality of chilli (*Capsicum annuum* L.) during cold storage. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 2742-2748, 2014

ALI, A.; MUHAMMAD, M. T. M.; SIJAM, K.; SIDDIQUI, Y. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. **Food Chemistry**, v. 124, p. 620–626, 2011.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2015. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2015. 104p.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 out. 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definições, classificação e emprego.

ASSIS, O.B.G.; BRITO, D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Brazilian Journal of Food Technonology**, v. 17, n. 2, p. 87–97, 2014.

BIERHALS, V. S.; CHIUMARELLI, M.; HUBINGER, M. D. Effect of Cassava Starch Coating on Quality and Shelf Life of Fresh-Cut Pineapple (*Ananas Comosus* L. Merrill cv "Pérola"). **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. E62-E72, 2011.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347–363, 1998.

CARVALHO, J.X.; SUÁREZ, R.O.; MENDES, F.Q.; FERNANDES, R.V.B.; CUNHA, M.C.; CARVALHO, A.M.X. Extensão da vida de prateleira de ovos pela cobertura com própolis. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 5, p. 2287–2296, 2013.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. 785p.

CUNHA, M. C. **Pós-colheita de mamão e maracujá após a aplicação de extrato de própolis de diferentes fontes botânicas**. Rio Paranaíba, 2014. 82 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa Campus de Rio Paranaíba.

DAIUTO, E.R.; MINARELLI, P.H.; VIEITES, R.L.; ORSI, R.O. Própolis e cera vegetal na conservação de abacate 'Hass'. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 4, p. 1463–1474, 2012.

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas. **Panorama da cadeia produtiva das frutas em 2012 e projeções para 2013**. Brasília: Instituto Brasileiro de Frutas, 2013. 133p.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**: culturas temporárias e permanentes. v. 40. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. 100 p.

KROCHTA, J.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, v. 51, p. 61–74, 1997.

LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; ROLIM NETO, P.J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 137-156, 2010.

MONCAYO, D.; BUITRAGO, G.; ALGECIRA, N. The surface properties of biopolymer-coated fruit: A review. **Ingeniería e Investigación**, v. 33, n. 3, p. 11-16, 2013.

PASSOS, F. R. **Extrato de própolis na conservação pós-colheita de frutas**. Rio Paranaíba, 2014. 67 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa Campus de Rio Paranaíba.

TORLAK, E.; SERT, D. Antibacterial effectiveness of chitosan-propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, n. 1, p. 52–55, 2013.

ZAHID, N.; ALI, A.; SIDDIQUI, Y.; MAQBOOL, M. Efficacy of ethanolic extract of propolis in maintaining postharvest quality of dragon fruit during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 79, n. 1, p. 69–72, 2013.

Inseticidas botânicos: extração, identificação de metabólitos secundários e aplicação no controle de pragas

Fernanda Santiago Chaves Soares¹

Márcio Santos Soares²

Flávio Lemes Fernandes³

Liliane Evangelista Visôto⁴

Evaldo Martins Pires⁵

INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins medicinais é uma cultura milenar, surgiu provavelmente com o ser humano e ainda hoje é bastante utilizada como recurso terapêutico de comunidades e ou grupos étnicos mundiais. Desde a antiguidade há relatos do uso de produtos

¹ Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba, MG.

E-mail: fernanda.santiago@ufv.br

² Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba, MG.

E-mail: marcioquimicoufv@yahoo.com.br

³ Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Agrárias, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba, MG. E-mail: flaviofernandes@ufv.br

⁴ Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba, MG.

E-mail: lvisotto@ufv.br

⁵ Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário de Sinop, Av. Alexandre Ferronato 1200, Reserva 35, Setor Industrial, 78557-267 - Sinop, MT -

E-mail: evaldo.pires@gmail.com

naturais na humanidade. Suas primeiras descrições estão presentes em escrituras sagradas, tratados médicos e também no manuscrito egípcio *Papyrus de Ebers*.

Um tratado chinês, cuja data é de 2800 aC, escrito pelo então herborista Shen Numg, enumera algumas propriedades medicinais de plantas. O *Papiro de Ebers*, datado de 1500 aC enumera aproximadamente 810 prescrições formuladas a partir de óleos, incensos e ceras vegetais utilizadas para tratamento de enfermidades (Gaspar, 2009).

O médico grego Pedanius Dioscórides (40-90 DC), publicou um dos primeiros trabalhos científicos *de Materia Medica*; o trabalho de Dioscórides descreve detalhadamente o processo de extrações de óleos e preparações de unguentos naturais para a terapia dos distúrbios de saúde (Nogueira et al., 2009). Dioscórides foi pioneiro na demonstração do uso do exsudato da papoula, *Papaver somniferum* como medicamento, realizou mais de mil preparações medicamentosas, diferindo suas propriedades pelo nível de "oleosidade" em cada solução (Nogueira et al., 2009).

O piretro (Figura 1), presente em flores secas de plantas dos gêneros *Chrysanthemum cinerariaefolium* e *Chrysanthemum coccineu*, era utilizado desde 400 a.C para controlar piolhos e teve seu uso difundido no século XIX (Braibante e Zappe, 2012).

Os carbamatos (Figura 1) foram isolados inicialmente da espécie *Physostigma venenosum*, o feijão-de-calabar, natural do oeste da Ásia. Seu extrato aquoso era utilizado em julgamentos de feitiçaria, onde indivíduos acusados por executar um determinado crime eram obrigados a ingerir o extrato, em uma prova de culpabilidade se o indivíduo morresse ou de sua inocência se sobrevivesse. Atualmente, os carbamatos estão presentes nas formulações de muitos agroquímicos, como Aldicarb, um dos pesticidas mais tóxicos encontrados no mercado (Braibante e Zappe, 2012).

O isolamento dos primeiros metabólitos puros do reino vegetal ocorreu no século XVIII. Este século, juntamente com o XIX, caracterizou-se pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcalóides. Entre os anos de 1806 e 1820 isolou-se os alcalóides, como morfina, quinina e estriquinina (Figura 1) (Pinto et al, 2002).

Os produtos naturais (PNs) extraídos de plantas com atividade biológica sempre exerceram um papel importante na terapêutica médica, nos mecanismos de defesa e no controle de pragas, pois atuam como modelos estruturais para a síntese de substâncias novas, ou protótipos ativos.

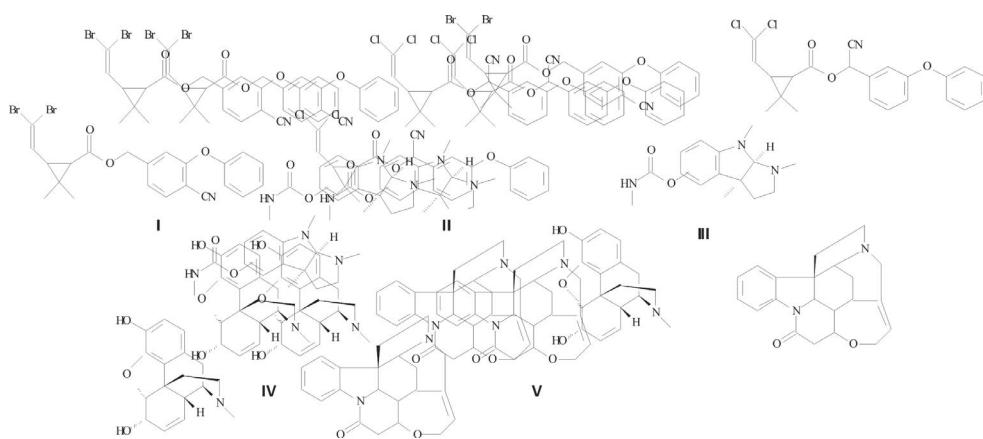


Figura 1. Estruturas químicas da deltametrina (I) e cipermetrina (II) (piretros); fisostigmina (III) (carbamato); morfina (IV) e estriquinina (V) (alcalóides); respectivamente.

Até a descoberta de inseticidas organossintéticos, na primeira metade do século passado, as substâncias extraídas de vegetais eram amplamente utilizadas no controle de insetos. As variações na eficiência do controle, devido às diferenças na concentração

do ingrediente ativo entre plantas e, principalmente, os baixos efeitos residuais, que apontava à necessidade de várias aplicações em períodos curtos, fez com que os inseticidas vegetais fossem gradativamente substituídos pelos sintéticos.

É inegável a preocupação crescente com o meio ambiente, dessa forma, observa-se o crescimento da agricultura orgânica que visa evitar os efeitos prejudiciais dos produtos químicos ao agroecossistema e, assim, substituí-los por métodos alternativos de controle de pragas e doenças. Nesse contexto, uma alternativa que vem sendo retomada para o controle de pragas é o uso de metabólitos secundários presentes em algumas plantas, os quais são chamados de "inseticidas botânicos".

O grande trunfo dos PNs é a expectativa de redução de resíduos nos alimentos, de intoxicação do homem, do ambiente (água, ar e solo) e dos organismos não alvo. Outra vantagem é a grande diversidade botânica disponível no planeta. Somente no Brasil há quatro biomas diferentes (Cerrado, Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica), que são detentores de milhões de metabólitos secundários, que podem ser explorados para uso no controle de pragas, doenças e de plantas invasoras.

O Brasil tem avançado nos estudos com os PNs, inclusive várias empresas nacionais e multinacionais, têm desenvolvido pesquisas nesta linha. Boa parte desses trabalhos considera os efeitos letais e subletais sobre as pragas, sendo que a maioria almeja alta toxicidade e baixo período residual. Ainda não são conhecidos os mecanismos específicos de ação de grande parte dos PNs, desta forma, tornam-se necessárias pesquisas que elucidem tais mecanismos e comprovem a postergação dos problemas relacionadas a resistência de pragas. Outros aspectos relevantes do uso de PNs devem ser considerados, como os métodos de extração, os efeitos dos mesmos sobre as principais pragas e a prospecção daqueles mais promissores para uso no manejo integrado associados ou não aos inseticidas sintéticos.

Assim, neste capítulo serão abordados os diferentes métodos de extração de PNs e metabólitos secundários, os principais efeitos letais e subletais dos grandes grupos de compostos sobre os insetos e os mecanismos bioquímicos de atuação dos PNs nos insetos-praga.

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS: OCORRÊNCIA E USOS

No Brasil, o conhecimento das propriedades das plantas medicinais está presente desde a colonização, sendo uma das grandes riquezas indígenas e africanas, cuja sabedoria tradicional passou de geração em geração, chegando até nos dias atuais, mas que está sendo perdida em decorrência de hábitos culturais advindos de outros países. O índio trouxe consigo um conhecimento profundo da flora e fauna medicinais, retirando delas os mais diversos “remédios”, usados de diferentes formas. As práticas curandeiras e preventivas estão relacionadas com o modo como ele percebe a doença e suas causas, sendo realizadas pelo pajé em rituais cheios de elementos mágicos e místicos (Gaspar, 2009).

Segundo González-Lamonthe et al. (2009), os metabólitos secundários encontrados nas plantas e em outros organismos vivos como algas, fungos, bactérias, animais possuem várias ações, dentre elas antibacterianas: são atenuantes de virulência, ou seja, adequam a resposta do sistema imune do organismo e propiciam a sinergia com antibióticos promovendo maior eficácia terapêutica.

O estudo farmacológico de compostos presentes em óleos essenciais auxilia no combate à resistência de fungos e bactérias e vêm contribuindo para o desenvolvimento de antibióticos mais eficazes. A resistência é caracterizada pela ineficácia do medicamento frente à infecção. Tal fato ocorre devido a uma alteração genética que dá origem a bactérias mutantes que se multiplicam livremente;

quanto maior é a frequência da administração do antibiótico, maior é a probabilidade do surgimento de microrganismos resistentes (Lüllman et al, 2008). Estudos bioquímicos comprovaram que os princípios ativos dos óleos essenciais que possuem efeitos bactericidas e fungicidas são derivados de produtos secundários do metabolismo de plantas, os metabólitos secundários (Hartmann, 2007).

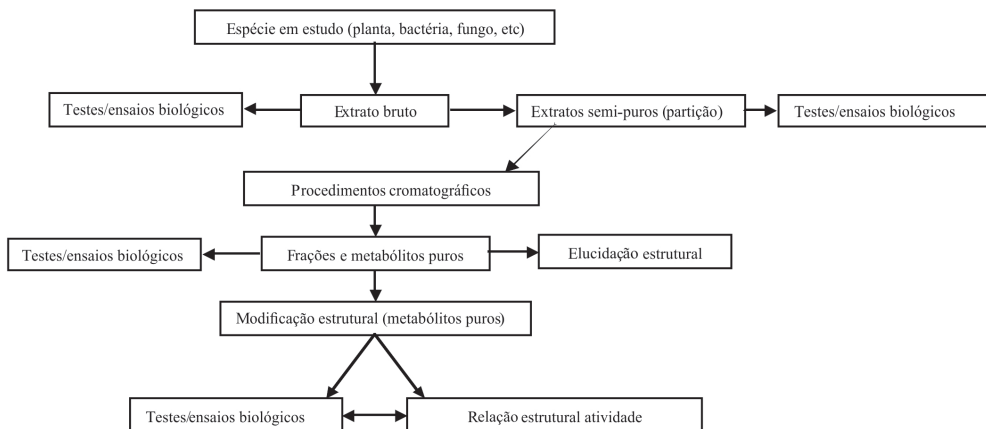
Os metabólitos secundários, diferentemente dos metabólitos primários, são compostos sintetizados numa fase subsequente à fase de crescimento vegetal ou de um organismo vivo. Não são considerados essenciais no crescimento da espécie, como os metabólitos primários, podem ser específicos para uma espécie, uma tribo e até mesmo para uma família no reino vegetal, mas são derivados dos mesmos através de rotas específicas (Simões e Spitzer, 1999).

Nas plantas, os metabólitos secundários ocorrem em pequenas quantidades e podem ser produzidos em detrimento a necessidades ecológicas e ou climáticas. Executam diversas funções como, atividade inseticida, adaptação das plantas a seus ambientes, aumento da probabilidade de sobrevivência de uma espécie através da atração/ repelência de insetos polinizadores e pragas, proteção contra patógenos, inibição do crescimento de outras plantas competidoras e "filtros solares", absorvendo a luz ultravioleta evitando que as folhas sejam danificadas, dentre outras funções (Dewick, 2002).

Quanto à ação inseticida dos PNs, sabe-se que nos Estados Unidos existem alguns registrados como: piretro (p.a. piretrinas, cinerina; extraído de flores) utilizado como inseticida doméstico; rotenona (p.a. rotenóides; extraído de raízes e tubérculos) utilizado como inseticida de jardins e alimentos orgânicos; riânia (p.a. alcalóides tipo rianodina, extraído de caule), sabadilha (p.a. alcalóides

veratrínicos; extraído de sementes) e neem (p.a. limonóides tipo azadirachtina; extraído de sementes) sendo os três últimos produtos utilizados na agricultura orgânica.

O fluxograma abaixo exemplifica as etapas de estudo envolvendo uma espécie vegetal/ organismo de interesse (Niero, 2003).



Fluxograma 1. Procedimentos gerais para obtenção de extratos e metabólitos secundários com atividade biológica

CLASSIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários são classificados em detrimento da rota metabólica de formação dos mesmos e não pelas funções orgânicas encontradas em suas estruturas. Podem ser classificados em quatro grupos: os policetídeos ou ácidos graxos, os terpenos, os alcalóides e os compostos fenólicos (Dewick, 2002).

Os policetídeos são formados a partir de combinações lineares de unidades de acetatos derivados da acetil coenzima-A, levando a predominância de compostos com cadeias lineares pares, tipicamente variando entre 12 a 20 átomos de carbono.

Há relatos na literatura de aproximadamente 29.000 terpenos isolados e caracterizados (Figura 2), sendo esses derivados do caminho do mevalonato, e tendo como unidade básica o isopreno. O isopreno, por sua vez é biossintetizado a partir do isopentenilpirofosfato (IPP) o qual é isomerizado à dimetilalilpirofosfato (DMAPP) (Dewick, 2002).

Os alcalóides são compostos que possuem em sua estrutura um átomo de nitrogênio (Figura 2), são derivados de aminoácidos e sintetizados a partir dos caminhos do piruvato e chiquimato. Já foram isolados e identificados mais de 12.000 representantes dessa classe, tendo como representante a morfina, um dos alcalóides mais empregados pelo homem no alívio de dores e desconfortos intensos.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários derivados da rota do chiquimato ou malonato/acetato. São descritos aproximadamente 8.000 compostos pertencentes à essa classe e os mesmos podem ser subdivididos em flavonóides, antocianinas, policetídeos e fenilpropanóides (Figura 2). Além possuírem várias atividades biológicas como anti-oxidantes naturais, bloqueadores de raios UV, controladores / sinalizadores de estresse hídrico, são também responsáveis pela coloração de pétalas de flores e polinizadores (Seow-Mun et al., 2012).

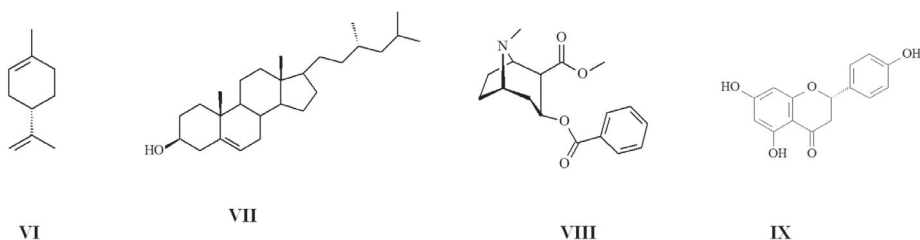


Figura 2. Estruturas químicas dos limoneno (VI) e colesterol (VII) (terpenos), cocaína (VIII) (alcalóide) e naringenina (IX) (flavonóide), respectivamente.

MÉTODOS CLÁSSICOS E AVANÇADOS DE OBTENÇÃO, EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS

Obtenção de extratos vegetais contendo metabólitos secundários

Para se obter extratos ou isolar compostos orgânicos de interesse farmacológico, inseticida ou de uso na cosmetologia deve-se levar em consideração características químicas das moléculas a serem purificadas e adequar os protocolos e metodologias de extração e purificação. Ao se aquecer suavemente uma parte vegetal ou destilá-la a vapor, pode-se obter misturas de compostos com propriedades peculiares, como lipofílicas, odoríferas, voláteis e termolábeis, denominadas óleos essenciais. Para o preparo dos "extratos brutos" onde estão presentes misturas complexas de diversas classes de metabólitos secundários, pode-se utilizar solventes orgânicos como etanol, metanol, água, hexano, acetato de etila e outros; colocando-os em contato com as partes vegetais de interesse e deixando-os repousar por horas ou até mesmo dias (Garcia, 2009).

Nesses estudos, deve-se sempre levar em conta o tipo de solvente utilizado, a fim de se obter o maior número de compostos advindos dos tecidos das plantas / organismos. Devido à alta heterogeneidade e a diferença de polaridade dos metabólitos secundários o sucesso da extração dependerá da técnica de extração e principalmente do solvente extrator (Garcia, 2009)

Segundo Simões (1999) quase todos os metabólitos secundários de interesse para o estudo fitoquímico apresentam solubilidade em misturas alcoólicas, as quais costumam ser utilizadas com certa frequência. Em contrapartida, metabólitos

secundários como alcalóides e ácidos graxos podem ser extraídos com hidrocarbonetos ou solventes apolares ou de baixa polaridade, como hexano, diclorometano, acetato de etila, ao passo que terpenos ou compostos fenólicos podem ser seletivamente extraídos com cetonas alifáticas ou ésteres em pH neutro.

O termo utilizado para a obtenção dos extratos é extração, onde “retira-se” de maneira mais eficiente e completa possível os metabólitos de interesse bioquímico ou as frações ativas contidas nesse vegetal (Simões, 1999). Ao escolher um método de extração deve-se levar em conta o quão eficiente é o mesmo, a estabilidade dos metabólitos extraídos, bem como custos e disponibilidade, considerando a finalidade do extrato ou substância que se quer obter.

EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS

Os métodos mais comuns de extrações de metabólitos secundários são infusão, decocção, sistemas de arraste de vapor d’água, extração utilizando aparelho de Soxhlet, sendo que esses métodos utilizam solventes ou sistema a quente. A maceração, percolação, turbólise, também são métodos comumente empregados, porém utilizam sistemas ou solventes à frio. Técnicas como microondas, ultrassons e extração por fluido supercrítico podem ser utilizadas, porém não são métodos muito convencionais (Navarro, 2005).

Extração por infusão

O processo de extração por infusão, um dos métodos mais utilizados para extração de metabólitos secundários, principalmente em residências, consiste em deixar, durante um intervalo de tempo o material vegetal em água fervente. Essa infusão é aplicada em partes vegetais como folhas, caules e raízes, as quais devem ser

trituradas, cortadas ou moídas, afim de que se possam ser facilmente extraída pela água (Simões, 1999).

Extração por decocção

A extração por decocção consiste em manter o material em estudo durante certo tempo imerso em água em ebulição. O problema dessa técnica é que muitas substâncias ativas podem sofrer alterações em suas estruturas devido ao longo período de aquecimento. Utiliza-se a técnica de extração por decocção em partes mais “duras” dos vegetais, como tronco e galhos (Simões, 1999).

Extração por arraste de vapor

A técnica de extração utilizando arraste de vapor d'água é utilizada para obtenção de óleos essenciais. Esses óleos possuem uma tensão de vapor superior à da água e conseqüentemente são arrastados pelo vapor d'água. Laboratorialmente, utiliza-se uma aparelhagem denominada de aparelho de Clevenger. Apesar de ser um processo clássico de extração de óleos voláteis pode levar à formação de artefatos, que são metabólitos secundários não sintetizados pelo organismo em questão, mas pelas reações paralelas no meio. No arraste de vapor, utiliza-se preferencialmente partes frescas de material (Simões, 1999).

Extração utilizando Aparelho de Soxhlet

A extração em aparelho Soxhlet, como o próprio nome sugere exige o uso da aparelhagem denominada Soxhlet, onde um cartucho com o material vegetal é colocado dentro do sistema de refluxo específico (Soxhlet) e o mesmo é acoplado num balão de aquecimento, juntamente com uma manta de aquecimento e um condensador. É uma técnica utilizada na extração de sólidos com solventes voláteis. Em cada ciclo, o material vegetal entra em

contato com o extrator, possibilitando uma extração com alto grau de eficiência e obtendo-se resultados qualitativos e quantitativos (Simões, 1999).

Extração via maceração

A maceração é uma técnica a frio na qual extrai-se o material em recipiente fechado, a temperatura ambiente, durante horas ou dias, sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Apesar de ser considerado um processo estático, pode-se variar essa operação, afim de aumentar a eficiência na extração. Por exemplo, ao se aquecer o sistema contendo o material em estudo e o solvente numa temperatura de aproximadamente 40 – 60 °C, tem-se a digestão; a maceração dinâmica consiste em deixar o sistema sob agitação mecânica constante; e a remaceração é aquela quando a operação é repetida utilizando o mesmo material vegetal, renovando-se apenas o líquido extrator, fazendo em média três repetições de adição do solvente extrator.

O processo de maceração é restrito quando se trabalha com substâncias ativas pouco solúveis, plantas com elevado índice de intumescimento e possíveis proliferações microbianas. Apesar dos inconvenientes apresentados, ainda é uma das técnicas extrativas mais usuais devido à simplicidade e custos reduzidos (Sonaglio et al., 1999).

Extração via percolação

Na percolação, ao contrario da maceração, o extrato ou principio ativo é arrastado pela passagem contínua do solvente extrator, fazendo com que haja o esgotamento da planta através

do gotejamento do material. Na percolação são obtidos extratos mais concentrados, podendo-se utilizar gradientes polaridades de solventes extratores. Essa técnica é indicada em processos contendo substâncias farmacologicamente ativas, em pequenas quantidades ou pouco solúveis (Navarro, 2005).

Turboextração

A turboextração ou turbólise consiste em aplicar tensões de cisalhamento variando de 5000 a 2000 rpm. Trata-se de um processo utilizado em partes vegetais como caules, raízes ou rizomas, pois como libera calor pode interferir nos processos metabólitos e também em substâncias voláteis (Huie, 2002).

Extração por microondas

Essa técnica utiliza solventes de várias polaridades e a irradiação como suporte, onde o aquecimento é viabilizado pelo uso contínuo de pressão. O aquecimento viabiliza o tempo de extração, mas pode ocasionar o aparecimento de artefatos como compostos hidrolisados ou mesmo formações de misturas racêmicas indesejáveis (Huie, 2002).

Extração por ultrassom

A técnica de extração utilizando ultrassom consiste em utilizar correntes de alta frequência no meio extrator (solvente e material) afim de promover a fragmentação de estruturas e membranas celulares do material em estudo, liberando com mais eficiência e facilidade os metabólitos secundários de interesse (Huie, 2002; Skoog, 2002).

Extração utilizando fluido supercrítico

A extração utilizando o fluido supercrítico é uma técnica que tem como solvente o gás carbônico, um solvente imiscível. É relativamente rápida, sem grandes custos e efetiva. Além de minimizar a produção de resíduos pode ser considerada uma técnica limpa, pois o solvente não é inflamável, possui custo baixo, não é corrosivo e não afeta o meio ambiente e nem a saúde dos seres vivos.

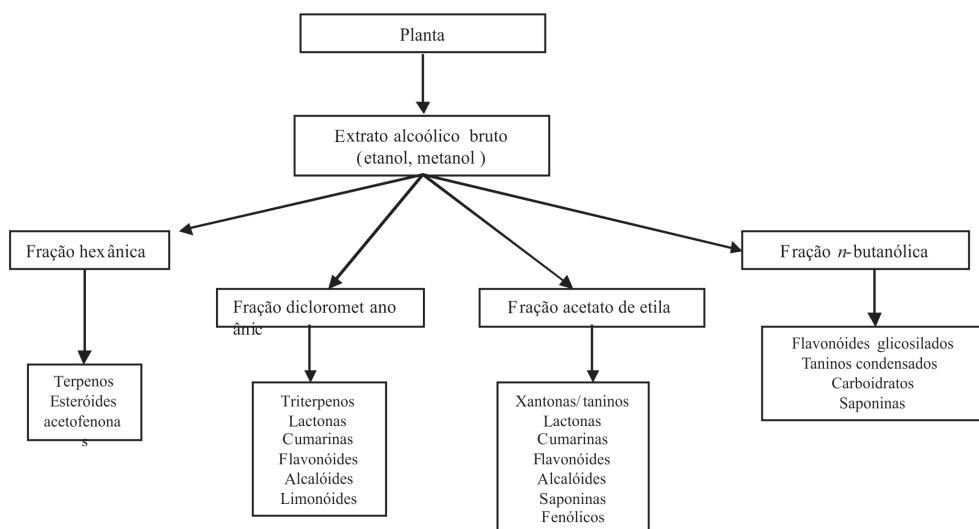
Pode-se otimizar os parâmetros de extração, como temperatura pressão, volume de fluxo afim de aprimorar o processo extrativo (Huie, 2002; Skoog, 2002).

SEPARAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS

Após a obtenção do extrato “bruto” da espécie em estudo, o próximo passo é a busca de princípios ativos através de compostos “puros” que podem ser isolados utilizando técnicas específicas, direcionadas e validadas o que garantem a integridade química, a constância da ação biológica, a segurança de utilização valorizando o potencial terapêutico da matéria-prima em estudo. São várias as técnicas de separação de metabólitos secundários, das quais se pode citar:

Partição líquido-líquido

Essa técnica consiste basicamente em semi-purificar o extrato “bruto” utilizando solventes em grau crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila / acetona, n-butanol), resultando numa separação de classes de metabólitos secundários que possuem interações químicas semelhantes, como especificado abaixo:



Fluxograma 2. Partição líquido- líquido de extratos orgânicos e separação de classes de metabólitos secundários. Fonte: adaptação Navarro, 2005

Cromatografia

A cromatografia foi reconhecida formalmente apenas no início do século 20 com trabalhos desenvolvidos e publicados pelo russo Michael Semenovich Tswett, apesar de haver relatos de usos de métodos de separação durante quase toda a história da humanidade. Em 1906, Tswett publicou trabalhos os quais atribuíam corretamente o mecanismo envolvido numa separação cromatográfica. Esta técnica se baseia na adsorção diferencial de componentes da amostra pelo sólido contido na coluna (fase estacionária), ocorrendo o desenvolvimento pela passagem do solvente (fase móvel) que carrega os compostos menos atraídos pelo sólido para distâncias maiores dentro da coluna. Pode-se dizer que a cromatografia consiste em um método físico-químico de separação e está fundamentada na migração diferenciada dos componentes de uma mistura, que

ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a estacionária (Collins, 2009).

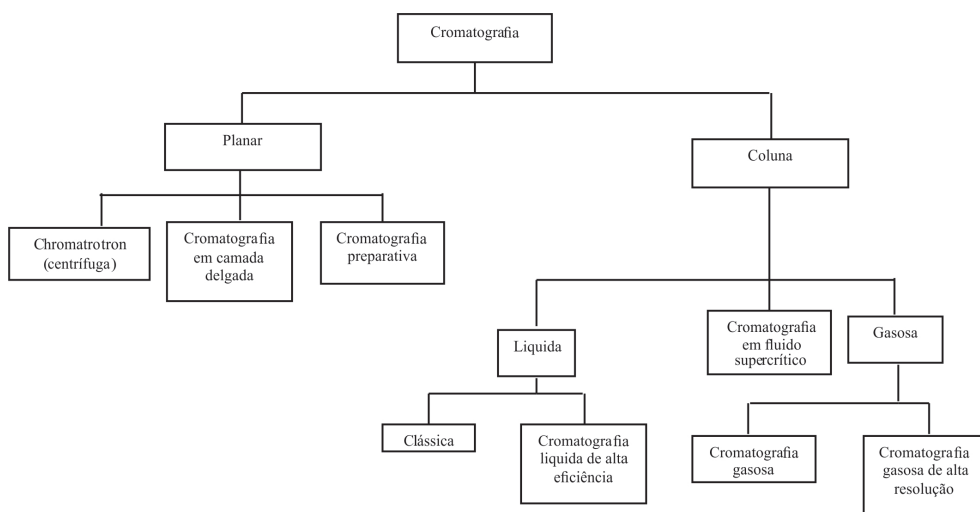
Essa migração se dá através de duas fases imiscíveis entre si; a fase móvel, composta geralmente por solventes orgânicos e a fase estacionária, que pode ser composta por sílicas, carbonato de cálcio, celite, sílicas modificadas como C-18; C-8, sephadex, dentre várias outras. E a separação pode ocorrer devido aos processos de adsorção, forças iônicas, exclusão e até mesmo por misturas desses mecanismos.

A cromatografia é uma técnica que consegue separar metabólitos semelhantes de misturas complexas através de “bandas” denominadas de bandas cromatográficas as quais podem ser analisadas qualitativamente e até quantitativamente.

Há vários tipos de cromatografia, como cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, chromatotron, cromatografia gasosa, e cromatografia gasosa de alta resolução (Degani et al, 1998).

Devido ao fato dessa técnica ser relevante as pesquisas de diferentes áreas do conhecimento, vários autores têm chamado o século 20 e 21 dos séculos da cromatografia (Collins, 2009).

O esquema abaixo exemplifica os diferentes tipos de cromatografia e nesse texto será abordada cromatografia em coluna.



Fluxograma 3. Diferentes técnicas de cromatografia.

Fonte: adaptação Degani et al, 1998

a) Cromatografia em coluna

A cromatografia em coluna (CC) é uma das técnicas mais utilizadas na área de química de produtos naturais, para pré-purificação de extratos orgânicos, isolamento de metabólitos secundários e até mesmo para separação de produtos obtidos via síntese orgânica. Utiliza-se como fases estacionárias mais freqüentemente a sílica comum e a sílica flash e também a alumina, sendo que os mesmos são acondicionados em tubos cilíndricos chamados de coluna cromatográfica de vidro. Os componentes dessa mistura são separados utilizando um sistema crescente de polaridade, onde o fluxo do mesmo deve ser mantido contínuo afim de que os metabólitos se desloquem com velocidades distintas.

Um princípio básico é aplicado na cromatografia em coluna: substâncias que possuem afinidade pela fase móvel serão separados daqueles que possuem afinidade pela fase estacionária, ou seja, a capacidade de um determinado eluente em arrastar um composto

adsorvido na cromatografia em coluna depende quase que exclusivamente da polaridade do solvente em relação ao metabólito. Via de regra, compostos de baixa polaridade atravessam a coluna com uma velocidade maior do que os compostos polares, porque os primeiros têm menor afinidade com a fase estacionária (Degani et al, 1998).

b) Cromatografia líquida de alta eficiência

A utilização da cromatografia não teria se difundido tanto se não fosse à informação quantitativa fornecida sobre as espécies separadas. Um dos métodos mais usados como técnica analítica de separação, com a intenção de caracterização, detecção e separação, é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ou Alta Pressão (CLAE) ou do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Nesse método de separação consegue-se uma alta sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas precisas, adequação à separação de compostos não voláteis ou termicamente frágeis, e acima de tudo, ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria (Degani et al, 1998).

A análise quantitativa em CLAE requer uma relação linear entre a magnitude do sinal e a concentração de um determinado soluto da amostra. A intensidade do sinal é dada pela área do pico ou pela altura do máximo. (Skoog et al, 2002). Em geral, os sistemas de CLAE já têm incorporados sistemas computadorizados de tratamentos de dados e quando concentrações padronizadas são usadas para preparar as curvas de calibração, é possível obter automaticamente um conjunto de resultados para cada composto isolado, relacionados com os tempos de retenção (Mendham, 2002).

Além do mais, as técnicas cromatográficas podem ser hifenadas, obtendo-se sistemas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD

ou HPLC-DAD), ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM ou HPLC-MS) e outras técnicas que promovem o incremento no desempenho das análises em termos de eliminação de interferências instrumentais, correção de tempo de retenção, seletividade, habilidades nas separações cromatográficas e precisão de medidas. O uso dessas técnicas hífenadas tem-se destacado bastante na utilização de análise de perfis químicos (ou "fingerprints", "screening") de extratos vegetais, pois fornecem, ao mesmo tempo, informações analíticas e espectroscópicas importantes para a identificação *on line* das substâncias presentes nesses extratos (Martins, 2008). Essa "hifenação" permite também verificar a presença de interferentes na eluição do composto de interesse a ser quantificado, além de tornar possível quantificações de substâncias que não apresentam grupos cromóforos, como no caso de triterpenos, dentre outros (Martins, 2008).

A CLAE apresenta várias vantagens em quantificações analíticas de fármacos, pesticidas, produtos naturais, e outros, como, eficiência na separação, alta reprodutibilidade, linearidade, automação e habilidade de analisar vários compostos em um único método (Forim, 2006).

c) Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (CG) é um processo usado na análise de gases ou substâncias voláteis ou volatilizáveis. Ela é uma técnica de separação que se baseia na distribuição da amostra entre a fase estacionária (sólida, líquida ou quimicamente ligada) e a fase móvel (gasosa). Algumas técnicas de cromatografia gasosa foram introduzidas em 1930, mas o desenvolvimento só se deu a partir de 1952, com a introdução da cromatografia gás-líquido. A partir daí houve um grande desenvolvimento de métodos e equipamentos

e, atualmente, a CG está presente na maioria dos laboratórios de análise química (Skoog, 2002).

Gases, substâncias voláteis ou substâncias volatilizáveis, que podem ser derivatizadas para obtenção de um composto volátil, podem ser separados por cromatografia gasosa. Por exemplo, ácidos graxos podem ser analisados através da obtenção dos seus respectivos ésteres, e açúcares devem ser silanizados para poderem ser analisados.

A CG tem alto poder de resolução, podendo diferenciar dezenas de substâncias de uma mesma amostra e alta sensibilidade, chegando a detectar 10^{-12} g de uma substância, fazendo com que a quantidade de amostra necessária para análise seja pequena. (Degani et al, 1998). Ela é uma excelente técnica quantitativa que permite a obtenção de resultados quantitativos que variam de picograma à miligrama e também encontra algumas aplicações qualitativas. Entretanto, não é, geralmente, utilizada para purificação e isolamento de compostos, já que quantidades mínimas de amostra são injetadas (Degani et al, 1998).

Apesar de ser uma técnica extremamente sensível e ter diversas aplicações, a CG apresenta algumas desvantagens: as substâncias (ou seus derivados) precisam ser volatilizáveis e estáveis termicamente; muitas vezes, a etapa de preparação da amostra é longa e complexa, o que aumenta o tempo e o custo da análise; não é uma técnica qualitativa eficiente, necessitando de técnicas alternativas para a identificação da substância; e, não é adequada para separações preparativas.

É comum usar este procedimento, para identificar compostos voláteis como sesquiterpenos, compostos fenólicos, hidrocarbonetos carotenos, álcoois lineares e triterpenos esteroidais. A Cromatografia Gasosa está acoplada freqüentemente a técnicas seletivas de espectroscopia como CG/EM, por exemplo, usado em estudos de

rastreamento de metabólitos secundários em espécies vegetais (Lanças, 1993).

CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS

O conhecimento quimiosistemático de determinadas classes de metabólitos das espécies em estudo pode fornecer informações importantes sobre o seu uso ou não como pesticida, fitoterápico, bactericida, medicinal, etc.

Alguns experimentos ou “marchas fitoquímicas” são de grande importância, quando se quer conhecer previamente a composição química do vegetal afim de que não se perca tempo, trabalho ou investimentos desnecessários em usar uma planta,, cuja presença ou índices de compostos bioativos estejam em desacordo com o que se quer buscar. A Tabela 1 sugere algumas reações químicas importantes que determinam classes de metabólitos secundários presentes na composição química vegetal (Farias et al., 1984).

A identificação ou elucidação dos metabólitos secundários isolados de uma determinada espécie pode ser realizada utilizando várias técnicas que variam desde técnicas mais simples como ultravioleta e infravermelho até técnicas com alto grau de sofisticação como a ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas (Silverstein et al., 2002).

A primeira técnica utilizada para elucidação é a espectroscopia no Infravermelho (IV ou IR), o qual fornece informações características da molécula e permite a possível identificação dos seus grupos funcionais. O IV mostra um rico agregado de bandas de absorção situadas nas regiões de 4000 a 400 cm^{-1} . A técnica de infravermelho é usada, além da identificação de estruturas de substâncias orgânicas, na comparação de substâncias, verificação do

grau de pureza de uma substância e até mesmo no acompanhamento de reações.

A espectrometria de massas é uma outra poderosa técnica analítica usada para identificar compostos desconhecidos, quantificar compostos conhecidos e para elucidar a estrutura e propriedades químicas de moléculas. O mecanismo baseia-se no bombardeamento de uma substância através de um feixe de elétrons, com energia suficiente para ionizar a molécula. Os íons moleculares e fragmentos (+) positivos produzidos são acelerados numa câmara de vácuo através de um campo eletrostático e rádio frequência sendo registrada na base da razão massa-carga (Silverstein et al., 2002).

Tabela 1. Reações químicas para caracterização de metabólitos secundários em espécies vegetais.

Metabólitos secundários	Reações químicas não específicas	Reações químicas específicas
Alcalóides	Reação de Mayer	Reação de Waisiely
tropânicos	Reação de Dragendorff	Reação de Vitali-Morin
Alcalóides indólicos	Reação com ácido picríco	Reação do Otto
Flavonóides	Reação de Shinoda	Reação de Wilson T (flavonóides)
	Reação de Borntrager	Redução com borohidreto de sódio
Antraquinonas	Reação de Shouteten	--
	Reação de Liebermann-Bouchard	--
Esteróides		
	Reação com cloreto férrico	Precipitação com acetato de chumbo
Taninos	Reação com vanilina clorídrica	Precipitação com sais de alcalóides

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é a técnica espectroscópica que disponibiliza um maior acervo de informações estruturais. Ela é baseada na absorção de energia,

via radiofrequência, por núcleos atômicos (ex. ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{39}K , etc) que possuem um momento de dipolo magnético, spin nuclear diferente de zero e um quadrupolo elétrico. A RMN proporciona a análise de pequenas quantidades de substâncias ou metabólitos puros, com grande precisão em escala de miligramas ou microgramas (Silverstein et al.,2002).

EFEITOS DE PRODUTOS NATURAIS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS SOBRE INSETOS

A expansão do conhecimento das estruturas químicas dos PNs, bem como da sua função nas interações planta-inseto, tem permitido uma melhor elucidação dos mecanismos bioquímicos e biológicos dessas interações, o que torna possível abordagens biorracionalis no desenvolvimento de novos agentes inseticidas. Sabe-se que o efeito dos PNs e metabólitos secundários em artrópodes pode ser positivo ou negativo. O efeito positivo pode favorecer a reprodução e estimular determinadas vias fisiológicas nos organismos. Por outro lado, o efeito negativo pode causar mortalidade desses organismos ou provocar efeitos subletais em sua biologia como inibição alimentar nos insetos, redução da motilidade intestinal, interferência na síntese do ecdisônio, inibição da biossíntese da quitina, deformações em pupas e adultos, redução na fecundidade, longevidade, esterilização e inibição na oviposição.

Há relatos de que PNs induzem respostas estimulatórias cerca de 40 a 60 % maior em insetos submetidos a algum agente químico, do que nos insetos controle. Inicialmente, pode ocorrer uma resposta inibitória, seguida por uma compensatória que, eventualmente, excede o controle, resultando em uma rede de resposta estimulatória referida como efeito hormético. Essa resposta de estímulo chamada de hormese é definida como o estímulo à

performance de um organismo por pequenas exposições a agentes que seriam prejudiciais ou tóxicos em níveis elevados de exposições.

A maioria dos estudos de hormese tem mostrado efeito positivo na fecundidade, na sobrevivência ou na redução da duração dos estágios imaturos de insetos e de ácaros quando expostos a doses subletais de inseticidas. Este fenômeno também tem sido registrado em outros grupos taxonômicos como plantas, bactérias, fungos e mamíferos, os quais são afetados, principalmente no crescimento, na sobrevivência, na longevidade, na reprodução e nas respostas metabólicas e fisiológicas, frente a agentes químicos como inseticidas, fungicidas e herbicidas.

No entanto, o efeito estimulatório de pesticidas não é sempre devido à hormese. Neste caso, processos de erupção do artrópode após a aplicação dos inseticidas pode ser devido a vários fatores como o clima, a destruição de inimigos naturais, a persistência, a taxa de cobertura do inseticida e a espécie de artrópodes na cultura.

O efeito negativo dos PNs sobre os organismos vivos pode ser classificado como agudo, subagudo e crônico. Na intoxicação aguda, o resultado normalmente se observa após o contato com uma única dose do pesticida. É aquela no qual os sintomas surgem rapidamente, algumas horas após a exposição excessiva, por curto período, a produtos altamente tóxicos. Pode ocorrer de forma leve, moderada ou grave, dependendo da quantidade do composto absorvido. A intoxicação subaguda ocorre por exposição moderada ou pequena, a produtos altamente ou medianamente tóxicos. Este tipo de intoxicação se processa de forma lenta. Por outro lado, a intoxicação crônica se caracteriza por surgimento tardio, em meses ou anos, por exposição pequena ou moderada a produtos tóxicos ou a múltiplos produtos, acarretando danos irreversíveis.

Segundo Menezes (2005), há basicamente três modos de ação dos PNs de plantas sobre os insetos:

Ação tóxica, Repelente e/ ou Alimentar: alguns PNs causam morte do inseto por intoxicação; mas, às vezes, atuam como repelentes, afastando os insetos da planta alvo, evitando assim a oviposição e a destruição das partes vegetais devido a mastigação; ou atuam ainda como fator antialimentar. Tem sido observado em insetos mastigadores, principalmente lepidópteros, a maior atividade de compostos inseticidas provenientes de extratos vegetais. A sensibilidade desses insetos, principalmente em relação a azadiractina, deve-se a ação das células deterrentes específicas, situadas nos palpos maxilares e na probólide (BLANEY, 1990). Alguns eventos fisiológicos, como a produção e a atividade de enzimas específicas, são reduzidas em consequência da ação deterrente, do consumo alimentar e da absorção de nutrientes que ficam prejudicados.

Há inúmeros relatos da atividade inseticidas de PNs sobre diferentes insetos. Um desses trabalhos, realizado no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, da Universidade Federal de Viçosa têm mostrado efeito tóxico de extratos aquoso, metanólico e hexânico de plantas das espécies *Annona mucosa*, *Agave angustifolia* e *Ageratum conyzoides* sobre a principal praga da soja *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera) (Tabela 2).

Tabela 2. Mortalidade de diferentes extratos e plantas à lagartas neonatas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera)

Espécie de planta	Mortalidade/extrato (%)		
	Aquoso	Metanólico	Hexânico
	24 horas		
<i>Annona mucosa</i>	30	3	0
<i>Agave angustifolia</i>	10	30	10
<i>Ageratum conyzoides</i>	12	70	0
	72 horas		
<i>Annona mucosa</i>	100	10	5
<i>Agave angustifolia</i>	13	100	50
<i>Ageratum conyzoides</i>	15	100	40

Outro estudo desse mesmo grupo de pesquisa revelou diferenças entre a toxicidade de diferentes extratos botânicos. Como exemplo, para *S. zeamais* os extratos mais tóxicos foram os metanólicos de *C. brasiliense* e *A. conyzoides*, pois causaram a morte de todos os insetos colocados nas placas de Petri. Para *Atta*. spp. os mais tóxicos foram os extratos metanólico e hexânico de *C. brasiliense*. Para *A. obtectus* o extrato que causou maior mortalidade foi o metanólico de *A. squamosa* e para *B. brassicae* foram os extratos metanólicos de *A. conyzoides* e de *C. brasiliense* (Tabela 3).

Tabela 3. Mortalidade de *S. zeamais*, *Atta* spp., *A. obtectus* e *B. brassicae* por diferentes extratos de plantas.

Espécies de plantas	Solventes/espécies de insetos (Mortalidade %) ¹			
Hexânico				
	<i>S. zeamais</i>	<i>Atta</i> spp.	<i>A. obtectus</i>	<i>B. brassicae</i>
<i>Agave angustifolia</i>	22,5±7,5 Aa	52,5±19,31 Ca	5±5 Ba	57,5±2,5 Ca
<i>Caryocar brasiliense</i>	10±4,08 Ab	80±4,08 Bb	40±10,80 Cb	90±4,08 Bb
<i>Ageratum conyzoides</i>	22,5±6,29 Aa	57,5±14,93 Ca	22,5±4,79 Ac	62,5±4,79 Ca
<i>Annona squamosa</i>	15±2,89 Ab	60±7,07 Cc	0±0 Ba	90±4,08 Db
<i>Solanum lycocarpum</i>	30±4,08 Aa	47,5±7,5 Ac	22,5±2,5 Ac	82,5±4,79 Cb
Metanólico				
<i>Agave angustifolia</i>	15±2,88 Aa	60±8,16 Ca	50±4,08 Ca	75±6,45 Ca
<i>Caryocar brasiliense</i>	100±0 Ab	100±0 Ab	75±6,45 Bb	95±2,89 Ab
<i>Ageratum conyzoides</i>	100±0 Ab	20±7,07 Bc	65±18,93 Ca	100±0 Ab
<i>Annona squamosa</i>	25±2,89 Aa	42,5±4,79 Cd	80±4,08 Db	65±2,5 Ca
<i>Solanum lycocarpum</i>	10±0 Aa	37,5±9,46 Cd	75±6,45 Bb	57,5±2,5 Ba
Aquoso				
<i>Agave angustifolia</i>	5±5 Aa	52,5±19,31 Ba	5±5 Aa	92,5±4,79 Ca
<i>Caryocar brasiliense</i>	10±4,08 Aa	45±5 Ba	10±5,77 Aa	55±6,45 Bb
<i>Ageratum conyzoides</i>	10±5,77 Aa	70±17,79 Ba	12,5±2,5 Aa	65±10,41 Bb
<i>Annona squamosa</i>	12,5±4,79 Aa	62,5±9,46 Ba	20±4,08 Aa	77,5±6,29 Bb
<i>Solanum lycocarpum</i>	12,5±4,79 Aa	70±10,80 Ba	42,5±9,46 Cb	60±7,07 Bb

¹Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Algumas plantas e metabólitos secundários provocam prejuízos na biologia e efeitos deterrentes e repelentes sobre insetos. Dentre as classes de metabólitos secundários envolvidos na defesa da planta contra herbivoria, destacam-se os taninos, os quais são conhecidos por causarem redução no crescimento e sobrevivência de insetos. O efeito dos taninos sobre os insetos dá-se em razão do fato desses compostos formarem complexos com as enzimas digestivas presentes no intestino dos herbívoros, e como consequência, levam a uma redução na eficiência da digestão de proteínas e por fim, retardam o crescimento (Tirelli et al., 2010).

Há relatos de repelência de pragas de grãos armazenados submetidas ao tratamento com extratos brutos de diferentes PNs e vários óleos essenciais contra *Sitophilus oryzae*. Extratos brutos de *Alysia polystachia*, *Solanum argentinum* e *Tillandsia recurvata* extraídos com etanol, clorofórmio e hexano foram avaliadas em relação à repelência e deterrência alimentar sobre o caruncho *S. oryzae*. Resultados demonstraram que o extrato de *A. polystachia* apresentou maior efeito deterrente enquanto o extrato hexânico de *S. argentinum* maior efeito de repelência (Viglianco et al., 2007).

Ação sobre órgãos e moléculas-alvo: alguns PNs podem agir no sistema neuroendócrino, interferindo nos processos normais de troca de tegumento e/ ou interferindo na metamorfose, sendo denominados reguladores de crescimento; ou interferem no processo respiratório da célula, prejudicando a síntese de ATP. Alguns trabalhos observaram que o primeiro e segundo instares ninfais são os mais sensíveis ao extrato aquoso de sementes e folhas de nim (Hammad et al., 2000). Tal encontro sugere que nos estágios iniciais o nim atua no sistema neuroendócrino e provoca sintomas de má formação nos adultos, característicos de disfunções do sistema endócrino dos insetos.

Ação por contato ou ingestão: algumas substâncias atuam por contato, que caracteriza o modo de ação de um inseticida que é absorvido pelo tegumento do inseto, afetando a biossíntese de hormônios da ecdise ou a formação da camada de quitina. Outros PNs atuam por ingestão, penetrando no organismo por via oral, afetando diretamente o sistema digestivo através da inibição da atividade enzimática, redução dos movimentos das paredes do intestino e alteração histológica do epitélio intestinal. A ingestão do óleo de nim na fase larval de *Ceraeochrysa claveri* mostrou-se tóxica a este predador, ocasionando alterações ultraestruturais em células colunares, regenerativas, endócrinas e musculares, sendo prejudicial

à integridade do epitélio intestinal (Scudeler, 2012). Alguns PNs atuam como inibidores de enzimas de insetos, como as proteases. Segundo Gomes (2014), presença de inibidores enzimáticos nos extratos de 10 genótipos de gergelim foram efetivos na inibição da atividade de tripsina de *Plodia interpunctella*, importante praga de grãos armazenados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao aumento da resistência de insetos e pragas à defensivos sintéticos ao longo das últimas décadas, o interesse em desenvolver e usar inseticidas botânicos para o manejo de pragas está aumentando nos últimos anos, principalmente devido à crescente demanda por alimentos livres de produtos nocivos ao homem e que acarretam prejuízos ao meio ambiente. O Brasil é uma fonte inesgotável de biomoléculas, sendo a maioria desconhecida, mas que podem servir de modelo para a síntese de novos defensivos.

A consolidação do uso dos PNs como parte do manejo depende de inúmeros fatores que devem ser considerados, já que o resultado inibitório esperado sobre a praga é o primeiro degrau da longa jornada. Isolamento dos princípios ativos, seleção do solvente utilizado na extração, testes de nanoformulações, de estabilidade, de métodos de aplicação, além da determinação do custo em relação aos inseticidas sintéticos, análise de impacto sobre inimigos naturais, determinação do efeito residual serão as etapas futuras e obrigatórias nesse estudo. O caminho a ser percorrido até o registro e a patente do produto final é longo e demandará esforços de um número relevante de pesquisadores de diferentes áreas. No entanto, torna-se um enorme atrativo considerando que apenas uma pequena parcela desses metabólitos foi investigada com esse propósito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLANEY, W.N. Antifeedant effects of azadirachtin and structurally related compounds of lepidopterous larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.55(2), p.149-160, 1990.

BRAIBANTE, M.E.F; ZAPPE, J.A. A Química dos Agrotóxicos. *Química Nova na Escola*, v.34, n.1, p.10-15, 2012.

COLLINS, C.H.; Pilares da Cromatografia. In Michael Tswett e o "nascimento" da Cromatografia. *Scientia Chromatografica*, v.1(1), p.7-20, 2009.

DEGANI, A.L.G; Quezia B.C.; Vieira, P.C. Cromatografia: Um breve Ensaio. *Química Nova na Escola Cromatografia*, nº 7, maio 1998, p. 21-25.

DEWICK, P. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. – John Wiley & Sons Ltd. 2ª ed., 2002, 507p.

FARIAS, F.M. .; BARREIRO, E.J.; COELHO, F.A.S.; COSTA, P.R.R. Análogos de prostaglandinas, síntese de novos prostanóides a partir do safrol. *Química Nova*, v.7, p.111, 1984.

FORIM, M.R. Estudo fitoquímico do enxerto de *Azadirachta indica* sobre *Melia azedarach*: quantificação de substâncias inseticidas. 2006. 320p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

GARCIA, L. M.Z.; Análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólitos secundários das folhas de *Mikania laevigata* sch. bip.

por métodos quimiométricos. 2009. 119p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

GASPAR, L. *Plantas medicinais*. **Pesquisa Escolar Online**, Fundação Joaquim Nabuco, Recife. Disponível em: <<http://basilio.fundaj.gov.br/pesquisaescolar/>>. Acesso em: 12 set. 2015.

GOMES, G.L.B. Detecção de inibidores de tripsina em genótipos de gergelim visando o controle de *Plodia interpunctella*. 2014. 59p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande.

GONZÁLEZ-LAMONTE, R.; MITCHELL, G.; GATTUSO, M.; DIARRA, M.; MALOUIN, F.; BOUARAB, K. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, v.10, n.8, p.3400-19, 2009.

HAMMAD, E.M.A.; NEMER, N.M.; HAWI, Z.K.; HANNA, L.T. Responses of the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* to the chinaberry tree (*Melia azedarach* L.) and its extracts. *Annals of Applied Biology*, v.137, p. 79-88, 2000.

HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.80, n.1, p.177-88, 1996.

HUIE. C.V. A review of modern sample preapration techniques for the extraction and analysis of medicinal plantas. *Anal Bional. Chem*, v.373, p.23-30, 2002.

LÜLLMAN, H.; MOHR, K.; HEIN, L.; BIEGER, D. Farmacologia, Texto e Atlas, 5ª edição, Editora Artmed, 2008, 416 p.

LANÇAS, F.M. Cromatografia em Camada Gasosa. São Carlos. ACTA, 1993, 113p.

MARTINS, L.R.R. Perfil cromatográfico e análise multivariada para o controle de qualidade de amostras comerciais do gênero *Phyllanthus* (quebra-pedra). 2008. 154p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

MENDHAM, J; DENNEY, R.C; BARNES, J.D; THOMAS, M.J.K, Vogel Análise Química Quantitativa. 6ª edição. LTC editora. 2002. 462p.

MENEZES, E.L.A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, mecanismos de ação e uso agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005, 53p.(Embrapa Agrobiologia, documentos 205).

NAVARRO, D.F. Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii Pohl* para a obtenção de frações e moléculas bioativas de potencial terapêutico. 2005. 291p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

NIERO R. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In Chechinel Filho V, Bresolin TMB. (org). Ciências químico-farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: UnivallI, 2003, p.150-215.

NOGUEIRA, L.J.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Histórico da Evolução da Química Medicinal e a Importância da Lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as Contribuições de Overton e de Hansch. *Revista Virtual de Química*, v.1, n.3, p.227-240, 2009.

PINTO, A.C.; SILVA D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A.; *Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas*. *Química Nova*, v.25, Supl. 1, p.45-61, 2002.

SCUDELER, E.L. Efeito do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no intestino médio de *Ceraeochrysa Claveri* (Návas, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae): estudo citoquímico, imunocitoquímico e ultraestrutural. 2012. 228p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Botucatu.

SEOW-MUN, H.; BOYCE, A.N.; SOMASUNDRAM, C. Antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents in the leaves of different varieties of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Australian Journal of Crop Science*, v.6(3), p.375-380, 2012.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5 ed.. Ed. Guanabara Koogan, S. A. Rio de Janeiro. 1994, 387p.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN G.; MELLO, J.C.P.D.; MENTZ, L.A.; Petrovick P.R.; 1999, p. 387-415.

SKOOG, D.A. *Princípios de análise instrumental*. 5 ed. Porto Alegre: Bookmann. 2002, 836p.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L.; Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; Org. FARMACONOSIA: da planta ao medicamento, 3 ed. Porto Alegre, UFRGS/EDUSC. 2001, cap. 13, p. 228-54.

TIRELLI, A.A.; ALVES, D.S.; CARVALHO, G.A.; SÂMIA, R.R.; BRUM, S.S.; GUERREIRO, M.C. Efeito de frações tânicas sobre parâmetros biológicos e nutricionais de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 34(6), p.1417-1424, 2010.

VIGLIANCO, A.I.; NOVO, R.J.; CRAGNOLINI, C.I.; NASSETTA, M.; CAVALLO, A. Antifeedant and repellent effects of extracts of three plants from Córdoba (Argentina) against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Bioassay*, v.3(4),p. 1-6, 2008.

Inovações tecnológicas para o manejo de mosca branca

Flávio Lemes Fernandes¹
Maria Elisa de Sena Fernandes¹
Valesca Pinheiro de Miranda¹
Nayara Cecília Rodrigues Costa¹
Renata Luciana Teodoro¹
Renata Cunha Pereira²
Arícia Lorrany dos Santos¹

INTRODUÇÃO

A mosca branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) tem sido uma praga de grande importância no mundo todo, de fato que a mesma tem causado sérios danos em inúmeros cultivos: grandes culturas (soja, algodão, feijão), hortaliças (batata, tomate, pepino, melão, melancia) e sobretudo fruteiras e plantas ornamentais. As perdas podem ser diretas e indiretas, as primeiras estão relacionadas à picada de sucção e injeção de toxinas, que na maioria das vezes reduzem o fluxo de seiva e causa encarquilhamento das folhas,

¹ Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Rio Paranaíba, CEP: 38810-000, Rio Paranaíba, MG

² Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Viçosa, Programa de Agroecologia, CEP: 38810-000, Viçosa, MG

gerando ainda um fungo (pulverulência preta= fumagina) do gênero *Capnodium*, que reduz a taxa fotossintética das plantas. Os danos indiretos correspondem às viroses que a mesma transmite, que estão associadas a redução do stand final da cultura, uma vez que as plantas apresentam sinal de nanismo e a planta não produz, sendo na verdade foco para a infestação do vírus em área total. Só na cultura do feijoeiro esta praga extrai elevada concentração de seiva e transmitem o vírus do mosaico dourado, ocasionando perdas de 40-100%.

Até o momento o único método de controle que tem sido adotado é o controle químico. Esse método de controle não tem sido utilizado com eficiência pois essa praga é resistente à maioria dos princípios ativos. Essa resistência tem sido elevada nos últimos anos. Estudos realizados pela equipe do Comitê Internacional de Ação à Resistência de Pragas (IRAC) tem mostrado inúmeras regiões com problemas de resistência. Além da resistência aos inseticidas, esta praga reproduz rápido e em grande quantidade, fato estes que agravam mais o ataque dessa praga. Por último, resta dizer a respeito da dispersão dessa praga, que é afetada diretamente pelas correntes de vento que a transportam a quilômetros de distância de uma lavoura para outra, de plantas hospedeiras para plantas convencionais e vice-versa.

Tendo em vista estas características exclusivas da mosca branca, esse capítulo abordará de forma sucinta e eficiente sobre as principais inovações tecnológicas e processos que poderiam ser adotados no manejo da mosca branca.

BIOECOLOGIA DE MOSCA BRANCA

A mosca-branca (*Bemisia* spp.) é uma praga responsável por elevados danos econômicos à agricultura, que podem chegar a 100% em algumas culturas. Ocorre em uma ampla faixa de plantas hospedeiras e coloniza principalmente espécies anuais e herbáceas. Apresenta alto potencial reprodutivo, que é dependente da fecundação, duração do ciclo biológico e razão sexual. A mosca-branca pode se reproduzir de forma sexuada ou por partenogênese. Na reprodução sexuada, a prole será de macho e fêmea e quando é partenogênica, não ocorre a fecundação e a prole será composta apenas de machos, denominado arrenotoquia. A metamorfose deste inseto é incompleta, apresentando os estádios de ovo, ninfa e adulto.

Os ovos são depositados de forma irregular na face inferior das folhas, presos por um curto pedicelo. A fase de ninfa passa por quatro instares:

No primeiro as ninfas são móveis nas folhas da planta, o é formato elíptico, de coloração branco esverdeada e medindo até 0,27 mm de comprimento e 0,18 mm de largura. O segundo instar é oval, e apresenta coloração branco-esverdeada e olhos brilhantes, o comprimento varia de 0,33 a 0,39 mm e sua largura de 0,18 a 0,24 mm (Figura 1).



Figura 1. Ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B em folha de tomate *Solanum lycopersicum* (Solanaceae).

O terceiro ínstar tem formato elíptico, cor verde-pálida a verde-escura e olhos vermelhos brilhantes na parte dorsal da cabeça e o comprimento varia de 0,51 a 0,60 e 0,30 a 0,36 de largura. No quarto ínstar, também chamado de pseudopupa, há uma redução do metabolismo do inseto e este não se alimenta, o formato é oval e já pode ser observada a divisão do corpo em cabeça, tórax e abdome. O seu comprimento é de 0,54 a 0,85 mm e a largura de 0,36 a 0,60 mm. No início deste estágio, a ninfa é plana e transparente, mas no final é convexa e opaca, com os olhos vermelhos bem visíveis. Os adultos voam principalmente impulsionados pelo vento, podendo alcançar altitudes elevadas (Figura 2). Os adultos medem de 1 a 2 mm de comprimento e 0,36 a 0,51 mm de largura, sendo a fêmea maior que o macho. A fêmea se diferencia do macho pelo tamanho e pela configuração da genitália.



Figura 2. Adultos de *Bemisia tabaci* biótipo B em folha de tomate *Solanum lycopersicum* (Solanaceae).

Em condições favoráveis de temperatura e da planta hospedeira, a mosca-branca pode apresentar de 11 a 15 gerações por ano, podendo, cada fêmea colocar de 100 a 300 ovos durante o seu ciclo de vida, que pode variar de 19 dias a 32° C, 22 dias a uma temperatura média de 23 °C a até 73 dias a temperatura de 15° C.

É uma espécie que se caracteriza por ser polífaga com grande capacidade de adaptar-se a novos hospedeiros e a condições climáticas adversas que pode ser encontrada em áreas tropicais, subtropicais e temperada. Períodos secos e quentes favorecem o desenvolvimento e a dispersão da praga, sendo, por isso, observados maiores picos populacionais na estação seca.

COMO MONITORAR A MOSCA BRANCA?

O programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP) apresenta como princípio básico a utilização do monitoramento que consiste no acompanhamento da ocorrência da praga na cultura, assumindo o critério de que as medidas de controle sejam adotadas apenas com o objetivo de diminuir a densidade populacional do inseto para níveis que não causem danos de importância econômica.

A melhor técnica usada no monitoramento é aquela que estima a densidade populacional do inseto levando em consideração a precisão, o custo e a distribuição estatística dos dados, de forma a dar subsídio para uma tomada de decisão eficiente e barata.

Várias técnicas podem ser empregadas para o monitoramento de pragas, dentre elas a batida de folhas em bandeja de fundo branco, a contagem direta dos insetos nas folhas, a coleta de folhas em sacola de plástico para contagem posterior e instalação periódica de armadilhas adesivas de cor amarela para futura contagem, são as técnicas, normalmente, mais empregadas na avaliação de insetos da ordem Hemiptera, como *B. tabaci*.

A técnica de batida de folhas em bandeja de fundo branco apresenta o menor custo empregado para utilizá-la, entretanto, devido ao tamanho reduzido de *B. tabaci* pode ocorrer à dispersão de parte dos insetos antes da contagem. A contagem direta dos insetos nas folhas demanda mais tempo, e conseqüentemente o custo é mais elevado, entretanto a precisão encontrada por essa técnica é melhor. A coleta de folhas em sacola de plástico possui o maior custo dentre as técnicas apresentadas, e parte dos insetos coletados podem morrer ou ficar aderidos às paredes da sacola, em razão da condensação de água proveniente da transpiração da folha. A instalação periódica de armadilhas adesivas de cor amarela apresenta um custo intermediário, entretanto esta técnica é usada

apenas para insetos adultos e que podem ou não ser atraídos pela cor da armadilha e ficarem fixados no adesivo.

Para melhor utilizar as técnicas e/ou escolher qual melhor atenderá a necessidade ou realidade da propriedade, é necessário, o conhecimento da biologia e do comportamento do inseto monitorado. No caso de *B. tabaci*, tendo em vista que depois da primeira infestação de adultos, a colonização aumenta drasticamente após a eclosão da primeira geração ninfa, é importante o acompanhamento desde o início da germinação das plantas.

A tomada de decisão para iniciar o controle da praga é embasada nos resultados do monitoramento que se resumem na presença ou ausência dos insetos na planta. Recomenda-se para *B. tabaci*, iniciar o controle com a presença de um indivíduo, em média, por planta, principalmente se a variedade não apresenta características de resistência a viroses. Devido à migração dos adultos, o nível de infestação de *B. tabaci* (adultos/planta) cresce linearmente com o tempo e em algumas culturas a simples presença de adultos ou de excrementos açucarados é considerada inaceitável comercialmente.

Na cultura do feijoeiro as avaliações de adultos de *B. tabaci* foram realizadas através de contagem direta dos insetos na folha, curvando-se levemente e cuidadosamente a planta para o lado. Para ninfas de *B. tabaci*, coletou-se um folíolo de feijoeiro por planta, sendo, na primeira semana após a emergência das plantas, na folha primária e, nas demais, no segundo par de folhas a partir do ápice das plantas. Estes folíolos foram observados sob microscópio estereoscópico, considerando-se a página abaxial.

Em plantas de pepino foi testada a técnica mais apropriada para o monitoramento de *B. tabaci*, pela técnica de contagem direta em folha os insetos adultos foram detectados no terço apical, em razão da migração de fêmeas para ovipositarem em folhas novas,

encontradas em maior número nessa região pela baixa dispersão e o baixo número de adultos mortos. Quando utilizou-se a técnica de batidas de folhas em bandeja de fundo branco, ocorreu dispersão de parte dos insetos adultos antes da contagem. E quando foi usada a sacola de plástico, parte dos insetos não foi contada porque morreram e/ou ficaram presos nas extremidades da sacola.

Na cultura do tomateiro, as maiores densidades de ninfas foram encontradas utilizando a técnica de contagem direta em folha do terço basal decorrentes da maior proporção de ninfas do terceiro e quarto instar visíveis a olho nu nas folhas mais velhas. Além disso, as folhas mais velhas proporcionam maior tempo de exposição à colonização por *B. tabaci*. Sugere-se para o tomateiro o nível de controle de 40% de folhas infestadas por ninfas e 60% de folhas infestadas por adultos provenientes de resultados encontrados no monitoramento.

Em plantas de mandioca, o monitoramento de *B. tabaci* foi realizado em diferentes meses do ano que apresentavam temperaturas elevadas e amenas. Foi aplicada a técnica de contagem direta em folha do terço apical que mostram maiores densidades populacionais de insetos com temperatura elevada e houve uma pequena queda na densidade populacional de insetos com temperatura amena, no entanto, mesmo com a redução observou-se a necessidade de controlar a praga.

USO DE VAZIOS SANITÁRIOS

Os vazios sanitários (VS) são instrumentos políticos que o governo federal, juntamente com os órgãos de fiscalização adota para quebrar o ciclo de vida de uma praga ou patógeno. É importante entender que VS é o período de tempo onde não se podem ter plantas suscetíveis ao ataque da praga ou do patógeno, nessa temática,

exclui-se áreas de pesquisa científica e produção de semente, que devem ser autorizadas e reconhecidas pelos órgãos de fiscalização. Um caso que tem sido considerado é o VS do feijão, que tem como objetivo reduzir a infestação da praga e a proliferação do vírus do mosaico dourado.

Esta medida fitossanitária foi publicada no DOU, em 2014, a IN 15, que estabelece o VS por 30 dias, referente aos estados de Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal. O VS da cultura do feijão ocorre entre os meses de setembro e outubro, que durante esse período não é permitida a presença de plantas hospedeiras e da cultura alvo. A manutenção das áreas é de responsabilidade dos produtores, que utilizam diversas técnicas para isso, como grade niveladora, roçadeiras e herbicidas para manter a área livre de plantas infestantes. Para esta cultura ainda não se tem resposta do resultado dessa medida, mas para outras culturas, como soja e algodão é medida essencial.

RESISTÊNCIA DE PLANTAS

Alternativas ao controle químico podem ser utilizadas com eficiência. Dentre elas, tem-se o melhoramento visando a resistência das plantas e a obtenção de cultivares resistentes, que é considerado ideal por reduzir as aplicações inseticidas, constituindo em uma tática efetiva, econômica e sustentável. Durante o período de obtenção de cultivares resistentes é de fundamental importância o estudo dos mecanismos e causas da resistência. É fato que, para mosca branca podem estar envolvidos dois mecanismos, sendo antixenose e antibiose. Na antixenose, o inseto possui menor preferência de alimentação ou oviposição nos acessos resistentes. Na antibiose as plantas hospedeiras ou respectivas substâncias possuem ação deletéria na biologia do inseto, alterando o desenvolvimento,

viabilidade, peso e fecundidade. O mecanismo de resistência pode ser desencadeado por inúmeras causas. Estas causas podem ser morfológicas, químicas e/ou físicas. Dificilmente um único fator é responsável pela resistência de uma planta a insetos pragas.

As características morfológicas consistem em barreiras mecânicas que influenciam na atração e repelência dos insetos. Várias características morfológicas têm sido relacionadas com a incidência de insetos, entre as quais se incluem os tricomas presentes na superfície abaxial e adaxial das folhas, os quais podem interferir na oviposição, fixação e alimentação.

Os metabólitos secundários podem ser armazenados dentro das células, glândulas epidérmicas ou em tricomas das plantas, além de serem excretadas pelos tricomas. Entre os metabólitos pesquisados encontra-se o zingibereno, um sesquiterpeno presente em folíolos de *Lycopersicon hirsutum* var. *hirsutum*. Sua presença foi detectada nos acessos de *L. hirsutum* var. *hirsutum* PI-126445 e PI-127826. Segundo Carter et al. (1989), o zingibereno ocorre exclusivamente no ápice de tricomas glandulares do tipo VI, o que foi confirmado por Gianfagna et al. (1992); porém, Maluf et al. (2001) e Freitas et al. (2002) associaram a presença desse aleloquímico também ao tricoma glandular do tipo IV.

Para mosca branca esta técnica poderia ser utilizada para reduzir sua população, utilizando-se estas plantas como repelentes ou para quebrar o ciclo biológico da praga. Esse tipo de ação poderia ser utilizado para auxílio nos vazios sanitários. Abaixo é representado um quaro com as principais espécies que possuem resistência à mosca branca (Tabela 1).

Nesse quadro 1, observa-se que os materiais BR-82 12547 e PI 229358 possuíam baixa quantidade de tricomas, e os outros materiais testados muitos tricomas. Isso pode ser um fato interessante visto que, quanto maior o número de tricomas maior será a suscetibilidade

da cultura a esta praga. Boa parte dos trabalhos realizados com mosca branca tem tido efeitos sobre os adultos. De alguma forma, vem reduzindo a taxa de oviposição ou tendo alguma repelência. Isso se torna importante quando se usa estas plantas para reduzir a população de mosca branca, utilizando-as em faixas nos cultivos.

Além de espécies que apresentam relativa resistência à mosca branca, existem aqueles que são resistentes ao begomovírus ou geminivírus. Uma vez que uma única mosca branca pode causar virose, o segundo caso, passa a ser mais interessante, pois se a resistência é parcial, mas a planta pode ter o vírus, não resolve o problema. Mas se a planta tem resistência a não se contaminar com o vírus, isso sim, pode se tornar uma linha de pesquisa para que os esforços sejam concentrados.

Tabela 1. Cultura, material genético, mecanismos de resistência e fases alvo de mosca branca.

Cultura	Material genético	Mecanismo	Fases	Fonte
Soja	BR-82 12547	Antixenose	Adultos	Lima & Lara 2004
Soja	PI 229358	Antixenose	Adultos	Lima & Lara 2004
Tomate	PI-127826	Antixenose	Adultos	Baldin et al. 2005
Tomate	PI-134417	Antixenose	Adultos	Baldin et al. 2005
Tomate	PI-134418	Antixenose	Adultos Adultos	Baldin et al. 2005 Baldin et al. 2005
Tomate	LA-444-1	Antixenose -	Vírus	Matos et a. 2003
Tomate	BGHs166, 616, 850, 990, 2102 e 2125	Antixenose	Adultos	Fernandes et al. 2009
Tomate	LA 716	Antixenose	Adultos	Fancelli et al. 2005
Tomate	IAC 14-2	-	Vírus	Matos et a. 2003

CONTROLE CULTURAL

Nós consideramos nesse método de controle, qualquer atividade que envolva manejo da cultura para reduzir a densidade popu-

lacional de mosca branca, dificultar a alimentação, reduzir as chances do encontro da praga com a cultura, alterar o sincronismo da praga com os momentos mais suscetíveis da cultura, reduzir a infestação e epidemias de viroses ao longo das áreas destinadas a consumo *in natura* ou de outra forma.

Época de plantio: Só para título de comparação, quando vamos a uma feira de hortaliças para compra-las fresquinhas, sempre vamos mais pela manhã. Quando nos atrasamos, e chegamos tarde à feira, compramos as piores, com má qualidade e ainda corremos o risco de não encontrar. A mosca branca deve chegar na cultura no momento em que o alimento não for favorável a ela. Exemplo é quando se escalona o plantio, e você passa a ter na mesma área talhões mais velhos que são fontes de moscas brancas e talhões novos que são receptores, pois os mais novos são as hortaliças frescas, e os mais velhos as hortaliças velhas, murchas e com sintomas de apodrecidas. A mosca branca, como excelente dispersora migra dos cultivos mais velhos para os mais novos. Considerando essa alta taxa de dispersão deve-se evitar com que as lavouras mais velhas e os vizinhos plantem no início dos ventos dominantes. Exemplo, se os ventos dominantes da sua região são Leste-Oeste, inicie o plantio do Oeste-Leste. Abaixo na figura 3 um esquema mostrando a forma ideal de plantio.

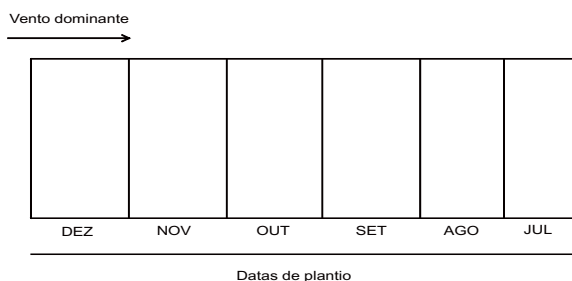


Figura 3. Esquema genérico de escalonamento de plantio, considerando a direção predominante dos ventos

Restos culturais: Todas as vezes que se colhe, fica na área restos de cultura. Quando ficam sementes, estas germinam e dão origem a uma nova planta, que é conhecida como "tiguera". Isso ocorre com frequência em soja, algodão. Por outro lado, em hortaliças, é comum após a colheita abandonarem os cultivos. Isso se torna um "prato cheio" para o domínio da mosca branca, pois a mesma completa inúmeros ciclos de vida e as populações aumentam a taxas incalculáveis, servindo como fontes para áreas recém implantadas. Dessa forma é aconselhável que se destrua os restos culturais, seja com herbicidas, grades, queimando ou enterrando. Com essa ação, diminui-se as taxas migratórias dos adultos dessa praga da lavoura mais velha para a mais a mais jovem.

Plantas hospedeiras: A mosca branca apresenta um amplo número de espécies hospedeiras, este fato, está relacionado exclusivamente à quantidade de espécies de plantas que o inseto pode se alimentar. Estudos têm demonstrado que esta espécie pode se alimentar de mais de 500 plantas de diferentes famílias. Esta praga seleciona estas plantas para hospedar-se, como forma de abrigo, alimentação e reprodução. Na primeira, o tempo que a

mesma permanece é temporário, mas faz algumas picadas de prova e se alimenta com dificuldade, por outro lado, é um ponto de encontro para acasalamento e manter a sua população. O conhecimento e a identificação de tais espécies hospedeiras são relevantes no processo de manejo da praga, uma vez que esta lesiona espécies de notável interesse econômico. A mosca-branca aloja-se em inúmeras culturas, podendo estas ser perenes, anuais, hortaliças e ornamentais.

O Comitê Brasileiro de Ação à Resistência de Inseticidas (IRAC) listou como as principais hospedeiras de mosca branca as plantas de abóbora (*Cucurbita moschata*), abobrinha (*Cucurbita pepo*), alface (*Lactuca sativa*), batata (*Solanum tuberosum*), berinjela (*S. melongena*), brócolis (*Brassica oleracea* variedade itálica), chicória (*Cichorium endivia*), couve (*B. oleracea* variedade acephala), couve-flor (*B. oleracea* variedade botrytis), ervilha (*Pisum sativum* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), jiló (*S. gilo*), melancia (*Citrullus lunatus* Schrad.), melão (*Cucumis melo* L.), pepino (*C. sativus*), pimentão (*Capsicum annuum*), repolho (*B. oleracea* variedade capitata) e tomate (*S. lycopersicum*).

O mesmo mencionou os cultivos de poinsettia, rosa, crisântemo e gérbera como plantas ornamentais que hospedam a praga. O Comitê ainda apontou a uva como cultura perene que aloja o inseto e relatou, para cultivos anuais, o algodão e o feijão. Uma pesquisa feita pela Embrapa na segunda metade da primeira década de 2000 reporta, também, a soja como hospedeiras, além dos demais cultivos citados pelo Comitê.

Em 2001, uma publicação científica listou várias famílias de plantas hospedeiras de espécies sinónimas de mosca-branca em diversos países. No Brasil citaram-se culturas da família Solanaceae e Euphorbiaceae. Para outras espécies sinónimas da praga, a pesquisa relatou que as famílias Myrtaceae, Lamiaceae, Caprifoliaceae, Crussiferaceae Asteraceae, Malvaceae

e Amaranthaceae apresentavam plantas hospedeiras de *B. tabaci*.

Adicional às famílias supracitadas, outro trabalho científico fez alusão a Chenopodiaceae, Commelinaceae e Fabaceae englobando plantas hospedeiras da praga. Nas famílias nomeadas em ambos os trabalhos, parte das espécies constituintes são plantas daninhas em cultivo. O grande potencial hospedeiro da mosca-branca possibilitou, assim, que a praga explorasse também as plantas daninhas.

Outra pesquisa realizada pela Embrapa em 2003, aponta que o inseto colonizou *Euphorbia heterophylla* L., *Chenopodium ambrosioides* L., *Senna obtusifolia* L., *Sida urens* L., *Solanum americanum* Mill., *Lepidium virginicum* L., *Gomphrena celosioides* Mart., *Richardia scabra* L., *Physalis angulata* L., *Acanthospermum hispidum* DC., *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze, *Leonotis nepetaefolia* (L.) R. Br., *Galinsoga cilata* (Raf.) Blake, *Stacytarphetta cayenensis* (L.C.Rich) Vahl, *Datura stramonium* L. e *Crotalaria incana* L.

Tais implicações demonstram a necessidade de manejo adequado de plantas daninhas na safra e entressafra das culturas, visto que a mosca-branca tem como hospedeiras plantas infestantes. Da mesma forma é necessário deixar na área plantas daninhas que tenham ação repelente a este inseto, dentre as plantas com repelência tem-se *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* e *Echinochloa crus-galli* que não apresentaram desenvolvimento de adultos durante 28 dias em um experimento que avaliou suscetibilidade de hospedeiras de dois biótipos de *B. tabaci* em algumas plantas daninhas. Outras espécies de plantas são apresentadas no estudo realizado por Villas Bôas et al. (2003) (Tabela 2).

Tabela 2. Relação das espécies de planta daninhas que se apresentam como melhores hospedeiras de mosca branca, em testes de livre escolha. Foram atribuídas notas relativas à infestação das plantas pela mosca-branca, sendo avaliadas a infestação de ninfas e adultos (4 = alta infestação; 3 = média infestação; 2 = baixa infestação e 1 = sem infestação). Embrapa Hortaliças. Brasília, 2003.

Nome Comum	Nome científico	Nota de Infestação	
		Ninfas	Adultos
Amendoim-bravo	<i>Euphorbia heterophylla</i>	4,0	4,0
Erva-de-Santa-Maria	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	4,0	4,0
Fedegoso	<i>Senna obtusifolia</i>	4,0	4,0
Guanxuma-rasteira	<i>Sida urens</i>	4,0	4,0
Maria-pretinha	<i>Solanum americanum</i>	4,0	4,0
Mentruz	<i>Lepidium virginicum</i>	4,0	4,0
Perpétua-brava	<i>Gomphrena celosioides</i>	4,0	4,0
Poaia-do-cerrado	<i>Richardia scabra</i>	4,0	4,0
Bucho-de-rã	<i>Physalis angulata</i>	4,0	3,7
Carrapicho-de-carneiro	<i>Acanthospermum hispidum</i>	4,0	3,0
Carrapicho-rasteiro	<i>Acanthospermum australe</i>	4,0	3,0
Cordão-de-frade	<i>Leonotis nepetaefolia</i>	4,0	2,7
Fazendeiro-peludo	<i>Galinsoga ciliata</i>	4,0	3,7
Gervão-azul	<i>Stachytarphetta cayenensis</i>	4,0	3,7
Quinquilho	<i>Datura stramonium</i>	4,0	3,0
Xique-xique	<i>Crotalaria incana</i>	4,0	3,0

Fonte: Adaptado de Villas Bôas et al. 2003

Uma das plantas hospedeiras em destaque é a serralha *Sochus oleraceus* que tem sido utilizada até como modelo de criação dessa praga em casa de vegetação para estudos. De fato, que esta planta tem sido encontrada com frequência em cultivos agrícolas. Nesta

planta as infestações são tão severas, que pode causar morte das folhas e da planta (Figura 4).



Figura 4. Planta de Serralha *Sochus oleraceus* atacada por mosca branca *Bemisia tabaci*. A seta preta mostra morte das folhas causada por mosca branca. Fonte: Miranda, 2015.

Fertilização: O agricultor sempre acredita que o uso de maior quantidade de fertilizante, pode aumentar a produtividade. O que não se sabe, é o quanto eu posso utilizar, de forma que a produtividade seja máxima e o custo não tão alto. Na verdade, hoje já existem softwares que calculam a quantidade correta de fertilizante a ser utilizado. As pragas, principalmente sugadoras são altamente dependente da qualidade da seiva. É fato que para a mosca branca isso não é diferente, pois a mesma succiona a seiva, e em condições de alta concentração de adubos nitrogenados, aumenta-se a concentração de aminoácidos, que são essenciais para o desenvolvimento da mosca branca. Em especial, a prolina, que é o aminoácido mais importante para insetos, pois o mesmo é requerido, nos processos metabólicos e motores dessa praga.

Material vegetal: Quando se fala em material vegetal, estamos considerando aqui sementes e mudas livre de vírus. De fato, que não é desejável a aquisição de sementes/mudas com vírus, pois as mesmas servirão de foco para toda a área. No entanto, é comum encontrar uma planta com vírus. Nesse sentido o melhor que se faz é eliminar a planta. Para isso, os produtores de mudas têm sido cada vez mais cautelosos, na hora de produzir mudas. Os mesmos têm utilizados em seus viveiros telas anti-afídeos. Essa ação reduz a entrada de adultos de mosca branca e mantêm a qualidade das mesmas. Sempre é bom também utilizar armadilhas adesivas para se monitorar os adultos. Sempre que se capturar, deve-se fazer uma revisão nas telas e aplicar um inseticida específico.

CONTROLE QUÍMICO

Quando aplicamos um inseticida para o controle de mosca branca objetivamos obter impacto sobre esta de forma que reduzam suas populações passando a não causarem prejuízos econômicos nas culturas. De fato, que o uso racional do inseticida, mantêm a molécula mais tempo no mercado, amplia o número de inseticidas no controle de uma praga e reduz problema de resistência. Esta última tem sido o principal entrave no controle dessa praga.

A resistência é definida como a população de uma praga que tolera doses de compostos tóxicos letais para a maioria da população suscetível daquela espécie. Resistência está relacionada à espécie e é uma característica hereditária, o processo desta se dá quando há pressão contínua de seleção por um mesmo composto tóxico (IRAC, 2015). Populações de *B. tabaci* de uma mesma região podem apresentar níveis de resistência diferentes, isso está relacionado às populações sofrerem pressões de seleção distintas. Abaixo na figura 5, um esquema de como a mosca branca se torna resistente a um determinado inseticida.

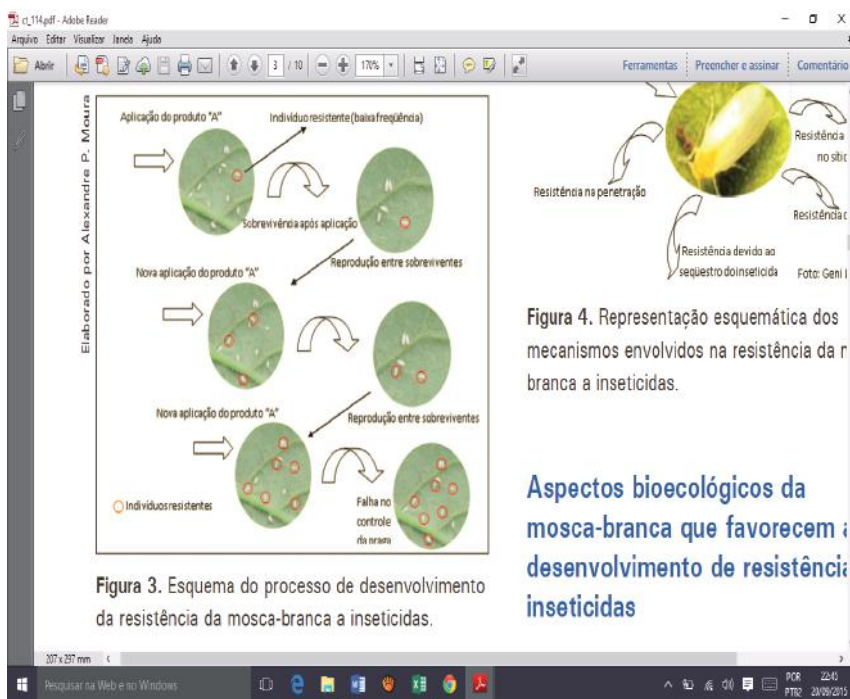


Figura 5. Esquema de como a mosca branca se torna resistente a um determinado inseticida (Fonte: Moura et al. 2013).

Em estudo feito pela Embrapa Hortaliças foi verificado altos níveis de resistência de *B. tabaci* a inseticidas neurotóxicos no Sudeste e Centro-oeste do Brasil, o resultado apresentado foi que várias cidades já apresentam resistência relativamente alta aos principais inseticidas utilizados para o controle da praga. Populações de mosca branca de Goiânia-GO, Taquara-DF e Jaíba-MG *B. tabaci* apresentaram resistência a Lambdaialotrina; Jaíba, Goiânia e Cristalina-GO apresentaram ao inseticida Imidaclopride, para Cartape foi encontrada maior resistência em Viçosa-MG, Jaíba e Brazilândia-DF. Algumas pesquisas destacam a resistência de mosca-branca a combinações de inseticidas como organofosforados e piretróides empregados juntamente no controle químico.

Para evitar resistência a inseticidas medidas preventivas podem ser tomadas para, é necessária implementação de Manejo de Resistência como parte do Manejo Integrado de Pragas (MIP), práticas como monitorar as populações de mosca-branca, adotar variedades resistentes ou as viroses por ela transmitidas, utilizar inseticidas somente quando a praga atingir o nível de controle, mas, sem atingir o nível de dano econômico e rotacionar diferentes classes e mecanismos de ação de inseticidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FORNAZIER, M.J.; PRATISSOLI, D.; MARTINS, D.S. 2010. Principais pragas da cultura do tomateiro estaqueado na região das montanhas do Espírito Santo. p.185-226. In INCAPER (ed.), Tomate. Vitória, INCAPER, 430p.

HAJI, F.N.P.; MATTOS, M.A. de A.; ALENCAR, J.A. de; BARBOSA, F.R.; MOREIRA, A.N. Aspectos biológicos, danos e estratégias de controle da mosca branca. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 2000. 32 p. (EMBRAPA-CPATSA. Circular Técnica, 55).

MOURA, A.P.; MICHEREFF FILHO, M.; GUIMARÃES, J.A. Manejo da resistência da mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) a agrotóxicos utilizados em hortaliças. Brasília: EMBRAPA-HORTALIÇAS, 2013. 10 p. (EMBRAPA-HORTALIÇAS. Circular Técnica, 144).

SOUZA, A.P.; VENDRAMIM, J.D. Efeito de extratos aquosos de meliáceas sobre *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiro. Bragantia, v.59, n.1, p.173-179, 2000.

VILAS BÔAS, G.L.; FRANÇA, F.H.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C. Avaliação da preferência de *Bemisia argentifolii* por diferentes espécies de plantas. Horticultura Brasileira. V.19, n.2, p.130-134, 2001.

Manejo integrado de pragas: aspectos teóricos e práticos

Ítalo Willian da Silva¹

Isabela Maria Reis Xavier Amorim Sanchez ²

Jéssica Emiliane Rodrigues Gorri³

Liliane Evangelista Visôto⁴

Camila Rocha da Silva⁵

INTRODUÇÃO

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) é um conjunto de medidas utilizadas para que o controle de pragas seja realizado de modo a aliar fatores que ocasionam a mortalidade natural, visando uma redução populacional de insetos abaixo do nível de dano

¹ Mestrando em Produção Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Agrárias, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba, MG. E-mail: italo.silva@ufv.br

² Graduada em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Agrárias, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba, MG. E-mail: isabela.sanchez@ufv.br

³ Graduada em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Agrárias, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba, MG. E-mail: jessica.rodrigues@ufv.br

⁴ Professora da Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba, MG. E-mail: lvisotto@ufv.br

⁵ Professora da Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Agrárias, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba, MG. E-mail: camila.rocha@ufv.br

econômico. O controle ideal é feito através do uso integrado das diversas técnicas de combate, que são selecionadas de acordo com o diagnóstico a ser realizado, buscando-se maneiras sustentáveis de alcançar o sucesso da prática. Além do mais, o MIP engloba um conjunto de técnicas vantajosas, como o controle químico e biológico, que se realizadas adequadamente, reduzem os custos das aplicações e as contaminações ambientais, agregando valor ao produto final e melhorando a saúde do consumidor.

De acordo com o MIP o momento correto para realizar o controle químico baseia-se nos níveis de dano econômico e de controle. O nível de dano econômico é determinado de acordo com a densidade de pragas, na qual o prejuízo causado pela praga é igual ao custo de seu controle. O nível de controle é a densidade populacional da praga no qual se deve entrar com o controle para evitar que esta alcance o nível de dano econômico (Stern et al., 1959). Para manter a população de pragas abaixo deste nível, é necessária a utilização simultânea de táticas de controle, economicamente viáveis e harmoniosas com o ambiente.

Muitas vezes os agricultores optam por não utilizar o MIP alegando a existência de várias exigências para o seu correto funcionamento. No entanto, o conjunto destas medidas resulta em benefícios líquidos importantes, como aumento dos lucros, redução do uso de pesticidas, não aparecimento ou ressurgência de pragas e diminuição da fitotoxicidade nas plantas. Como pode ser comprovado em 24 países da Ásia e da África, que ao longo dos últimos vinte anos, utilizaram o MIP adequadamente e foram capazes de obter reduções substanciais (30,7%) no uso de pesticidas, juntamente com maiores rendimentos (Pretty e Bharucha, 2015).

A cada dia novas estratégias e táticas vão sendo desenvolvidas estimulando o uso e conseqüentemente, aumentando o número de adeptos ao MIP.

ESTRATÉGIAS E TÁTICAS DE CONTROLE ASSOCIADOS AO MIP

O controle químico é o principal método de controle de pragas utilizado nas culturas. No entanto, problemas podem surgir com o excesso de aplicações de inseticidas como, contaminação do solo e da água, aumento de resíduos no produto final, impacto negativo a saúde dos organismos não alvos e benéficos como as abelhas. Além disso, o controle químico pode provocar problemas de ordem econômica, já que as pragas podem causar prejuízos que não são percebidos pelo produtor, como o controle de pragas que não atingiram o nível de dano econômico.

Tais problemas podem ser reduzidos ao se adotar o MIP, que é uma estratégia baseada nos ecossistemas e se concentra, a longo prazo, na prevenção do ataque de pragas ou nos seus danos. Neste sistema, os insetos são considerados pragas quando ocasionam danos econômicos, sendo eliminados somente após a observação dos fatores ambientais que afetam os mesmos e sua capacidade de prosperar, uma vez que o principal objetivo do método é a redução do uso de agroquímicos. Uma combinação de técnicas, como o controle biológico, manipulação do habitat, modificação de práticas culturais e utilização de variedades resistentes, podem ser utilizadas no MIP. Na aplicação de inseticidas somente é recomendada após o monitoramento, que indicará a necessidade de acordo com as diretrizes estabelecidas.

Algumas táticas de controle proporcionam maior efetividade em um programa de manejo integrado de pragas. Tais práticas são descritas a seguir:

Uso de variedades resistentes – a utilização de variedades resistentes auxilia o produtor no controle de pragas e patógenos

que comumente atacam suas culturas. O uso da resistência varietal é uma tática de controle importante dentro do manejo integrado e sempre que disponível deve ser utilizada. O importante na adoção desta tecnologia é obedecer às recomendações de uso, realizando o refúgio e adotando outras formas de controle que contribuam no manejo da resistência. Exemplo: Soja RR2 Pro, variedade de soja resistente a *Helicoverpa armigera*.

Rotação de culturas – a rotação de culturas consiste em alternar espécies vegetais numa mesma área agrícola com objetivo de interromper o ciclo de desenvolvimento das pragas. Ela deve ser realizada até a eliminação das fontes de sobrevivência dos insetos presentes nos restos culturais. As espécies escolhidas devem ter, ao mesmo tempo, propósito comercial e de recuperação do solo. Essa prática melhora as características físicas, químicas e biológicas do solo; contribui com o controle de plantas daninhas, doenças e pragas; repõe matéria orgânica e protege o solo da ação dos agentes climáticos; ajuda na viabilização do sistema de plantio direto e de seus efeitos benéficos sobre a produção agropecuária e sobre o ambiente como um todo. Exemplos: aveia preta - milho - soja (para produção de palha); aveia - soja - nabo forrageiro - milho (para elevada reciclagem de nutrientes K e N para o milho); rotação soja - soja - milho ou soja (2/3) e milho (1/3) (para controle de doenças e pragas na soja); nabo forrageiro - milho na primavera - soja (boa descompactação superficial do solo, alta produção de palha, reciclagem de potássio e controle de invasores e algumas pragas); soja - girassol safrinha - milho (bom para a produtividade do milho e estruturação do solo).

Eliminação de restos culturais e hospedeiros alternativos – essa prática objetiva eliminar restos culturais para que esses resíduos vegetais não sejam hospedeiros para as pragas. A eliminação de

restos culturais e plantas voluntárias são técnicas que aliadas à rotação de culturas visam à redução de hospedeiros alternativos durante a entressafra e como consequência, há redução do inóculo de doenças e a persistência de pragas no campo. Exemplos: eliminação do algodoeiro pós-colheita para controle do bicudo-do-algodoeiro, eliminação de frutos caídos de citrus para controle de mosca das frutas (*Drosophila melanogaster*).

Preparo do solo – o revolvimento da área de plantio permite que insetos-praga do solo sejam expostos aos raios solares e eliminados por dessecação. Além disso, essa prática possibilita a eliminação de pragas através da ação mecânica dos implementos. Exemplo: preparo do solo em cana-de-açúcar para reduzir ovos da **cigarrinha-da-raiz** (*Mahanarva fimbriolata*).

Adubação balanceada – a fertilidade do solo é um fator que influencia diretamente no desenvolvimento e na sanidade das culturas. Desequilíbrios nutricionais podem tornar as plantas mais susceptíveis e palatáveis aos insetos. Deve-se sempre manter uma nutrição equilibrada, sem excessos ou restrição de nutrientes, de forma a fornecer a cultura somente o que for necessário e de forma mais natural possível, utilizando técnicas como fixação biológica de nitrogênio e adubações orgânicas. Exemplo: a adubação fosfatada reduz o corte de plantas pelas formigas.

Alteração da época de plantio e/ou colheita – para algumas pragas, a antecipação ou atraso na época de plantio ou colheita causa uma diminuição considerável no ataque, isso porque o período de maior suscetibilidade da cultura não coincide com picos populacionais da praga, reduzindo os danos causados pela mesma. Exemplo: plantio no início da época chuvosa reduz os danos de cupins e formigas em eucalipto.

Poda ou desbaste – cortar os ramos de plantas perenes atacados por pragas interrompe o ciclo de desenvolvimento do inseto. Exemplo: poda em frutíferas para controle de coleobrocas, poda de galhos mais baixos de eucalipto e incorporação dos restos com grade ou rolo-faca para controlar lagartas desfolhadoras, poda e queima de galhos atacados por serradores.

Irrigação – a irrigação por aspersão controla principalmente insetos diminutos e de tegumento mole como pulgões e tripes; já que estes podem ser “lavados” pela água. Exemplo: Uso de irrigação via pivô central ou por aspersão convencional para controle mecânico de pulgões, tripes, lagartas pequenas e mosca-branca em tomate industrial.

Cultura isca – o plantio de variedades susceptíveis próximas às áreas de cultivo tem o objetivo de atrair pragas para estas áreas e posteriormente, realizar o controle nestes locais, evitando ou diminuindo a chance desta praga alcançar a lavoura. Exemplo: plantio de curcubitáceas próximas as culturas hospedeiras de *Diabrotica speciosa*.

Catação manual – a catação de ovos e lagartas encontrados nas plantas cultivadas é recomendada para evitar que estas se desenvolvam e venham causar perdas na produção. Esta técnica é mais usual em pequenas áreas. Exemplo: coleta de besouros *Costalimaita ferruginea vulgata* em viveiros e jardim clonais, catação manual de lagarta-rosca em viveiros e *Lampetis* spp. em áreas de implantação de *Eucalyptus* spp., escavação de formigueiros recém formados, para matar a rainha.

Barreiras físicas – as barreiras podem ser de origem vegetal ou artificial e servem para impedir que a praga alcance uma determinada cultura e cause danos. Exemplo: uso de casa-de-vegetação para

produção de mudas; uso de sombrite em viveiros, uso de cones invertidos no tronco das árvores, uso de tinta e embalagens.

Armadilhas – as armadilhas são utilizadas para realizar o monitoramento do crescimento populacional da praga, e deste modo, auxiliar na tomada de decisão do seu controle. Elas podem ser adesivas, luminosas, do tipo *pitfall*, *McPhail* e com feromônios. Exemplo: armadilhas confeccionadas com garrafas pet, de coloração vermelha, contendo compostos voláteis para atrair e capturar a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*).

Utilização de feromônios – esta técnica consiste em causar o confundimento do inseto através da saturação do ambiente com feromônios sintéticos. Isto impede que o macho e a fêmea se acasalem, além disso, permite realizar o monitoramento da densidade populacional das pragas e assim determinar o momento de controle. Exemplo: Septos de borracha usados para monitoramento de *Helicoverpa armigera* em soja.

Esterilidade – a liberação de insetos estéreis tem a finalidade de causar a diminuição dos acasalamentos férteis, deste modo ocorre a redução da sua população a cada nova geração.

Controle biológico - consiste no uso de organismos que previnem, reduzem ou erradicam a infestação de pragas e doenças nas plantações. O uso dos agentes naturais objetiva reduzir a população da praga, que passa a ser mantida em um nível que não cause danos econômicos à cultura (abaixo do nível de controle). Os agentes biológicos de controle mais utilizados são vírus, bactérias e fungos entomopatogênicos e nematoides benéficos, que atuam nocivamente na biologia das pragas. Existem ainda, insetos que são considerados parasitoides, os quais utilizam outros insetos como hospedeiro para completar seu ciclo de vida. Já os predadores fazem

outros insetos de presa. Todos constituem uma estratégia eficaz e possível de ser incluída nos programas de controle de pragas, em diversas culturas. Estes produtos possuem vantagens em relação a defensivos químicos, tais como baixa toxicidade, segurança de manuseio, baixo impacto ambiental e baixa pressão de seleção de populações resistentes. Exemplos: bactéria *Bacillus thuringiensis* para controle de lagartas, nematoide *Beddingia siricidicola* para controlar a vespa-da-madeira, parasitoide *Cotesia flavipes* para controle da broca-da-cana, percevejo *Podisus nigrispinus* para controle de lagartas.

Controle químico – no manejo integrado de pragas deve-se utilizar, de maneira harmoniosa, todas as técnicas de controle disponíveis. A aplicação de defensivos químicos é recomendada somente quando o nível de controle for alcançado, com base no monitoramento de pragas. Quando o controle químico for necessário é importante ainda, que sua utilização seja focada nos produtos seletivos para os inimigos naturais.

Existem inúmeras táticas de controle que podem ser utilizadas para redução do crescimento populacional de insetos-praga em diferentes culturas. No entanto, tais procedimentos devem ser selecionados considerando casos específicos, cultura, praga e outros fatores ambientais.

INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS NO MIP

O clima tropical brasileiro é propício para surgimento de novas pragas, ressurgência e aumento das populações devido à resistência ou surtos populacionais. Este fato, aliado com aumento dos gastos com pesticidas, fez com que pesquisas fossem desenvolvidas a

fim de incrementar os programas de manejo integrado de pragas. Os resultados desses estudos já podem ser vistos no mercado brasileiro na forma de novas estratégias, que se consolidam de modo econômico, prático e sustentável.

Uso de drones para monitoramento de pragas

O mais novo equipamento utilizado no monitoramento de pragas é denominado drone. Este é semelhante a uma pequena aeronave que, sem qualquer contato físico direto, é capaz de executar tarefas como monitoramento e mapeamento de áreas. Os drones são controlados a distância através de meios eletrônicos e computacionais, sendo supervisionados pelo homem ou controladores lógicos programáveis.

Atualmente, no Brasil pode-se encontrar drones gerando imagens importantes para a agricultura de precisão. O monitoramento dos cultivos a partir de imagens possibilita a aquisição de dados da área das lavouras durante todo o ciclo produtivo. Tais informações são úteis para o manejo e monitoramento de safras, bem como para a gestão e logística da produção. Segundo Silva Neto (2013), as imagens capturadas por drones, aliadas a uma boa técnica de geoprocessamento geram resultados satisfatórios, acarretando melhor distribuição da área e acompanhamento do plantio.

Honkavaara et al. (2013) afirmaram que a utilização de drones possibilita a coleta de dados eficientes, em termos de custo, espaço desejado e resoluções temporais. Para os autores, uma importante vantagem dessa tecnologia refere-se ao fato que, os dados de sensoriamento remoto podem ser obtidos ainda que sob condições de imagem pobres, ou seja, sob a cobertura de nuvens, fato que torna o método operacional em uma ampla gama de aplicações de medição ambiental. Os drones na agricultura podem ser utilizados em outras situações como, por exemplo, para detecção e controle de invasores na plantação de milho. Estudantes da Universidade de

Queensland na Austrália utilizaram drones para espalhar um ácaro predador (*Neoseiulus californicus*) no controle de duas espécies de Ácaro Rajado nas plantações de milho. Os trabalhos foram conduzidos por Michael Godfrey (Figura 1). Esta espécie de ácaro predador teve seu potencial como agente efetivo no manejo dessa praga comprovado em diversos países, inclusive no Brasil. Ele se alimenta dos ovos, larvas, ninfas e adultos do ácaro rajado, multiplicando-se rapidamente em campo, quando utilizado corretamente, sem causar dano à cultura e ao meio ambiente.



Figura 1. Drone utilizado para liberação de ácaros (A). Ácaros *Neoseiulus californicus* liberados em plantações de milho na Austrália (B).

Fonte: Universidade de Queensland (2015). Fonte: <https://www.uq.edu.au/news/article/2015/04/drone-used-drop-beneficial-bugs-corn-crop>

Comunicação entre os insetos: inovação no controle de pragas

Atualmente, o método existente para monitoramento e identificação da presença de percevejos nas plantações de soja é a do pano de batida, que além de exigir mão-de-obra qualificada, demanda tempo dos técnicos envolvidos no monitoramento e, por isso, não é de interesse dos produtores, especialmente em plantios

extensivos. Na prática, o controle desses insetos é realizado por meio de calendários de aplicações baseados na fenologia das plantas, com intervenções pouco criteriosas e que não levam em conta a dinâmica dos percevejos no campo.

Em 2014 foi desenvolvida pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos e pela Fundação MT uma tecnologia inovadora para controle de percevejos. Trata-se da utilização de feromônios sintéticos, em armadilhas, para monitorar e controlar populações desses insetos nas lavouras de soja. É uma tecnologia sustentável já que visa reduzir o uso de produtos químicos sem perder o foco no aumento da produtividade agrícola.

As pastilhas ou septos, que simulam a liberação de feromônios, são colocados no interior de armadilhas, confeccionadas com garrafas do tipo pet, que podem permanecer no campo por até 30 dias consecutivos (Figura 2). O objetivo é causar o confundimento dos insetos e interromper a sua reprodução. O inseto ao entrar na armadilha não consegue sair e com isso há redução da sua população. Tais armadilhas facilitam o monitoramento dos percevejos nas lavouras de soja, já que a captura é específica à praga-alvo, exigindo somente que o produtor averigue o número de insetos capturados. As armadilhas devem ser alocadas em diferentes locais na área cultivada e as inspeções destas devem ser semanais. Assim, quando o número de insetos atingir um nível pré-estabelecido, a aplicação de inseticida será recomendada. Com tal estratégia, aumenta-se a efetividade do controle, diminui o número de aplicações e como consequência reduz custos e contaminações do meio ambiente, tornando a produção de soja mais sustentável. Estudos estão sendo realizados para se detectar o número exato para se constatar a infestação.

O uso de feromônios é mais preciso e elimina a perda de grãos que se tem com o pano de batida. No entanto, essa prática

não deve ser considerada exclusiva, já que em áreas colonizadas pelo inseto é necessário realizar o monitoramento com o pano de batida para detecção das ninfas, uma vez que somente os adultos são atraídos pelo feromônio.



Figura 2. Armadilha para captura de percevejos na cultura da soja.
A seta indica a pastilha de feromônio.

Fonte: http://www.clubeamigosdocampo.com.br/app_uploads/public/galeria/2014/11/f1.jpg

Tecnologia móvel no controle das pragas

Em 2014 foi lançado um equipamento constituído por um sistema que combina o uso de mapas, mobilidade e dados. Essa inovação tem como objetivo auxiliar o produtor a tomar decisões rápidas para proteger a sua área de plantio, reduzindo os custos de produção através da utilização mais racional de defensivos.

O processo é feito através da inspeção de pragas por um técnico munido de um coletor de dados móvel, o qual mapeia seu trajeto na lavoura a partir de um GPS (Figura 3). Este equipamento aponta focos de ocorrência de pragas no campo. Os dados são apresentados em tempo real para o produtor por meio de interface *on-line*, mapas de calor, gráficos e fotos. Estas informações permitem que ele visualize a situação dos talhões e a identifique em quais são necessários aplicar os defensivos.

Segundo os idealizadores, a comunicação automatizada agiliza a tomada de decisões feitas pelo agricultor no combate às ocorrências de pragas, que podem ser detectadas em estágio inicial, quando ainda não afetam a produção. Além disso, reduz custos com defensivos, já que a identificação geolocalizada de áreas afetadas permite ao produtor concentrar sua aplicação em áreas específicas. O produtor ainda tem a possibilidade de medir a eficácia dos agroquímicos aplicados à lavoura.



Figura 3. Verificação da ocorrência de pragas em campo através um coletor móvel de dados.

Fonte: http://www.agrolink.com.br/culturas/milho/noticia/strider-lanca-tecnologia-movel-de-combate-a-pragas-e-reduz-pernas-na-producao-rural_206285.html

Armadilha inteligente

Pesquisadores do Laboratório de Inteligência Computacional da Universidade de São Paulo/ *Campus* São Carlos desenvolveram, em parceria com pesquisadores da Universidade da Califórnia e da filial norte-americana da empresa brasileira Isca Tecnologias, um sensor a laser capaz de identificar e quantificar automaticamente diferentes espécies de insetos voadores causadores de doenças ou pragas agrícolas. Os insetos são identificados pela frequência da batida das suas asas, através de um feixe de luz (Figura 4).

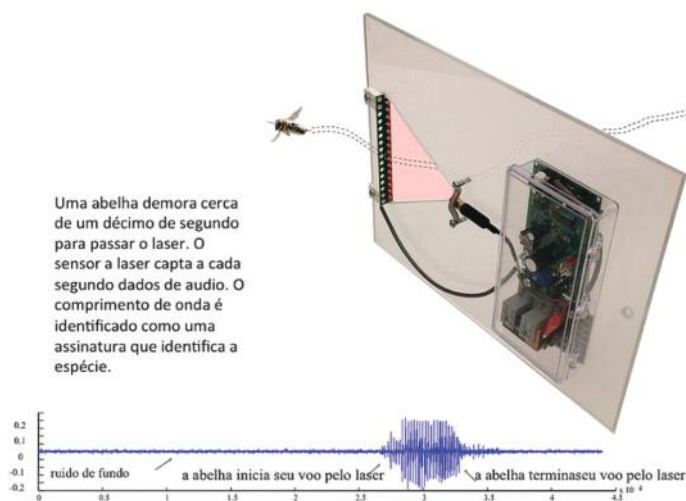


Figura 4. Sistema Wireless Bug Sensor capaz de identificar o inseto.

Fonte: <http://www.isca.com.br/pt/noticias/61d89c6b-13ee-41ae-8156-7a2a86b5c8ee/inovacao-armadilhas-inteligentes>

Esse sensor foi utilizado em um protótipo de armadilha inteligente desenvolvida pelos mesmos pesquisadores. O dispositivo identificou insetos voadores em tempo real, por meio do sensor laser, capturou espécies-alvos, como as transmissoras de doenças

e pragas agrícolas, e permitiu que outros insetos não nocivos, como abelhas e outros polinizadores fossem lançados de volta para o meio ambiente (Chen et al., 2014).

A armadilha foi construída com um tubo com o sensor a laser acoplado em sua entrada e um saco coletor em sua saída (Figura 5). O equipamento possui uma válvula na entrada que libera substâncias que atraem as fêmeas de algumas espécies. Ao voar diante da entrada da armadilha, o inseto é sugado por um fluxo de ar gerado por uma ventoinha, como a de um computador, em direção a uma câmara onde está o sensor a laser. Quando identificado como espécie não nociva, uma porta de saída é aberta e o inseto é empurrado para fora da armadilha por meio da inversão da direção do fluxo de ar. No entanto, se for identificado como espécie nociva, o inseto é empurrado pelo fluxo de ar para o saco coletor, onde fica retido em um papel adesivo semelhante ao utilizado nas armadilhas adesivas convencionais que não são seletivas.

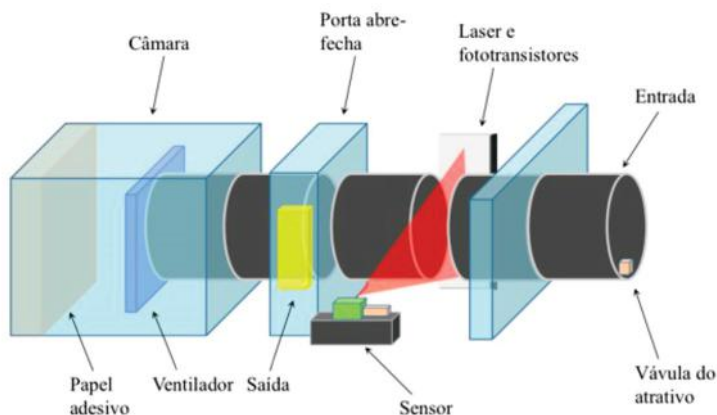


Figura 5. Protótipo de armadilha inteligente utilizando o sensor a laser.

Fonte: http://agencia.fapesp.br/sensor_identifica_insetos_pela_frequencia_do_batimento_das_asas/19377/

Esta armadilha permite identificar e quantificar com maior facilidade e precisão a presença de insetos indesejáveis em uma determinada área. Possibilitando o monitoramento em tempo real da população de insetos praga em uma determinada região e reportar esses dados por meio de redes sem fio para uma central de controle. Além dessas vantagens, os pesquisadores estimam que o sensor tem potencial para ser amplamente utilizado em razão do baixo custo de produção, menos de R\$ 30,00 e por ser alimentado por energia solar ou bateria. Porém, pesquisas adicionais estão sendo realizadas para o desenvolvimento deste produto comercial para fins de controle de pragas no campo.

OUTROS ASPECTOS: ALERTA PARA O USO INCORRETO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS

Agroquímicos são amplamente utilizados no controle de pragas e, quando utilizados de forma inadequada, podem gerar populações resistentes, surgimento de novas pragas ou ressurgências de outras, redução de inimigos naturais e o desenvolvimento de fitotoxicidade.

Ressurgência de pragas

De acordo com pesquisadores da Embrapa, os maiores inimigos dos produtores de soja na safra de 2015/16 serão a lagarta falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*) e a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). A elevação da população da falsa-medideira está relacionada com o uso abusivo de agroquímicos para o controle da ferrugem asiática. Depois da ocorrência do fungo no Brasil, a média de aplicações para seu controle subiu de um para três por safra, sendo que o primeiro registro de surto das lagartas foi registrado na soja entre um a dois anos após a entrada de ferrugem no país. A relação entre fungo e lagarta está no desequilíbrio do ecossistema

de ambos, no qual os fungicidas usados de forma descontrolada para a ferrugem, também atingem fungos entomopatogênicos que atuam no controle da lagarta.

Redução de inimigos naturais

A ação dos inimigos naturais muitas vezes é capaz de manter a população de pragas em densidades inferiores ao nível de dano econômico. Entretanto, o uso inadequado dos inseticidas pode acarretar queda das populações destes. Assim, destaca-se a importância da etapa de diagnose do Manejo Integrado de Pragas, no qual também ocorre a identificação das populações dos insetos benéficos, determinando um possível nível de não ação, no qual a densidade de inimigos naturais existentes pode cessar ou reduzir o uso do controle químico.

O bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) é praga-chave nos cafeeiros, acarretando grandes prejuízos pela redução de área fotossintética com a formação de suas minas. O principal controle se dá por meio de pulverizações com os inseticidas clorpirifós, deltametrina, dimetoato, monocrotofós e permetrina. Gusmão et al. (2000) avaliaram o efeito desses inseticidas sob o principal inimigo natural do bicho-mineiro, as vespas parasitoides da família Braconidae (Hymenoptera). Os resultados desse trabalho mostraram que todos apresentaram alta toxicidade às vespas, na sub-dose e na dose recomendada.

Na fase inicial da cultura do algodoeiro os inseticidas sistêmicos vêm sendo amplamente empregados, para a proteção das plantas contra o ataque de insetos sugadores e lagartas. Tais inseticidas como os pertencentes ao grupo dos neonicotinoides reduzem a população do percevejo predador *Podisus nigrispinus*. Dentro dos neonicotinoides, lambdacialotrina, monocrotofós, metiocarbe e o tiametoxam mostraram-se altamente tóxicos ao predador (Torres et al., 2002).

Fitotoxicidade

A fitotoxicidade é definida como o efeito nocivo que pode ser desencadeado por qualquer concentração dos agroquímicos. Porém, com o elevado número de pulverizações realizadas nos controles convencionais aumentam-se as ocorrências deste efeito, gerando prejuízos e queda na produtividade.

Resultados do trabalho realizado com várias concentrações do inseticida piriproxifeno no tratamento de sementes, para controle de dípteros no milho, mostraram que a maior concentração usada levou a uma diminuição notável em todos os parâmetros de crescimento testados das plântulas. Verificou-se que o crescimento do milho foi significativamente inibido pelo aumento da concentração, prejudicando a germinação de sementes, crescimento das plântulas, redução do índice estomático em ambas as superfícies adaxial e abaxial de folhas e decréscimo de conteúdos de pigmentos fotossintéticos em comparação com o grupo controle. Este trabalho sugere que a utilização excessiva e descontrolada de pesticidas resulta em efeitos fitotóxicos afetando processos morfológicos, anatômicos, fisiológicos e metabólicos da planta (Coskun et al., 2015).

Incluir o Manejo Integrado de Pragas na realidade do produtor é a alternativa para minimizar os aspectos negativos gerados, não só pelo uso abusivo e incorreto dos agroquímicos, mas também pela mudança climática. Em associação com o MIP, introduzir variedades transgênicas no planejamento dos produtores e investir no avanço de pesquisas com inseticidas botânicos poderão reduzir consideravelmente o número de aplicações, fitotoxidez, a sobrevivência dos inimigos naturais e o custo de produção por hectare.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cada dia faz-se necessário a compreensão do MIP e a sua inserção em termos práticos. Novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas, aliando a teoria e a prática para diminuir o uso de produtos químicos, no qual trará economia para o produtor, menor contaminação dos alimentos e do meio ambiente.

A teoria sobre o conceito de todas as etapas e aplicações são necessárias para a prática do sistema, é nela que há a compreensão, por meio de vários estudos, que o MIP deve ser adotado. As ações de um manejo com estratégias integradas deve ser a realidade não só de fazendas modelos ou de grandes produtores. O momento atual pede que desde a agricultura familiar até o grande latifundiário realize este manejo consciente, no qual sua execução volte como melhorias, não só para o produtor, mas para a população e o agroecossistema.

Estudos definem que o objetivo dessa estratégia não é o de eliminar as pragas, mas reduzir sua população de modo a permitir que seus inimigos naturais permaneçam na lavoura, agindo sobre suas presas, favorecendo a volta do equilíbrio natural desfeito pela plantação e pelo uso incorreto de defensivos agrícolas. Dessa forma, o entendimento do sistema de cultivo como um todo e o conhecimento das inter-relações ecológicas entre os insetos agressores, seus inimigos naturais e o ambiente é necessário.

A comunidade científica aposta que para atingir o maior número de praticantes do MIP é necessário a divulgação e capacitação de suas etapas. Ao ser realidade no cenário do produtor, este manejo trará mudança de comportamento nos agentes produtivos, redução no uso de inseticidas, preservação e identificação dos inimigos naturais e retomada no uso do controle biológico de pragas, que é o idealizado para uma produção de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEN, Y.; WHY, A.; BATISTA, G.; MAFRA-NETO, A.; KEOGH, E. Flying insect classification with inexpensive sensors. *Journal of Insect Behavior*, v.27, p.657-677, 2014.

COSKUN, Y.; KILIC, S.; DURAN, R. The effects of the insecticide pyriproxyfen on germination, development and growth responses of maize seedlings. *Fresenius Environmental Bulletin*, v.24, p.278-284, 2015.

GUSMÃO, M.R.; PICANÇO, M.; GONRING, A.H.R.; MOURA, M.F. Seletividade fisiológica de inseticidas a vespidae predadores do bicho-mineiro-do-cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.4, p.681-686, 2000.

HONKAVAARA, E.; SAARI, H.; KAIVOSOJA, J.; PÖLÖNEN, I.; HAKALA, T.; LITKEY, P.; MÄKYNEN, J.; PESONEN, L. Processing and Assessment of Spectrometric, Stereoscopic Imagery Collected Using a Lightweight UAV Spectral Camera for Precision Agriculture. *Remote Sensing*, v.5, p.5006-5039, 2013.

ISCA. INOVAÇÃO - Armadilhas Inteligentes. Disponível em: <<http://www.isca.com.br/pt/noticias/61d89c6b-13ee-41ae-8156-7a2a86b5c8ee/inovacao-armadilhas-inteligentes>>. Acesso em: 25 ago. 2015.

PRETTY, J.; BHARUCHA, Z.P. Integrated pest management for sustainable intensification of agriculture in Asia and Africa. *Insects*, v.6, n.1, p.152-182, 2015.

REVISTA GLOBO RURAL. Fundação MT testa nova armadilha para monitoramento do percevejo marrom. Disponível em: < <http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/noticia/2014/11/fundacao-mt-testa-nova-armadilha-para-monitoramento-do-percevejo-marrom.html>>. Acesso em: 03 set. 2015.

SILVA NETO, M. Como utilizar imagens aéreas na agricultura de precisão? Disponível em: <http://www.agrimensordofuturo.com/post.cfm?post=como%20utilizar%20imagens%20a%C3%89reas%20na%20agricultura%20de%20precis%C3%83o%3f&id=42>>. Acesso em: 16 ago. 2015.

STERN, V.M.; SMITH, R.F.; VAN DEN BOSH, R.; HAGEN, K.S. The integrated control concept. *Hilgardia*, v.29, n.2, p.81-101, 1959.

THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND. Drone used drop beneficial bugs com crop. Disponível em: <<https://www.uq.edu.au/news/article/2015/04/drone-used-drop-beneficial-bugs-corn-crop>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

TORRES, J.B.; SILVA-TORRES, C.S.A.; SILVA, M.R.; FERREIRA, J.F. Compatibilidade de inseticidas e acaricidas com o percevejo predador *Podisus Nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) em algodoeiro. *Neotropical Entomology*, v.31, p. 311-317, 2002.

Avanços da pesquisa para o manejo eficiente de nutrientes em hortaliças

Leonardo Angelo de Aquino¹

Junia Maria Clemente²

Luiz Otávio Duarte Silva³

Luiz Paulo Dornelas dos Santos³

Thaísa Fernanda Oliveira³

Os cultivos de hortaliças se caracterizam pelo intenso uso de insumos, do solo, de cultivares modernas e elevadas produtividades. O elevado valor de comercialização da maioria das espécies olerícolas determina em muitos casos, elevadas doses de fertilizantes, pois a relação entre o valor de venda de produtos e o da compra de fertilizantes é favorável ao uso de maiores doses desses.

Oficialmente as recomendações de nutrientes em hortaliças são realizadas com base nas tabelas de adubação (Raij et al., 1997; CFSEMG, 1999). Essas tabelas consideram as classes de fertilidade

¹ Engenheiro Agrônomo, M. Sc., D. Sc. em Fitotecnia e Professor da Universidade Federal de Viçosa, UFV - *Campus* Rio Paranaíba. E-mail: leonardo.aquino@ufv.br

² Engenheira Agrônoma, M. Sc., D. Sc em Fitotecnia e Pós-Doutora em Agronomia - Produção Vegetal da UFV - *Campus* Rio Paranaíba. E-mail: junia.clemente@gmail.com

³ Engenheiro Agrônomo, Mestrando em Agronomia - Produção Vegetal. UFV – *Campus* Rio Paranaíba. E-mail: luiz.duarte@ufv.br; luizsantos.ufv@gmail.com; thaisafernanda135@gmail.com

do solo e há indicação de doses condizente com tais classes. As tabelas de adubação oficiais possuem algumas limitações: não consideram que as classes de fertilidade são variáveis não só com os teores no solo, mas também com fatores como o ciclo da cultura e produtividade almejada; não consideram variações de época, local e cultivares na demanda de nutrientes; e, não tem variação contínua de doses com variáveis do solo (fertilidade, profundidade, quantidade de resíduos culturais, etc) e nem com a produtividade (que influi na demanda de nutrientes).

O cenário de recomendações oficiais defasadas, associado ao elevado potencial produtivo das cultivares modernas e à elevada relação de valor de venda dos produtos hortícolas em relação ao valor de compra dos fertilizantes, leva o olericultor a aplicar doses de nutrientes muito maiores que as recomendadas nas tabelas oficiais. No entanto, tal situação não implica em condições adequadas à obtenção do potencial produtivo das cultivares modernas, tão pouco, na maior eficiência do uso dos fertilizantes e no maior retorno econômico.

Um método eficiente e de boa exatidão para estimar a necessidade de adubação de uma cultura, o qual satisfaz os princípios das leis gerais da adubação, é o do balanço nutricional. Esse método tem sido recomendado para calcular a necessidade de adubação para eucalipto (Barros et al., 1995), soja (Santos et al., 2008a) e melão (Deus et al., 2015).

O sistema de balanço nutricional se baseia na comparação da demanda de nutrientes com o suprimento a partir dos nutrientes disponíveis no solo, nos resíduos culturais e em entradas extras como chuva e água de irrigação. A demanda de nutrientes é calculada com base na eficiência de utilização dos nutrientes (CUB) o qual expressa a quantidade de matéria seca produzida por unidade do nutriente que a planta acumula. Este depende de características do cultivo

(disponibilidade dos nutrientes, adubações empregadas, sistema de irrigação, época de plantio, etc) e da planta (características das cultivares relacionadas à capacidade de absorção dos nutrientes e de utilizá-los para o crescimento). A capacidade de extração e de conversão dos nutrientes em matéria seca podem levar à CUBs distintos de nutrientes entre cultivares. Isso leva a necessidade do refinamento dos sistemas de balanço nutricional considerando-se as cultivares e não apenas a meta de produtividade para a cultura.

A partir da meta de produtividade estima-se a produção de matéria seca. A razão entre matéria seca e CUB determina o conteúdo de nutriente em determinado órgão da planta. A razão entre a extração (ou conteúdo total) e a taxa de recuperação do nutriente aplicado pela planta permite estimar a demanda de nutriente pelo cultivo. Dessa demanda, subtrai-se o suprimento pelo solo e resíduos culturais, obtendo-se a quantidade de nutrientes a se aplicar via fertilizantes.

CARACTERÍSTICAS DAS CULTIVARES INFLUENCIAM A DEMANDA DE NUTRIENTES

Uma das formas de se otimizar o uso de fertilizantes aplicados na agricultura é o plantio de cultivares com maior eficiência na utilização de nutrientes (Fernandez et al., 2013; Aquino et al., 2015), pois, o uso adequado de nutrientes é fundamental para aumentar e sustentar a produção agrícola. A partir disso torna-se necessário o entendimento do padrão de partição de MS entre as partes da planta, a variação desse padrão entre cultivares e os efeitos das condições ambientais sobre o processo, a fim de ajudar na escolha da melhor cultivar para cada propósito e maximizar a produtividade (Fernandes et al., 2012).

A capacidade de produção de matéria seca em função do acúmulo de nutrientes pode ser influenciada por características fisiológicas da cultivar relacionadas com a fotossíntese líquida e com a capacidade de alocação dos nutrientes nas diferentes partes da planta (Oliveira et al., 2014; Mauad et al., 2015). Em cultivo de cenoura, por exemplo, o CUB foi diferente entre cultivares, o que acarretou acúmulos distintos de nutrientes para a mesma produtividade de algumas cultivares. A maior produtividade não esteve somente associada à maior matéria seca de parte aérea (área foliar), mas também à capacidade de translocação de fotoassimilados da cultivar para o órgão de interesse econômico (Aquino et al., 2015).

Os processos de divisão e expansão celular são mantidos por plantas com maior eficiência de utilização de nutrientes, mesmo com baixos teores de nutrientes nos tecidos (Cecílio Filho et al., 2013). Balemi e Schenk (2009), em estudo sobre a eficiência de utilização de P em genótipos de batata, constataram diferenças entre os genótipos quanto à eficiência de utilização deste nutriente, de modo que aqueles com maior eficiência de utilização apresentaram maior produção de MS da parte aérea.

No cultivo da batata normalmente são empregadas altas doses de fertilizantes, muitas vezes superiores à necessidade da planta (Queiroz et al., 2013; Kawakami, 2015). Isso, além de aumentar os custos de produção da cultura, causa redução na eficiência de uso dos fertilizantes. Bregagnoli et al. (2003) ressaltam que o crescimento excessivo da parte aérea da batateira pode ser reflexo de fertilização desequilibrada, em especial excesso de N e de K. Em situações de crescimento excessivo de folhas a captação da radiação pelas folhas é menos eficiente, o que compromete a produtividade de tubérculos.

A determinação da extração de nutrientes é primordial para aferir as quantidades que devem ser aplicadas via fertilizantes (Fernandes et al., 2011). O excesso de nitrogênio (N), por exemplo,

estimula crescimento vegetativo intenso na batateira, reduz a matéria seca e o amido nos tubérculos da batata, retarda a maturação e prolonga a duração do período vegetativo (Cardoso et al., 2007).

Fatores como maior duração do ciclo e maior capacidade de translocação de fotoassimilados para os órgãos comerciais podem aumentar o CUB e permitir maior produtividade para um mesmo acúmulo de nutrientes. A adição de maiores doses de fertilizantes pode aumentar o teor dos nutrientes na parte aérea e tubérculos e com isso, reduzir o CUB para uma mesma produtividade.

A menor eficiência de utilização pode ser pela maior absorção dos nutrientes, pois à medida que se aumentam os teores de nutrientes na planta, o CUB diminui, como consequência do acúmulo crescente de nutriente, proporcionalmente, superior a MS da planta. Embora, as peculiaridades de cada cultivar façam grande diferença no manejo e na produtividade (Coraspe-León et al., 2009; Otoni et al., 2012; Aquino et al., 2015), ainda não se tem recomendações específicas de adubação para a maioria das cultivares, provavelmente, devido à falta de maiores informações referentes à eficiência de uso dos nutrientes.

A extração de nutrientes depende não só de fatores externos, que estão relacionados com o ambiente de cultivo, mas também de fatores internos, como o potencial genético e a idade da planta (Zanon et al., 2013). Como a absorção, o transporte e a redistribuição de nutrientes apresentam controle genético, existe a possibilidade de melhorar e/ou selecionar cultivares mais eficientes quanto ao uso de nutrientes (Bengtsson, 2012; Silva et al., 2014).

Dessa forma, a constatação de diferenças na eficiência de utilização dos nutrientes entre as cultivares, tem grande relevância prática, pois, permite a adoção de regimes diferenciados de adubação. Assim, o emprego de cultivares eficientes na utilização

de nutrientes torna-se fator importante no cenário atual, em função da demanda por produtividades mais elevadas e redução de custos com o uso de fertilizantes.

Oliveira et al. (2016) verificaram diferenças significativas nos CUBs de N, P e K, e nos índices de colheita desses (percentagem do total absorvido que é exportado) em cultivares de batateira (Tabela 1). Simularam a extração (total acumulado pela planta) e a exportação (quantidade dos nutrientes nos tubérculos) de N, P e K para três cultivares e três produtividades (Figura 1). Evidenciaram o efeito positivo da produtividade sobre a extração e exportação dos nutrientes. Os distintos CUBs entre cultivares para cada nutriente leva a extração e exportação distintas, como a maior demanda de N pelas cultivares Asterix e Atlantic comparadas à Ágata; maior demanda de P das cultivares Ágata e Atlantic, comparadas à Asterix; e, maior demanda de K da cultivar Atlantic comparada à Asterix e a Ágata. Assim, o efeito de cultivar deve ser considerado nos sistemas de balanço nutricional, pois podem influenciar a demanda de nutrientes tanto quanto a produtividade.

Tabela 1. Índice de colheita e coeficientes de utilização biológica de N, P e K na parte aérea (CUBPA) e nos tubérculos (CUBTB). Rio Paranaíba – MG (2015)

Cultivares	Índice de colheita (%)			CUBPA (kg kg ⁻¹)			CUBTB (kg kg ⁻¹)		
	N	P	K	N	P	K	N	P	K
Ásterix	78,4 b	90,1 a	71,7 b	39,7 c	545,0 a	17,4 c	79,9 a	428,4 b	51,4 a
BRSIPR Bel	81,1 a	92,0 a	82,1 a	40,7 c	495,2 b	26,0 a	88,6 a	398,8 c	52,4 a
Cupido	76,5 b	90,8 a	79,3 a	37,3 d	515,0 b	23,1 b	84,2 a	377,4 c	43,9 b
Ágata	79,4 b	92,7 a	77,0 a	42,3 c	624,8 a	19,5 c	80,2 a	356,1 c	41,9 b
Nicolet	80,6 a	89,0 b	77,1 a	35,4 d	462,1 b	18,8 c	72,6 b	487,7 a	47,6 b
FL2215	79,6 b	87,8 b	71,1 b	36,0 d	447,6 b	18,1 c	65,1 b	440,9 b	52,3 a
FL2027	81,7 a	90,7 a	80,0 a	39,0 c	456,1 b	22,3 b	74,4 b	394,8 c	47,1 b
FL1867	76,6 b	87,3 b	69,0 b	41,3 c	528,8 a	20,5 c	77,5 b	469,8 a	56,4 a
FL2221	84,2 a	91,1 a	79,3 a	48,9 b	561,2 a	27,1 a	72,9 b	435,5 b	55,1 a
Atlantic	80,6 a	90,4 a	77,7 a	48,2 b	532,2 a	20,0 c	92,4 a	429,9 b	44,8 b
Acumulator	81,3 a	88,0 b	78,1 a	49,3 b	493,1 b	23,2 b	83,8 a	490,5 a	48,8 b
Verdi	83,8 a	92,0 a	73,0 b	54,2 a	593,9 a	16,3 c	81,4 a	394,9 c	46,6 b
Taurus	82,5 a	90,4 a	75,5 a	44,3 c	576,9 a	17,6 c	77,6 b	491,1 a	46,4 b
F	2,34*	2,88**	4,22**	11,25**	12,61**	7,48**	3,48**	4,58**	5,25**
Média	80,5	90,2	76,2	42,8	525,5	20,9	79,3	430,5	48,8
CV (%)	4,5	2,6	5,6	9,0	14,4	13,2	10,9	10,9	8,8

¹Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo critério de agrupamento de Scott-Knott à 5 % de probabilidade. **, * - significativo a 1 e 5 %, respectivamente.

Fonte: Oliveira et al. (2016).

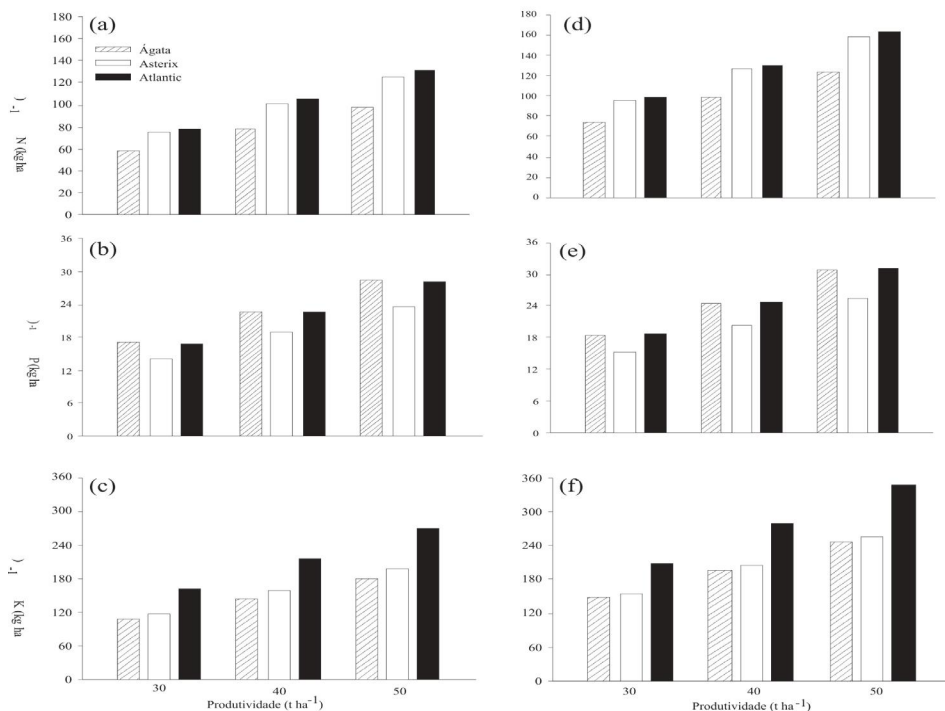


Figura 1. Estimativa da extração (a, b, c) e da exportação (d, e, f) de N, P e K em função da produtividade para as cultivares de batata Ágata, Asterix e Atlantic. Rio Paranaíba – MG (2015).

Fonte: Oliveira et al. (2016).

IMPORTÂNCIA DAS CURVAS DE ABSORÇÃO DE NUTRIENTES DA CULTURA NO MANEJO DE FERTILIZANTES

As curvas de absorção de nutrientes tipicamente podem ser divididas em três fases (Figura 2). A primeira corresponde à fase de baixo acúmulo de nutrientes, fase em que o acúmulo de matéria seca é baixo, pois a cultura está se estabelecendo. Geralmente nessa fase os teores dos nutrientes são altos, no entanto, com baixo acúmulo devido à baixa matéria seca acumulada. Numa segunda

fase há rápido acúmulo de matéria seca, especialmente foliar, o que influencia positivamente o acúmulo de nutrientes pela cultura. Na última fase, a taxa de acúmulo de nutrientes reduz, mas o total acumulado aumenta. Para os nutrientes móveis na planta o total acumulado nas folhas pode ser reduzido devido à translocação para o órgão comercial da planta (bulbo, raiz, frutos, etc). Nessa fase é comum a redução do teor do nutriente nas folhas e aumento nos órgãos de reserva da planta. A matéria seca de folhas geralmente é reduzida devido à senescência e/ou menor emissão de novas folhas, enquanto que, a matéria seca dos órgãos de reserva aumenta como consequência do acúmulo de fotoassimilados.

O conhecimento deste padrão de absorção é importante para o manejo das adubações, em especial no que diz respeito à necessidade e benefícios do parcelamento. Os nutrientes móveis no solo e demandados em grandes quantidades geralmente são aplicados parceladamente. Isso visa reduzir danos por reduzido potencial osmótico no sistema radicular em fases iniciais da cultura e perdas pela movimentação do nutriente no solo ou mesmo volatilização. Além disso, o parcelamento é forma de sincronizar o fornecimento dos nutrientes via adubações de cobertura com a demanda da planta, o que reduz a quantidade desses propensos aos processos de perda. No entanto, as aplicações em cobertura devem anteceder a demanda da planta, a qual pode ser conhecida pelas curvas de absorção.

Além da definição das épocas de aplicação de fertilizantes, as curvas de absorção contemplam a proporção do nutriente que está no órgão comercial em relação ao total acumulado. Essa relação, também conhecida como índice de colheita é importante para fins de fluxo de nutrientes no solo. Nutrientes mais acumulados no órgão comercial podem levar ao empobrecimento do solo, em especial quando as adubações são inferiores as quantidades exportadas e

o nutriente é demandado em grande quantidade, como observado para o K em cenoura, por exemplo (Aquino et al., 2015).

Pesquisas realizadas para determinar curvas de extração de nutrientes em cultivares de cebola mostram padrão distinto de extração de acordo com a cultivar (Figuras 2 e 3). O ponto comum entre as curvas é que a partir da bulbificação (9ª folha) o acúmulo de nutriente se intensifica. A cultivar Optima acumula matéria seca e nitrogênio de forma semelhante à cultivar Sirius (Figura 3). No entanto, a cultivar Optima acumula mais P ainda no início da bulbificação e menos K, comparada à cultivar Sirius. Assim, para a cultivar Sirius a manutenção de boas condições para o suprimento de P e adubação com K na fase de bulbificação é importante, já que o maior acúmulo ocorre mais ao final do ciclo, quando comparada à cultivar Optima. Essas variações entre cultivares, associadas com as fontes dos nutrientes utilizadas, com o solo e com o regime hídrico e sistema de irrigação podem orientar estratégias mais efetivas de adubação da cultura.

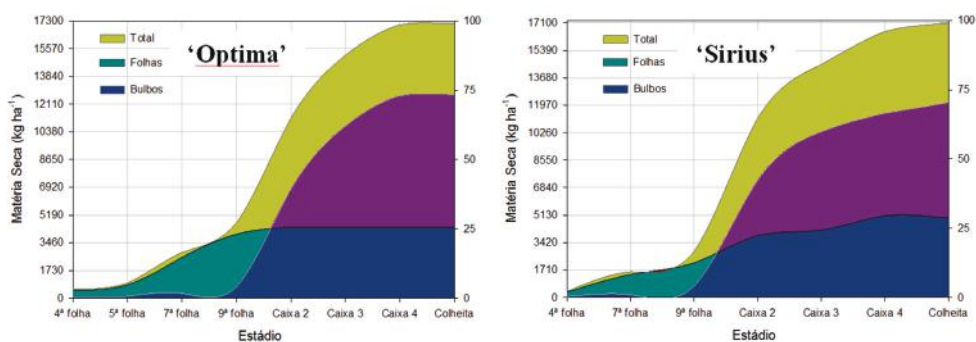


Figura 2. Acúmulo de matéria seca nos bulbos, folhas e total (bulbos + folhas) pelas cultivares de cebola 'Optima' e 'Sirius' em função do estágio de fenológico da cultura.

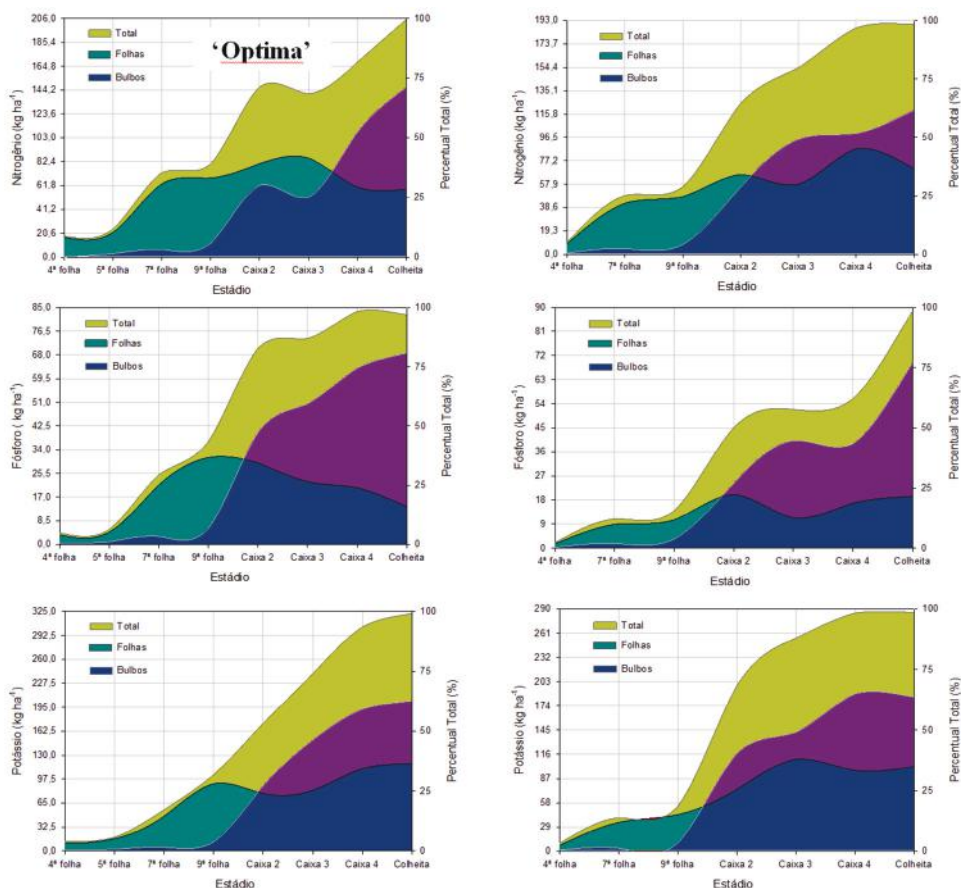


Figura 3. Acúmulo de N, P e K nos bulbos, folhas e total (bulbos + folhas) pela cebola 'Optima' e 'Sirius' em função do estágio de fenológico da cultura.

O padrão distinto de absorção de nutrientes observado para as diferentes cultivares, confirmam a necessidade de realização de pesquisas regionais ou locais sobre nutrição mineral com a finalidade de se aprimorar as recomendações de adubação e os períodos de aplicação dos fertilizantes para a cultura da cebola. A quantidade demandada e os momentos de maior demanda devem ser conhecidos para o uso eficiente dos fertilizantes em olerícolas.

MÉTODOS DE APLICAÇÃO E FONTES DE FERTILIZANTES FOSFATADOS EM OLERÍCOLAS

Embora o acúmulo de P pela planta seja baixo, elevadas doses de adubos fosfatados são aplicadas. Estas se devem em parte ao baixo teor natural de P na maioria dos solos brasileiros e à sua alta fixação pelos oxidróxidos de Fe e de Al, o que o torna indisponível para as plantas (Novais et al., 2007; Raij, 2011). Para as culturas olerícolas, o problema da fixação ainda é agravado pelo fato da aplicação dos fertilizantes ser feita em área total, seguida por incorporação no solo a uma profundidade de 15 a 20 cm. Essa forma de aplicação aumenta o contato entre o nutriente e o solo e, por conseguinte, a fixação (Büll et al., 2004), o que diminui a eficiência da adubação fosfatada (Sousa et al., 2010). Com isso, o aumento dessa eficiência é importante para reduzir as grandes quantidades de P aplicadas no solo (Miyazawa et al., 2011).

Devido ao caráter fixador de P dos solos tropicais, a adequada disponibilidade para a planta é garantida por meio do aumento da dose ou redução do volume de solo adubado para a mesma quantidade adicionada (Büll et al., 2004). Entretanto, em função da eutrofização e do aumento do custo de produção, opta-se pela redução do volume de solo adubado (localização) (Sharangi & Sahu, 2009), que é mais eficiente que a aplicação em área total (fosfatagem), em especial para fontes mais solúveis de P (Franzini et al., 2009). Estas, em virtude da disponibilização rápida de P, têm seu uso justificado em culturas de ciclo mais curto (Chien et al., 2010).

Dessa forma, estudos que comparam a adubação em área total com a localizada no caso dos fertilizantes fosfatados têm sido frequentes em culturas extensivas (Carneiro et al., 2008; Santos et al., 2008b; Franzini et al., 2009; Barbosa et al., 2015). No entanto, apesar da alta demanda das hortaliças, nesse grupo de culturas

pouco tem sido estudado sobre o modo de aplicação (Büll et al., 2004). Na cultura do alho, Büll et al. (2004) verificaram que em solo argiloso a produção de bulbos foi influenciada pela localização do fertilizante fosfatado. Em trabalho com a cultura da cebola, Sharangi & Sahu (2009) verificaram que a aplicação do fertilizante fosfatado a 5,0 cm de distância da linha de plantio proporcionou produtividades maiores e com o uso de doses menores quando comparada à distância de 7,5 cm.

Pesquisas recentes, com olerícolas (Silva et al., 2016; Santos et al., 2016) têm demonstrado que a aplicação à lanço com incorporação do P é menos eficiente, uma vez que favorece o contato do fertilizante fosfatado aplicado com o solo. Na cultura da batata a produtividade é maior quando a adubação fosfatada é feita 100% no sulco de plantio, e significativamente maior quando há aumento da dose do fertilizante fosfatado (Santos et al., 2016). Isso deve-se ao fato de ocorrer menor fixação do nutriente e conseqüentemente, maior disponibilidade desse na fase inicial de desenvolvimento da cultura. Resultados positivos com a localização do fertilizante são evidenciados para o conteúdo total de P, nos quais a cultura acumulou, de forma geral, até 50% a mais de P quando comparado com a fertilização realizada completamente a lanço (Tabela 02).

O método de aplicação do P influenciou as eficiências agrônômica e de recuperação na cultura da batata (Tabela 2). A adubação no sulco de plantio corresponde a aumentos na eficiência agrônômica de até 100%, em se tratando da menor dose de P aplicada e na eficiência de recuperação de P cerca de 2,5 vezes. A maior disponibilidade do nutriente, principalmente na fase inicial de desenvolvimento, contribui para incrementos em produtividade e aumento de eficiência da adubação fosfatada.

Em repolho, quando o P foi aplicado a lanço, houve aumento de produtividade até a dose de 800 kg ha⁻¹ de P₂O₅, a qual proporcionou

Avanços Tecnológicos Aplicados à Pesquisa na Produção Vegetal

a produtividade de 136,9 t ha⁻¹ (Figura 4a). Com a aplicação localizada do P houve variação exponencial da produtividade com as doses de P₂O₅ testadas (Figuras 4b e 4c). Sem fosfatagem, a máxima produtividade de 128,6 t ha⁻¹ foi alcançada com 640 kg ha⁻¹ de P₂O₅ (Figura 4b). Todavia, quando se utilizou a fosfatagem (200 kg ha⁻¹ de P₂O₅), a máxima produtividade de 139,2 t ha⁻¹ foi obtida com 320 kg ha⁻¹ de P₂O₅, aplicados na linha (Figura 4c). A fosfatagem não proporcionou incremento significativo na produtividade de cabeças.

Tabela 2. Produtividade, conteúdo total de P, eficiência agrônômica e eficiência de recuperação em função de métodos de aplicação e doses de P na cultura da batata cultivar Ágata. Rio Paranaíba, 2015.

Dose P ₂ O ₅ (kg ha ⁻¹)	Métodos de Aplicação de P (% Lanço + % Localizado)					Média
	100 + 0	75 + 25	50 + 50	25 + 75	0 + 100	
Produtividade (t ha⁻¹)						
0	8,71					-
300	12,9 Db	14,0 Db	16,2 Cb	17,8 Bb	20,4 Ab	16,3 b
600	17,3 Ba	19,4 Ba	19,6 Ba	20,5 Ba	23,1 Aa	20,0 a
Média	15,6 C	16,2 C	18,4 B	18,6 B	21,7 A	
CV (%)	9,71	F _{Método}	35,45**	F _{Dose}	80,7**	
F _{Método x Dose} = 0,0 ^{ns}						
Conteúdo Total de P (kg ha⁻¹)						
0	3,1					-
300	5,6 Cb	5,2 Cb	7,3 Ba	7,0 Bb	8,3 Ab	6,7 b
600	7,7 Ca	7,8 Ca	7,5 Ba	8,6 Ba	10,0 Aa	8,3 a
Média	6,6 C	6,9 C	7,5 B	7,3 B	9,2 A	
CV (%)	7,0	F _{Método}	81,4**	F _{Dose}	194,20**	
F _{Método x Dose} = 0,0 ^{ns}						
Eficiência Agrônômica de P (kg kg⁻¹)						

Avanços Tecnológicos Aplicados à Pesquisa na Produção Vegetal

0			0,0			-
300	40,3 Da	52,0 Ca	30,4 Eb	69,2 Ba	83,1 Aa	54,9 a
600	34,6 Ba	38,1 Ba	41,3 Ba	48,9 Ab	51,2 Ab	42,8 b
Média	37,4 C	50,5 B	35,8 C	53,6 B	67,1 A	
CV (%)	14,30	F _{Método}	69,10**	F _{Dose}	125,90**	
F _{Método x Dose} = 0,0 ^{ns}						

Eficiência de Recuperação de P (%)

0			0,0			
300	1,8 Ca	2,8 Ba	1,6 Aa	3,2 Ba	4,3 Aa	2,9 a
600	1,6 Aa	1,8 Ab	1,6 Ca	2,1 Ab	2,5 Ab	1,9 b
Média	1,8 C	1,9 C	2,2 B	2,5 B	3,4 A	
CV (%)	22,0	F _{Método}	30,5**	F _{Dose}	60,8**	
F _{Método x Dose} = 0,0 ^{ns}						

ns, *, **, não significativo ou significativo a 5 e 1% de probabilidade pelo teste F. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5%.

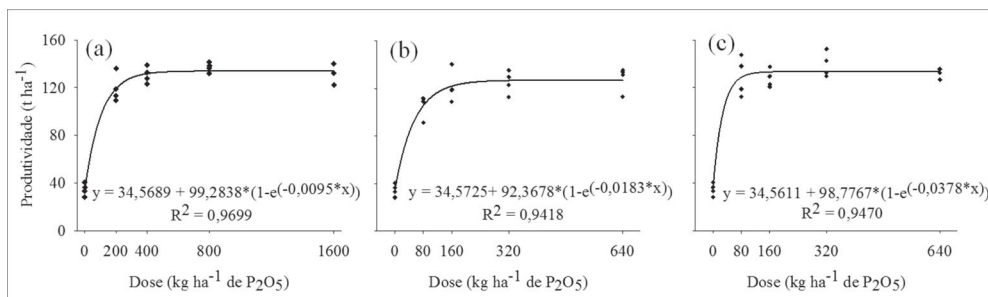


Figura 4. Produtividade de cabeças em função do P aplicado a lanço (a) ou localizado na ausência (b) ou presença (c) de fosfatagem. Rio Paranaíba-MG, 2015

A eficiência agrônômica (EA), que mede a produção de cabeças (em kg) por kg de P₂O₅ aplicado, foi reduzida com o incremento das doses (Figura 5). A EA para as doses de máxima produtividade foi

de 127,1 kg kg⁻¹, para o P aplicado a lanço (Figura 5a), e 146,9 e 201,3 kg kg⁻¹ para o P aplicado em linha, na ausência ou presença de fosfatagem, respectivamente (Figuras 5a e 5b). A maior EA na aplicação com P localizado e com máximas produtividades semelhantes demonstram a maior eficiência da aplicação localizada em comparação à aplicação a lanço.

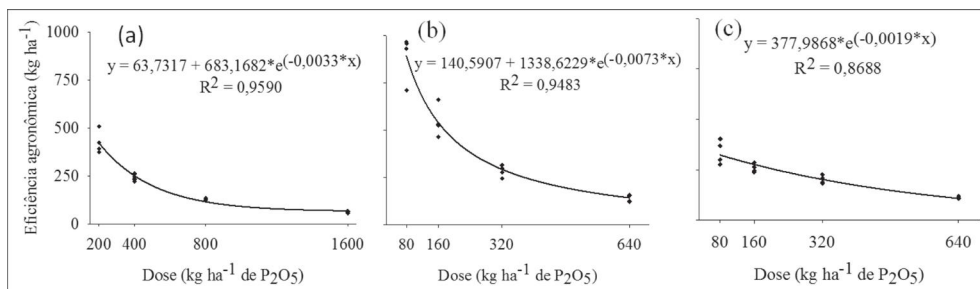


Figura 5. Eficiência agrônômica em função do P aplicado a lanço (a) ou localizado na ausência (b) ou presença (c) de fosfatagem. Rio Paranaíba-MG, 2015

A eficiência de recuperação (ER) também foi reduzida com o aumento da dose de P₂O₅ (Figura 6). A ER para as doses de máximas produtividades foi de 15,3%, para o P aplicado a lanço (Figura 6a), e 22,5 e 25,3% para o P aplicado em linha, sem ou com fosfatagem, respectivamente (Figuras 6b e 6c). A ER reflete a percentagem do nutriente aplicado que a planta absorveu (Fageria, 1998) e, dessa forma, a eficiência do modo de aplicação do fertilizante.

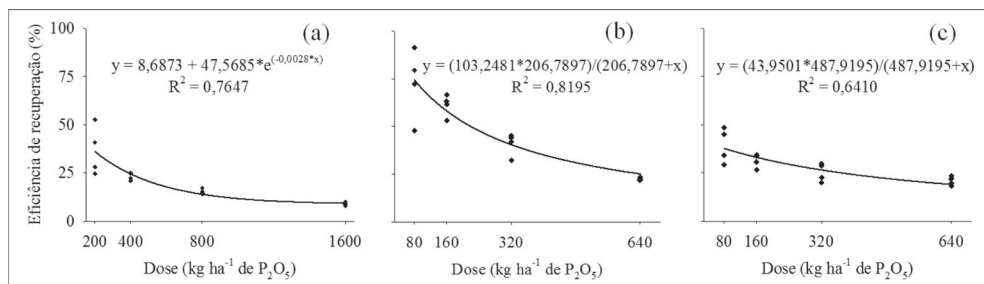


Figura 6. Eficiência de recuperação em função do P aplicado a lanço (a) ou localizado na ausência (b) ou presença (c) de fosfatagem. Rio Paranaíba-MG, 2015

Outra vertente de boas práticas com relação a adubação fosfatada em hortaliças é a utilização de fontes de P eficientes. O mercado de fertilizantes oferece uma série de opções para uso do produtor. O fosfato monoamônico (MAP), o superfosfato triplo e o simples são as principais fontes de P utilizadas nas fertilizações da batateira, por exemplo (Rosen et al. 2014). Outras fontes como termofosfatos, fosfatos reativos naturais, fontes solúveis revestidas com polímeros para liberação controlada e incorporação de substâncias húmicas e micronutrientes em grânulos são apresentadas como alternativas para maior aproveitamento do P pelas plantas (Frazão, 2013; Ferreira, 2014). Basicamente esses fertilizantes diferem quanto ao processo de produção, o que leva diferenças principalmente na granulometria e solubilidade, características que podem influenciar na resposta da batateira às aplicações de P.

O uso de fontes eficientes quanto a liberação e composição apresenta-se como forma de minimizar o problema e até, em algumas situações, diminuir as quantidades utilizadas nas fertilizações da cultura da batata, desde que componham um sistema de recomendação refinado e que se conheça as potencialidades dessas fontes.

Em pesquisa realizada por Santos et al. (2016), as maiores produtividades de batata, cultivar Ágata, foram alcançadas com o fertilizante 05-26-00 (com substâncias orgânicas), seguido por 03-28-00 (com polímero sintético) e MAP, independentemente da dose do fertilizante utilizada (Tabela 3). O melhor desempenho dessas fontes pode ser relacionado à maior solubilidade e imediata disponibilidade do P à cultura. Frazão (2013) encontrou respostas positivas de fontes solúveis de P associadas às substâncias orgânicas na disponibilidade de P no solo e na produção de biomassa da cultura do milho.

As fontes termofosfato magnesiano, fosfato natural reativo e MAP revestido com polímero sintético apresentaram resultados próximos aos obtidos com o tratamento controle (Santos et al., 2016). A baixa solubilidade dessas fontes, associada à alta demanda inicial da batateira, contribuiu para deficiência de P em momentos de maior demanda pela cultura, o que comprometeu a produtividade.

As eficiências agrônômica e de recuperação foram altamente influenciadas pelas fontes dos fertilizantes fosfatados (Tabela 3). A utilização de fontes solúveis e adubação realizada localizadamente no sulco de plantio são estratégias importantes para melhor aproveitamento dos fertilizantes fosfatados e maior produtividade das culturas olerícolas.

Tabela 3. Produtividade, eficiência agronômica e eficiência de recuperação em função de fontes e doses de P na cultura da batata cultivar Ágata. Rio Paranaíba, 2015.

FONTES	DOSE (kg ha ⁻¹ de P ₂ O ₅)					
	300		600		300	
	Produtividade (t ha ⁻¹)		Eficiência Agronômica (kg kg ⁻¹)		Eficiência Recuperação (%)	
Controle	10,10		0,00		0,00	
Fosfato Natural						
Reativo	10,93 bD	13,25 aD	6,70 aE	12,20 aB	1,33 aB	0,79 aB
MAP	18,30 bB	22,90 aB	67,40 aB	49,10 bA	7,37 aA	4,24 bA
MAP _{rev pol1}	13,20 aC	14,83 aC	24,10 aD	18,30 aB	5,50 aA	0,77 bB
05-26-00 _{rev sub org}	23,35 aA	25,30 aA	101,40 aA	58,30 bA	7,25 aA	5,76 aA
Superfosfato Triplo						
Termofosfato						
Magnesiano	8,40 bE	13,70 aD	0,00 bF	13,70 aB	1,45 aB	1,15aB
03-28-00 _{rev pol2}	19,40 bB	23,50 aB	71,30 aB	51,30 bA	6,70 aA	4,15 bA
Média Geral	16,50		34,90		3,42	
F _{Fontes}	103,4**		96,0**		17,7**	
F _{Doses}	74,5**		47,6**		23,8**	
F _{Fontes x Doses}	0,0 ^{ns}		1,59 ^{ns}		0,0 ^{ns}	
CV (%)	9,0		24,1		34,6	

^{ns}, *, **, não significativo ou significativo a 5 e 1% de probabilidade pelo teste F. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott knott a 5% de probabilidade.

MAP – monoamônio fosfato (11-52-00); rev pol 1 – revestimento com polímero (tecnologia 1); rev sub org – revestimento de MAP com substâncias orgânicas; rev pol2 – revestimento do fertilizante com polímero (tecnologia 2).

CONCLUSÕES

As recomendações oficiais com base em tabelas de recomendação podem ser consideradas defasadas. A substituição desse modelo de recomendação por sistemas de balanço nutricional com dados específicos de cada cultivar permite maior exatidão nas estimativas da necessidade de nutrientes via fertilizantes.

Estudos que avaliem fontes e modos de aplicação dos fertilizantes e curvas de absorção de nutrientes para cada cultivar de determinada espécie de hortaliça são importantes para realização de ajustes nos programas de adubação e alcance de maiores produtividades.

REFERÊNCIAS

Aquino, R.F.B.A.; Assunção, N.S.; Aquino, L.A.; Aquino, P.M.; Oliveira, G.A.; Carvalho, A.M.X. Nutrient demand by the carrot crop is influenced by the cultivar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 39: 541-552, 2015.

Barbosa, N.C., Arruda, E.M., Brod, E., & Pereira, H.S. Distribuição vertical do fósforo no solo em função dos modos de aplicação. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 1, 2015.

Balemi, T.; Schenk, M.K. Genotypic variation of potato for phosphorus efficiency and quantification of phosphorus uptake with respect to root characteristics. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.172, p.669-677, 2009.

Barros N.F., Novais R.F., Teixeira J.L., Fernandes Filho, E.I. NUTRICALC 2.0 - Sistema para estimar el balance de nutrientes y

recomendaciones de fertilizantes para la plantación de eucaliptos. **Bosque**. 1995;16:129-31.

Bengtsson, G.B. Effects of genotype, soil type, year and fertilization on sensory and morphological attributes of carrots (*Daucus carota* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, p.1786-1799, 2012.

Bregagnoli, M.; Bregagnoli, F.C.R.; Minami, K.; Gratieri, L.A.; Minchillo, M. Análise bromatológica de sete cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivadas na safra de verão no Sul de Minas Gerais. **Horticultura Brasileira**, v.21, p.387-387, 2003.

Büll, L.T., Costa, M.C.G., Novello, A., Fernandes, D.M., Bôas, V., & Lyra, R. Doses and forms of application of phosphorus in vernalized garlic. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 5, p. 516-521, 2004.

Cardoso, A.D.; Alvarenga, M.A.R.; Melo, T.L.; Viana, A.E.S. Produtividade e qualidade de tubérculos de batata em função de doses e parcelamentos de nitrogênio e potássio. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p.1729-1736, 2007.

Carneiro, L.F., Furtini Neto, A.E., Resende, Á.V.D., Curi, N., Santos, J.Z.L., & LAGO, F.J.D. Fontes, doses e modos de aplicação de fósforo na interação fósforo-zinco em milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1133-1141, 2008.

Comissão de fertilidade do solo do estado de Minas Gerais - CFSEMG. **Sugestões de Adubação para Hortaliças**. In: Ribeiro, A.C.; Guimarães, P.T.G.; Alvarez V., V. H., eds. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais, 5ª Aproximação. Viçosa, MG, 1999. p. 171 - 174.

Coraspe-León, H.M.; Muraoka, T.; Franzini, V.I.; Piedade, S.A.S.; Granja, N.P. Absorción de macronutrientes por plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) em la producción de tubérculo-semilla. *Interciencia*, Caracas, v.34, p.57-63, 2009.

Cecílio Filho, A.B.; Silva, G.S.; Cortez, J.W.M. Phosphorus fertilization of 'Fuyutoyo' cabbages in phosphorus-rich Eutruxox soil. **Chilean journal of agricultural research**, v. 73, n. 3, p. 288-292, 2013.

Chien, S.H., Prochnow, L.I., TU, S., & Snyder, C.S. Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 89, n. 2, p. 229-255, 2011.

Deus, A.L.; Soares, I.; Neves, J.C.L.; Medeiros, J.F.; Miranda, F.R. Fertilizer recommendation system for melon based on nutritional balance. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 39: 498-511, 2015.

Fageria, N.K. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, n. 1, p. 6-16, 1998.

Fernandes, A.M.; Soratto, R.P.; Pilon, C. Soil phosphorus increases dry matter and nutrient accumulation and allocation in potato cultivars. **American Journal Potato Research**, v. 92, p. 117-127, 2015.

Fernandes, A.M.; Soratto, R.P.; Silva, B.L.; Souza-Schlick, G.D. Crescimento, acúmulo e distribuição de matéria seca em cultivares de batata na safra de inverno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 826-835, 2011.

Fernandes, A.M.; Soratto, R.P. Eficiência de utilização de nutrientes por cultivares de batata. **Bioscience Journal**, v.29, p.91-100, 2013.

Fernandes, A.M.; Soratto, R.P. Nutrition, dry matter accumulation and partitioning and phosphorus use efficiency of potato grown at different phosphorus levels in nutrient solution. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36, p.1528-1537, 2012.

Ferreira, N.R. Eficiência agronômica de fertilizantes organominerais sólidos e fluidos em relação a disponibilidade de fósforo. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado) – **Universidade Estadual Paulista**, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2014.

Franzini, V. I., Muraoka, T., Coraspe-León, H. M., & Mendes, F. L. Eficiência de fosfato natural reativo aplicado em misturas com superfosfato triplo em milho e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, p. 1092-1099, 2009.

Frazão, J.J. Eficiência agronômica de fertilizantes organominerais granulados à base de cama de frango e fontes de fósforo. 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado) – **Universidade Federal de Goiás**, Escola de Agronomia, Goiânia, 2013.

Hopkins, B.G.; Ellsworth, J.W.; Shiffler, A.K.; Bowen, T.R.; Cook, A.G. Pre-plant versus in-season application of phosphorus fertilizer for Russet Burbank potato grown in calcareous soil. **Journal of Plant Nutrition**, v. 33, p. 1026–1039, 2010.

Mauad, M.; Garcia, R.A.; Silva, R.M.M.F.; Silva, T.A.F.; Schroeder, I.M.; Knudsen, C.H.; Quaresma, E.V.W. Produção de matéria seca e acúmulo de macronutrientes na parte aérea das plantas de Niger. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.39, p.533-540, 2015.

Kawakami, J. Redução da adubação, doses e parcelamento de nitrogênio no crescimento e produtividade de batata. **Horticultura Brasileira**, v.33, p.168-173, 2015.

Miyazawa, K., Takeda, M., Murayama, T., & Watanabe, K. Combining pre-transplanting phosphorus application and green manure incorporation: a trial for reducing fertilizer input. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 128-137, 2011.

Novais, R. F.; Smyth, T. J.; Nunes, F. N. Fósforo. In: Novais, R.F.; Alvarez V., V. H.; Barros, N. F.; Fontes, R. L. F.; Cantarutti, R. B.; Neves, J. C. L. (Eds.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, 2007. p. 471-550.

Novais, R.F.; Smyth, T.J. Fósforo em solo e planta sob condições tropicais. Viçosa: **UFV**, 1999. 399p.

Oliveira, M.W.; Silva, V.S.G.; Lígia Sampaio Reis; Oliveira, D.C.; Silva, J.C.T. Produção e qualidade de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas no nordeste de Minas Gerais. **Ciência Agrícola**, v. 12, p.9-16, 2014.

Oliveira, T.F.; Aquino, L.A.; Gentil, T.G.; Clemente, J.M.; Reis, M.R. Demanda de nitrogênio, fósforo e potássio da batata influenciada pela cultivar. *Journal of Plant Nutrition*, 2016.

Otoni, B.S.; Mota, W.F.; Belfort, G.R.; Silva, A.R.S.; Vieira, J.C.B.; Rocha, L.S. Produção de híbridos de tomateiro cultivados sob diferentes porcentagens de sombreamento. **Revista Ceres**, v. 59, p. 816-825, 2012.

Queiroz, L.R.M.; Kawakami, J.; Muller, M.M.L.; Oliari, I.C.R.; Umburanas, R.C.; Eschemback, V. Adubação NPK e tamanho da batata-semente no crescimento, produtividade e rentabilidade de plantas de batata. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 119-127, 2013.

Raij, B. VAN; Cantarella, H.; Quaggio, J. A.; Furlani, A. M. C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônômico/Fundação IAC, 1997. 285p. (Boletim Técnico, 100).

Raij, B. van. Fertilidade do solo e manejo de nutrientes. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2011. 420 p.

Rosen, C.J.; Kelling, K.A.; Stark, J.C.; Porter, G.A. Optimizing phosphorus fertilizer management in potato production. **American Journal Potato Research**, v. 91, p. 145-160, 2014.

Sandaña, P.; Kalazich, J. Attainable CO₂ Emission of ware potatoes under high yield conditions in Southern Chile. **American Journal Potato Research**, v. 92, on line, 12 fevereiro 2015.

Santos, F.C.; Neves, J.C.L.; Novais, R.F.; Alvarez V., V.H.; Sedyama, C.S. Modelagem da recomendação de corretivos e fertilizantes para a cultura da soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32: 1661-1674, 2008a.

Santos, J. Z. L., Furtini Neto, A. E., Resende, Á. D., Curi, N., Carneiro, L. F., & Costa, S. D. A. Frações de fósforo em solo adubado com fosfatos em diferentes modos de aplicação e cultivado com milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 705-714, 2008b.

Santos, L.P.D.; Aquino, L.A.; Novais, R.F.; Silva, L.O.D.; Oliveira, T.F. Métodos de aplicação de fósforo na cultura da batata. (no prelo). 2016

Santos, L.P.D.; Aquino, L.A.; Novais, R.F.; Silva, L.O.D.; Oliveira, T.F. Eficiência de fontes de fósforo na cultura da batata. (no prelo). 2016

Sharangi, A. B.; Sahu, P. K. Effect of placement and dose of phosphatic fertilizers on onion. **Journal of plant nutrition**, v. 32, n. 11, p. 1901-1913, 2009.

Silva, G.O.; Pereira, A.S.; Carvalho, A.D.F. Seleção de clones de batata para fritura com base em índices de seleção. **Revista Ceres**, v. 61, p. 941-947, 2014.

Silva, L.O.D.; Santos, L.P.D.; Aquino, L.A.; Novais, R.F.; Oliveira, T.F. Métodos de aplicação de fósforo na cultura do repolho. (no prelo). 2016

Sousa, D. M. G.; Rein, T. A.; Goedert, W. J.; Lobato, E.; Nunes, R. S. Fósforo. In: Prochnow, L. I.; Casarin, V.; Stipp, S. R. Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes: nutrientes. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2010. v. 2, p. 67- 132.

Zanon, A.J.; Streck, N.A.; Kräulich, B.; Silva, M.R.; Bisognin, D.A. Desenvolvimento das plantas e produtividade de tubérculos de batata em clima subtropical. **Revista Ciência Agrônômica**, v.44, p.858-868, 2013.

Mecanismos celulares da resposta da folha de *coffea arabica* a stress/defesa: análise proteómica do apoplasto

Leonor Guerra-Guimarães^{1,2}
Cândido Pinto Ricardo³

INTRODUÇÃO

O café é a *commodity* mais importante no comércio agrícola internacional, que representa uma enorme fonte de rendimento para vários países latino-americanos, africanos e asiáticos. Muitos desses países são fortemente dependentes do agro-negócio do café, que pode representar mais de 75% das suas receitas totais de exportação. A ferrugem alaranjada da folha (CLR), causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, é a principal doença de *Coffea arabica* a nível mundial com perdas de produção que podem chegar aos 40%,

¹ Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal; ²Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food (LEAF), Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal. Email: leonorguimaraes@isa.ulisboa.pt

³ Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, 2780-157 Oeiras, Portugal. Email: ricardo@itqb.unl.pt

se não forem aplicadas medidas de controlo. O melhoramento para resistência à CLR é do ponto de vista ambiental e económico a estratégia mais adequada e sustentável. Desde 1955, o Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC/ISA/UL, Portugal) tem vindo a cooperar com os países produtores de café para resolver esta grave doença a nível internacional (Rodrigues *et al.* 1975, Várzea & Marques 2005, Silva *et al.* 2006).

A análise das interações *Coffea sp.*-*H. vastatrix* permitiu reconhecer a aplicação do conceito de gene-a-gene descrito por Flor (1942), a esta associação e, assim, inferir os genótipos de virulência das raças de *H. vastatrix* estudadas. Foram identificados nove genes dominantes (S_{H1} - S_{H9}), que condicionam a resistência de *Coffea sp.*, e os correspondentes genes de virulência (v1-v9) em *H. vastatrix* (Rodrigues *et al.* 1975, Várzea & Marques, 2005). Não há nenhuma evidência da existência de defesas constitutivas no cafeeiro, mas foram identificados diversos mecanismos de resistência induzida durante a infecção por *H. vastatrix* (Silva *et al.* 2006 e referências aí contidas). Estudos citológicos anteriores mostraram que para muitos genótipos de *Coffea sp.*, os primeiros sinais de incompatibilidade (resistência) correspondem à reacção de hipersensibilidade (Silva *et al.* 2002, Silva *et al.* 2008). Trabalhos pioneiros em bioquímica clássica, mostraram que a expressão de resistência do cafeeiro à *H. vastatrix* está associada (entre outras respostas) ao aumento de actividade de enzimas oxidativas (tais como a lipoxigenase, peroxidases e a superóxido-dismutase), enzimas da via fenilpropanóide (fenilalanina amoníaco-liase) e de proteínas relacionadas com a patogenicidade, como as quitinases (Rojas *et al.* 1993, Silva *et al.* 2002, Silva *et al.* 2008, Guerra-Guimarães *et al.* 2009a, Guerra-Guimarães *et al.* 2009b).

Nas últimas décadas o uso de metodologias moleculares de diferentes abordagens veio abrir novas perspectivas no estudo das interações *Coffea sp.-H. vastatrix*. Por exemplo, supressão genética por hibridação subtractiva, sequenciação nucleotídica por 454pyrosequencing e análise de expressão genica por qRT-PCR permitiram identificar vários genes possivelmente envolvidos na resistência do hospedeiro (Fernandez *et al.* 2004, Diniz *et al.* 2012; Fernandez *et al.* 2012). Por outro lado a análise das proteínas previstas pelos marcadores de sequências expressas (ESTs) revelou que um quarto são proteínas de resistência a doenças, de stress/defesa e componentes de vias de transdução de sinal (por exemplo, quitinases beta-1,3-glucanases , PR10, lipoxigenase, fatores de transcrição WRKY).

O sufixo -ômica tem sido usado nos domínios biológicos para criar designações como genômica, proteômica e metabolômica, etc, que expressão os estudos em larga escala de genes, proteínas, metabolitos, etc. Este tipo de análises só é possível recorrendo a técnicas de alto rendimento com apoio bioinformático, de forma a integrar toda a informação obtida de modo coerente. Sendo as proteínas os agentes finais das respostas celulares aos stresses temos centrado parte dos nossos estudos de *stress* em cafeeiro na análise proteômica. A proteômica tornou-se numa ferramenta que permite não só anotar e caracterizar as proteínas existentes numa amostra (fornecendo informação complementar à obtida pelo genoma e transcrito), como também obter informação sobre os processos/respostas celulares que estão envolvidos em determinado fenómeno ou condição biológica. A interpretação deste tipo de estudos é integrativa, isto é, necessita de utilizar as bases de dados que ligam os genes e as proteínas a processos celulares e vias metabólicas. A abordagem proteômica permite, assim, a identificação simultânea de um grande número de proteínas e,

consequentemente, novos genes e vias de sinalização/metabólicas, fundamentais para uma melhor compreensão da interação planta-agente patogénico. A proteómica pode ainda fornecer informações sobre a localização da proteína, as interações proteína-proteína, complexos enzimáticos ou modificações pós-traducionais (PTMs) que são essenciais para uma melhor compreensão dos processos biológicos (Abril *et al.* 2011, Delanois *et al.* 2014, Pinheiro *et al.* 2014, Jorin-Novo *et al.* 2015).

Numa interação *Coffea sp.-H. vastatrix*, nas fases iniciais do processo de colonização o fungo cresce maioritariamente no espaço extracelular das células do mesófilo das folhas, desenvolvendo interações importantes na superfície celular (Silva *et al.* 2002, Várzea & Marques 2005, Silva *et al.* 2006). Como tal pareceu-nos importante estudar as proteínas (proteoma) existentes nesse importante compartimento celular. O espaço extracelular (ou apoplasto), é composto por todo o compartimento das células da planta externo às membranas plasmáticas, incluindo as paredes celulares, o espaço intercelular e o fluído apoplástico (APF). É um compartimento dinâmico, importante na regulação da estrutura da célula, nas respostas ao stress abiótico e biótico e nos processos de reconhecimento e de sinalização (Agrawal *et al.* 2010). O APF é composto por proteínas segregadas, enzimas, metabolitos e iões que são importantes na comunicação inter/intra-celular, é o meio de transporte de materiais para as células, e desempenha um papel fundamental nas interações das plantas com o meio ambiente (Ding *et al.* 2012). Tem sido demonstrado que, enquanto algumas das proteínas secretadas são constitutivas do APF, outras são induzidas por sinais de natureza biótica ou abiótica (Guerra-Guimarães *et al.* 2009b, 2014, 2015).

A análise proteómica pode ser realizada utilizando duas abordagens distintas: uma, *gel-based*, em que os polipeptídeos

constituintes das proteínas são separados electroforeticamente em gel de poli(acrilamida) bi-dimensional (2-DE), e outra, *gel-free* ou *shotgun*, em que os polipeptídeos são hidrolisados por uma protéase e os péptidos resultantes são separados cromatograficamente (e.g. HPLC, LC-MS). Na técnica 2-DE os polipeptídeos de interesse são posteriormente retirados do gel, digeridos (e.g. tripsina) e os péptidos resultantes são identificados por espectrometria de massa (MS) por comparação dos valores das massas obtidas experimentalmente *versus* o valor teórico existente nas bases de dados. Esta técnica tem a vantagem de que, uma vez que a separação dos polipeptídeos em gel 2-DE é anterior à identificação por MS, garante a conectividade física entre os péptidos e as proteínas reduzindo significativamente a complexidade da análise. Atualmente, continua a ser a abordagem mais utilizada em proteómica, particularmente no estudo de culturas agrícolas cujos genomas são desconhecidos. Infelizmente, esta técnica apresenta algumas desvantagens importantes, ou seja, tem um desempenho pobre quanto à análise de proteínas hidrofóbicas e básicas e pode ser bastante limitada no que diz respeito ao rendimento. Na abordagem *gel-free* há uma cobertura maior do proteoma e também é possível identificar proteínas de membrana. No entanto, uma das principais desvantagens desta abordagem reside na falta de ligação entre a proteína e os seus péptidos. Além disso, apesar dos grandes avanços nas técnicas de espectrometria de massa, numa amostra de proteínas de uma cultura agrícola a identificação e quantificação dos polipeptídeos é difícil, especialmente no caso de culturas com genomas poliplóides complexos e com grandes famílias de proteínas. Os péptidos partilhados entre várias proteínas não contribuem para a identificação conclusiva de uma proteína em particular (Zivy *et al.* 2015).

A preparação de extratos proteicos para 2-DE requer um protocolo reprodutível e com baixa contaminação de interferentes.

Se a matriz proteica for muito complexa será conveniente fazer uma extracção fraccionada para facilitar a análise das amostras. Na separação de proteínas por electroforese 2-DE em gel de poliacrilamida, os polipeptídeos são separados na 1ª dimensão por focagem isoeléctrica num gradiente de pH imobilizado (IPG) em tiras de gel de poliacrilamida, que permitem uma separação eficiente e reprodutível segundo o ponto isoeléctrico (pI). Seguidamente, a tira (IPG) é colocada no topo dum gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para separação os polipeptídeos em função da sua massa molecular (2ª dimensão). Os polipeptídeos separados por 2-DE podem ser visualizados, no próprio gel, através da sua coloração com azul de Coomassie, nitrato de prata ou compostos fluorescentes (ex. SYPRO Ruby, etc.). O método de coloração a escolher depende da quantidade de proteína existente na amostra já que cada composto tem gamas de detecção e linearidade diferentes. Após a coloração, os géis são digitalizados recorrendo a equipamento que permite registar a intensidade da coloração de cada polipeptídeo (ou *spot*). Essa informação é posteriormente tratada usando software adequado para fazer a quantificação e análise comparativa da intensidade dos vários *spots* obtidos nos géis 2-DE (ex. PDQuest, Biorad, GeneBio, Amersham Biosciences). Estes programas de análise permitem padronizar as diferenças existentes de gel para gel, quantificar e comparar a intensidade (quantidade) relativa de cada polipeptídeo presente nos diferentes géis, etc. Os *spots* de interesse são excisados dos géis e digeridos por uma protéase (normalmente a tripsina), sendo os péptidos resultantes identificados por MS com recurso a bases de dados. O espectrómetro mais comumente utilizado é do tipo MALDI-TOF/TOF, que é composto por um ionizador (MALDI, *matrixassisted laser desorption/ionization*), um analisador (TOF, *time-of-flight*) e um detector que regista o tempo de voo (TOF, *time-of-flight*) dos vários péptidos ionizados. O espectro de MS para um

polipeptído obtido por esta técnica corresponde ao chamado “*peptide mass fingerprint*” que, como o nome indica, pode ser visto como a impressão digital do polipeptído. Através do cruzamento dos dados obtidos com a informação das bases de dados quer de nucleóticos quer de proteínas, é possível identificar os polipeptídos existentes em cada *spot* e, conseqüentemente, inferir as proteínas de que fazem parte. Assim, pode-se construir um mapa de referência contendo todas as proteínas expressas num determinado momento (Santos *et al.* 2004, Soares *et al.* 2012).

Apresentam-se em seguida dois dos nossos estudos de proteômica do apoplasto de folha de cafeeiro sob o efeito de stress, num caso de natureza abiótica e no outro de natureza biótica.

ESTUDOS DE PROTEÓMICA

Modulação das proteínas do apoplasto da folha de cafeeiro em condições de estufa.

O estudo da interação *C. arabica*-*H. vastatrix* permitiu verificar a influência ambiental sob as características das proteínas do apoplasto da folha das plantas crescidas em condições de estufa. O objetivo do trabalho foi estabelecer o proteoma anotado do apoplasto da folha de *C. arabica* e avaliar em que medida as condições de crescimento em estufa exerceu alguma influência. O fluido apoplástico (APF) foi obtido por infiltração da folha por vácuo (Fig.1) (Guerra-Guimarães *et al.* 2009b, 2014) e os polipeptídos das proteínas recuperadas foram separados por 2-DE e subseqüentemente identificados por MALDI-TOF-MS, seguido de pesquisa de homologia em bases de dados de EST de cafeeiro. A análise bioinformática revelou que a maioria das 195 proteínas identificadas estão envolvidas no metabolismo da parede celular e na resposta ao stress/defesa. Embora a maior parte

das proteínas siga o mecanismo de secreção clássica, uma pequena percentagem delas parece resultar da secreção não convencional (sem péptido sinal clássico).

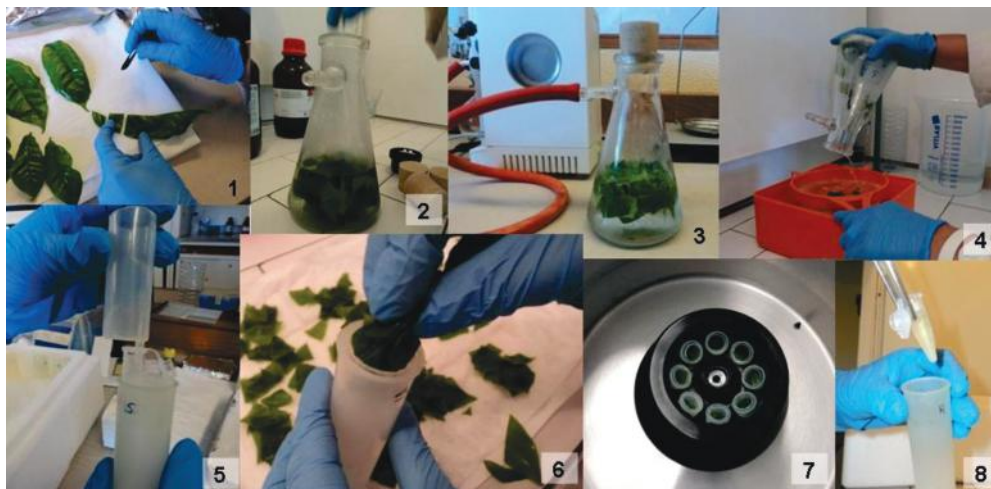


Figura 1. Esquematização do processo de extração do fluido apoplástico das folhas de cafeeiro obtido por infiltração por vácuo. As folhas são cortadas em fragmentos (1) que são colocados numa solução tampão (2) e infiltrados por aplicação de vácuo durante 5 períodos de 30 segundos (3). Os fragmentos são lavados com água destilada (4) e em seguida introduzidos numa seringa, contendo na ponta um tubo *ependorff* (5,6), sendo todo o conjunto, por sua vez, introduzido num tubo e centrifugado a 5000g durante 15 min a 4°C (7). O fluido intercelular recolhido no *ependorff* (8) é congelado a -20°C até ser utilizado (Guerra-Guimarães *et al.* 2014).

A análise de componentes principais revelou que as proteínas do APF formaram dois grupos distintos, com a amplitude térmica a contribuir para esta separação (maior ou menor do que 10°C, respectivamente). Sessenta e um *spots* polipeptídicos permitiram definir estes dois grupos e 28 proteínas foram identificadas, estando envolvidas no metabolismo proteico (degradação e glicosilação), metabolismo da parede celular (degradação e modificação) e enzimas pertencentes a famílias de diferente natureza (Fig. 2). Curiosamente as proteínas de stress/defesa apareceram como mais abundantes no grupo I que está associado com uma maior amplitude de térmica. Parece que as proteínas identificadas no APF da folha de cafeeiro podem ser fundamentais na modulação de ligeiras modificações estruturais no apoplasto que são cruciais para o desenvolvimento/adaptação da planta às condições ambientais prevalentes (Guerra-Guimarães *et al.* 2014). Esse conhecimento, isto é, proteínas comuns que têm um papel relevante, poderia ser um ponto de partida para uma análise mais profunda dos mecanismos envolvidos nas respostas de stresse do cafeeiro.

Proteínas candidatas a biomarcadores de resistência contra a H. vastatrix

Neste estudo a análise proteómica do APF das folhas de cafeeiro foi realizada para investigar os processos celulares associados às interações *C. arabica*-*H.vastatrix* incompatíveis (resistentes) e compatíveis (suscetíveis), durante o período 24-96h após a inoculação (hai). A análise comparativa dos géis 2-DE revelou 210 *spots* polipeptídicos cuja abundância relativa variou entre as amostras (controlo, resistente e susceptível) durante o período 24-96hai. As proteínas identificadas estavam maioritariamente envolvidas na degradação de proteínas, metabolismo da parede celular e respostas de stress/defesa (Fig.2), sendo 70% delas

hidrolases, particularmente hidrolases de açúcares e peptidases/proteases. As alterações detectadas no proteoma do APF ao longo do processo de infecção revelou duas fases distintas na resposta de defesa, uma inicial/basal (24-48 hai) e outra tardia/específica (72-96 hai). Em comparação com a susceptibilidade, a resistência esteve associada a um maior número de proteínas, o que foi particularmente evidente na fase mais tardia/específica da resposta.

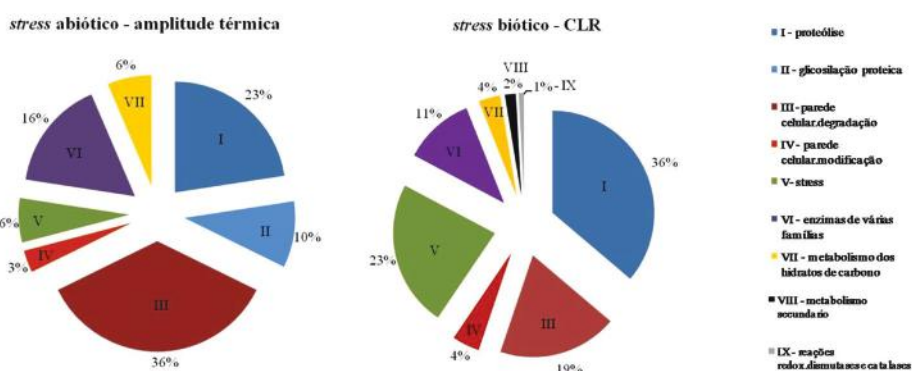


Figura 2. Caracterização funcional dos processos biológicos das proteínas identificadas no apoplasto das folhas de cafeeiro, com base na ontologia de “MapMan Bin” e “GO” (Lohse et al. 2014; Conesa & Götz, 2008). Adaptado de Guerra-Guimarães et al. 2014, 2015.

As proteínas envolvidas na resposta de resistência foram principalmente, glico-hidrolases (GHs) da parede celular, proteases de serina (subtilases e carboxipeptidases) e proteínas relacionadas com a patogenicidade (proteínas-PR). As GHs conferem grande plasticidade aos polissacarídeos da parede celular, as proteases (juntamente com fosfatases) estão envolvidas na regulação das proteínas da parede celular através de PTMs e as proteínas PR estão

diretamente envolvidas na atividade antifúngica. Estes resultados sugerem que algumas GHs, proteases e proteínas PR são possíveis candidatos a marcadores de resistentes de cafeeiro à CLR. Anticorpos produzidos contra quitinase, pectinesterase, serina carboxipeptidase, reticulina oxidase e subtilase foram utilizados num ensaio de imunodeteção, tendo-se observado um aumento destas proteínas na amostra resistente (Guerra-Guimarães *et al.* 2015). A fiabilidade destes possíveis marcadores de resistência está a ser avaliada em várias cultivares de cafeeiro com valor comercial. Os genes correspondentes aos marcadores proteicos poderão ser integrados em programas de melhoramento visando a selecção, assistida por marcadores, de genótipos com resistência a *H. vastatrix*.

CONCLUSÕES

A proteómica quantitativa tem-se mostrado muito útil quando se pretende investigar problemas biológicos que necessitam do estudo comparativo de amostras em diferentes situações ambientais. A comparação das proteínas do APF das folhas de cafeeiro cuja abundância relativa variou, quando sujeitas a diferentes amplitudes térmicas (stress abiótico) e quando infectadas com *H. vastatrix* (stress biótico), permitiu verificar a existência de uma forte analogia nestes dois processos. Mais de 50% das proteínas cuja abundância relativa variou estavam envolvidas na proteólise e na degradação da parede celular. As principais categorias que diferenciam os dois tipos de stress, biótico e abiótico, foram: *i*) as proteínas de stress/defesa, cujo número e diversidade é muito maior na situação de stress biótico (23% contra 6%); *ii*) as proteínas do metabolismo secundário e *redox* que apenas foram identificadas no stress biótico; *iii*) as proteínas envolvidas no metabolismo de glicosilação proteica que foram apenas identificadas no stress abiótico. No entanto,

para além das diferenças óbvias nos metabolismos celulares induzidos/inibidos que parecem ser característicos de cada tipo de stress, é necessário analisar cuidadosamente as proteínas dos processos metabólicos que foram comuns aos dois tipos de stress. É possível encontrar diferentes proteínas com funções metabólicas semelhantes e/ou as mesmas proteínas, com ligeiras modificações estruturais (PTMs, isoformas, etc), modulando de modo relevante as respostas às condições ambientais prevalentes. Só o conhecimento profundo do tipo, função e quantidade de proteínas expressas em determinado momento, condição e compartimento celular poderá vir a ser integrado com informações de outras áreas e, no futuro, gerar conhecimento que possa ser utilizado na fenótipagem de variedades tolerantes/resistentes. A análise integrativa dos dados da transcritômica com os da proteômica e metabolômica será fundamental para melhor compreensão dos sistemas biológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abril, N.; Gion, J.M.; Kerner, R.; Mueller-Starck, G.; Navarro Cerrillo, R. M.; Plomion, C. Proteomics research on forest trees, the most recalcitrant and orphan plant species. *Phytochemistry*, v.72, p.1219-1242, 2011.

Agrawal, G. K.; Jwa, N.S.; Lebrun, M.H.; Job, D.; Rakwal, R. Plant secretome: Unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics*, v.10, p.799-827, 2010.

Conesa, A.; Gotz, S. Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics. *Int J Plant Genomics*, 619832, 2008.

Delaunoy, B.; Jeandet, P.; Clément, C.; Baillieux, F.; Dorey, S.; Cordelier, S. Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies. *Front. Plant Sci*, v. 5, p.249, 2014.

Ding, Y.; Wang, J.; Wang, J.; Stierhof, Y.D.; Robinson, D.G.; Jiang, L. Unconventional protein secretion. *Trends in Plant Science*, v.17, p.606-615, 2012.

Diniz, I.; Talhinhos, P.; Azinheira, H. G.; Várzea, V.; Medeira, C.; Maia, I. Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. *Eur. J. Plant Pathol*, v.133, p.141–157, 2012.

Fernandez, D.; Santos, P.; Agostini, C.; Bon, M.C.; Petitot, A.S.; Silva, M.C. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Mol Plant Pathol*, v.5, p.527-536, 2004.

Fernandez, D.; Tisserant, E.; Talhinhos, P.; Azinheira, H. G.; Vieira, A.; Loureiro, A. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals *in planta* expressed pathogen secreted proteins and plant functions expressed in a late compatible plant-rust interaction. *Mol. Plant Pathol*, v.13, p.17–37, 2012.

Guerra-Guimarães, L.; Cardoso, S.; Martins, I.; Loureiro, A.; Bernardes, A.S.; Varzea, V. Differential induction of superoxide dismutase in *Coffea arabica*-*Hemileia vastatrix* interactions. In: 22th International Conference on Coffee Science (ASIC2008), 2008, Campinas, Brazil. Proceedings. Paris: Association for Science and Information on Coffee (Ed.), 2009a. p.1036–1039.

Guerra-Guimarães, L.; Silva, M.C.; Struck, C.; Loureiro, A.; Nicole, M.; Rodrigues Jr, C.J. Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. *Biologia Plantarum*, v.53, p.702-706, 2009b.

Guerra-Guimarães, L.; Vieira, A.; Chaves, I.; Pinheiro, C.; Queiroz, V.; Renaut, J.; Ricardo, C. P. Effect of greenhouse conditions on the leaf apoplastic proteome of *Coffea arabica* plants. *Journal of Proteomics*, v.104, p.128-139, 2014.

Guerra-Guimarães, L.; Tenente, R.E.; Pinheiro, C.; Chave, I.; Silva, M.C.; Cardoso, F.; Planchon, S.; Barros D.R.; Renaut, J.; Ricardo, C.P. Proteomic analysis of apoplastic fluid of *Coffea arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*. *Frontiers in Plant Science – Plant Proteomics*, v.6, p.478, 2015.

Jorrín-Novo, J.V.; Pascual, J.; Sánchez-Lucas, R.; Romero-Rodríguez, M.C.; Rodríguez-Ortega, M.J.; Lenz, C.; Luis Valledor, L. Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: Moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. *Proteomics*, v.15, p.1089–1112, 2015.

Lohse, M.; Nagel, A.; Herter, T.; May, P.; Schroda, M.; Zrenner, R. Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. *Plant Cell Environ*, v.37, p.1250-1258, 2014.

Pinheiro, C.; Guerra-Guimarães, L.; David, T.S.; Vieira, A. Proteomics: State of the art to study Mediterranean woody species under stress. *Environmental and Experimental Botany*, v.103, p.117-127, 2014.

Santos, P.M.; Teixeira, M.C.; Sá-Correira, I. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microrganismos. *Boletim de Biotecnologia*, v.77, p.7-17, 2004.

Silva, M.C.; Nicole, M.; Guerra-Guimarães, L.; Rodrigues Jr, C.J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.60, p.169-183, 2002.

Silva, M.C.; Várzea, V.M.; Guerra-Guimarães, L.; Azinheira, H.; Fernandez, D.; Petitot, A.S. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. J. Plant Physiol*, v.18, p.119-147, 2006.

Silva, M.C.; Guerra-Guimarães, L.; Loureiro, A.; Nicole, M.R. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.72, p.29-38, 2008.

Soares, T.C.B; Queiroz, V.T.; Guimarães, L.C.E.G; Miranda, F.D.; Lima, A.B.P. Princípios básicos em proteômica vegetal. In: Dirceu Pratisoli (Ed.). *Tópicos Especiais em Produção Vegetal III*. Alegre, ES: UFES, Centro de Ciências Agrárias, 2012. p.119-148.

Rodrigues, Jr. C.; Bettencourt, A.; Rijo, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annu. Rev. Phytopathol*, v.13, p.49-70. 1975.

Rojas, M.L.; Montes de Gómez, V.; Ocampo, C.A. Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting

hypersensitively to the coffee leaf rust. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, v.43, p.209-219, 1993.

Várzea, V.M.P.; Marques, D.V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance. in: Zambolim, L.; Zambolim, E.; Várzea, V.M.P. (Eds). *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*; Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. p.53–74.

Zivy, M.; Wienkoop, S.; Renaut, J.; Pinheiro, C., Goulas, E.; Carpentier, S. The quest for tolerant varieties: the importance of integrating “omics” techniques to phenotyping. *Frontiers in Plant Science – Plant Proteomics*, v.6, p.448, 2015.

Inovação aplicada à fertilidade do solo uma experiência de vida

¹Roberto Ferreira Novais

INTRODUÇÃO

Atualmente, pelos elevados valores do fator de impacto (FI) ansiosamente perseguidos em nossas publicações, cobrados pelas nossas universidades para que sejam mais bem ranqueadas entre as melhores, uma indagação que me faço e que se tem tornado persistente nos últimos anos, diz respeito ao retorno quanto à inovação tecnológica que minhas publicações científicas podem ter trazido.

À medida que rumo para o término de meu quase meio século de vida acadêmica, o sentimento que me domina é o de que as quase três centenas de trabalhos publicados sobre fertilidade de solo e nutrição de plantas foram modestos, nebulosos mesmo quanto à clareza objetiva de suas aplicações. Houve muita energia gasta de minha parte, de meus alunos, de laboratoristas, gastos

¹Universidade Federal de Viçosa, Instituto de Ciências Agrárias
Campus Rio Paranaíba, Minas Gerais
E-mail: rnovais@ufv.br

financeiros de toda ordem como financiamentos à pesquisa, com a infraestrutura disponível, etc. Certamente, ou, provavelmente, algo parecido ocorre com outros pesquisadores.

Como há algum tempo esta questão me aflige, alguns textos meus já foram escritos e apresentados em publicações de divulgação sem o crivo do "peer review" dos artigos científicos. Como esses textos retratam o que agora, mais intensamente, penso sobre o assunto, eu os transcrevo como um suporte para o texto apresentado neste capítulo.

"Quando acompanhamos a evolução agrícola dos solos do Cerrado, de uma posição que apenas fazia com que uma cidade ficasse longe uma da outra (comentário de um professor americano que conhecia o Brasil desde a década de 1960, antes do "Cerrado" atual) para uma agricultura que atualmente enche os olhos de qualquer um (palavras também desse mesmo professor em viagens mais recentes, às mesmas regiões visitadas no passado), sentimos, como cidadãos, pesquisadores, orgulhosos da grandiosidade dessa evolução. A comunidade acadêmica e científica mundial nos respeita mais agora pela nossa agricultura exuberante, de um modelo que poderá ser repetido em outras partes semelhantes do mundo, onde, ainda hoje, apenas servem para aumentar as distâncias entre cidades... As soluções para esses solos vieram de pesquisas, muitas publicadas em revista sem indexação naquela época inicial dos maiores achados, sem medidas de FI, típicas das "gray literatures".

História semelhante tem o eucalipto no Brasil. Em 1970 não se sabiam detalhes menores dessa cultura, como tolerância à acidez, exigências nutricionais, espécies a serem usadas (não se falava ainda sobre clones) e tantos outros. Hoje, nossas florestas são visitadas por silvicultores, professores e pesquisadores de todo o mundo, para entender como em seis anos conseguimos produzir

300 m³/ha de madeira! De novo, toda a ciência que sustentou esta meteórica evolução não apresenta FI de revistas onde foi publicada, essencialmente maior que zero; de novo, mais "gray literatures". Há diversos exemplos adicionais a esses dois: Cerrado e Eucalipto, com a participação efetiva no PIB brasileiro e, nestes casos sim, com excelente correlação com o IDH da população envolvida.

Na sua fase inicial da concessão do Prêmio Nobel, os escolhidos tinham nas pesquisas impactantes da época a razão para a premiação. Mais recentemente, os escolhidos têm, em muitos casos, em suas antigas descobertas científicas, que se mostraram transformadoras do conhecimento e de grande retorno à humanidade, ao longo dos anos ou de décadas, o tempo necessário à comprovação da escolha correta.

Há, então, um perfil inovador para a concessão do Prêmio Nobel: a comprovação de fato, da importância da descoberta para a humanidade. Não há como errar, ou se erra menos desta maneira.

Pode-se concluir que mesmo que nossos pesquisadores que mudaram o Cerrado, as florestas de eucalipto, a cafeicultura, a bovinocultura-Nelore tenham em suas publicações FI zero, que nossas revistas científicas estejam claudicando numa luta desigual para aumentar os seus FIs em comparação às melhores do primeiro mundo, é difícil conceber a importância plena dessa medida, vista de uma maneira numérica, simples em que indivíduos, revistas, instituições de pesquisa são "medidos" e ranqueados em um dado momento, sem os resultados de qualidade comprovada em um período de tempo longo o necessário.

Certamente, se houvesse o prêmio Nobel para grandes alterações que a ciência fez para a Humanidade, a utilização Agrícola do Cerrado, o cultivo do eucalipto no país, dentre outros, seriam fortes candidatos a essa honraria.

Não sou contra FI (seria muita ingenuidade). Preocupa-me o fato de em nosso País (como no resto do mundo) aqueles envolvidos em ranquear pessoas, revistas, instituições... não discutam sobre como usar bem e, se possível, rever alguns dos componentes do que se chama "qualidade" para o usuário de nossa ciência ou como foi a evolução histórica desta ciência para se chegar à essencial medida de sua qualidade atual (Novais, 2008).

Houve um "upgrade" da máxima "Publish or Perish" para "Publish with high impact factor or Perish". E não deveria haver também um FI para a extensão das informações veiculadas naqueles artigos?

Nossas pesquisas são crescentemente mais complexas, com aplicação mais universal, com o intuito de tê-las publicadas em revistas com maiores FIs e não com informações de interesse local, condição para menores FIs. Tê-los escritos em inglês é essencial a uma condição para que tenham visibilidade. Visibilidade para quem? Portanto, estamos rumando para uma condição curiosa, da vaidade pessoal ou institucional, numa procura crescente de melhores "estatísticas" na ciência mundial.

Percebo, por outro lado, que a informação fragmentada dos artigos científicos, de modo geral com pouca efetividade para a extensão, torna-se interessante, mais útil ao seu usuário final, quando um pesquisador junta em sua preleção esses fragmentos, dando-lhes uma ideia de conjunto, de consistência inteligível a uma plateia interessada na utilização prática de toda a informação apresentada. Pode-se concluir que a organização de ideias individuais num todo mais coeso, com suas interdependências bem estabelecidas, a compreensão deste e sua "extensão" para aplicação prática torna-se muito mais eficiente. Algo semelhante acontece quando esses artigos são ordenados e "temperados" nos bons livros escritos por aqueles que querem, por exemplo, deixar

sua vida científica registrada em uma leitura organizada e que, se individualizada nos artigos, seria de pouca utilidade quanto à sua compreensão prática - sua extensão.

Assim, pode-se conjecturar que aulas e palestras, de modo particular aquelas que têm como origem uma densa vida científica de seu autor, ou que seus livros, com características semelhantes às indicadas para as palestras e aulas, seriam uma maneira de aproximarmos a Ciência do Solo aos seus usuários. Todavia, de modo particular em nosso País, palestras e livros não são bem-vindos nos Curriculae Vitarum (CVs), normalmente desconsiderados como medidas de qualificação do pesquisador.

No passado, em 1968, o CNPq estabeleceu uma bolsa para "Pesquisador Conferencista", não mais existente. Não seria hora de repensar tudo isto?

Quanto aos livros, estimular e dar o real valor àqueles com o perfil de qualidade indicado anteriormente, separando-os das "coletâneas de capítulos" que, em muitos casos, constituem-se de citações infundáveis das informações fragmentadas dos artigos científicos?" (Novais, 2012).

A seguir, apresento um breve conteúdo daqueles trabalhos que tiveram meu envolvimento e que, com um alto grau de otimismo, mais me pareceram úteis para a possível evolução da Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas. Alguns deles nem mesmo foram publicados.

A DIFÍCIL IDENTIFICAÇÃO DA DEFICIÊNCIA FOLIAR DE MANGANÊS EM SOJA

Verificou-se, há algumas décadas, que o sintoma visual de deficiência nutricional na soja, caracterizado por uma clorose internerval nas folhas basais, era causado pela deficiência de Mn e

não de Mg, como se supunha, na região do PADAP – Alto Paranaíba. Houve recomendações de um calcário dolomítico que, se aplicado, teria intensificado o problema, em consequência do aumento do pH do solo, que já se encontrava muito alto. A acidificação do solo com H_2SO_4 para pH próximo a 5,0 – 5,5 (Figura 1), não mais permitiu que o sintoma ocorresse (Novais et al, 1989).

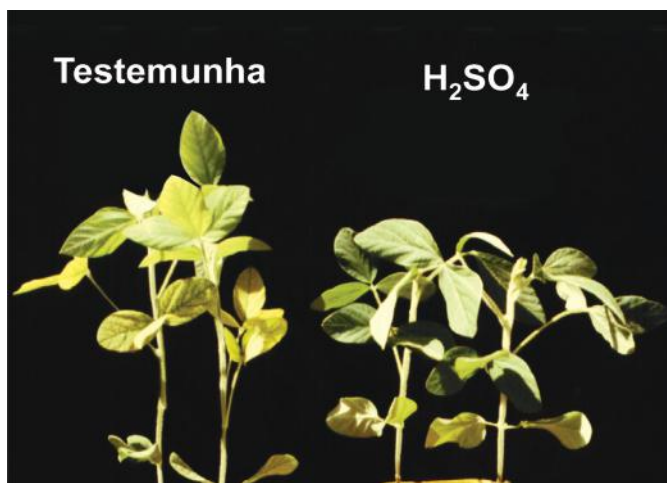


Figura 1. Plantas com deficiência de manganês à esquerda, com clorose internerval nas folhas basais, cultivadas em solos com pH acima de 6,5 e à direita plantas sem o sintoma, em solo acidificado com ácido sulfúrico.

O curioso é que, ainda hoje, é comum encontrar-se deficiência de Mn em diversos cultivos de olerícolas na região, devido ao elevado pH dos solos.

O NÍVEL CRÍTICO FOLIAR DE SOJA VARIA COM O PODER TAMPÃO DE FÓSFORO DO SOLO

Verificou-se, pela primeira vez, que o nível crítico foliar de P em soja varia com o poder tampão ou fator (PTF) capacidade de P no solo. Assim, nos solos arenosos, o nível crítico é maior que nos argilosos. Maior acúmulo de P inorgânico na planta nos solos com menor PTF, como nos arenosos, para o mesmo status nutricional de P na planta, justifica o observado (Tabela 1). Conjectura-se que alimentos obtidos em solos submetidos a menor intemperismo (menor PTF) apresentem, de modo geral, menor conteúdo de P que aqueles obtidos em solos tropicais mais intemperizados (Muniz et al., 1985; Fabres et al., 1987).

Tabela 1. Concentrações críticas de diferentes frações de fósforo na parte aérea de plantas de alface em diferentes solos.

Solos	Frações de fósforo			
	Pts	Pi	Pos	Pt
	----- mg P/Kg de mat. fresca -----			dag/kg
LV-1	350	278	72	0,67
LVA-1	316	235	81	0,61
LVA-2	273	217	56	0,53
LVA-3	237	162	75	0,52
LV-2	210	150	60	0,47
LV-3	101	38	63	0,40

Fonte: Fabres et al. (1987).

Pts: P total solúvel em ácido; Pi: P inorgânico; Pos: P orgânico solúvel e Pt: P total (nítrico-perclórica).

FOSFATAGEM *versus* APLICAÇÃO LACALIZADA DE FÓSFORO

Depois de longa revisão, chegamos à conclusão de que a aplicação de uma fonte de P em solos, para o cultivo de plantas, deve ser localizada, com grande economia na dose recomendada.

Essa economia é da ordem de cinco a seis vezes, quando comparada à dose para a fosfatagem de 0-20 cm de profundidade e a dose localizada, em um solo com muito baixa disponibilidade de P. Essa comparação foi modelada em um capítulo do livro de Novais e Smyth (1999), confirmada em trabalhos sobre soja (Tabela 2) (não publicados), e sobre eucalipto (Tabela 3), em trabalho publicado por Fernandez et al, (2000) e, mais recentemente, em cultivos de olerícolas (Tabela 4) na região de Cerrado de Rio Paranaíba (trabalhos não publicados). A verificação que a planta como agente solubilizador de fosfatos (fonte de prótons e drenos de P e de Ca) beneficia-se dessa fonte, função semelhante ao solo que também gera solubilização da rocha sem, contudo, a correspondente liberação do P para a planta (Figura 2). Mecanismos semelhantes, embora mais rápidos, ocorrem com relação à aplicação de uma fonte solúvel e o antagonismo entre os drenos planta e solo. Para mim, os passos iniciais da compreensão deste processo (fosfatagem *versus* aplicação localizada de P) encontra-se entre minhas mais significativas contribuições científicas.

Tabela 2. Produtividade de soja (três anos), em resposta ao modo de aplicação do fertilizante no sistema plantio direto.

Aplicação ⁽¹⁾		Média
A lanço	Sulco	
----- % -----	-----	sacas ha ⁻¹
0	100	60,5
25	75	59,2
50	50	57,8
75	25	54,8
100	0	50,5
Sem adubo		38,4

(1) Adubação com 400 kg ha⁻¹ da formulação 4-23-23 + Ca = 4,5%; S = 2,5 %; Zn = 0,3%; B = 0,2% e Cu = 0,15%.

Fonte: Fundação MT.

Avanços Tecnológicos Aplicados à Pesquisa na Produção Vegetal

Tabela 3. Produção de biomassa e recuperação de fósforo por eucalipto influenciados por fontes, doses e modo de aplicação do fertilizante.

Fosfato natural	Fonte solúvel	Modo de aplicação	Biomassa aérea	P recuperado
----- Kg/ha de P -----			t/ha	%
<i>Eucalyptus camaldulensis</i> - 9,7 anos				
0	0		63	-
172	0	Faixa	81	8,0
172	0	Sulco	114	16,6
41	23	Faixa/cova	99	9,8
41	23	Sulco/cova	148	35,6

Fonte: Fernandez et al. (2000).

Tabela 4. Resposta da cultura da batata à aplicação de fósforo a lanço (L) e no sulco (S) de plantio em solo de Cerrado.

Tratamento	Produtividade (sc/ha)
Sem P	280 b
1500 kg/ha de 08-30-08 (L)	322 b
1500 kg/ha de 08-30-08 (S)	490 a
2000 kg/ha de 08-30-08 (L)	334 b
2000 kg/ha de 08-30-08 (S)	554 a
1500 kg/ha de 08-30-08 (L) + 1200 kg/ha de SS (L)	349 b
1500 kg/ha de 08-30-08 (S) + 1200 kg/ha de SS (L)	502 a
1500 kg/ha de 08-30-08 (S) + 1200 kg/ha de SS (S)	565 a
1500 kg/ha de 08-30-08 (S) + 600 kg/ha de SS (S)	541 a
1500 kg/ha de 08-30-08 (S) + 300 kg/ha de SS (S)	523 a

Fonte: Prof. Leonardo A. Aquino (dados não publicados).

Cultura anterior: milho silagem. P-Mehlich-1 = 25 mg/dm³; P-remanescente = 17 mg/L.

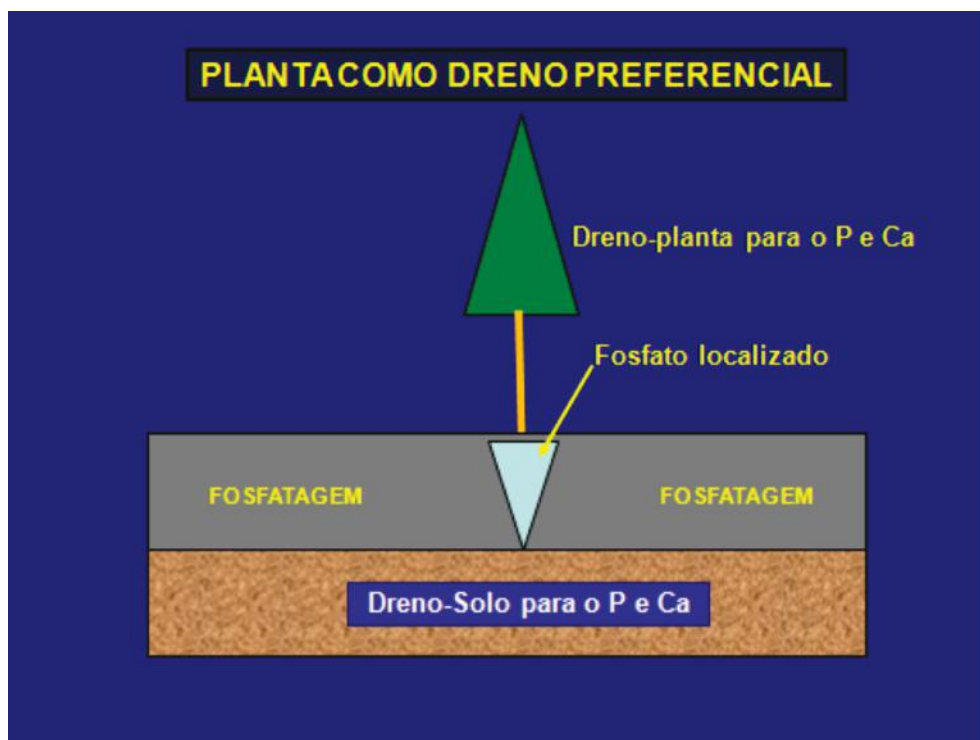


Figura 2. Comparação entre a planta e o solo como drenos-P e Ca quanto a efetividade da aplicação localizada de P em relação à fosfatagem.

“EUCALIPTO FELIZMENTE EXISTE”

Título de uma palestra apresentada em diversas partes do país na última década, com retorno bastante positivo, de modo particular para o setor Florestal Brasileiro (Figura 3).

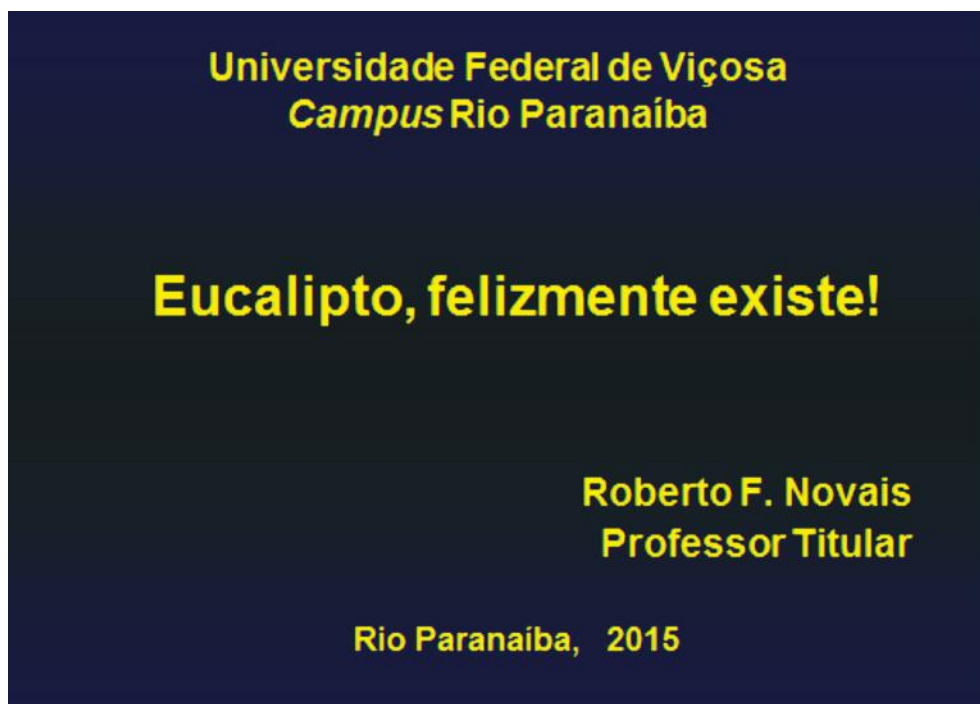


Figura 3. Título de palestra apresentada sobre o eucalipto quanto aos chavões “eucalipto seca o solo”, “eucalipto empobrece o solo”, dentre outros.

Procura-se com esta palestra contra argumentar chavões equivocados, apresentados pela sociedade, de modo geral, e mesmo por alguns professores universitários, tais como: “o eucalipto seca o solo”, “o eucalipto empobrece o solo”, etc. Utilizo argumentos que indicam que “felizmente o eucalipto seca o solo” uma vez que esta é uma função precípua de árvores, no sentido de esvaziar o solo de águas de chuvas, aumentando a umidade atmosférica, para a estocagem de “nova” entrada de água do período chuvoso seguinte, num ciclo de renovação de umidade e de chuvas. Essa função não é exclusiva do eucalipto, como também não lhe é sobreviver em um solo com muito baixa disponibilidade hídrica.

“Felizmente o eucalipto empobrece o solo”, como de fato também acontece naqueles da floresta Atlântica ou da Amazônia, por serem solos muito intemperizados, com baixa densidade de cargas positivas e muito alta adsorção iônica, tornando-se um substrato com baixo poder de retenção de cátions e, inconvenientemente, alto de ânions como o fosfato e, portanto, com alto poder de perdas de nutrientes. Imobilizados nas árvores, os nutrientes encontram-se em um ambiente mais conservador.

A ORQUIDOFILIA E A ORQUIDOLOGIA

Cultivo seminífero de orquídeas

Embora fosse inicialmente apenas um hobby, tornou-se material de pesquisa, com o envolvimento de estudantes de IC e de pós-graduação.

Na fase inicial desse período, desenvolvi uma técnica para germinação de sementes em um ambiente caseiro, sem as condições de assepsia comum aos laboratórios de cultura de tecidos. Essa técnica implicou a substituição de uma “câmara de fluxo laminar” por uma seringa descartável de 20 mL (Figura 4), onde as sementes são desinfestadas em uma solução de hipoclorito de sódio (água sanitária comercial – ASC - a 10 % v/v) e submetidas a uma agitação por 15 min. A solução de ASC é descartada, utilizando-se uma agulha fina – para aplicação muscular – e água autoclavada (em panela de pressão) é succionada para esta seringa, para lavar resíduos de ASC das sementes. Por a agulha ser fina, as sementes ficam retidas na seringa. As sementes, agora suspensas em água autoclavada, são transferidas para um frasco com meio de cultura, através de um furo na tampa, substituindo-se a agulha fina por

uma de diâmetro maior, de uso veterinário, o que permite a saída das sementes, agora desinfestadas, para o frasco com o meio (Figura 5). O nível de contaminação é muito baixo e semelhante aos obtidos em laboratórios de cultura de tecidos (Figura 6). O recultivo (transferência de plantas para um meio novo em outro frasco) também dispensa a capela de fluxo laminar, ao borrifar sobre as plantas transferidas do frasco de semeadura para o de recultivo uma solução de 2 a 5% de ASC, sobre o frasco aberto para com as novas mudas transferidas.

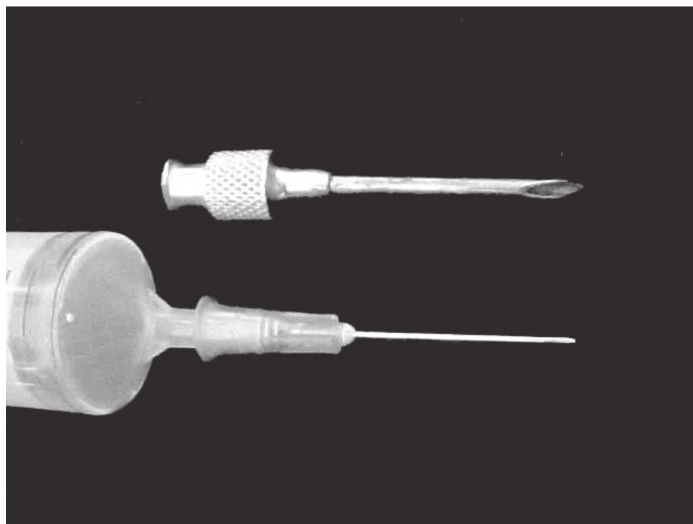


Figura 4. Utilização de seringa descartável para germinação de sementes de orquídeas em substituição a câmara de fluxo laminar.

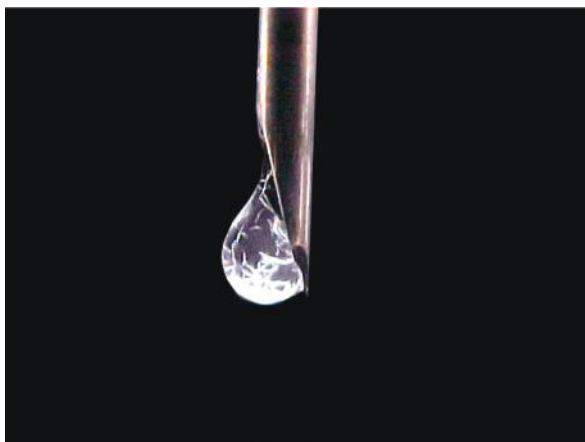


Figura 5. Utilização de agulha grossa, de uso veterinário com uma gota de sementes em suspensão que serão injetadas em um frasco de cultura.

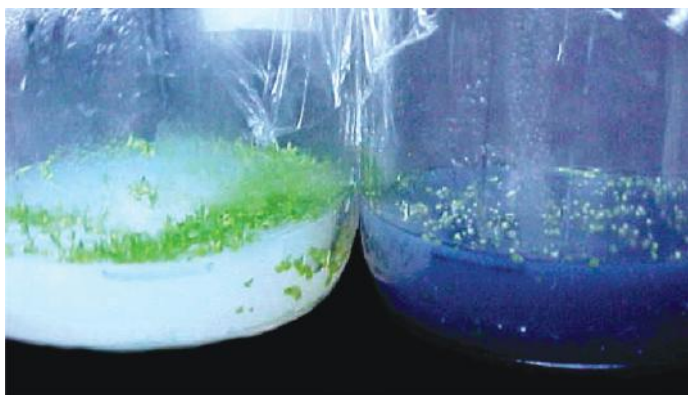


Figura 6. Sementes germinadas nos frascos de semeio de orquídea. Frascos à esquerda e à direita respectivamente sem e com carvão ativado.

Mesmo a preparação de meios de cultivo, sem autoclavagem, substituída pela adição ASC no meio ainda quente, não solidificado, tem mostrado ser eficiente como desinfestante. Elimina-se, neste

caso, a necessidade de uma autoclave e câmara de fluxo laminar, simplificando, em muito, todo o procedimento de cultivo seminífero de orquídeas, que antes era exclusivo de laboratórios de alta tecnologia.

Embora algumas dessas técnicas tenham sido aprimoradas por pesquisas de pós-graduação, dando-lhes o rigor científico necessário, elas foram desenvolvidas sem o suporte utilizado no processo científico.

Novos meios de cultura foram também desenvolvidos (Figura 7).

Considero ser este um dos aspectos da criação científica que mais satisfação me trouxe. Ele tem como característica o não envolvimento prévio de informações cadastradas em artigos científicos, mas a utilização de fragmentos de conhecimento da Biologia que permitem o processo dedutivo/criativo fora dos trâmites usuais do processo científico tradicional.

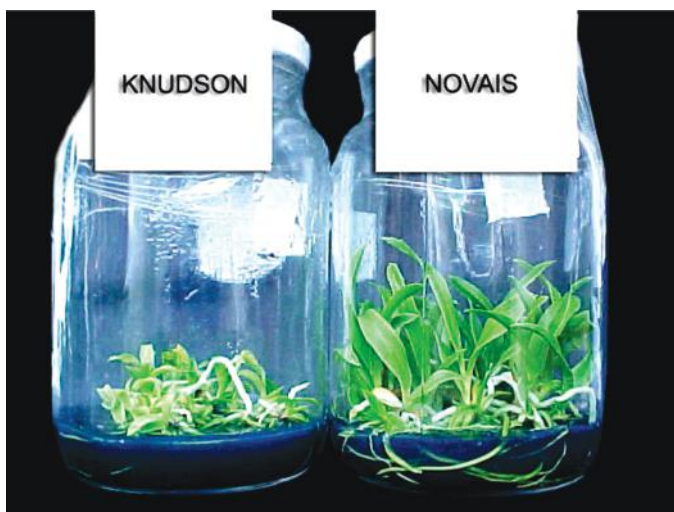


Figura 7. Meios de cultura para germinação de orquídeas; À esquerda um meio tradicional e à direita o que desenvolvemos.

SUBSTRATO PARA CULTIVO

Ainda sobre orquídeas, substituí o tradicional xaxim, utilizado como substrato para o cultivo desta planta, com exploração comercial proibida pelo IBAMA, por uma mistura de seixos rolados de quartzo (da peneiragem de areia lavada para construção), com carvão, meio a meio em volume (Figura 8), obtendo excelentes resultados (Figura 9). Atualmente utilizada generalizadamente a casca de pinus tem como inconveniente sua decomposição rápida e como consequência uma intensa imobilização de nitrogênio, principalmente, e de outros nutrientes. A instabilidade desse substrato causa uma baixa sustentabilidade da qualidade das plantas cultivadas, tornando-as debilitadas ao longo do tempo, com mau crescimento e má floração. De novo, a opção para esse substrato estável foi dedutiva, sem testes teóricos prévios, dentro da combinação de conhecimentos científicos diversos.



Figura 8. Substrato para cultivo de orquídea constituído por seixos rolados e carvão em substituição ao xaxim.



Figura 9. Muda frágil de orquídea recém plantada no meio com seixos rolados e carvão, mostrando excelente estabelecimento inicial da muda.

HERANÇA DE CORES DE FLORES DO GRUPO DAS “CATLEIAS”

Sobre a genética de orquídeas, é antiga a indagação sobre a herdabilidade das cores de suas flores quando plantas do grupo das “catleias” são submetidas a cruzamentos inter ou intra específicos.

A compreensão desse modelo surgiu como registro fotográfico de progênies de mais de dois mil cruzamentos conduzidos nas últimas três décadas, o que me permitiu modelar a herança das cores das progênies, a partir das cores das flores das matrizes utilizadas nos cruzamentos. Compreende-se, atualmente, a ocorrência de flores com cor magenta apenas, oriundas de um cruzamento entre matrizes de cores brancas (Figura 10) ou de cores brancas e magentas num cruzamento entre duas matrizes de cores magentas (Figura 11).



Figura 10. Cruzamento entre duas matrizes de flores albas de orquídea com progênie de plantas de cor magenta apenas, e genes provavelmente envolvidos.

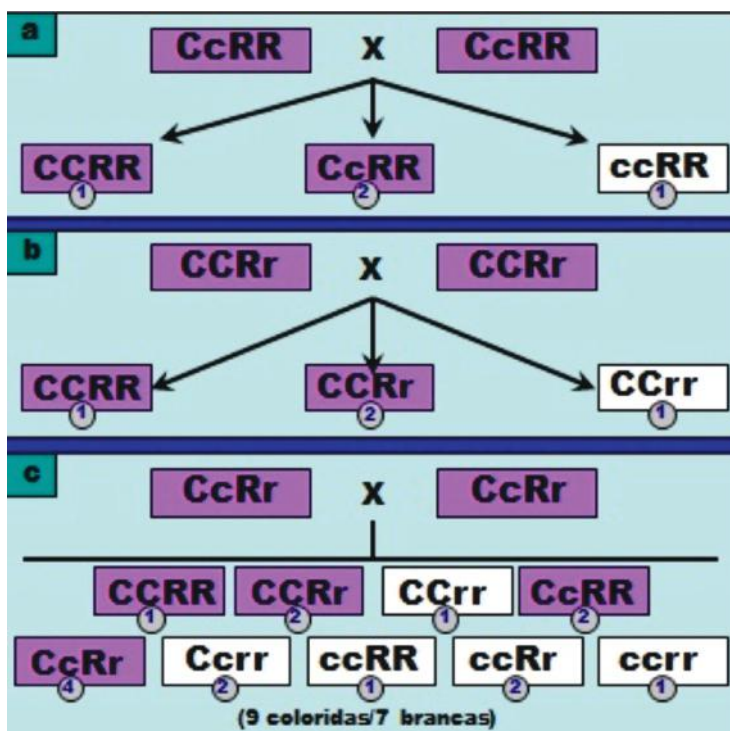


Figura 11. Cruzamento entre duas matrizes de flores coloridas de orquídea com progênie de plantas de cor colorida e alba, e genes provavelmente envolvidos.

Palestras sobre esse modelo já foram apresentadas diversas vezes no país e, mais recentemente, no "II Simpósio Brasileiro sobre o Cultivo de Orquídeas" na UNESP, Campus de Jaboticabal/SP.

Assim, numa vida acadêmica/científica intensa, o não programado, o não construído dentro de um projeto acadêmico, deu-me significativa satisfação pessoal, sem mesmo gerar nenhuma publicação científica sobre o assunto.

RESPOSTAS NÃO USUAIS A ALTAS DOSE DE CALCÁRIO (CÁLCIO) POR PLANTAS DE *PHALAENOPSIS*

Um dos gêneros de orquídea mais comercializado, o *Phalaenopsis*, é extremamente exigente a altas doses de Ca. A verificação desse fato ocorreu quando se observou que plantas emitiam raízes pelos furos no fundo dos vasos e aderiam com avides à brita calcária colocada em uma bancada utilizada como suporte dos vasos (Figura 12). A certeza de que a brita era calcária e não granítica gerou outra constatação: a de que uma dose de calcário equivalente a 10t/ha colocada em um vaso causou, contrariamente ao esperado (acreditava-se ser esta dose exagerada), um resultado muito interessante: um crescimento espetacular da planta submetida ao calcário e pífio da planta submetida a fertilizações usuais recomendadas para orquídeas em geral (Figura 13). De novo, observações esparsas, agrupamento de informações e dedução foram produtivos, com resultados que, em geral, não são obtidos no modelo tradicional da visão reducionista utilizada, com frequência pela ciência.



Figura 12. Raízes de orquídeas aderidas à brita calcária, indicando grande avides da planta por cálcio.



Figura 13. Grande resposta de plantas de *Phalaenopsis* à aplicação de calcário. À esquerda planta com adubação mineral usual e à direita planta com o equivalente de 10 t/ha de calcário.

A REVERSIBILIDADE DE FÓSFORO NÃO-LÁBIL PARA LÁBIL EM SOLOS SUBMETIDOS À REDUÇÃO MICROBIANA OU QUÍMICA NÃO OCORRE

A formação de P não-lábil a partir de formas lábeis, retidas aos oxihidróxidos de Fe Al é a causa para o baixo efeito residual da fertilização fosfatada em solos tropicais. Para a compreensão do modelo envolvido amostras de solos foram previamente submetidas a ambientes de redução dos oxihidróxidos de Fe e Al, constituídos de: solução de sacarose (redução microbiana); oxalato de amônio (redução química de formas amorfas de óxidos); e de citrato-ditionito-bicarbonato - DCB (redução química de formas cristalinas de óxidos). A determinação do P remanescente desses tratamentos, como um indicador da CMAP (Capacidade Máxima de Adsorção de P do solo) mostrou significativo aumento de seus valores após a

reação microbiana, equivalente à redução com DCB (Tabela 5). A incubação prévia aos tratamentos de redução, de uma dose de P com os solos, seguida de extrações sucessivas com resina de troca aniônica, mostrou que a reversibilidade de P não-lábil com a redução microbiana ou química não se concretizou, demonstrando a grande estabilidade dessa forma.

Tabela 5. Valores de fósforo remanescente de amostras dos solos sem redução (N) e submetidas a redução com sacarose (S), com oxalato de amônio (Ox) e com citrato-ditionito-bicarbonato de sódio (CDB).

Solo	N	S	Ox	CDB
	----- mg L ⁻¹ -----			
RQo	37,1	49,8	57,9	60,0
LVd	21,1	41,0	54,4	59,4
LVw	38,1	52,7	56,7	60,0
LVd	29,9	45,8	49,8	58,4
LAdx	29,9	45,8	55,8	60,0
LAd	46,1	51,2	60,0	60,0
LVAd1	3,4	33,0	24,2	47,0
LVAd2	4,8	33,9	26,4	44,5
LVd	4,6	34,9	18,9	47,0
LVd	3,2	31,2	39,9	35,8
LVd	1,8	32,1	18,9	27,2
Média	20,0	41,0	42,1	50,8

Fonte: Fernández et al. (2008).

Pode-se conjecturar que a redução que ocorre em solos hidromórficos, geralmente enriquecidos com carbono orgânico, é bem mais efetiva quanto a futuras fertilizações fosfatadas do que em solos bem drenados, com a expectativa de liberação de formas fixadas de P (P não-lábil) anteriormente adicionado ao solo.

O APARENTE EQUÍVOCO DA NÃO EXTRAÇÃO DE P-Ca PELA RESINA DE TROCA IÔNICA MISTA

O extrator de Mehlich-1 (M-1) foi muito criticado pela sua inconveniente e exagerada extração de P-Ca de solos pouco intemperizados ou, mesmo se muito intemperizados, que receberam fosfatos naturais. A solução passava pela utilização da resina de troca aniônica (RA) na determinação de P disponível de solos, dada sua insensibilidade a forma de P-Ca. Dessa maneira, esse extrator, contrariamente ao M-1, não superestimaria o teor de P disponível em solos ricos em P-Ca. Todavia, com o tempo, para aumentar o espectro de extração da RA, desenvolveu-se a resina mista (RM) para a extração conjunta de ânions e cátions do solo, assumindo-se a não interferência da resina catiônica (RC) adicionada sobre a extração do P pela RA.

Em trabalho recente verificamos que a RM extrai mais P que a RA em solos com mais P-Ca, assemelhando-se ao M-1, deixando de ter a vantagem que a RA sozinha tinha sobre o M-1 nessa condições (Tabela 6). A razão para isto é o fato de a RC imobilizar o Ca proveniente do P-Ca (dreno para Ca além de P) e com isto aumentar a extração de P, o que não ocorre com a RA apenas, por ser dreno apenas para o P solubilizado. Assim, como em todo o processo científico, os modelos disponíveis estão apenas à espera de modelos melhores, numa episódica sucessão evolutiva.

Tabela 6. Fósforo disponível por três extratores em solos que receberam três doses de P na forma dos Fosfatos de Gafsa e de Araxá e do Superfosfato Triplo, para a média de tempos de equilíbrio testados.

Solo	Dose	Resina		Mehlich-1
		Aniônica	Mista	
		----- mg dm ⁻³ -----		
			Controle	
LV	0,0	4,04 ab	4,83 a	1,96 b
LVA	0,0	3,59 a	2,60 ab	0,69 b
LA	0,0	8,06 a	9,70 a	7,86 a
			Fosfato de Gafsa	
LV	75 e 150	16,33 c	38,33 b	45,01 a
LVA	75 e 150	19,06 c	41,76 b	55,47 a
LA	75 e 150	16,07 c	54,83 b	103,82 a
			Fosfato de Araxá	
LV	75 e 150	5,40 c	10,40 b	38,49 a
LVA	75 e 150	5,26 c	10,04 b	44,49 a
LA	75 e 150	9,88 c	17,19 b	84,85 a
			Superfosfato Triplo	
LV	75 e 150	29,11 b	34,62 a	17,47 c
LVA	75 e 150	38,15 b	41,42 a	21,95 c
LA	75 e 150	70,19 b	72,29 a	70,76 ab

Fonte: Freitas et al. (2013).

Médias seguidas pela mesma letra na linha, não difere estatisticamente a 5% pelo teste de Tukey.

A VARIAÇÃO PROPORCIONAL DO NÍVEL CRÍTICO DO FÓSFORO DISPONÍVEL PELO MEHLICH-1 COM O PODER TAMPÃO DE FÓSFORO DO SOLO, COMO ESPERADA, NÃO OCORRE

As tabelas de interpretação de níveis críticos (NC) de P disponível do solo pelo extrator de Mehlich-1 (M-1) tem dupla entrada: uma para o teor encontrado pelo extrator e a outra para uma medida do poder tampão de P (PTF) do solo. Para isso, utiliza-se o teor de argila ou, mais comumente, a concentração do P remanescente (P rem), Esse modelo estabelece que, com o aumento do PTF, o nível crítico de P M-1 torna-se menor dado o desgaste do poder de extração deste extrator. Assim, em solos argilosos, por exemplo, o NC é menor que nos solos arenosos – nos primeiros os teores do disponível são subestimados em relação aos arenosos.

Conseqüentemente, as tabelas de interpretação da disponibilidade do P pelo M-1 e recomendação de fertilizantes fosfatados variam proporcionalmente (inversamente) com o P rem do solo. Isto parecia indiscutível até recentemente. Verificamos que o desgaste da acidez do M-1 é pouco expressivo, o que manteria a esperada linearidade entre os NC do P M-1. Por outro lado, o desgaste descontínuo, não linear, do sulfato desse extrator indica um modelo também descontínuo, não linear, para a interpretação do P disponível de solos pelo M-1 (Novais et al, 2015), contrariamente ao adotado até então (Figura 14).

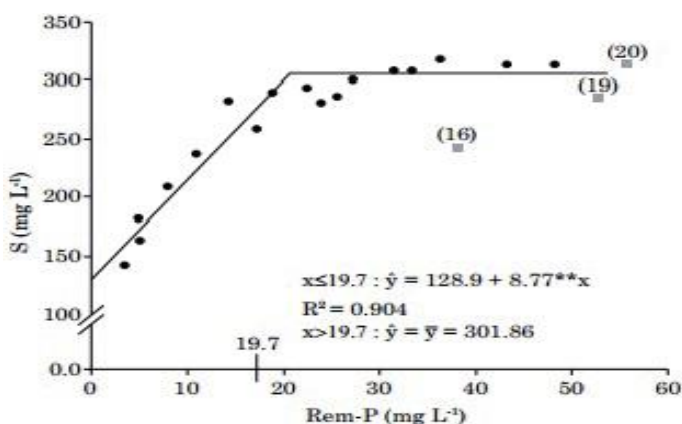


Figura 14. Teor de enxofre no extrato-solo do Mehlich-1, como variável dos valores de P remanescente (P-rem) dos solos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meu sentimento nesta altura de minha vida acadêmica e de pesquisador é a de algo parecido com o brinquedo de blocos de montar “Legos”. As peças individuais (os artigos científicos ou os blocos – peças) correspondem a um amontoado de formas, cores e

tamanhos disformes. Todavia, quando montados, organizados em uma estrutura única tornam-se criativos, interessantes, espetaculares mesmo, quando os blocos ou artigos científicos individualizados o permitem. Se, individualmente, esses blocos forem limitados em número ou qualidade, os resultados possíveis de suas montagens tornam-se pífios, modestos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Fabres AS, Novais RF, Neves JCL, Barros NF, Cordeiro AT. Níveis críticos de diferentes frações de fósforo em plantas de alface cultivadas em diferentes solos. Rev. Bras. Ci. Solo. 1987, 11:51-57.

Fernandez LQP, Dias LE, Barros NF, Novais RF, Moraes EJ. Productivity of *Eucalyptus camaldulensis* affected by rate and placement in two phosphorus fertilizers to a Brazilian Oxisol. For. Ecol. Manag. 2000, 127:93-102.

Fernández IE, Novais RF, Nunes FN, Ker JC. Reversibilidade de fósforo não-lábil em solos submetidos à redução microbiana e química. II – Extrações sucessivas do fósforo pela resina de troca aniônica. Rev. Bras. Ci. Solo, 2008, 32:2319-2330.

Freitas IF, Novais RF, Villani EMA, Novais SV. Phosphorus extracted by ion exchange resins and Mehlich-1 from Oxisols (Latosols) treated with different phosphorus rates and sources for varied soil-source contact periods. Rev. Bras. Ci. Solo. 2013, 37:317-326.

Muniz AS, Novais RF, Barros NF, Neves JCL. Nível crítico de fósforo na parte aérea da soja como variável do fator capacidade de fósforo no solo. Rev. Bras. Ci. 1985, Solo.9:237-243.

Novais RF. A frágil relação entre a pesquisa em ciência do solo e a sua extensão. Boletim Informativo da SBCS. 2012, 14-21 2012.

Novais RF, Neves JCL, Barros NF, Sedyama T. Deficiência de manganês em plantas de soja cultivadas em solos de cerrado. Rev. Bras. Ci. Solo, 1989, 13:199-204.

Novais RF. Publish or perish – Fator de impacto, produto interno bruto e índice de desenvolvimento humano. Boletim Informativo da SBCS. 2008:25-27.

Novais RF, Smyth TJ. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1999, 399 p.

Novais SN, Mattiello EM, Vergutz L, Melo LCA, Freitas IF, Novais RF. Loss of extraction capacity of Mehlich-1 and monocalcium phosphate as a variable of remaining P and its relationship to critical levels of soil phosphorus and sulfur. Rev. Bras. Ci. Solo. 2015, 39:1079-1087.

MELHORAMENTO GENÉTICO DA SOJA PARA QUALIDADE DO ÓLEO

Pedro Ivo Vieira Good God¹
Frederico Dellano Souza Silva²
Vinícius Ribeiro Faria³
Marcos de Oliveira Pinto⁴
Newton Deniz Piovesan⁵

INTRODUÇÃO

Na safra 2014/15 estima-se que a produção de soja no mundo foi de 319,3 milhões de toneladas (USDA, 2015). O Brasil é o segundo maior produtor de soja, com 94,5 milhões de toneladas, sendo superado pelos Estados Unidos, com 108,0 milhões de toneladas, e na frente da Argentina, com 60,8 milhões de toneladas. Nesta

¹ Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Agrárias, Caixa Postal 22, CEP: 38810-000 Rio Paranaíba – MG. E-mail: pedro.god@ufv.br

² Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Agrárias, Caixa Postal 22, CEP: 38810-000 Rio Paranaíba – MG. E-mail: frederico.dellano@ufv.br

³ Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Agrárias, Caixa Postal 22, CEP: 38810-000 Rio Paranaíba – MG. E-mail: virfaria@yahoo.com.br

⁴ EMBRAPA - CNPMS, CEP: 35701-970 Sete Lagoas – MG. E-mail: marcosbqiufv@yahoo.com.br

⁵ Universidade Federal de Viçosa, BIOAGRO, CEP: 36570-900 Viçosa – MG. E-mail: ndpiovesan@gmail.com

mesma safra, a área total cultivada no Brasil foi de 31 milhões de hectares, resultando em uma produtividade média de 3.000 kg/ha. Os Estados de Mato Grosso e Paraná são os principais produtores dessa cultura, contribuindo com 29 e 17 %, respectivamente, na produção nacional (CONAB, 2015).

A cadeia produtiva da soja tem papel importante no desenvolvimento da economia brasileira. O Brasil é o maior exportador de soja do mundo, com um volume de exportação, estimado na safra 2014/15, de 50 milhões de toneladas (USDA, 2015). O crescimento dos setores envolvidos com a soja, por meio de investimentos em tecnologias, novas áreas agrícolas e indústrias de processamento de grãos e refino de óleos, tem promovido resultados positivos não apenas em volumes operados, mas também no aumento da produtividade da cultura.

A posição de destaque da soja brasileira no contexto mundial está relacionada com as pesquisas desenvolvidas no país, o alto grau de tecnificação dos agricultores e a expansão da fronteira agrícola. Na pesquisa, o melhoramento genético se destaca por desenvolver cultivares para as diversas regiões do país, com alta produtividade e resistência ou tolerância a fatores bióticos e abióticos adversos. Entretanto, ainda muito deve ser feito para resolver problemas reais ou potenciais, com o objetivo de satisfazer as necessidades dinâmicas do mercado consumidor, produtores e indústrias de transformação.

A maior parte do óleo de soja produzido no mundo destina-se ao consumo humano. Entretanto, por possuir uma cadeia produtiva organizada e estabelecida, o óleo de soja tem sido a principal matéria prima para produção do biodiesel no Brasil. Estima-se que o óleo de soja contabiliza aproximadamente 80% de todos os óleos de origem vegetal utilizados na produção de biodiesel no país (ANP, 2015).

Apesar do óleo de soja ser o mais utilizado para a produção de biodiesel, o mesmo não apresenta composição de ácidos graxos ideal para esse fim. As sementes de soja possuem aproximadamente 18% do óleo bruto, o qual é constituído basicamente por cinco ácidos graxos principais: 11% de ácido palmítico (16:0), 4% de ácido esteárico (18:0), 25% de ácido oleico (18:1 Δ 9), 52% de ácido linoleico (18:2 Δ 9,12) e 8% de ácido linolênico (18:3 Δ 9,12,15) (Graef et al., 2009). Linhagens ou acessos de soja com teores modificados de ácidos graxos estão disponíveis em bancos de germoplasma (Fehr, 2007). A partir destes genótipos, os alelos responsáveis pelas alterações nos teores de ácidos graxos podem ser transferidos para variedades elite, ou germoplasma adaptado às condições brasileiras, através de programas específicos de melhoramento genético.

A especificidade de programas para o melhoramento da qualidade das sementes reside no panorama geral de que programas de melhoramento genético da soja, tanto da iniciativa privada como pública, sempre estiveram voltados para a criação de variedades mais produtivas, resistentes às principais doenças e com alta estabilidade de produção. Atualmente existem demandas específicas de cultivares transgênicas resistentes a herbicidas e insetos praga. Com raras exceções, pouco programas investem na melhoria da composição da semente. Entretanto, existe uma demanda latente para tipos especiais de soja que agreguem em suas sementes uma composição mais adequada para determinados usos, principalmente se forem variedades convencionais ou não transgênicas.

Variedades especiais de soja mais apropriadas para a agroindústria devem possuir, entre outras características, alto teor de ácido oleico (> 50%), baixíssimo teor de ácido linolênico (\sim 1,0%) e alta produtividade. Para a alimentação humana (soja *food*) e animal (soja *feed*) podem ser elencadas uma série de

atributos de qualidade, que são alvo de programas de melhoramento genético, como, a ausência de *beany flavor* (característico das variedades convencionais), condicionada pela eliminação genética de lipoxigenases, alto teor de óleo ou proteína, grãos graúdos, uniformes e coloração de hilo clara. Outros atributos de qualidade podem ser incorporados às sementes. Destaca-se a eliminação de inibidores de proteases e a redução de oligossacarídeos (rafinose + estaquiose) que promovem ganhos na alimentação humana e animal. Além disso, podem ser incorporados à semente fatores nutricionais ativos, como o aumento de isoflavonas e a alteração da qualidade de proteínas com o aumento de aminoácidos sulfurados e o teor de metionina.

CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES DO ÓLEO DE SOJA PARA A INDÚSTRIA

No contexto do uso do óleo de soja pela indústria de alimentos e como matéria prima para a produção do biodiesel, um dos objetivos principais do melhoramento genético está relacionado aos parâmetros de qualidade do óleo para uso e processamento. O alto conteúdo de ácidos graxos polinsaturados determina a estabilidade oxidativa do óleo (Park et al., 2008). As modificações necessárias para que haja incremento na qualidade do óleo podem ser resumidas nas seguintes metas: (i) redução de 8 para 1% do conteúdo de ácido linolênico da semente de soja; (ii) aumento do ácido oleico de 25 para > 50%; e, (iii) redução de 11 para 4% do conteúdo de ácido palmítico.

Essas alterações são benéficas, pois aumentam a estabilidade oxidativa e a vida útil do óleo, além de reduzir a necessidade de hidrogenação química. Outro importante benefício é a redução dos teores de gorduras saturadas, melhorando a saúde humana e

reduzindo a ocorrência de problemas cardiovasculares (Mozaffarian et al., 2006). Dessa forma, modificar a composição do óleo de soja, por meio de alterações genéticas nas proporções dos diferentes ácidos graxos, permite a obtenção de uma matéria prima de melhor qualidade, agregando maior valor econômico à cultura e beneficiando a indústria e os consumidores em geral.

Em 2004 foi lançado o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) pelo Governo Federal Brasileiro, que prevê a adição de biodiesel ao diesel mineral. No ano de 2005 a lei 11.097/05 estabeleceu percentuais mínimos de mistura de biodiesel ao diesel, e o monitoramento da inserção do novo combustível no mercado. A partir de 1º de julho de 2014 tornou-se obrigatória a adição de 6% de biodiesel (biodiesel B6), e 7% (biodiesel B7) a partir de 1º de novembro de 2014. Neste mesmo ano a produção de biodiesel alcançou o volume de mais de 3,4 bilhões de litros no Brasil (ANP, 2015).

Apesar da soja ser a principal matéria prima para produção do biodiesel, o teor de ácidos graxos polinsaturados presentes não são desejáveis para esta finalidade, devido à sua baixa estabilidade oxidativa. Os ácidos linoleico e linolênico destacam-se como os mais suscetíveis à degradação oxidativa enzimática e não enzimática. A degradação oxidativa de ácidos graxos polinsaturados se dá pela presença de duplas ligações nas cadeias de carbonos, tornando estas moléculas suscetíveis ao ataque oxidativo. Segundo Park et al. (2008), o aumento concomitante de ácidos graxos polinsaturados (C18:2 + C18:3) no óleo de soja reduzem substancialmente a estabilidade oxidativa (Figura 1).

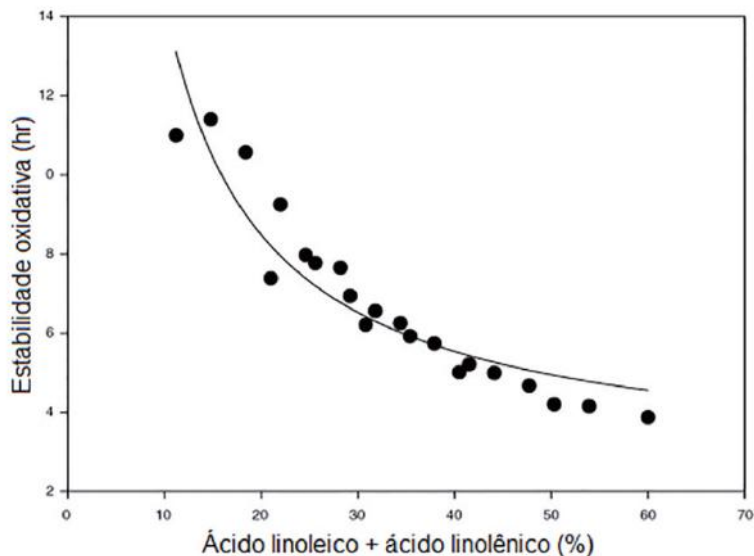


Figura 1. Estabilidade oxidativa do biodiesel em função do conteúdo de ácido linoleico e linolênico. Adaptado de: Park et al. (2008)

Dessa forma, o alto teor de ácidos graxos polinsaturados é responsável pela redução da estabilidade à oxidação e da qualidade do óleo de soja para a produção do biodiesel (Alonso e Maroto, 2000). Portanto, espera-se que a utilização de cultivares de soja com teores modificados mais adequados devem melhorar a estabilidade oxidativa do óleo e outras qualidades tecnológicas (Santos et al., 2013).

CONTROLE GENÉTICO E BIOSÍNTESE DO ÓLEO NA SOJA

a. Biossíntese de ácidos graxos

A via de biossíntese de ácidos graxos em plantas envolve pelo menos dois compartimentos celulares, o plastídio e o retículo endoplasmático. A via plastidial é responsável principalmente pela

biossíntese de ácidos graxos destinados a membranas celulares, enquanto que a via do retículo endoplasmático destina-se principalmente à biossíntese de ácidos graxos de armazenamento. Durante a biossíntese de ácidos graxos, as dessaturases introduzem duplas ligações em cadeias saturadas, produzindo os ácidos graxos insaturados e polinsaturados.

As enzimas dessaturases podem ser classificadas em duas grandes classes, as solúveis e as ligadas à membrana. Dessaturases solúveis representam um grupo pequeno de enzimas que possuem dois motivos conservados, histidina e ferro (Shanklin e Cahoon, 1998) e adicionam uma dupla ligação em ácidos graxos ligados à Proteína Carreadora de grupos Acil (ACP), a proteína mais importante desse grupo é a Δ -9-estearoil-ACP dessaturase. As dessaturases de membranas possuem quatro domínios transmembrana e três regiões ricas em histidina separadas [HX(3 ou 4)H, HX(2 ou 3)HH e HX(2 ou 3)HH] e ligadas coordenadamente a dois átomos de ferro, que compõem o sítio catalítico (Dyer et al., 2002).

Entre as dessaturases de membranas destacam-se as ω -6-dessaturases, responsáveis pela conversão de ácido oleico em ácido linoleico, e as ω -3-dessaturases, responsáveis pela síntese de ácido linolênico a partir de ácido linoleico. Essas enzimas podem estar localizadas no cloroplasto e no retículo endoplasmático (Figura 2). Algumas particularidades são observadas nos mecanismos das reações, dependendo da localização subcelular dessas dessaturases. As dessaturases de retículo endoplasmático possuem como doador de elétrons o citocromo b5, enquanto que as plastidiais possuem a ferredoxina; outra diferença encontrada se refere ao substrato primário, no retículo endoplasmático é a fosfatidil colina (PC) e no plastídeos são os galactolipídeos (GL), especialmente os monogalactosil diacilglicerol e digalactosil diacilglicerol.



Figura 2. Vias de produção de ácidos graxos polinsaturados em plantas superiores. Em vermelho estão destacadas as modificações genéticas nas principais dessaturases responsáveis pela alteração da produção de ácidos graxos insaturados

b. ω-3-dessaturases

O controle genético da síntese dos ácidos graxos polinsaturados tem sido estudado por meio da obtenção e caracterização de mutantes com conteúdo diferenciado de ácidos graxos. Até o momento não se tem ao certo o número de genes que codificam para cada dessaturase em soja. No entanto alguns estudos preliminares têm identificado alguns desses genes e os mecanismos de regulação que estes apresentam frente a variações ambientais.

Um grande número de genes também tem sido observado para as ω-3-dessaturases. Bilyeu et al. (2003) descreveu inicialmente a presença de 3 genes que codificam para essa dessaturase, denominados *GmFAD3A*, *GmFAD3B* e *GmFAD3C*. Nas sementes de soja foi observada alta expressão do gene *GmFAD3A* e baixa expressão do gene *GmFAD3C*. Os transcritos do gene *GmFAD3B* não foram detectados. Assim, muito provavelmente, o gene *GmFAD3A* é o principal responsável pela biossíntese de ácido linolênico em sementes.

Outros estudos têm evidenciado a presença de mais genes controlando o conteúdo de ácido linoleico/linolênico. Análises moleculares de linhagens mutantes desenvolvidas no Japão

identificaram quatro formas dos genes *FAD3*, *GmFAD3-1a*, *GmFAD3-1b*, *GmFAD3-2a*, e *GmFAD3-2b* (Anai et al., 2005). Três deles mostraram-se equivalentes aos descritos anteriormente por Bilyeu et al. (2003). O gene *GmFAD3-1a* é equivalente *GmFAD3B*, *GmFAD3-1b* é equivalente a *GmFAD3A* e *GmFAD3-2a* é equivalente a *GmFAD3C*. Os perfis de acúmulo de transcritos desses genes foram avaliados por PCR semiquantitativo. Demonstrou-se que os transcritos do gene *GmFAD3-1a* não foram detectados nos estádios iniciais da ontogenia de sementes. Os transcritos dos genes *GmFAD3-1b* e *GmFAD3-2a* foram detectados em todos os estádios; de outra forma, os transcritos do gene *GmFAD3-2b* só foram detectados nos estádios iniciais do desenvolvimento da semente.

Modificações nos teores totais de óleo e de ácido oleico são observadas em soja cultivada em elevadas temperaturas. Normalmente há um aumento no conteúdo do ácido oleico e diminuição no conteúdo dos ácidos linoleico e linolênico. O conteúdo de ácido palmítico e esteárico geralmente não é afetado por mudanças das temperaturas de cultivo.

Em estudos envolvendo diferentes temperaturas de cultivo, têm sido observadas a expressão diferencial dos genes *GmFAD3*. Byfield e Upchurch (2007) avaliou o efeito de três temperaturas (30/29°C, 26/22°C e 22/18°C) em três genótipos de soja (Dare, N99-3170 e N01-3544) nos níveis de transcritos dos genes *GmFAD3A*, *GmFAD3B* e *GmFAD3C*. Em sementes com 35 dias após florescimento, o acúmulo de transcrito reduziu de 5 a 15 vezes para o gene *GmFAD3A*, 2 a 9 vezes para o gene *GmFAD3B* e 2 a 3 vezes para o gene *GmFAD3C* em sementes desenvolvidas em um ambiente quente (30/26°C) vs. ambientes normais (26/22°C) ou frios (22/18°C). As reduções dos níveis de transcritos dos genes foram positivamente associadas à redução no conteúdo de ácido linolênico nas sementes dos três genótipos analisados. Deste modo,

a regulação transcricional do gene da ω -3-dessaturase explica, pelo menos em parte, as alterações na composição de ácidos graxos em diferentes temperaturas.

c. ω -6-dessaturases

Diversos estudos têm demonstrado que a enzima *GmFAD2* deve ser a principal responsável pelo acúmulo de C18:1 em sementes. Os genes *FAD2* foram caracterizados em *Arabidopsis thaliana* e associados com a conversão de ácido oleico (18:1) em ácido linoleico (18:2) através da inserção de uma ligação dupla na posição 12 do carbono na cadeia de um hidrocarboneto. Heppard et al. (1996) apresentaram a existência dos genes microssomais para ω -6-dessaturases em soja, sendo eles, *GmFAD2-1* e *GmFAD2-2*, os quais também catalisam a conversão do ácido graxo monoinsaturado.

Segundo Tang et al. (2005), a soja possui em seu genoma duas isoformas específicas de *FAD2*, estas designadas de *FAD2-1A* e *FAD2-1B*, que diferem em apenas 24 resíduos de aminoácidos. A expressão desses genes estudada em levedura revelou que a isoforma *FAD2-1A* é mais instável do que *FAD2-1B* quando mantida a temperatura de crescimento elevada. Resultados semelhantes foram observados em estudo com três variedades de soja (Dare, A6 e N01-3544). Verificou-se que o aumento da temperatura se correlacionou positivamente com o aumento no conteúdo de ácido oleico e redução no conteúdo de ácido linolênico, evidenciando que esses genes respondem a modificações na temperatura.

Entretanto, em outros estudos constatou-se que os níveis de transcrição de *FAD2-1* e *FAD2-2* não aumentaram em baixas temperaturas, como seria esperado (Heppard et al., 1996). No genótipo de soja mutante FA22, que possui 50% de ácido oleico, os níveis de acúmulo de transcritos desses genes também não tiveram

correlação com o conteúdo de ácido oleico. Assim, possivelmente, outros genes podem estar envolvidos na regulação da via de biossíntese de ácido oleico nesse genótipo. A existência de múltiplas cópias do gene *FAD2* na soja não é surpreendente, dado que a soja é um paleopoliplóide.

Em resumo, existem pelo menos cinco genes que compreendem a família de genes *FAD2* na soja. Entre eles, *FAD2-1A* e *FAD2-1B*, que são expressos principalmente em sementes em desenvolvimento e, provavelmente, determinam os níveis de ácido oleico na soja. Um sexto gene (*FAD2-3*) foi caracterizado por Li et al. (2007), que demonstrou não haver nenhuma resposta deste gene com respeito a mudanças de temperatura.

d. Marcadores moleculares associados ao conteúdo de ácidos graxos

Alt et al. (2005) encontrou marcadores moleculares associados ao alelo *ol* para o gene suprimido *FAD2-1* no mutante de soja M23, que possui teor de ácido oleico acima de 50%. Foram feitos cruzamentos entre M23 e Archer, uma cultivar com teor normal de ácido oleico. A segregação entre as 88 plantas F_2 seguiram a relação 1:2:1. Os indivíduos *olol* tiveram a maior média para o teor de ácido oleico, os indivíduos *Olol* foram intermédios, enquanto os indivíduos *OIOl* apresentaram menor média. Registou-se uma variação significativa entre os indivíduos *olol* com sua distribuição se sobrepondo aos indivíduos *OIOl* e *Olol*, o que confirma que outros genes têm influência sobre os teores de ácido oleico.

Alguns genótipos mutantes, que possuem baixo nível de ácido linolênico, já tiveram os alelos do gene *GmFAD3A* bem caracterizado, o que tem permitido o desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). O acesso PI361088B (3,8% de 18:3) possui uma inserção de dois resíduos de timidina

na posição 310 da região codificadora, promovendo mudança do quadro de leitura e, conseqüentemente, o surgimento de um códon de parada prematuro na posição 328.

A mutação na linhagem M5 (3,3% de 18:3) é similar a de PI3661088B, apresentando também uma mudança no quadro de leitura. No entanto, neste caso ocorre uma deleção de 19 nucleotídeos na posição 1057, resultando em uma proteína com 25 resíduos de aminoácidos a mais na extremidade C-terminal. O acesso CX1512-44 (3% de 18:3) apresenta uma mutação de apenas um par de bases na posição 811, exatamente no sítio de *splicing*, o que leva à formação de uma proteína com estrutura alterada. O acesso C1640 (3,7% de 18:3) também contém uma mutação de troca de bases, mas esta encontra-se na região codificante, o códon para triptofano (TGG) no éxon 6 é modificado para um códon de parada (TGA) (Chappell e Bilyeu, 2007).

Estudos mais recentes utilizando genotipagem em larga escala permitiram o desenvolvimento de marcadores para a discriminação de alelos mutantes para ácidos graxos (Shi et al. 2015). Foram detectados alelos mutantes de *FAD2-1A* (fontes, 17D e PI 603.452) e *FAD2-1B* (PI 283327), *FAD3A* (fontes, CX1512-44 e C1640) e *FAD3C* (fonte, CX1512-44). Os autores validaram a precisão dos ensaios utilizando populações múltiplas, e observaram uma associação perfeita entre os alelos SNP e os ácidos graxos. Estes ensaios com marcadores foram robustos e confiáveis para a detecção de alelos SNP, o que permite a sua utilização precisa na seleção assistida por marcadores.

Kim et al. (2015) estudaram a sequência genômica de um gene candidato para a característica de baixo teor de ácido linolênico na variedade PE1690, derivada de um programa de mutação induzida. Foi descoberta uma mutação no gene *GmFAD3A*. A mutação produziu um códon de parada prematura, tornando a enzima dessaturase

não funcional. Os autores desenvolveram um marcador genético associando o alelo do gene *GmFAD3A* de PE1690 com o nível do ácido linolênico, e testaram 89 progênies F_2 . Os resultados mostraram que a mutação de *GmFAD3A* em PE1690 foi associada com reduzido teor de ácido linolênico no óleo da semente de soja.

O genótipo A29 foi desenvolvido a partir do cruzamento de linhagens com baixo teor de ácido linolênico. Dessa forma a linhagem A29 apresenta baixíssimo conteúdo de ácido linolênico. O reduzido conteúdo de 18:3 em A29 é devido ao agrupamento de três locos em homozigose recessiva para os genes *GmFAD3A*, *GmFAD3B* e *GmFAD3C*. Com base em A29 foram desenvolvidos marcadores moleculares do tipo SNPs para os alelos dos três genes (Bilyeu et al., 2006). Esses marcadores foram associados ao conteúdo de ácido linolênico em populações segregantes e têm sido utilizados para o desenvolvimento de novo germoplasma com apenas 1% de ácido linolênico (Pinto, 2013).

DESENVOLVIMENTO DE VARIEDADES DE SOJA COM TEORES MODIFICADOS DE ÁCIDO GRAXOS

Alterações nos teores de ácidos graxos insaturados presentes no óleo de soja são obtidas por meio de melhoramento genético convencional (seleção recorrente; retrocruzamentos) e engenharia genética (marcadores moleculares; clonagem e transformação de genes). Em programas de melhoramento para a qualidade do óleo, além da redução do conteúdo de ácido linolênico e o aumento de ácido oleico, também é comum a necessidade de aumento do conteúdo total de óleo.

A herança do conteúdo de ácidos graxos polinsaturados e monoinsaturados normalmente é de natureza quantitativa. Entretanto, pelo efeito de genes maiores, herança simples já foi

constatada em cruzamentos envolvendo linhagens mutantes com teores modificados de ácidos graxos. Conforme já discutido, existem vários genes para dessaturases caracterizados, cuja influência nos teores de ácidos graxos já foi comprovada. O conhecimento dos genes que modulam os teores de ácidos graxos permite o estabelecimento de estratégias de melhoramento baseadas em marcadores moleculares. Como exemplos podemos citar a seleção assistida por marcadores bem como a seleção genômica ampla (GWS – *Genome Wide Selection*). Por tratar-se de uma característica quantitativa, com poucos relatos de genes de efeitos maiores, as estratégias de melhoramento para aumento no teor total de óleo são diferenciadas.

Na Figura 3 são apresentadas as principais estratégias que podem ser aplicadas para o melhoramento quantitativo e qualitativo do óleo. O aumento do conteúdo total de óleo envolve programas de seleção recorrente, mapeamento de QTL e GWS (Subprograma 1). A alteração qualitativa do óleo envolve principalmente o uso de retrocruzamentos assistidos, a clonagem e transformação genética (Subprogramas 2 e 3).



Figura 3. Estratégias de melhoramento genético aplicadas ao aumento do conteúdo de óleo e alteração do perfil de ácidos graxos em sementes de soja

Uma das grandes limitações para o melhoramento da qualidade do óleo (através da alteração do perfil de ácidos graxos) é a indisponibilidade de materiais genéticos adaptados às condições brasileiras. Em geral, as fontes doadoras de genes para alteração de ácidos graxos são acessos de bancos de germoplasma ou linhagens derivadas de programas de mutação induzida, as quais não apresentam potencial agrônômico para serem utilizadas como cultivares. Dessa forma, as estratégias de melhoramento adotadas envolvem sempre uma primeira etapa, que é a obtenção de germoplasma adaptado com perfil alterado.

O método dos retrocruzamentos é utilizado com sucesso para a transferência inicial de alelos de interesse a variedades adaptadas. Esta estratégia permite a produção de linhagens adaptadas com reduzido teor de ácido linolênico e teor aumentado de ácido

oleico. Nesse caso, materiais portadores de genes que controlam os teores de óleo são utilizados como doadores e cultivares de alto desempenho agrônomico são as recorrentes. Nesta primeira fase, a seleção e recuperação de genomas são feitos por meio de ferramentas moleculares com o objetivo de se reduzir tempo e custo, além de se aumentar a precisão do processo seletivo.

Uma das ferramentas que permite aumentar a acurácia seletiva nos retrocruzamentos é o uso de marcadores moleculares para o monitoramento da transferência dos alelos de interesse. A identificação dos genes de efeito maior que controlam a produção de ácidos graxos tem possibilitado o desenvolvimento de marcadores moleculares, que quando utilizados, aceleram o processo de produção de cultivares elites com alto teor de ácido oleico e reduzido teor de ácido linolênico. O uso de marcadores moleculares em um programa de retrocruzamentos assistidos não se limita a selecionar somente os alelos de interesse. Outra estratégia é acelerar o processo de recuperação do genoma do progenitor recorrente. É possível selecionar aqueles indivíduos ou famílias que mais se assemelham geneticamente ao progenitor recorrente e dessa forma reduzir em até duas gerações o número de retrocruzamentos necessários.

A seleção simultânea para o alelo de interesse e a recuperação de genoma por marcadores tem sido aplicada no Programa de Melhoramento de Qualidade da Soja (PMQS) da Universidade Federal de Viçosa. A linhagem A29 é utilizada como progenitor doador dos alelos para baixíssimo linolênico (1%). Além da linhagem A29, o genótipo CS303TNKCA também é utilizado por ser oriundo do acesso BARC12, outra fonte doadora, que apresenta 3% de ácido linolênico. Estes progenitores foram cruzados e as progênies F_2 e $F_{2:3}$ selecionadas para baixo conteúdo de ácido linolênico. Marcadores moleculares para os genes *FAD3A*, B e C foram utilizados para confirmar a seleção dos alelos de interesse. Além disso, marcadores

do tipo microssatélites permitiram determinar as similaridades genéticas das progênie selecionadas aos genitores CD222 e CD219RR, a serem utilizados como progenitores recorrentes.

Na Figura 4 é possível visualizar nos gráficos famílias $F_{2:3}$ selecionadas para o baixo conteúdo de ácidos graxos e com alta similaridade genética aos progenitores recorrentes CD219RR e CD222. As famílias $F_{2:3}$ são derivadas do cruzamento A29/CS303TNKCA. É possível verificar que entre a famílias selecionadas a similaridade média em relação aos progenitores recorrentes foi de 0,55 e 0,49. O conteúdo médio de ácido linolênico foi de 1,25 e 1,03%, considerados de baixíssimo teor. Dessa forma, é possível identificar aquelas famílias que apresentam baixo linolênico e que compartilhem locos gênicos com os progenitores recorrentes, antes mesmo de se realizar o primeiro retrocruzamento. Como resultados é possível reduzir o número de gerações para a recuperação dos genomas recorrentes.

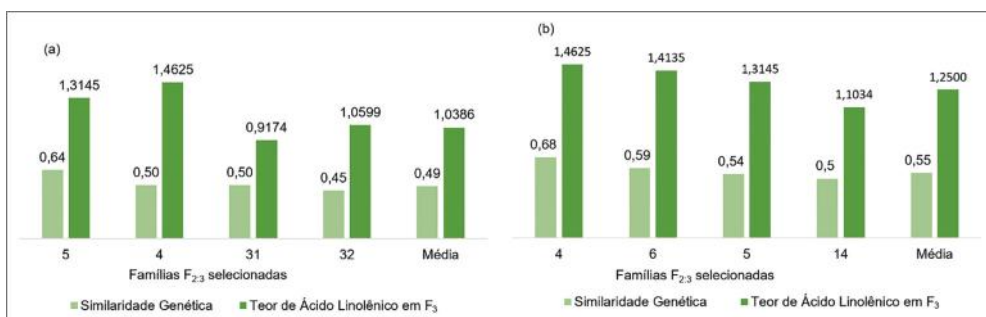


Figura 4. Similaridade genética e teor de ácido linolênico em famílias $F_{2:3}$ derivadas do cruzamento entre A29 e CS303TNKCA. Em (a) famílias selecionadas para alta similaridade com o progenitor CD222. Em (b) famílias selecionadas para alta similaridade com o progenitor CD219RR

Outra ferramenta que aumenta a eficiência no processo seletivo é a determinação do conteúdo de ácidos graxos por meio de microanálises não destrutivas. Esta abordagem consiste na quantificação de ácidos graxos em sementes, através de Cromatografia Gasosa, em que é preservada a viabilidade da semente. Pequenas porções do cotilédone são removidas sem danificar o embrião para se determinar o conteúdo de ácidos graxos. As sementes com perfil adequado podem ser utilizadas no avanço de geração, possibilitando a seleção antes do plantio. Como exemplo, as famílias $F_{2:3}$ indicadas na Figura 4 foram selecionadas previamente a partir de sementes F_2 . Em sequência, as famílias $F_{2:3}$ derivadas têm o seu perfil confirmado, de maneira a aumentar a acurácia seletiva.

Materiais adaptados, obtidos por retrocruzamentos, que contém alelos controladores do teor de ácidos graxos podem ser utilizados em blocos de cruzamentos visando aumentar os teores totais de óleo. Nesse caso, a estratégia a ser utilizada pode ser a seleção recorrente.

A seleção recorrente consiste na obtenção de genótipos superiores com manutenção de variabilidade genética ao longo dos ciclos de seleção. As principais vantagens deste método são: a obtenção de maior variabilidade genética pelo inter cruzamento de múltiplos genitores; a oportunidade para a ocorrência de recombinações, devido aos inter cruzamentos sucessivos; o aumento cumulativo da frequência de alelos favoráveis e a facilidade para a incorporação de germoplasma exótico na população.

Embora a seleção recorrente não seja muita empregada em plantas autógamias, os principais programas de melhoramento a têm utilizado como estratégia para aumento de rendimento para o teor de óleo de soja. O aumento no teor de óleo tem sido obtido com sucesso, em vários programas de seleção recorrente desenvolvidos por pesquisadores norte-americanos e brasileiros, conduzidos

principalmente no IAC e na ESALQ/USP.

O teor de óleo em cultivares de soja tem uma amplitude limitada, variando entre 18,5 a 23,5%, o que pode inviabilizar a obtenção de ganhos genéticos expressivos. Contudo, existem introduções com percentuais variando de 13 a 28%. O emprego da seleção recorrente e a utilização de germoplasma exótico em programas de melhoramento foi sugerido por Vello (1985), para ampliar a base genética e promover a recombinação de alelos favoráveis, permitindo assim ganhos genéticos elevados para teor de óleo e produtividade sem, contudo, reduzir a variabilidade genética após vários ciclos de seleção.

Em seleção recorrente podem ser utilizados cruzamentos múltiplos ou é utilizado o intercruzamento através da macho-esterilidade. Nos cruzamentos múltiplos os genitores são combinados de forma que a contribuição destes seja igual, utilizando esquema semelhante a um dialelo circulante. Em programas de melhoramento que utilizem populações biparentais, progressos genéticos significativos poderão ser também atingidos desde que sejam incorporados genitores com altos teores e divergentes.

A identificação de populações superiores em gerações precoces tem sido fonte de vários trabalhos em soja, com a proposição de melhorar a eficiência de programas de melhoramento. Neste sentido, a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) pode ser uma importante ferramenta para aumentar a eficiência de seleção em gerações precoces. Com a identificação de QTL que aumentem o teor de óleo, abrem-se perspectivas de uma melhor orientação dos cruzamentos a serem realizados, através da combinação dos efeitos de diferentes QTL, o que possibilita a seleção de genótipos que expressem ao máximo potencial para produção de óleo.

Ferramentas estatísticas tradicionalmente pouco usadas no melhoramento de plantas anuais podem ser utilizadas com o

objetivo de aumentar a acurácia seletiva. Dentre estas ferramentas destaca-se o Método dos Modelos Mistos (BLUP/REML) e a Inferência Bayesiana. Estes métodos possibilitam a predição de efeitos aleatórios de modelos genético-estatísticos aplicados no melhoramento. É possível então a predição de valores genéticos ou a determinação da influência de marcadores moleculares associados a características de interesse. Além disso, a incorporação da informação de genealogias mais complexas, como o caso da seleção recorrente, permite a predição de valores genético mais acurados. Como consequência, é possível aumentar os ganhos de seleção em comparação com métodos tradicionais baseados em valores fenotípicos. Outra vantagem é a possibilidade de se utilizar informação *a priori*, em relação aos parâmetros genéticos, como é o caso da Inferência Bayesiana. A associação destas ferramentas estatísticas a tecnologias de genotipagem em larga escala (*high throughput*) permitiu o desenvolvimento da seleção em escala genômica, conhecida como GWS. A GWS apresenta melhores perspectivas de que a SAM e o emprego de QTL.

Com base nas estratégias e ferramentas apresentadas é possível obter linhagens melhoradas para o conteúdo e qualidade do óleo de soja. O PMQS/UFV tem obtido linhagens experimentais com baixo conteúdo de ácido linolênico e médio conteúdo de ácido oleico (Tabela 1). Estas linhagens também foram selecionadas para o aumento do conteúdo de óleo e/ou proteína. Essas linhagens possuem potencial de lançamento como novas cultivares e também podem ser utilizadas em blocos de cruzamentos para a seleção recorrente.

Tabela 1. Linhagens experimentais melhoradas para características de qualidade da semente

Linhagem	Proteína (%)	Óleo (%)	Ácido Linoleico (g/100g óleo)	Ácido Linolênico (g/100g óleo)	Ácido Oleico (g/100g óleo)
VX- 11-1450	43,28	18,66	44,69	9,88	36,90
VX- 11-3514	40,90	18,52	36,94	5,95	39,22
VX- 11-3535	41,74	16,69	44,13	6,53	43,87
VX- 11-3615	41,16	17,07	43,24	6,98	44,34
VX- 11-4559	41,82	19,31	54,99	5,57	35,65
VX- 11-3060	35,17	20,29	67,03	0,93	18,40
VX- 11-3269	38,88	22,64	60,94	1,67	22,03
VX- 11-3400	38,00	20,89	61,73	1,79	23,56
VX- 11-3815	39,90	20,24	60,83	1,86	23,96
VX- 11-4234	45,25	19,65	60,33	0,96	27,09

VARIEDADES TRANSGÊNICAS

A engenharia genética é uma importante ferramenta utilizada para auxiliar as técnicas de melhoramento tradicional. Com a manipulação genética é possível que um ou mais genes sejam transferidos de um organismo para outro e, dessa forma, novas características podem ser expressas. Nos últimos anos, a transformação genética e aplicação da genômica funcional permitiu a obtenção de soja com alterações na composição de ácidos graxos do óleo.

Uma das principais estratégias utilizadas para a obtenção de soja com essas modificações é o silenciamento gênico, transcricional ou pós-transcricional, visando à modificação genética da expressão de enzimas-chave da biossíntese de ácidos graxos polinsaturados. A abordagem do silenciamento gênico via técnica de RNA de interferência (RNAi) tem mostrado bons resultados na modificação genética da composição de ácidos graxos no óleo, apresentando

vantagens em termos de sua eficiência e estabilidade com relação às técnicas de silenciamento por co-supressão ou RNA antisense (Tang et al., 2007).

Utilizando siRNA (small interference RNA) Flores et al. (2008) silenciaram um gene da família da ômega-3 ácido graxo dessaturase (FAD3), utilizando uma sequência conservada de 318 nucleotídeos como repetições invertidas em um cassete de expressão com um promotor semente-específico. A enzima FAD3 é responsável pela síntese de ácido linolênico (18:3), na via de biossíntese de ácidos graxos polinsaturados. Como resultados, eles demonstraram que não só ocorreu o silenciamento, mas também que este foi herdado de forma estável nas linhas de soja transgênica. Isso comprova que a técnica de siRNA é uma estratégia eficiente de silenciamento de genes de genomas complexos e pode ser muito útil para o melhoramento genético de soja.

Zhang et al. (2014) trabalhando com transformação genética inseriram um fragmento de cerca de 801 pb do *GmFAD2-1b* na cultivar de soja Williams 82. Os resultados indicaram que as plantas geneticamente manipuladas exibiram um aumento significativo em ácido oleico (até 51,71%) e uma redução de ácido palmítico (<3%). Não foi observada diferença estrutural entre os ácidos graxos de plantas transgênicas e os extratos de óleo de espécimes não transgênicos.

Dessa forma, a modificação da expressão de ácidos graxos polinsaturados, através da transformação genética de plantas, é uma estratégia que possibilita a obtenção de cultivares com teores modificados. A transformação genética da soja consiste, portanto, de uma via alternativa ao melhoramento convencional, principalmente quando a base genética da espécie não permite maiores avanços na obtenção de cultivares melhoradas.

REFERÊNCIAS

ALONSO, D.L.; MAROTO, F.G. Plant as “chemical factories” for the production of polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, v.19, p.481-497, 2000.

ALT, J.L.; FEHR, W.R.; WELKE, G.A.; SANDHU, D. Phenotypic and molecular analysis of oleate content in the mutant soybean line M23. *Crop Science*, v.45, p.1997-2000, 2005.

ANAI, T.; YAMADA, T.; KINOSHITA, T.; RAHMAN, S.M.; TAKAGI, Y. Identification of corresponding genes for three low- α -linolenic acid mutants and elucidation of their contribution to fatty acid biosynthesis in soybean seed. *Plant Science*, v.168, p.1615-1623, 2005.

ANP. Boletim mensal do biodiesel - agosto de 2015. ANP, 2015. 13p. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=77348&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1443483342131>>. Acesso em: 15 set. 2015.

BILYEU, K. D.; PALAVALLI, L.; SLEPER, D. A.; BEUSELINCK, P. R. Three microsomal omega-3 fatty-acid desaturase genes contribute. *Crop Science*, v. 43, p.1833-1838, 2003.

BILYEU, K.D.; PALAVALLI, L.; SLEPER, D.A.; BEUSELINCK, P.R. Molecular genetic resources for development of 1% linolenic acid soybeans. *Crop Science*, v.46, p.1913-1918, 2006.

BYFIELD, G.E.; UPCHURCH, R.G. Effect of temperature on delta-9 stearoyl-acp and microsomal omega-6 desaturase gene expression

and fatty acid content in developing soybean seeds. *Crop Science*, v.47, p.1698-1704, 2007.

CHAPPELL, A.S.; BILYEU, K.D. The low linolenic acid soybean line PI 361088B contains a novel GmFAD3A mutation. *Crop Science*, v.47, p.1705-1710, 2007.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos – setembro de 2015. CONAB, 2015. 139p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_11_10_42_03_boletim_graos_setembro_2015.pdf>. Acesso em: 15 set. 2015.

DYER, J.M.; CHAPITAL, D.C.; KUAN, J.W.; MULLEN, R.T.; TURNER, C.; MCKEON, T.A.; PEPPERMAN, A.B. Molecular analysis of a bifunctional fatty acid conjugase/desaturase from tung. implications for the evolution of plant fatty acid diversity. *Plant Physiology*, v.130, p.2027-2038, 2002.

FEHR, W. R. Breeding for modified fatty acid composition in soybean. *Crop Science*, v.47, p.72-87, 2007.

FLORES, T.; KARPOVA, O.; SU, X.; ZENG, P.; BILYEU, K.; SLEPER, D.A.; NGUYEN, H.T., ZHANG, Z.J. Silencing of GmFAD3 gene by siRNA leads to low α -linolenic acids (18:3) of fad3-mutant phenotype in soybean [*Glycine max* (Merr.)]. *Transgenic Research*, v.17, p.839-850, 2008.

GRAEF, G.; LAVALLEE, B.J.; TENOPIR, P.; TAT, M.; SCHWEIGER, B.; KINNEY, A.J.; VAN GERPEN, J.H.; CLEMENTE, T.E. A high-oleic-acid and low-palmitic-acid soybean: agronomic performance and evaluation as a feedstock for biodiesel. *Plant Biotechnology Journal*, v.7, p.441-421, 2009.

HEPPARD, E.P.; KINNEY, A.J.; STECCA, K.L.; MIAO, G.H. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal Δ -6-desaturase genes in soybeans. *Journal Plant Physiology*, v.110, p.311-319, 1996.

KIM, M.; SONG, J.T.; BILYEU, K.D.; LEE, J. A new low linolenic acid allele of GmFAD3A gene in soybean PE1690. *Molecular Breeding*, v.35, p.155, 2015.

LI, L.; WANG, X.; GAI, J.; YU, D. Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean. *Journal of Plant Physiology*, v.164, p.1516-1526, 2007.

MOZAFFARIAN D.; KATAN M.B.; ASCHERIO A.; STAMPFER M.J.; WILLETT W.C. Trans fatty acids and cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine*, v.354, p.1601-1613, 2006.

PARK, J.; KIM, D.; LEE, J.; PARK, S.; KIM, Y.; LEE, J. Blending effects of biodiesels on oxidation stability and low temperature flow properties. *Bioresource Technology*, v.99, p.1196-1203, 2008.

PINTO, M.O.; GOOD-GOD, P.I.V.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Associação de marcadores moleculares SNP com o conteúdo de ácido linolênico em sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.48, p.263-269, 2013.

SANTOS, E.M.; PIOVESAN, N.D.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Low linolenic soybeans for biodiesel: Characteristics, performance and advantages. *Fuel*, v.104, p.861-864, 2013.

SHANKLIN, J.; CAHOON, E.B. Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.49, p.611–641, 1998.

SHI, Z.; BACHLEDA, N.; PHAM, A.T.; BILYEU, K.; SHANNON, G.; NGUYEN, H.; LI, Z. High-throughput and functional SNP detection assays for oleic and linolenic acids in soybean. *Molecular Breeding*, v.35, p.176, 2015.

TANG, G.; GALILI, G.; ZHUANG, X. RNAi and microRNA: breakthrough technologies for the improvement of plant nutritional value and metabolomic engineering. *Metabolomics*, v.3, p. 357-369, 2007.

TANG, G.Q.; NOVITZKY, W.P.; GRIFFIN, H.C.; HUBER, S.C.; DEWEY, R.E. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. *The Plant Journal*, v.44, p.433–446, 2005.

USDA. Oilseeds: World markets and trade. USDS, 2015. 39p. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2015.

VELLO, N.A. Efeitos da introdução de germoplasma exótico sobre a produtividade e relações com a base genética das cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). 1985. 91p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ZHANG, L.; YANG, X.; ZHANG, Y.; YANG, J.; QI, G.; GUO, D.; XING, G.; YAO, Y.; XU, W.; LI, H.; LI, Q.; DONG, Y. Changes in Oleic Acid Content of Transgenic Soybeans by Antisense RNA Mediated Posttranscriptional Gene Silencing. *International Journal of Genomics*, v.2014, p.1-8, 2014.

Impactos da colheita na lavoura cafeeira

Felipe Santinato¹

Renato Adriane Alves Ruas²

Rouverson Pereira da Silva³

Alberto Carvalho Filho⁴

Antônio Tássio Santana Ormond⁵

INTRODUÇÃO

A colheita do café, manual ou mecanizada, é realizada anualmente visando à retirada de toda a produção obtida na safra. Geralmente, ela é procedida no meio do ano, nos meses de maio a agosto, sendo realizada na planta e também no chão em duas operações: colheita do café de planta e recolhimento do café de chão (Matiello et al., 2010).

1 Email: fpsantinato@hotmail.com. Endereço: Rua das Margaridas. Nº 783. Bairro Primavera. Cep.: 13.087-450. Campinas-SP.

2 Email: renatoruas@ufv.br. Endereço: Rodovia MG, 230, km 07, caixa postal 22. Cep.: 38.810-000. Rio Paranaíba-MG.

3 Email: rouverson@fcav.unesp.br. Endereço: Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n. FCAV/UNESP, Departamento de Engenharia Rural. Cep.: 14.884-900. Jaboticabal-SP.

4 Email: albertoufv@gmail.com. Endereço: Rodovia MG, 230, km 07, caixa postal 22. Cep.: 38.810-000. Rio Paranaíba-MG.

5 Email: tassiormond@gmail.com. Endereço: Rua Leonidas de Souza, 932, Quadra 25, Conjunto São José 1. Cep.: 78,7154-24. Rondonópolis-MT.

Na colheita do café da planta, para desprender os frutos dos ramos, ocorre grande exposição das partes vegetativas aos órgãos derrçadores (mãos trabalhadores ou hastes da derrçadoras das colhedoras), promovendo danos ao cafeeiro. Os danos são desfolha, quebra de ramos laterais e também o ramo principal em alguns casos, notadamente na "ponteira", descortçamento do tronco e danificação das gemas e botões florais, ocorrendo esta última principalmente quando a colheita é executada tardiamente (Santinato et al., 2013). Independentemente do tipo de dano, este refletirá em alterações na morfologia da planta e em alguns casos culminará na redução da produtividade (Santinato et al., 2014).

A produtividade do cafeeiro está condicionada ao crescimento ocorrido no ano anterior (Camargo & Camargo, 2001). Sendo assim, quanto maior o número de ramos e número de nós crescidos no período, maior será a capacidade produtiva da planta. Outros fatores, tais como o comprimento e espessura do internódio, também interferem na capacidade produtiva da lavoura (Santinato et al., 2014b).

Além destes fatores, em que a ação do homem pode influenciar, alterando o manejo da cultura (adubação, fitossanidade, práticas culturais e sistema de colheita), existem também os fatores edafoclimáticos, como temperatura, pluviosidade de umidade relativa do ar, que irão configurar a floração, pegamento da florada e o enchimento de grão. Cerca de apenas 50% das flores emitidas tornam-se frutos e os frutos permanecem nos pés durante aproximadamente 220 dias, estando sujeitos a vários fatores que podem reduzir a produtividade (Matiello et al., 2010).

Devido à dificuldade de se obter produtividades elevadas devido aos impactos do processo de colheita na fisiologia do cafeeiro, objetiva-se com este capítulo, apresentar resultados de três experimentos que evidenciam o reflexo de várias práticas

utilizadas na colheita do café na morfologia e na produtividade das plantas. Além disso, deseja-se apontar possíveis recomendações e soluções para o cafeicultor, na tentativa de minimizar as perdas na safra seguinte.

EXPERIMENTO 1

Neste primeiro experimento estudou-se a colheita mecanizada do café com uma a seis operações da máquina, comparando-a à colheita manual, em lavouras de produtividade elevada e mediana (respectivamente 121,54 e 50,78 sacas de café ben.ha⁻¹).

Este trabalho foi instalado em 2013, no município de Patos de Minas, MG, nas Fazendas Dona Neném e São João Grande, de propriedade de Eduardo Pinheiro Campos, em lavouras da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. Utilizou-se uma colhedora Jacto, modelo K3, que operou em todos os tratamentos com 800 rpm e 1.000 m h⁻¹. Os sete tratamentos foram delineados em blocos ao acaso, com quatro repetições, em parcelas de cinco plantas, em cada uma das áreas. Avaliou-se a biometria das plantas ao longo do tempo, a configuração dos ramos plagiotrópicos e as produtividades durante duas safras posteriores à execução dos tratamentos.

Na lavoura de carga inicial alta (121,54 sacas de café ben.ha⁻¹), a colheita mecanizada com uma operação da colhedora proporcionou menores danos causados às plantas (dado pela quantidade de material vegetal perdido incluindo folhas, ramos e flores) em relação aos demais tratamentos, sendo 41,9% inferior à colheita manual. A colheita com duas operações da colhedora promoveu danos causados às plantas semelhantes à colheita manual. A partir de três operações, a colheita mecanizada danificou mais os cafeeiros que a colheita manual, com superioridade que variou de 31,1 a 49,4%. As colheitas com cinco e seis operações apresentaram

a mesma quantidade de danos causados às plantas entre si (Tabela 1). Da mesma forma, na lavoura de carga inicial intermediária (50,78 sacas de café ben.ha⁻¹), a colheita com uma operação da colhedora foi o tratamento menos prejudicial às estruturas vegetativas das plantas, com 30,96% a menos de danos causados às plantas que a colheita manual. A colheita com duas operações acarretou na mesma quantidade de danos causados às plantas que a colheita manual. Com três operações da colhedora houve acréscimo de 28,36% nos danos causados às plantas em relação a colheita manual. As colheitas com cinco e seis operações acarretaram em valores semelhantes, em torno de 50% superiores à colheita manual (Tabela 1).

Tabela 1. Danos causados às plantas decorrentes das colheitas mecanizadas com uma a seis operações da colhedora e colheita manual, em duas lavouras de café, Patos de Minas, MG

Número de operações da colhedora	Lavoura de carga inicial alta	Lavoura de carga inicial intermediária
	Danos causados às plantas (kg planta ⁻¹)	
1	0,57 Aa	0,68 Aa
2	1,15 Ab	1,02 Ab
3	1,43 Ac	1,37 Ac
4	1,65 Ad	1,67 Ad
5	1,82 Ade	1,94 Ae
6	1,94 Ae	2,16 Ae
Colheita manual	0,98 Ab	0,98 Ab
CV (%)	7,37	6,42

*Médias seguidas por mesmas letras minúsculas, comparadas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade. Médias seguidas por mesmas letras maiúsculas, comparadas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste t à 5% de probabilidade.

A lavoura de carga inicial alta (121,54 sacas de café ben.ha⁻¹ na safra 2013) produziu na safra de 2014, em torno de 44,14 sacas

de café ben.ha⁻¹, representando redução de 63,68%. A lavoura de carga inicial intermediária (50,78 sacas de café ben.ha⁻¹ na safra 2013) produziu na safra de 2014, 95,62 sacas de café ben.ha⁻¹ (Tabela 2), obtendo acréscimo de 46,82%. Tal fato demonstra o efeito acentuado da bienalidade do cafeeiro, que ocorre devido a competição de metabólitos que são utilizados para o crescimento das plantas e produção de frutos. Normalmente, a bienalidade é mais acentuada negativamente na safra seguinte a uma safra de elevada produtividade, uma vez que o cafeeiro não regula a carga que irá produzir (Rena et al., 1986). A produção elevada consiste em um dreno muito intenso de nutrientes, dessa forma, a planta desenvolve baixo crescimento de nós e ramos novos e, como consequência, apresentará baixa produtividade na safra seguinte (DaMatta et al., 2004). Na média do biênio, obteve-se carga de 82,84 e 73,2 sacas de café ben.ha⁻¹, respectivamente para as lavouras de carga inicial alta e intermediária.

Na lavoura de carga inicial intermediária, as maiores produtividades na safra de 2014 foram obtidas nos tratamentos com uma e duas operações da colhedora, bem como a colheita manual. Tais produtividades foram cerca de 64% inferiores à primeira safra (Tabela 2).

A colheita com três operações promoveu redução de 21,74% na produtividade em relação à colheita manual, o que corresponde a 9,42 sacas de café ben.ha⁻¹ a menos. As colheitas com quatro a seis operações, acarretaram em produtividades 66,72 a 86,68 inferiores à colheita manual, correspondendo à redução de produtividade de 115,76 sacas de café ben.ha⁻¹ em relação à safra do ano anterior (121,54 sacas de café ben.ha⁻¹) (Tabela 2). Tamanha redução é atribuída ao efeito da bienalidade, também constatada por Pereira et al., (2011) e Valadares et al., (2013), demonstrando os efeitos negativos decorrentes dos tipos de colheita na produção.

Devido ao ano de bionalidade positiva em 2014, na lavoura de carga inicial intermediária, houve incremento na produtividade em relação à safra anterior em todos os tratamentos, exceto aonde utilizou-se a colheita com cinco operações da colhedora, que obteve valores semelhantes à colheita com seis operações (Tabela 2). As colheitas com cinco e seis operações reduziram a produtividade de maneira acentuada.

As maiores produtividades foram obtidas nas colheitas com uma e duas operações da colhedora e colheita manual, com acréscimo médio de 83,84% em relação à safra anterior (Tabela 2). As colheitas com três e quatro operações acarretaram reduções de produtividade de 16,74 e 22,65% em relação à colheita manual.

Tabela 2. Produtividade da 2ª safra e variação de produtividade em relação à 1ª safra, decorrentes das colheitas mecanizadas com uma a seis operações da colhedora e colheita manual, realizadas na 1ª safra, em duas lavouras de café, Patos de Minas, MG

Número de operações da colhedora	Lavoura de carga inicial alta		Lavoura de carga inicial intermediária	
	Produtividade 2ª safra Sacas de café ben ha ⁻¹	Variação de produtividade %	Produtividade 2ª safra Sacas de café ben ha ⁻¹	Variação de produtividade %
1	44,14 Aa	- 63,68	95,62 Ba	+ 88,3
2	43,27 Aa	- 64,39	93,21 Ba	+ 83,56
3	33,91 Ab	- 74,91	75,95 Bb	+ 49,58
4	14,42 Ac	- 88,13	70,56 Bb	+ 38,96
5	9,78 Ac	- 91,95	45,83 Bc	- 9,75
6	5,77 Ac	- 95,24	51,44 Bc	+ 1,31
Colheita manual	43,33 Aa	- 64,35	91,23 Ba	+ 79,67
CV (%)	25,89	-	20,69	-

*Médias seguidas por mesmas letras minúsculas, comparadas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade. Médias seguidas por mesmas letras maiúsculas, comparadas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste t à 5% de probabilidade.

Notou-se que, na lavoura de carga inicial alta, logo após a colheita, o enfolhamento foi menor onde se utilizaram repetidas operações da colhedora, obtendo valores de 21,79 e 46,6%, respectivamente, para seis e três operações da colhedora. Isso ocorreu devido à maior desfolha proporcionada pela repetição de operações, o que aumenta o tempo de contato das varetas da colhedora com a vegetação da planta. A colheita com uma passada proporcionou enfolhamento semelhante à colheita manual (Figura 3).

Após 90 e 180 dias, verifica-se que a diferença de enfolhamento entre os tratamentos diminuiu consideravelmente, de forma que os valores ficaram próximos. Segundo as equações de regressão os valores tendem a se estabilizar ao longo dos dias que transcorrem (Tabela 3). Analisando o coeficiente angular da reta, verifica-se que a taxa de enfolhamento foi superior nos tratamentos que obtiveram os menores valores iniciais de enfolhamento, notadamente no que utilizou seis operações da colhedora. Isso ocorreu, devido ao efeito do "palmeamento", que se dá pela emissão constante de ramos plagiotrópicos secundários e, conseqüentemente, maior número de nós e de folhas (Matiello et al., 2010).

Na última avaliação realizada (270 dias após a colheita) nota-se que o enfolhamento foi semelhante em todos os tratamentos, fato este que demonstra a elevada capacidade do cafeeiro de recomposição de seus ramos e da área foliar. Nos novos nós haverá gemas que se diferenciarão em folhas e também em frutos que pertencerão à safra de dois ciclos seguintes, uma vez que, geralmente no momento da colheita, a safra subsequente já encontra-se definida pelo crescimento no ano anterior. Isto sugere que na próxima safra (2015) a capacidade produtiva das plantas poderá ser semelhante entre os tratamentos, independentemente do tipo de colheita realizado.

Na lavoura de carga inicial intermediária, as plantas estavam mais enfolhadas que na lavoura de carga inicial alta, com valores superiores à 55%, mesmo quando utilizou-se seis operações da colhedora (Figura 4). Essa diferença, é referente à carga que a lavoura de carga inicial alta apresentava antes de ser colhida ($121,54$ sacas de café ben.ha⁻¹), sendo maior que o dobro da carga da lavoura de carga inicial intermediária. Em lavouras de alta produtividade, ocorre naturalmente maior senescência das folhas, devido ao esgotamento das reservas que foram drenadas para os frutos (Matiello et al., 2010). No entanto, os valores finais de enfolhamento, entre as duas lavouras foram semelhantes, entorno de 90%. Segundo DaMatta et al., (2007), o período citado, correspondente ao mês de abril é quando ocorre o máximo ganho de área foliar em cada ciclo do cafeeiro, tendendo a se estabilizar e, posteriormente se reduzir após a colheita.

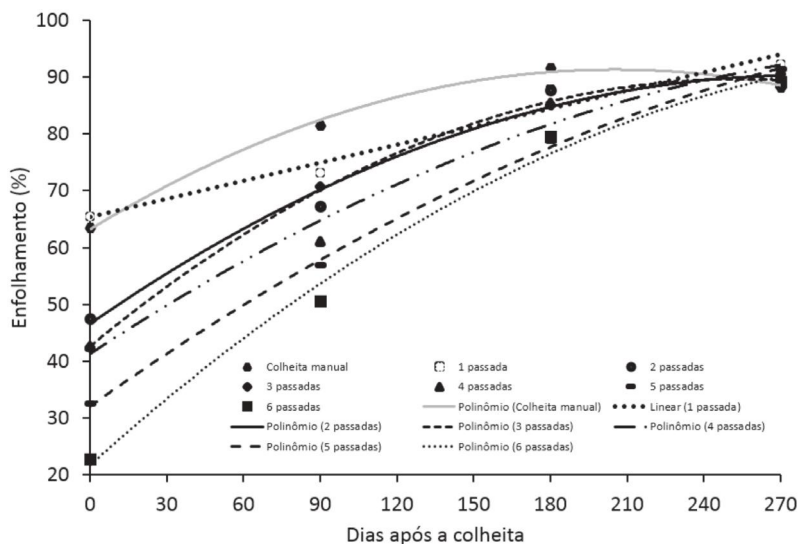


Figura 1. Enfolhamento proporcionado por diferentes tipos de colheita, ao longo de 270 dias, na lavoura de carga inicial alta, safras 2013/14, Patos de Minas, MG.

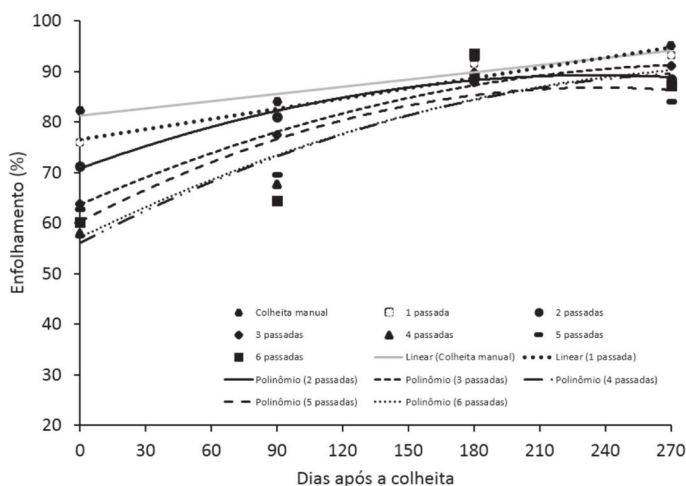


Figura 2. Enfolhamento proporcionado por diferentes tipos de colheita, ao longo de 270 dias, na lavoura de carga inicial intermediária, safras 2013/14, Patos de Minas, MG.

Tabela 3. Enfolhamento do cafeeiro, nas lavouras de carga inicial alta e intermediária em função do número de operações da colhedora e colheita manual, Patos de Minas, MG.

Número de operações da colhedora	Equação	F	R ²
Lavoura de carga inicial alta (bienalidade positiva)			
1	$65,4362 + 0,1057x$	64,642**	0,96
2	$46,6046 + 0,3118x - 0,00055x^2$	9,23**	0,98
3	$42,6825 + 0,3706x - 0,00073x^2$	19,469**	0,99
4	$41,3304 + 0,2961x - 0,0004x^2$	6,741*	0,98
5	$32,1324 + 0,3183x - 0,00036x^2$	4,689*	0,99
6	$21,789 + 0,4046x - 0,00056x^2$	11,195**	0,99
Colheita manual	$63,2532 + 0,2731x - 0,00066x^2$	14,326**	0,99
Lavoura de carga inicial intermediária (bienalidade negativa)			
1	$76,5232 + 0,0678x$	37,728**	0,93
2	$70,8243 + 0,1566x - 0,00033x^2$	4,356*	0,98
3	$63,6633 + 0,1886x - 0,00032x^2$	4,694*	9,99
4	$56,0971 + 0,2227x - 0,00036x^2$	5,159*	0,91

Avanços Tecnológicos Aplicados à Pesquisa na Produção Vegetal

5	$60,2938 + 0,2238x - 0,00047x^2$	9,207**	0,79
6	$57,1581 + 0,2103x - 0,00032x^2$	2,873**	0,78
Colheita manual	$81,1909 + 0,0479x$	14,139**	0,94

* = significância à 5% de probabilidade; ** = significância à 1% de probabilidade.

*Médias seguidas por mesmas letras maiúsculas, comparadas nas colunas superiores de coloração cinza e minúsculas, comparadas nas colunas intermediária de coloração preta e na linha pontilhada, não diferem entre si, pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

A análise de variância apontou diferença, nos tratamentos estudados, quanto ao número de nós totais, nós de crescimento e nós de produção apenas na lavoura de carga inicial alta, sem haver diferença para a lavoura de carga inicial intermediária. Também não houve diferença pelo teste F ($P \leq 0,05$), na lavoura de carga inicial alta, para a variável nós velhos. Aos 270 dias após a colheita verifica-se que o maior número de nós foram obtidos nas colheitas com cinco e seis operações (Figura 5). Tal fato é decorrente do maior "palmeamento" dos ramos, também verificado pela taxa de enfolhamento. Não verificou-se diferença nessa avaliação na lavoura de carga inicial intermediária, provavelmente devido ao menor "palmeamento", decorrente do maior enfolhamento logo após a colheita. Isto, por que quanto menor o enfolhamento maior é a penetração de luz solar no interior do dossel da planta que diferencia as gemas em ramos plagiotrópicos secundários (Matiello et al., 2010).

As colheitas com cinco e seis operações da colhedora obtiveram os menores números de nós de produção, com menor presença de frutos nos ramos (Figura 5). Os resultados dessa avaliação foram confirmados pelas menores produtividades obtidas em 2014. O oposto é verificado com relação ao número de nós de crescimento, o que poderá acarretar em produtividades maiores na safra de 2015, minimizando o efeito negativo da bienalidade, na média das

três safras. Não houve diferença entre os tratamentos quanto ao número de nós velhos.

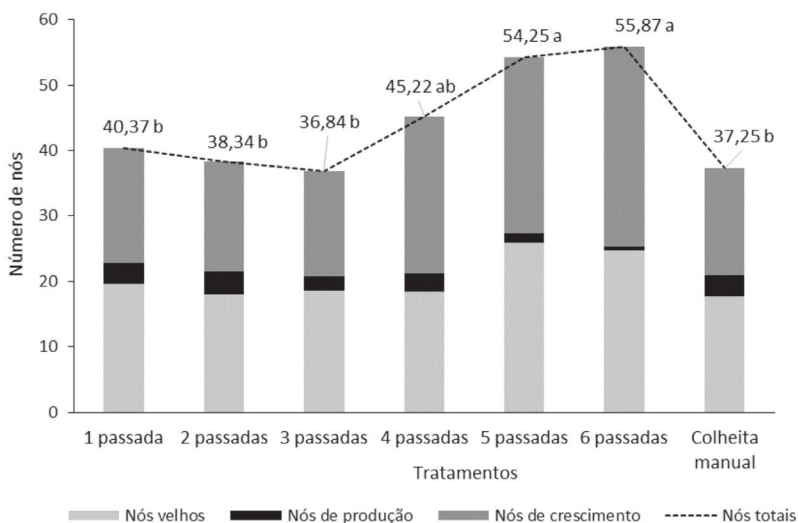


Figura 3. Número total de nós, nós velhos, nós de produção e nós de crescimento em plantas de café, 270 dias após diferentes tipos de colheita. Patos de Minas, MG.

Duas safras posteriores à execução dos tratamentos ocorreram profundas modificações nas produtividades em detrimento das diferenças de respostas morfológicas já evidenciadas pelas avaliações de biometria e composição de ramos.

Verificou-se, na segunda safra, que as colheitas com 1 e 2 passadas da colhedora, bem como a colheita manual não se diferenciaram quanto à produtividade. A partir de 3 passadas houve declínio na produtividade. As reduções de produtividade entre os tratamentos com 3; 4; 5 e 6 passadas e a média de 1 e 2 passadas e colheita manual foram de 13,1 e 17,4; 29,16 e 22,8; 33,76 e 47,5 e 37,76 e 41,9 sacas de café ben.ha⁻¹, respectivamente para

as lavouras Dona Neném e São João Grande.

Apesar das grandes diferenças de produtividade entre os tratamentos na segunda safra, na terceira safra as produtividades se igualaram entre todos os tratamentos estudados. Ou seja, em dois anos o cafeeiro consegue recuperar suas estruturas vegetativas ao ponto de produzir a mesma quantidade de café, independentemente da intensidade de desfolha que foi submetido.

Notou-se grande acréscimo na produtividade entre a terceira e segunda safra nos tratamentos que colheram com 4; 5 e 6 passadas, os mesmos foram: 50,9; 40,8 e 54,5 sacas de café ben. ha⁻¹ respectivamente, na Fazenda Dona Neném. Tais valores foram muito superiores aos obtidos pelos tratamentos que colheram com 1; 2 e 3 passadas, e colheita manual. Na Fazenda São João Grande, em ano de bienalidade negativa, somente os tratamentos com 5 e 6 passadas tiveram acréscimo na produtividade.

Na média das três safras estudadas, as maiores produtividades foram obtidas pelos tratamentos que colheram com 1 e 2 passadas e colheita manual, na lavoura Dona Neném. Já na lavoura São João Grande o tratamento que colheu com duas passadas obteve a maior produtividade.

Nas duas lavouras notou-se que na média das três safras os tratamentos que colheram com 3 e 4 passadas obtiveram produtividades inferiores aos melhores tratamentos, porém com diferenças que vêm diminuindo ao longo do tempo. A ação intensa das colhedoras promove o efeito do "palmeamento" dos ramos, e o mesmo eleva a capacidade produtiva das plantas ao longo do tempo. Para maiores conclusões haverá a colheita da 4ª safra no ano de 2016 objetivando verificar se na média das 4 safras as produtividades voltam a se equilibrar, mesmo após abruptos declínios no ano seguinte à aplicação dos tratamentos.

Tabela 4. Produtividade do café em 2^a, 3^a e 4^a safras, e média das 3 safras, bem como as variações entre a 2^a e a 1^a e a 3^a e a 2^a safras, em função dos tipos de colheita estudados.

Trat.	2 ^a safra		Var. 2 ^a - 1 ^a		3 ^a safra		Var. 3 ^a - 2 ^a		Média das 3 safras	
	DN	SJG	DN	SJG	DN	SJG	DN	SJG	DN	SJG
1 P	44,1 ab	95,6 aA	-77,4	44,8	70,6 aA	57,1 aB	26,5	-38,5	78,8 aA	67,8 abB
2 P	43,3 ab	93,2 aA	-78,3	42,4	73,8 aA	67,3 aA	30,5	-25,9	79,5 aA	70,4 aB
3 P	30,5 abB	75,9 abA	-91,0	25,2	57,9 aA	61,2 aA	27,5	-14,8	69,9 abA	62,6 abA
4 P	14,4 bB	70,5 abA	-107,1	19,8	65,3 aA	66,8 aA	50,9	-3,8	67,1 abA	62,7 abA
5 P	9,8 bB	45,8 cA	-111,8	-4,9	50,6 aB	68,3 aA	40,8	22,5	60,6 bA	54,9 cA
6 P	5,8 bB	51,4 bcA	-115,8	0,7	60,3 aA	66,4 aA	54,5	14,9	62,5 bA	56,2 bcA
Manual	43,3 ab	91,2 aA	-78,2	40,5	65,1 aA	48,6 aB	21,7	-42,6	76,6 aA	63,5 abB
CV (%)	24,59				19,11				8,52	

*DN = Dona Neném (1^a safra = 121,54 sc. ben./ha) e SJG = São João Grande (1^a safra = 50,78 sc. ben./ha).

**Médias seguidas das mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas, nas linhas, não diferem de si pelo teste de Tukey e t, ambos a 5% de probabilidade.

Diante do exposto conclui-se que:

1 – A colheita mecanizada do café com até duas operações da colhedora não se diferencia da colheita manual quanto à variação da produtividade a curto e longo prazos.

2 – Mesmo submetendo o cafeeiro a situações de desfolha intensa, após duas safras a produtividade volta a se equilibrar, independentemente do tipo de colheita realizado.

3 – O efeito do palmeamento promove aumento na capacidade produtiva das plantas e ao longo dos anos tende a equilibrar as produtividades entre os tipos de colheita adotados.

4 – O estudo terá continuidade por mais duas safras

EXPERIMENTO 2

Neste segundo experimento objetivou-se verificar a influência produtiva da colheita mecanizada e manual em lavouras de primeira safra, utilizando colhedora convencional e adaptada. As lavouras cafeeiras de primeira safra apresentam profundas diferenças com relação às adultas. Primeiramente elas são constituídas, em sua maioria, de ramos herbáceos, os que estão em crescimento pleno e ainda não lignificados. Estes ramos são mais frágeis e possuem gemas que irão originar a produção da safra seguinte. Outro ponto é que os frutos de café encontram-se próximos ao tronco, ao contrário das lavouras adultas que apresentam frutos mais distantes do tronco nos terços inferior e médio, e próximos somente no terço superior. Com isso para se colher cafés de primeira safra há a necessidade de aproximar as hastes do tronco, o que o danifica com maior

intensidade (Santinato et al., 2014b).

Outra grande diferença que dificulta a colheita mecanizada de primeira safra é a altura de inserção dos ramos plagiotrópicos no tronco, sempre baixas, próximas ao solo, e normalmente em altura inferior à altura de inserção da colhedora. Isto promove o “atropelamento” dos ramos pela máquina, quebrando-os além de não colher o café (Santinato et al., 2014b).

Diante disto, têm se desenvolvido adaptações nas colhedoras que as ajustem para a colheita desta situação especial. Normalmente faz-se o rebaixamento da colhedora, substituindo o suporte das esteiras por outro de menor espessura, utilizam-se varetas de maior comprimento, que possibilitam que estas alcancem com maior facilidade os café próximos do tronco, reduz-se a distância entre os cilindros, adaptando-os à menor estrutura da lavoura, rebaixam-se as placas justapostas que são posicionadas em torno dos pés de café, reduzindo a altura de ação da máquina em relação ao solo, dentre outras modificações. Esse aperfeiçoamento pode elevar a eficiência de colheita e reduzir os danos às plantas (Matiello et al., 2010).

Neste experimento testou-se as colhedora convencional e adaptada, em como a colheita manual em duas lavouras com estágio de maturação maduro e imaturo. O experimento foi realizado no município de Buritizeiro, MG, na Fazenda Serra Norte, em lavouras da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. Os cinco tratamentos foram estudados no delineamento experimental de blocos ao acaso, em parcelas de cinco plantas, em cada uma das lavouras. Avaliou-se a biometria e a produtividade da safra seguinte à operação.

Não houve diferença entre os tratamentos estudados para o número de nós e para o enfolhamento nas duas lavouras estudadas aos 180 dias após a colheita de 2014. Tal fato mostra que os tipos de colheita não influenciaram no crescimento dos ramos do cafeeiro. Houve diferenças entre as duas lavouras estudadas para o número

de nós e para o enfolhamento, sendo que a lavoura madura obteve os menores valores, apresentando menor crescimento. Isto ocorreu pois, quando se permite que os frutos permaneçam por mais tempo nas plantas ocorre o depauperamento da lavoura e conseqüente redução do crescimento e da produtividade na safra seguinte, já que os frutos são drenos constantes da planta (Tabela 5).

Tabela 5. Número de nós e enfolhamento da lavoura, 180 dias após a colheita, em função dos tratamentos estudados

Tipo de colheita	Lavoura imatura	Lavoura madura	Lavoura imatura	Lavoura madura
	Número de nós		Enfolhamento (%)	
T1 - Adaptada I	15,1 aA	10,0 aB	89,27 aA	88,7 aA
T2 - Adaptada II	13,87 aA	10,8 aB	95,8 aA	83,5 aB
T3 - Convencional I	13,75 aA	9,3 aB	88,22 aA	87,4 aA
T4 - Convencional II	12,85 aA	10,45 aB	94,82 aA	80,9 aB
T5 - Manual	13,47 aA	13,47 aA	87,59 aA	87,6 aA
CV (%)	31,12		21,63	

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, não diferem de si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

A indiferença entre os tratamentos para número de nós e enfolhamento refletiu na não diferença entre eles também na produtividade. Na Tabela 6 observou-se que independentemente do tipo de colheita utilizado, não houve diferença entre as produtividades da safra subsequente à execução dos tratamentos. Ou seja, a colheita mecanizada do café de primeira safra pode ser realizada mecanicamente sem que haja prejuízos na produtividade da safra seguinte.

Tabela 6. Produtividade do cafeeiro de 2015, uma safra após a execução dos tratamentos (tipos de colheita).

Tipo de colheita	Produtividade de 2015 (sacas de café ben.ha ⁻¹)
Colhedora adaptada	29,68 a
Colhedora convencional	32,75 a
Colheita manual	27,60 a
CV (%)	30,37

*Médias seguidas das mesmas letras não diferem de si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

Pode-se concluir que:

1 – A colheita do café de primeira safra pode ser realizada mecanicamente sem que haja prejuízos na produtividade pois esta não diferiu da colheita manual.

EXPERIMENTO 3

Neste outro experimento testou-se o uso de extensores de borracha na ponta da haste das colhedoras de café. Este artifício visa reduzir os danos às plantas, já que o mesmo é constituído de material menos rígido que as hastes normais, de fibra de vidro. Além disso, o aparato, por ser maleável, adquire movimento oscilatório que derricha maior quantidade de frutos por ter maior área de contato.

Sua utilização de início foi empírica, e após a condução de alguns trabalhos, como este, pôde-se ter fundamentos para sua recomendação. O experimento foi instalado na Fazenda Gaúcha, situada em Presidente Olegário, MG, em lavoura de café da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. Os cinco tratamentos foram estudados no delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições, em parcelas de cinco plantas. Avaliou-se a biometria e a produtividade da safra seguinte.

Não houve diferença no número de nós e enfolhamento da lavoura 180 dias após a colheita. Tal fato demonstra a rápida recomposição vegetativa do cafeeiro que igualou o número de nós e o enfolhamento entre os tratamentos estudados depois de 180 dias (Tabela 1). No entanto, a recomposição vegetativa não foi suficiente para suplantiar os danos às plantas ocorridos na colheita de 2014, pelos tratamentos Haste longa, culminando na redução da produtividade (Tabela 7).

Tabela 7. Número de nós e enfolhamento da lavoura, 180 dias após a colheita, em função dos tratamentos estudados.

Tipo de colheita	Biometria do cafeeiro	
	Número de nós	Enfolhamento (%)
T1 – Hastes curtas	9,31 a	64,05 a
T2 – Hastes curta + 10 cm de extensor	9,0 a	63,25 a
T3 – Haste curta + 7 cm de extensor	9,34 a	53,17 a
T4 – Haste curta + 4 cm de extensor	8,47 a	60,66 a
T5 – Haste longa	8,9 a	54,02 a
T6 – Colheita manual	9,46 a	56,07 a
CV (%)	39,44	33,02

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, não diferem de si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

Comumente na colheita o cafeicultor utiliza as hastes longas na colhedora para aumentar a área de contato do órgão derrizador com os frutos que se encontram próximos do tronco. Esta estratégia eleva a eficiência de colheita em relação à haste curta (menor área de contato) (Santinato et al., 2014d), no entanto reduz a produtividade no ano seguinte como pode ser visto na Tabela 8. A haste longa promoveu redução da produtividade em relação aos demais tratamentos. Dessa forma indica-se a utilização dos extensores de borracha pois os mesmos não influem na produtividade da safra seguinte, não diferindo da colheita manual, além de terem

proporcionado maiores eficiências de colheita (+10%) (Santinato et al., 2014d).

Os extensores de borracha devem ser posicionados nas hastes que estão colhendo os cafés próximos do tronco, como no terço superior das plantas adultas e em grande parte das plantas novas. Deve-se evitar colocar hastes no ponto máximo das plantas, mesmo utilizando extensores, tanto em plantas adultas quanto novas, pois a ação das hastes na ponteira dos cafeeiros prejudica seu crescimento.

Deve-se esclarecer que os tamanhos dos extensores de borracha, adotados nos tratamentos do presente estudo, não são normas para serem seguidas em qualquer tipo de colhedora. Tais dimensões foram as mais apropriadas para o teste da colhedora em questão. O tamanho ideal do extensor é o correspondente à sobreposição de uma haste de um cilindro na outra do cilindro ao lado. O tamanho do extensor é alterado conforme a distância entre cilindros de cada colhedora em questão.

Tabela 8. Produtividade do cafeeiro de 2015, uma safra após a execução dos tratamentos (tipos de colheita)

Tipo de colheita	Produtividade de 2015 (sacas de café ben.ha ⁻¹)
T1 – Hastes curtas	43,2 a
T2 – Hastes curta + 10 cm de extensor	37,83 ab
T3 – Haste curta + 7 cm de extensor	41,11 a
T4 – Haste curta + 4 cm de extensor	46,32 a
T5 – Haste longa	31,75 b
T6 – Colheita manual	42,16 a
CV (%)	30,37

*Médias seguidas das mesmas letras não diferem de si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

Com relação à durabilidade dos materiais constatou-se que o material mais resistente foi o Tubo de borracha preto (22 dias), seguido da mangueira de silicone (12 dias). Os mesmos sofreram

menos danos que os demais materiais permanecendo até o final do experimento, com destaque para o Tubo de borracha preto.

Pode-se concluir que:

1 – Não se deve utilizar hastes longas para a colheita mecanizada do café, as mesmas devem ser substituídas por hastes curtas dotadas de extensores de borracha.

2 – A colheita mecanizada do café de primeira safra não interfere na produtividade do cafeeiro na safra seguinte.

3 – Deve-se utilizar o Tubo de borracha preto na ponta das hastes vibratórias das colhedoras

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto neste capítulo pode-se inferir a que níveis de danos nas plantas podemos trabalhar na colheita mecanizada do café, otimizando as regulagens das colhedoras e promovendo a manutenção de elevadas produtividades sem a redução abrupta das mesmas em detrimentos de excessos passíveis de serem evitados. Além disso, concluímos que a colheita mecanizada também pode ser executada em lavouras de primeira safra, desde que se utilizem colhedoras adaptadas, derrubando o pressuposto de que ela seria prejudicial ao desenvolvimento do cafeeiro. Os trabalhos também nos nortearam sobre como utilizar os extensores de borracha na ponta das hastes das colhedoras, reduzindo os danos.

REFERÊNCIAS

CAMARCO, A.P.; CAMARGO, M.B.P. Definições e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, v. 60, n.1, p. 65-68, 2001.

CANNELL, M.G. Crop physiological aspects of coffee bean yield – a review. **Kenya Coffee**, 41:245-253, 1976.

DaMATTA, F. M. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. **Field Crops Research**, v. 86, p. 99-114, 2004.

MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R. A.; FERNANDES, D. R. **Cultura do Café no Brasil, Manual de Recomendações**. Rio de Janeiro e Varginha: Fundação Prócafé, 2010. 542p.

PEREIRA, S. O.; BARTHOLO, G. F.; BALIZA, D. P.; SOGREIRA, F. M.; GUIMARÃES, R. J. Produtividade e Bionalidade do cafeeiro em função do espaçamento de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 2, p. 152-160, 2011.

SANTINATO, F.; RUAS, R.A.A.; SILVA, R.P.; TAVARES, T.O.; SANTINATO, R. Efeitos morfológicos decorrentes da colheita mecanizada com até seis operações da colhedora e colheita manual. In Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 40, p. 139-140, 2014 a.

SANTINATO, F.; SILVA, R. P.; CASSIA, M. T.; SANTINATO, R. Análise quali-quantitativa da operação de colheita mecanizada de café em duas safras. **Coffee Science**, Lavras, v. 9, n. 4, p. 495-505, 2014 b.

SANTINATO, F.; SILVA, R.P.; RUAS, R.A.A.; CASSIA, M.T.;

SANTINATO, R. Efeitos fisiológicos na cultura do café decorrentes da utilização de uma a seis passadas da colhedora. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIIRAS, 39, Poços de Caldas. **Trabalhos apresentados...** Poços de Caldas: MAPA/PROCAFÉ, 2013. P. 204 – 207.

SANTINATO, F.; TAVARES, T.O.; SILVA, R.P.; RUAS, R.A.A.; SANTINATO, R. Utilização de extensores de borracha nas extremidades das hastes vibratórias das colhedoras de café. *In*: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 40, Serra Negra. **Anais...** Serra Negra: MAPA/PROCAFÉ, 2014d. p.145.

SANTINATO, F.; SILVA, R.P.; SILVA, C.D.; RUAS, R.A.A.; SANTINATO, R. Desempenho operacional de colhedoras de café em lavoura de primeira safra. *In* Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 40^o, Serra Negra, p. 126-127, 2014 c.

VALADARES, S. V.; NEVES, J. C. L.; ROSA, G. N. G. P.; MARTINEZ, H. E. P.; VENEGAS, V. H. A.; LIMA, P. C. Produtividade e bienalidade da produção de cafezais adensados, sob diferentes doses de N e K. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, v. 48, n. 3, p.296-303, 2013.

Inspeção de pulverizadores na região do Alto Paranaíba-MG

¹Diego Sichoeki.

²Renato Adriane Alves Ruas.

³José Márcio de Souza Júnior.

⁴Guilherme Andrade Gontijo.

⁵João de Deus Godinho Júnior.

⁶Alberto Carvalho Filho.

INTRODUÇÃO

A Região do Alto Paranaíba destaca-se no cenário agrícola nacional pela sua elevada e diversificada produtividade agropecuária. Porém, para manutenção destas altas produtividades, faz-se necessário o uso intensivo de fertilizantes e agrotóxicos que,

- 1 Diego Sichoeki. Email: diegolns@yahoo.com.br. Endereço: Av. Rio Grande do Sul, Nº 1802, caixa postal 48, Bairro Distrito Industrial. Cep.:78.640-000.Canarana-MT.
- 2 Renato Adriane Alves Ruas. Email: renatoruas@ufv.br. Endereço: Rodovia MG, 230, km 07, caixa postal 22. Cep.: 38.810-000. Rio Paranaíba-MG.
- 3 José Márcio de Souza Júnior. Email: jose.marcio@ufv.br. Endereço: Rua Soares, Nº 345, Bairro Niterói. Cep.: 38.840-000. Carmo do Paranaíba-MG.
- 4 Guilherme Andrade Gontijo. Email: guilherme.gontijo@ufv.br. Endereço: Rua Gabriel Resende Silva, Nº 194, Bairro Minas Gerais. Cep.: 38.840-000. Carmo do Paranaíba-MG.
- 5 João de Deus Godinho Júnior. Email: joao.godinho@ufv.br. Endereço: Rua Governador Valadares, Nº 121, Bairro Centro. Cep.: 38.840-000. Carmo do Paranaíba-MG.
- 6 Alberto Carvalho Filho. Email: albertoufv@gmail.com. Endereço: Rodovia MG, 230, km 07, caixa postal 22. Cep.: 38.810-000. Rio Paranaíba-MG.

quando mal empregados, podem comprometer sobremaneira a sustentabilidade de todo o processo produtivo. Desta forma, o emprego de equipamentos para este fim, deve ser feito de forma criteriosa, procurando fazer com que o produto atinja o alvo no momento certo, na quantidade correta, com o mínimo de contaminação de outras áreas e sem esquecer o lado econômico da aplicação. Para tanto, os pulverizadores devem se encontrar em boas condições de uso e serem operados por pessoas treinadas, sob pena de causarem sérios danos às lavouras, ao meio ambiente e à lucratividade, se mal utilizados.

Uma maneira de estimular produtores e técnicos a manterem seus pulverizadores em condições adequadas de uso é por meio da realização obrigatória de inspeções periódicas, que consistem na verificação das condições técnicas dos pulverizadores. O que em alguns países da Europa, como a Alemanha, já é uma realidade. No entanto, no Brasil a realização de inspeções periódicas de pulverizadores é recente, e ainda, não é instituída por lei. E apenas em alguns estados, como o de Santa Catarina, esta inspeção é feita apenas como caráter de certificação. Nesse caso, os pulverizadores são inspecionados por técnicos ligados a órgãos de pesquisa públicos e, se o equipamento for considerado apto, recebe um selo de certificação.

No entanto, na região do Alto Paranaíba, apesar de ser muito importante para o processo de produção agrícola, em geral, pouca atenção tem sido dada à qualidade dos equipamentos empregados nas aplicações de agrotóxicos, o que pode reduzir a eficácia de certos tratamentos. O que pode ser atribuído a esses problemas serem omitidos devido ao elevado rendimento das lavouras comumente produzidas na região. Entretanto, todo o ônus das aplicações mal realizadas fica para o meio ambiente, comprometendo seriamente a sustentabilidade do sistema produtivo a médio e longo prazo.

Desta forma, o levantamento de dados referentes à situação dos pulverizadores na Região do Alto Paranaíba pode contribuir para a realização de um mapeamento mais detalhado sobre a qualidade das pulverizações na região. Isso possibilitará a implantação de ações específicas voltadas para a solução dos eventuais problemas.

PROCEDIMENTOS DE INSPEÇÃO DE PULVERIZADORES

No ano de 2001, foi publicada a primeira tese de doutorado sobre inspeção de pulverizadores agrícolas no Brasil (Gandolfo, 2003). A partir desta data, diversas outras ações foram implementadas para levantar informações sobre a qualidade dos pulverizadores no Brasil afora, o que tem contribuído substancialmente para o levantamento de maiores detalhes da situação sobre as aplicações de agrotóxicos no Brasil. De modo geral, todas essas ações procuram seguir uma mesma linha de atuação, considerando-se as devidas adaptações para realidade local de cada região. Primeiramente, aplica-se um questionário ao proprietário ou responsável pelo pulverizador com o objetivo de coletar informações relacionadas à área da propriedade e as culturas cultivadas no estabelecimento rural (Tabela 1).

Tabela 1. Informações gerais da propriedade e do pulverizador a ser inspecionado

Informações da Propriedade	
Nome da Propriedade:	
Nome do Proprietário:	
Município:	
Culturas:	
Endereço para correspondência:	
Coordenadas Geográficas:	
Água utilizada nas pulverizações	
Origem:	
Tubulação:	
Material do depósito:	
Informações do Pulverizador	
Tipo:	
Cód. de identificação:	
Dispositivo de agitação:	
Modelo:	
Marca:	
Sistema de engate:	
Locais com filtros:	
Ano de fabricação:	
Capacidade do depósito:	
Informações da Bomba	
Tipo:	
Acionamento:	
Modelo:	
Potência:	
Fabricante:	
Rotação:	
Pressão nominal:	
Vazão à pressão nominal:	
Informações das Barras e Pontas	
Número de seções:	
Tipo de ponta:	
Material de fabricação da ponta:	
Número de bicos:	
Vazão da ponta:	
Comprimento da barra:	
Fabricante:	
Modelo da ponta:	
Taxa de aplicação:	

Em seguida, para qualificar o pulverizador, uma proposta que tem sido adotada é atribuir pontos a cada item de interesse na máquina. Como cada item pode comprometer a pulverização de forma diferenciada, eles devem receber pontuações independentes.

Nesse sentido, realizou-se um trabalho na Região do Alto Paranaíba-MG no ano de 2013, onde foram inspecionados 30 pulverizadores hidráulicos e 30 hidropneumáticos cujo objetivo geral foi avaliar a qualidade das pulverizações na região. Para tanto, atribuiu pontuações de 0 e 15, de forma que, 0 representou item ausente ou inadequado e 5, 10 ou 15 representou item presente ou adequado parcial ou totalmente. Assim, a pontuação máxima alcançada por um pulverizador totalizou 600 pontos divididos em três fatores (mão de obra, equipamento e calibração) para ambos os tipos (hidráulico e hidropneumático). Para avaliação da mão de obra a nota máxima foi de 150 pontos. Já para a avaliação da calibração, a pontuação máxima destinada foi de 150 pontos e para a condição do equipamento, a nota máxima foi 300 pontos.

AVALIAÇÃO DA QUALIFICAÇÃO DA MÃO DE OBRA

Na avaliação da mão de obra o operador deve ser questionado sobre: a forma com que realiza a lavagem e uso do equipamento de proteção individual (EPI); procedimento utilizado para desentupir pontas e mangueiras (uso de pincéis ou ar comprimido); nível de alfabetização; curso nos últimos dois anos; conhecimento dos riscos da deriva; conhecimento dos procedimentos de calibração; conhecimento das variáveis climáticas; de seus limites para realização da aplicação e forma de monitoramento dessas; revisão do equipamento antes das aplicações e sobre a limpeza, após o término da jornada de trabalho (Tabela 2).

Tabela 2. Questionário utilizado para avaliação da mão de obra envolvida na aplicação de agrotóxico

Itens avaliados	Nota total
Segurança na aplicação	Usa EPI 10
	Sabe como proceder com lavagem 10
	Limpa com pincel as pontas e mangueiras 10
	Sabe ler e escrever 10
Conhecimentos	Fez Algum curso nos 02 últimos anos 10
necessários para a prática de	Conhece sobre os riscos da deriva 10
pulverização	Conhece os procedimentos de calibração 10
	Sabe calcular a vazão adequada 10
Condições	Sabe a faixa de temperatura adequada 10
meteorológicas para aplicação	Sabe a faixa de umidade relativa do ar adequada 10
	Sabe a faixa de velocidade do vento adequada 10
Equipamentos para	Possui 10
avaliação climática	Acompanha nas aplicações 10
Cuidados com a	Revisa o pulverizador antes das aplicações 10
máquina	Limpa o pulverizador após as aplicações 10
Pontuação máxima (subtotal)	150

AVALIAÇÕES DAS CONDIÇÕES DO EQUIPAMENTO

Em relação ao equipamento, deve ser avaliado o estado das mangueiras, filtros, tanque de depósito, barras, ventilador, tacômetro, manômetro, pontas, lavador de embalagens, reservatório de água limpa, proteção de partes móveis, uniformidade de distribuição volumétrica, ângulo das pontas e nível de ruído (Tabela 3).

Tabela 3. Questionário utilizado para avaliação da condição do pulverizador

Itens avaliados	Presença e Estado dos itens		Nota total
	avaliados		
Vazamentos no depósito	Ausente		10
Mangueiras	Sem vazamentos		10
	Sem fissuras		10
	Não dobradas		5
Filtro da bomba	Presente		10
	Limpo		10
	Sem fissuras na malha		10
Filtros de linha	Presentes		5
	Limpos		5
	Sem fissuras na malha		5
Filtros das pontas	Presentes		5
	Limpos		5
	Sem fissuras na malha		5
Filtro do reabastecimento do depósito	Presente e em boas condições		5
Posicionamento de filtros e mangueiras	Não interfere o jato de pulverização		10
Proteção das partes móveis	Polias e Ventilador protegidos		5
	Árvore cardâmica protegida		5
Agitador de calda	Funcional		10
Lavador de embalagens	Funcional		5
Reservatório de água limpa	Funcional		5
Manômetro	Presente		15
	Preciso		15

Avanços Tecnológicos Aplicados à Pesquisa na Produção Vegetal

Válvulas antigotejo	Presentes	10
	Funcionais	10
Espaçamento entre pontas	Uniforme	15
Estado das pontas	São todas do mesmo modelo	10
	Apresentam mesma vazão	10
Alinhamento das barras de pulverização ¹	Alinhadas Verticalmente ¹	7
	São alinhados ²	
Dutos de condução de ar ²	Alinhadas Horizontalmente ¹	3
	Não apresentam vazamentos ²	
Acelerador manual	Funcional	10
Horímetro	Funcional	5
Análise de uniformidade de distribuição da barra	Adequada	15
Tacômetro	Funcional	15
Marcador de nível de tanque	Apresenta escala visível	5
Marcador de linhas ¹	Possui ¹	10
Turbina ²	Não apresenta pás tortas ²	
Níveis de ruído	Aceitáveis	5
Pontuação máxima (subtotal)		300

¹ Avaliações realizadas em pulverizadores hidráulicos. ² Avaliações realizadas em pulverizadores hidropneumáticos.

1- Vazamentos do tanque de depósito de calda

Faz-se a verificação da presença ou não de vazamentos no tanque de depósito de calda e contabilização do número de vazamentos. De forma que, independentemente da intensidade do vazamento, o pulverizador que apresentar vazamento no tanque de depósito de calda não pontua neste item, conforme procedimento adotado por Andersen & Nilsson (2009).

2- Mangueiras danificadas

Faz-se o levantamento do número mangueiras com presença de fissuras, que possibilitem o vazamento da calda, e presença dobras que possam obstruir a passagem da calda (Bjugstad, 1998).

3- Condições dos filtros

Faz-se a verificação da presença dos filtros de sucção (da bomba), de linha, da entrada do depósito e das pontas. Quando presentes, observa-se o estado de conservação e limpeza do mesmo.

4- Posicionamento das mangueiras e bicos hidráulicos

Neste caso, observa-se se existe alguma mangueira interceptando o jato de pulverização. E se os bicos hidráulicos estão posicionados de forma correta. Caso haja a presença de obstrução local ou a interferência do jato de pulverização, o pulverizador não recebe pontuação neste item.

5- Proteção das partes móveis

Nesta avaliação é feita a observação “presença ou ausência” de proteção adequada dos componentes que apresentam movimento, tais como: correia, eixo cardan, ventilador (em caso de pulverizador hidropneumático) e polias. Em caso de presença, devem ser atribuídos pontos positivos à avaliação.

6- Funcionamento do agitador de calda

Independentemente do agitador de calda ser do tipo hidráulico ou mecânico, deve-se observar se agitação da calda é vigorosa, a fim de homogeneizá-la. Para isso, deve-se acionar a bomba hidráulica do pulverizador na rotação nominal de trabalho. Caso o agitador esteja funcionando de forma correta devem ser acrescentados pontos positivos à avaliação.

7- Lavador de embalagens

De acordo com a Lei 7.802 de 1989, a lavagem de embalagens é obrigatória e neste caso deve ser verificada a presença e

funcionalidade do lavador de embalagens. Assim, para que ele seja considerado funcional, deve proporcionar pressão suficientemente alta para promover a remoção total dos agrotóxicos das embalagens.

8- Tanque de lavagem para as mãos

Deve-se verificar a presença do tanque com água limpa para ser realizada a lavagem das mãos do operador após o manuseio do pulverizador ou então, após o preparo da calda. Além disso, verificar se este está abastecido com água, o que o configura como funcional.

9- Precisão e funcionalidade do manômetro

Primeiramente deve ser feita a verificação da presença do manômetro instalado no pulverizador e de seu funcionamento, a partir do acionamento da bomba hidráulica do pulverizador e da observação da movimentação do ponteiro. Caso o manômetro esteja funcionando, deve ser avaliada a sua precisão. Nesse caso, o manômetro deverá ser retirado e acoplado em uma bancada de teste. Esta avaliação deve ser realizada conforme a norma NBR-12446/1992, na qual explicita que, as comparações devem ser realizadas com pressão mínima de 25% da escala máxima até o valor máximo correspondente a 75% do fundo de escala. A escala do manômetro será considerada adequada quando a pressão máxima do manômetro não ultrapassar 2500 kPa, uma vez que, a pressão de trabalho máxima de uma ponta cônica é de 2000 kPa, sendo desnecessário um manômetro com escala maior. Assim, nessa avaliação ocorre pontuação tripla, posto que é considerada a presença, a funcionalidade e adequação de escala.

10 - Presença e funcionalidade da válvula antigotejo

O sistema hidráulico do pulverizador deve ser acionado, a fim de pulverizar a calda, e posteriormente interrompido, observando-se se existe fluxo de calda nas pontas imediatamente após cessar a pressão de pulverização. De forma que, caso as pontas permaneçam gotejando, o gotejador será classificado como não funcional. Nessa avaliação ocorre dupla pontuação, em caso de presença e em caso de funcionalidade.

11 - Espaçamento entre pontas

Através da utilização de um instrumento de medida com resolução de 0,01m deverá ser medida a distância entre bicos de pulverização nos pulverizadores avaliados. As medidas que destoarem da média em 10% serão consideradas inadequadas e não pontuarão.

12 - Classificação dos tipos de pontas

Todas as pontas deverão ser retiradas e verificadas quanto ao seu modelo. Para que esse fator seja considerado adequado, é necessário que todas as pontas sejam do mesmo modelo.

13 - Funcionamento do acelerador manual e tacômetro

Apesar de não ser um componente do pulverizador, deve ser observado o funcionamento do acelerador manual do trator, uma vez que é de extrema importância para manter estável a rotação do motor enquanto se realiza a calibração, e posteriormente, a pulverização. Além deste, e tão importante quanto, o tacômetro deve estar em funcionamento, para que, durante a pulverização seja monitorada a rotação do momento da calibração, a qual deve permanecer constante.

14 - Marcador de nível de calda no depósito

Caso o marcador de nível do depósito esteja com má visibilidade ou inexistente, o pulverizador não deve receber pontuação neste item.

15 - Níveis de pressão sonora

As avaliações deste item são baseadas no método descrito na NBR-10152 (ABNT, 1987). Para isso, durante a medição do nível de ruído, a temperatura ambiente deve estar entre -5 e 30°C e a velocidade do vento deve ser inferior a 5,0 m s⁻¹. A medição deve ser realizada com o pulverizador em regime de trabalho (bomba e ventilador acionado) e motor do trator na rotação de trabalho utilizada pelo produtor. Para pontuar o nível de ruído deve estar dentro do limite permitido pela norma NR 31 que é de 85 decibéis (dB).

AVALIAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO PULVERIZADOR

Para esta avaliação deve ser verificada a rotação da tomada de potência, vazão de calda, escolha de pontas e filtros, presença de mais de um jogo de pontas, pressão de trabalho, percentual de deriva, volume de ar gerado pela turbina e adoção de procedimentos para monitoramento das condições climáticas (Tabela 4). E também, devido às características construtivas dos dois pulverizadores, algumas avaliações devem ser realizadas de modo diferenciado para cada um deles. Tais como: determinação do volume de aplicação, determinação da deriva e avaliação da distribuição volumétrica.

Tabela 4. Questionário utilizado para avaliação da calibração do pulverizador

Itens avaliados	Presença e Estado dos itens avaliados	Nota total
Rotação do motor	Trabalha na rotação nominal do motor	10
	A da TDP rotação é adequada	10
Velocidade	É ajustada com escalonamento das marchas	10
Pontas e filtros das pontas	São escolhidas em função do alvo e clima	10
	São aferidas antes da aplicação	10
	A vazão é uniforme	10
	A propriedade possui mais de um jogo de pontas	10
	Os filtros são escolhidos em função do produto	10
Regulagem	Pressão é adequada de acordo com as pontas	10
	A taxa de aplicação real condiz com a recomendada	10
	A uniformidade de distribuição é aferida	10
Condições climáticas na aplicação	Monitora-se a temperatura	10
	Monitora-se a velocidade do vento	10
	Monitora-se a umidade relativa do ar	10
Potencial de risco de deriva ¹	Baixo ²	10
Volume de ar ²	É correspondente ao manual do pulverizador ²	
Pontuação máxima (subtotal)		150

¹ Avaliações realizadas em pulverizadores hidráulicos. ² Avaliações realizadas em pulverizadores hidropneumáticos

1 - Funcionamento do contagiros, da TDP e ajuste da velocidade

Esta variável é analisada a fim de garantir a estabilidade das diferentes situações de aplicação. Para isto deve ser observado se o contagiros funciona e se o trator opera na rotação nominal do motor. Para isto, deve-se utilizar um tacômetro a fim de mensurar

se a rotação do motor utilizada condiz com a rotação de 540 rpm da TDP. Para este item considera-se uma variação de 10 rpm para mais ou para menos.

O ajuste da velocidade será considerado adequado quando feito com o escalonamento das marchas, uma vez que, quando é feito variando a rotação do motor, pode levar à operação fora da rotação nominal do motor e com isso, variações na rotação da tomada de potência, afetando, sobremaneira o deslocamento volumétrico da bomba do pulverizador.

2 - Escolha e adequação das pontas e filtros

Neste item será considerado correto este procedimento de escolha, quando esta for realizada de acordo com o alvo e o clima no momento da aplicação. E os filtros adequados quando estes forem os mesmos daqueles recomendados pelo catálogo do fabricante das pontas.

3 - Determinação da vazão das pontas hidráulicas

A verificação deste item deve ser realizada em função da vazão proporcionada por cada uma, em relação à média das vazões de todas as pontas instaladas no pulverizador.

Para isto a vazão de cada ponta deve ser mensurada através da coletada do líquido pulverizado (água) com o auxílio de uma mangueira flexível acoplada diretamente no bico e a um recipiente de coleta. Visando assim, a verificação e determinação do desvio padrão das pontas. De forma que, será considerado adequado, o desvio que não ultrapassasse 10% em relação à média aritmética das demais pontas (Andersen & Jorgensen, 2009).

4 - Determinação do volume de aplicação

Esta avaliação deverá ser realizada após a avaliação da determinação da qualidade das pontas, posto que, a média da vazão das pontas é utilizada para a determinação da taxa de aplicação do pulverizador. Para este parâmetro, também é levada em conta a velocidade de deslocamento (Equação 01) do conjunto trator-pulverizador, determinada a partir da medição do tempo gasto para o conjunto percorrer uma distância de 50 metros, sendo a medição realizada duas vezes.

$$V = \frac{50}{T} 3,6 \quad (01)$$

Em que:

V= velocidade de deslocamento do pulverizador (km h⁻¹) e

T= tempo para o pulverizador percorrer 50m (s).

Para os pulverizadores hidráulicos, a vazão do pulverizador (V_p) é determinada de acordo com a Equação 02.

$$V_p = \frac{((Qt/2)/1000)600}{VE} \quad (02)$$

Em que:

V_p= vazão do pulverizador (L ha⁻¹),

Qt= vazão coletada por ponta no intervalo de dois minutos (L)

V= velocidade de deslocamento (km h⁻¹) e

E= espaçamento entre bicos (m).

Para os pulverizadores hidropneumáticos, o procedimento para o

cálculo da taxa de aplicação é realizado, conforme a Equação 03.

$$Vp = \frac{60 N_b q}{0,1 Fv} \quad (03)$$

Em que:

Vp = volume de aplicação expresso em ($L ha^{-1}$),

N_b = número de bicos,

q = vazão média das pontas ($L min^{-1}$),

F : espaçamento entre ruas da cultura (m) e,

v : velocidade ($km h^{-1}$).

Os volumes os volumes obtidos pela coleta realizada pela equipe devem comparados com os volumes de aplicação informados pelos operadores, oferecendo pela diferença entre ambos, o valor correspondente ao erro na taxa de aplicação desejada. De forma que o limite de erro para que a calibração seja considerada aceitável deverá ser de 5% para mais ou para menos, conforme proposto por Ozkan (1987).

5 - Determinação da deriva do pulverizador hidráulico

Esta determinação deverá feita a partir de dados de densidade e diâmetros de gotas, depositadas na superfície de etiquetas de papel hidrossensível distribuídas equidistantes da barra a 2 e 6 metros. De forma que é considerado como limite aceitável de deriva, percentual igual a 8% do volume pulverizado para dois metros distantes da barra e 0,2% para seis metros distantes da barra (Jorgensen & Witt, 2000).

6 - Uniformidade de distribuição volumétrica da barra de pulverização

Esta avaliação é feita empregando-se a mesa horizontal, provida de 20 canaletas graduadas com resolução de 2 ml e espaçadas a 0,05m entre si. Essas canaletas, quando a mesa disposta na posição horizontal, coletam calda de pulverização das pontas, quando estão em funcionamento. Ao se terminar a coleta, a mesa é colocada na posição vertical e essas canaletas conduzem o líquido para provetas graduadas. O conteúdo dessas canaletas é aferido e a partir desses resultados, calcula-se a uniformidade de distribuição através da determinação do coeficiente de variação distribuição horizontal. De forma que, o coeficiente de variação do conjunto de canaletas é considerado satisfatório quando menor que 10% (Langenakens, 1999).

7 - Uniformidade de distribuição volumétrica do arco de pulverização

Para verificar a adequada uniformidade de distribuição volumétrica vertical utiliza-se uma mesa vertical (Figura 2). Para coleta do líquido, utilizando esta mesa, o pulverizador deverá ser deslocado paralelamente a bancada, que irá coletar o líquido pulverizado, determinando-se assim a distribuição vertical.



Figura 2. Coleta de calda com mesa de avaliação de uniformidade de distribuição volumétrica vertical

8 - Volume de ar produzido pelo ventilador do pulverizador hidropneumático

Nesta avaliação, a velocidade deve ser medida com anemômetro adequado posicionado a 0,10 m da saída de ar. Após realização da leitura (duas vezes em cada seção de saída de ar da turbina do pulverizador), determina-se o volume de ar produzido conforme a Equação 04 (Hinze, 1950). A partir desses cálculos os valores médios de vazão de ar obtidos na inspeção são comparados com o manual do pulverizador avaliado, admitindo-se uma variação de 10% de volume de ar em relação ao valor especificado pelo fabricante do pulverizador.

$$Q = \sum_{i=1}^{i=n} a_i \omega_{0i} \quad (04)$$

Em que:

Q = vazão de ar ($m^3 s^{-1}$),

a_i = áreas da seção onde se realizam as medições da velocidade do vento (m^2); e,

w_{oi} = velocidade em cada ponto ($m s^{-1}$).

CLASSIFICAÇÃO DOS PULVERIZADORES AVALIADOS

Após as avaliações, gera-se a nota final do pulverizador, que é classificado quanto à nota em função de escala pré-estabelecida (Tabela 5).

Tabela 5. Classificações dos pulverizadores avaliados de acordo com a nota alcançada nas avaliações

Percentual alcançado	Qualificação
0 - 40	Ruim
41 - 60	Regular
61 - 80	Bom
81 - 90	Muito Bom
91 - 100	Excelente

PRINCIPAIS RESULTADOS ENCONTRADOS NA INSPEÇÃO DE PULVERIZADORES NO ALTO PARANAÍBA

Pode-se observar que o fator que mais contribui para a nota final da qualidade da pulverização realizadas no Alto Paranaíba podem ser atribuídas as atividades realizadas durante o procedimento de calibração do pulverizador. Isso se deve, principalmente à qualificação da mão de obra empregada na operação, o que pôde ser comprovado na avaliação da mão de obra. Neste caso, verificou-se que a maioria dos operadores ignoram as condições climáticas para calibrar os

equipamentos e realizar as aplicações. Não raro, isso se dá devido à grande demanda de pulverização.

No fator equipamento, o item que mais influenciou foi o nível de ruído, seguido pelo eixo cardan desprotegido e presença de vazamentos em mangueiras. Essas constatações apontam para necessidades de melhorias nas condições de trabalho dos trabalhadores, uma vez que eles estão sujeitos a sérios riscos de acidentes.

Os manômetros apresentaram-se em melhor condição operacional nos pulverizadores hidráulicos em relação aos hidropneumáticos. Entretanto, 50% dos pulverizadores inspecionados não aplicam o volume de calda desejado, resultando muitas vezes em baixos controles e necessidade de novas aplicações, ou ocorrência de fitotoxicidade nas lavouras pelo excesso de produto aplicado.

De modo geral, verificou-se que os pulverizadores do Alto Paranaíba classificam-se como regular e bom, necessitando, principalmente, maior qualificação da mão de obra empregada na calibração e operação dos equipamentos.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Níveis de ruído aceitáveis**: 10152 (NB-95). Rio de Janeiro, 4p. 1987.

ANDERSEN, P.G.; JORGENSEN, M.K.; Calibration of sprayers. In: **Third European Workshop on Standardised Procedure for the Inspection of Sprayers**. 2009. Quedlinburg, Alemanha.

ANDERSEN, P.G.; NILSSON, E.; Regular calibration and technical checks of pesticide application equipment (according article 8/5) In:

Third European Workshop on Standardised Procedure for the Inspection of Sprayers. 2009. Quedlinburg, Alemanha.

BJUGSTAD, N. Control of crop sprayers in Norway. In: **AGENG. 1998**, Oslo. Eurageng: Oslo: s.n. 1998.

BRASIL, **Lei 7802, de 11 de julho de 1989**. Publicada no Diário Oficial da União em 12 de julho de 1989.

BRASIL. NR-31– **Segurança e Saúde no Trabalho na Agricultura, Pecuária Silvicultura, Exploração Florestal e Aquicultura**. Portaria GM n.º 86, de 03 de março de 2005.

HOLOWNICKI, R.; DORUCHOWSKI, G.; SWIECHOWSKI, W.; GODYN, A. Automatic self adjusting air-jet sprayer concept for fruit trees. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON AGRICULTURAL ENGINEERING**, Warwick, 2000.

GANDOLFO, M. A.; ANTUNIASSI, U. R. **Inspeção periódica de pulverizadores agrícolas**. Energia na Agricultura. Botucatu, v. 18, p. 67-76, 2003.

JORGENSEN, L.; WITT, K. L. Spraying and the impact on the environment: Spraying

technique in relation to approval and use of pesticides in Northern Europe. In: **HARDI**

INTERNATIONAL. Hardi international application technology - course 2000. Taastrup, 2000.

HINZE, G. Der Biber. Körperbau und Lebensweise, Verbreitung und Geschichte. Akademie verlag, Berlin, 1950.

LANGENAKENS, J. **Sprayng Nozzles: usability limits**. St. Joseph. ASAE, 1999.

OZKAN, H.E. Sprayer performance evaluation with microcomputers. **Application Engineering Agriculture**, v. 3, n. 1, p. 36-41, 1987.

Estrutura e organização de artigo científico

Rogério Faria Vieira

PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

Podem ser classificadas em primárias ou secundárias. As primárias são as que primeiro divulgam novidades numa forma que permita outro pesquisador repetir o estudo e testar a conclusão. As publicações primárias são permanentes, indexadas em bases de dados (Scielo, AGRIS, Scopus) e devem estar disponíveis para a comunidade científica. Outra característica da publicação primária é ser avaliada por outros pesquisadores antes da publicação. Esses pesquisadores, denominados revisores (*peer reviewers*), avaliam criticamente o manuscrito para auxiliar o editor a tomar a decisão de publicá-lo ou não. As publicações primárias geralmente são organizadas em Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão.

1 Pesquisador Embrapa/Epamig, Vila Gianetti, 47, Viçosa MG 36570-000. e-mail: rfvieira@epamig.br

São primárias: artigo completo (*full-length article*), nota (*note*) ou comunicação (*short communication*), entre outras. Não atendem os requisitos de publicação primária o resumo de congresso e a tese. No resumo, e mesmo no resumo expandido, não há informações suficientes para que outro pesquisador consiga repetir o estudo e testar a conclusão. Ademais, o resumo normalmente não passa pelo crivo de revisores. Logo, o resumo não deve ser empecilho para a publicação do estudo em revista primária. A tese também não passa pelo crivo de revisores; é submetida a uma banca, que é diferente da revisão por pares. O estudo da tese pode, após a defesa, ser publicado em revista primária, se apresentar novidades de interesse científico. As revistas diferem entre si quanto ao nível dos artigos que publicam e ao número de leitores. Artigo em inglês publicado em revista de prestígio tem mais chance de ser lido e citado que artigo em português publicado em revista de pequena circulação.

Após o estudo sair em publicação primária, a novidade do estudo é condensada em publicações secundárias como livros, boletins, circulares, artigos de revisão (*review articles*). O papel da publicação secundária é agrupar e organizar, de modo claro e acessível, as informações primárias. No artigo de revisão, embora a maioria ou todas as informações apresentadas tenham sido publicadas, a análise conjunta de estudos relevantes de determinada área do conhecimento pode levar a nova teoria, ideia ou mesmo quebra de paradigma. Por isso, o artigo de revisão tem papel relevante na ciência.

Há revistas científicas que publicam tanto artigos primários como secundários (artigos de revisão); outras, só aceitam os primários. As revistas informam os tipos de artigos que aceitam na sua página da Web. Os artigos comumente aceitos nessas revistas são artigo completo, nota ou comunicação e artigo de revisão. Essas publicações têm formatos distintos, detalhados nas "Diretrizes para Autores" (*Guide for Authors*) da revista.

ORGANIZAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Característica da publicação primária é ter o texto organizado em seções: *Abstract, Introduction, Materials and methods, Results and Discussion* (Fig. 1). O acrônimo AIMRaD indica essa sequência, adotada por muitas revistas. O *Abstract* (Resumo) está separado do corpo do artigo, pois não traz informação nova. No entanto, em razão de ser muito lido, o Resumo é incluído sobre o diagrama.

No diagrama, com formato de ampulheta (Fig. 1), a forma de cada seção indica se a informação é uniforme (Material e Métodos e Resultados), se começa de forma ampla (Introdução) ou se termina de forma ampla (Discussão). Ou seja, inicia-se a Introdução com informações gerais sobre o tema do estudo. Em seguida, restringem-se gradualmente as informações até chegar ao assunto específico do artigo. A Discussão tem sequência inversa à da Introdução: inicia-se com informações específicas (geralmente resultados relevantes) e, gradualmente, amplia-se o foco. No final da Discussão apresenta-se a conclusão do estudo. Essa conclusão deve ser tão ampla ou geral quanto permitirem os resultados discutidos.

Na nota ou comunicação, mantém-se a estrutura AIMRaD. Contudo, como o texto é mais curto que no artigo completo, essas publicações têm regras um pouco diferentes das do artigo completo. Essas regras são informadas nas "Diretrizes para Autores" da revista.

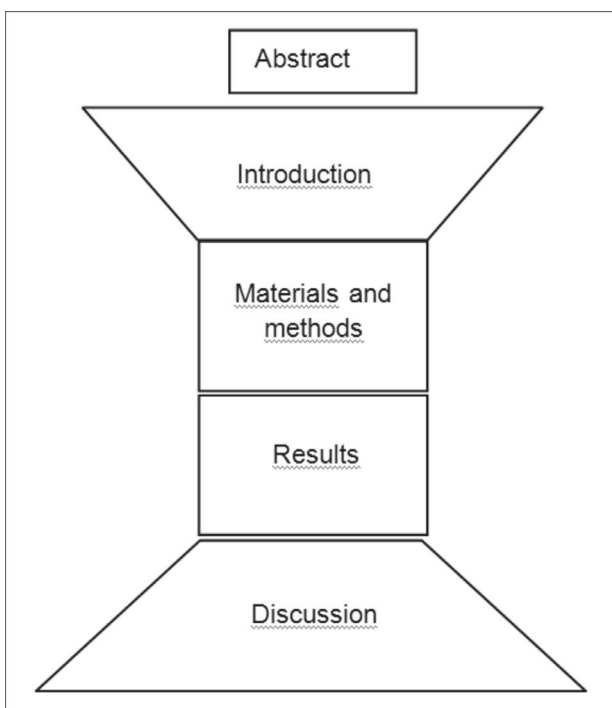


Figura 1. Organização (AIMRaD) do artigo científico usada em muitas revistas.

INTRODUÇÃO

Na Introdução, informam-se as motivações ou razões fundamentais (*rationale*) para a realização do estudo e disponibilizam-se informações essenciais (*background*) para o leitor entender e avaliar os resultados, sem precisar acessar publicações prévias sobre o tema. A citação de artigos relevantes sobre o tema do estudo dá credibilidade à argumentação empregada nesta seção. Se necessário, termos especializados podem ser definidos aqui.

No início da Introdução, apresenta-se, de forma geral, a importância ou a necessidade do estudo. Em seguida, o assunto afunila para subáreas e, finalmente, termina com o tema específico

do estudo. No exemplo a seguir (*Nature* DOI: 10.1038/srep08371), a Introdução começa informando a importância da lagarta *Tuta absoluta*. O leitor infere, portanto, que essa lagarta é ameaça ao tomateiro (problema colocado de forma geral) em algumas regiões do mundo aonde chegou recentemente. Depois, paulatinamente, o leitor recebe mais informações (*background*) e razões essenciais (*rationale*) para inferir a necessidade ou a motivação do estudo e para entender e avaliar os resultados que serão apresentados na seção Resultados. No final da Introdução, os autores informam o objetivo do estudo.

*"The tomato borer, Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), is a serious pest species native to South America that recently became a major threat to tomato production in the Mediterranean Basin and may become a problem in most countries of Africa, and Eurasia^{1,2}. Tuta absoluta was first observed outside its native range in Eastern Spain in 2006, and can now be found throughout Southern Europe, North Africa and the Middle East^{1,2}. Precise knowledge of the source population of T. absoluta invading the Mediterranean basin is required to help develop strategies to control this species³. **Such knowledge is currently lacking. The tomato borer was first observed** outside South America in Eastern Spain in 2006, and two years later in North Africa. This suggests a single introduction point in Southern Europe followed by a geographical expansion in Southern Europe and North Africa. **However these historical records do not reveal** the identity of the source population in South America. **Indirect methods based on** population genetics are needed to infer the invasion routes of T. absoluta. **Here, we analyzed the genetic variability** of samples collected in South America, Europe,*

*Africa and the Middle East to infer precisely the source of the T. absoluta populations invading the Mediterranean Basin and **to test the hypothesis of a single versus multiple introductions into the old world continents.***

Outra característica da Introdução é começar pelo que se **conhece** sobre o tema do estudo, como nas três primeiras frases acima do exemplo da *Nature*. Cada uma dessas frases termina com número(s) sobreposto(s), que indica a fonte da informação, detalhada em Referências no final do artigo. Essas fontes, geralmente citadas no final da frase, nem sempre são necessárias no início da Introdução, pois a ausência de fonte indica que a informação é amplamente aceita pela comunidade científica. O verbo no presente (“...is a serious pest...”) indica a ampla aceitação da informação. No exemplo da *Nature*, no entanto, os autores optaram por citar as fontes. Após apresentar o que se conhece sobre o tema, apresenta-se o que se **desconhece** (lacuna no conhecimento). No exemplo acima, uma lacuna mais geral foi apresentada: “*Such knowledge is currently lacking*”. Na sequência, os autores continuaram a informar o que se **conhece**: “*The tomato borer was first observed...*”. Em seguida, o **desconhecido** foi introduzido no texto de forma específica: “*However these historical records do not reveal...*”. É comum introduzir a lacuna específica no conhecimento com conectores como *however, although, but* ou com frases como *little work has been done*. Na frase seguinte, os autores informaram, resumidamente, como pretendem preencher a lacuna no conhecimento: (*Indirect methods based on...*). A explicitação da lacuna permite ao leitor antever o objetivo do estudo, apresentado, indiretamente, no início da frase final da Introdução: “*Here, we analyzed the genetic variability...*”, seguido da hipótese (“...*to test the hypothesis of...*”).

Note, no exemplo acima, que cada frase da Introdução conduz o leitor, naturalmente, ao objetivo do estudo. No exemplo 1 a seguir, os objetivos (“*The specific objectives are...*”) são enunciados junto com a metodologia resumida para atingir os objetivos (“*To do this...*”) e a hipótese do estudo (“*Our hypothesis is that...*”). No entanto, o mais comum é indicar apenas o objetivo do estudo (exemplo 2) no final da Introdução. O objetivo geralmente é apresentado no passado, mas pode ser enunciado no presente em algumas revistas (exemplo 1), seguido de verbo no infinitivo (determinar, comparar, desenvolver, avaliar, estabelecer).

1) The specific objectives are to (1) determine whether shade tree or cocoa litter has a larger effect on process of nutrient mineralization and immobilization, (2) rank these litter sources as nutrient sinks or sources and (3) establish the contribution of litter and husks to the nutrient budget of these systems. **To do this**, we measured nutrient stocks in litter fall production, in the accumulated litter and fruits to estimate biogeochemical cycling within these various cocoa agroforestry systems. **Our hypothesis is that** cocoa-cabruca systems on high fertility soils will rank highest in litter derived nutrient transfer rates given shade tree diversity (Johns 1999; Lobão et al. 2012) with variable nutrient absorbing capacities (Leão and Silva 1991). (*Plant Soil* 383:313, 2014).

2) The **objective of the present study was** to determine the early response mechanisms of perennial ryegrass to P (*Annals of Botany* 107:243, 2011).

MATERIAL E MÉTODOS

O objetivo, nesta seção, é descrever o delineamento experimental e informar o que se usou e se fez para que outro pesquisador possa repetir o estudo e chegar a resultados semelhantes. Essas informações também permitem ao leitor julgar a validade dos resultados, pois estes dependem do modo como o estudo foi realizado. Por isso, informam-se, no Material e Métodos, os fatores que podem influenciar os resultados. Alguns desses fatores podem ajudar, durante a redação da Discussão, a explicar por que os resultados do estudo são diferentes dos resultados de outros estudos. Por fim, a leitura desta seção permite ao leitor julgar a adequação ou o acerto da conclusão (feita para a população-alvo que a amostra representou).

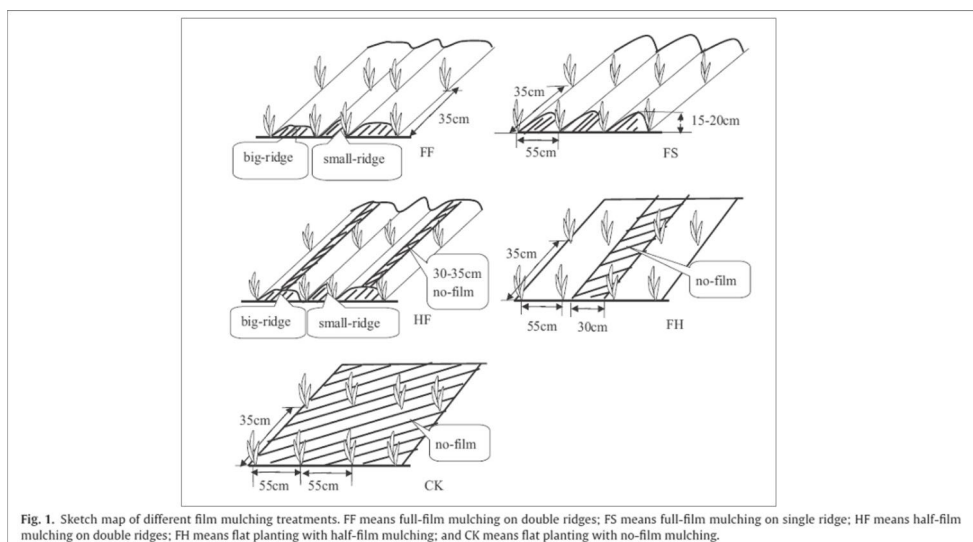
Com exceção de Material e Métodos curtos, esta seção geralmente é dividida em subseções, para facilitar tanto a redação quanto a leitura. Para saber o que escrever no título das subseções, consulte artigos na revista-alvo (revista onde pretende submeter o manuscrito). No artigo "*Soil water status and root distribution across the rooting zone in maize with plastic film mulching*" (*Field Crops Research* 156: 40, 2014), os títulos das subseções e subsubseções do Material e Métodos foram estes:

1. Sites description
2. Experimental design and field management
3. Data collection
 - 1.1. Root length, weight and diameter measurements
 - Soil water content at different depths

Statistical analysis

Geralmente, escreve-se esta seção em ordem cronológica, ou seja, na sequência das etapas ou ações executadas durante a condução do estudo. No entanto, pode-se organizar parte desta seção, ou toda ela, de outra forma, desde que a organização facilite a compreensão do que se fez e usou. Para planejar a sequência das informações, é útil consultar artigos da revista-alvo.

Tabelas/figuras podem ser usadas em Material e Métodos para facilitar o entendimento de procedimentos. Este exemplo foi apresentado no Material e Métodos de artigo publicado na *Field Crops Research* (156: 40, 2014):



Às vezes, é necessário explicar por que a análise foi feita de determinado modo ou por que foram escolhidas determinadas espécies ou cultivares. Dê boas razões para ter feito a análise da forma proposta, e não de outra forma, ou para ter escolhido determinadas espécies ou cultivares.

Se o método usado é novo, forneça todos os passos necessários para que outro pesquisador possa repeti-lo. Se, no entanto, o método foi publicado em inglês, pode-se indicar apenas o nome do método e a referência, ou o nome do método, a referência e algumas informações-chaves sobre o método. Apenas o nome do método e a referência são suficientes se o método é bem conhecido (exemplo 1 a seguir). No entanto, apresente mais informações (exemplo 2), além da referência, se isso facilitar o entendimento do método por leitores menos familiarizados com ele. No exemplo 2, além da referência, é informado: "...using a pinboard and transparent perforated plastic sheet...". Se houve modificações em método publicado, cite a fonte original e detalhe apenas as mudanças. Se o método está escrito em outra língua (português, por exemplo), forneça detalhes relevantes do método e cite a fonte original.

- 1 Available P for plants was assessed by Bray's 1 method (Bray and Kurtz, 1945).
- 2 *The roots were sampled **using a pinboard and transparent perforated plastic sheet** following the methods of Kono et al. (1987).*

Além dos procedimentos, das formas de análise, das técnicas empregadas, descreva também equipamentos ou instrumentos usados ou construídos para tomar os dados, como no exemplo a seguir. O fabricante e o modelo do equipamento devem ser fornecidos, se esses fatores puderem influenciar os resultados.

"The proton gradient was measured by monitoring the rate of decrease in fluorescence of the metachromatic fluorescent probe 9-amino-6-chloro-2-metoxiacridina using a Fluoroskan Ascent spectrofluorimeter (model FL; Thermo Labsystems)" (*Plant Physiology* 161: 1557, 2013).

Evite citar marcas comerciais; o nome genérico ou químico é preferível. O nome genérico é usado mundialmente, diferentemente do nome comercial. No entanto, se as marcas comerciais diferirem em alguma característica que possa influenciar os resultados, deve-se apresentar também o nome comercial e o nome do fabricante, como no exemplo a seguir. Repare que o nome comercial (Quadris) é escrito com inicial maiúscula para diferenciá-lo do nome genérico (azoxystrobin).

"Fungicide applications of azoxystrobin (Quadris®, Syngenta Crop Protection) at 444 ml/ha were made during the R3 and R5 growth stages for both years of the experiment" (*Crop Protection* 54: 206, 2013).

Informações sobre como foram realizadas as análises estatísticas geralmente são necessárias; elas aparecem no final do Material e Métodos. Antes de fornecê-las, consulte artigo semelhante ao seu na revista-alvo para preparar algo semelhante.

A voz passiva (foram usados, foram determinadas ou usaram-se, determinaram-se) é comum nesta seção. Nos quatro exemplos anteriores usou-se a voz passiva: "*was assessed*", "*were sampled*", "*was measured*" e "*were made*". Ou seja, a ênfase foi na ação (o que se fez) e não no agente da ação (quem fez). Por isso, é comum escrever nesta seção: "as amostras foram coletadas", "*roots were sampled*". Atualmente, muitas revistas permitem que também se indiquem, como executores da ação, os autores do estudo ("*we*"), mesmo se apenas um deles tenha praticado a ação: "nós coletamos as amostras", "*we sampled the roots*". Portanto, voz passiva ("*was fed*") e voz ativa ("*we used*") ocorrem, simultaneamente, no Material e Métodos de boas revistas, como neste exemplo:

“*We used 30 bees per colony per treatment (270 total bees)... Each bee was fed 10 μ L of unscented, reagent-grade 1 M sucrose (30% sucrose w/w)*” (Nature DOI: 10.1038/srep10989).

RESULTADOS

Dependendo da revista e/ou da extensão do manuscrito, esta seção é escrita sozinha (Resultados) ou junta com a discussão (Resultados e Discussão). Por motivos didáticos, abordaremos Resultados e Discussão em seções separadas.

A função desta seção é apresentar dados que construam e legitimem novos conhecimentos. Os resultados governam o conteúdo e a estrutura do manuscrito. Por isso, escrever esta seção antes das demais permite ao redator entender os pontos mais importantes da história a ser contada no manuscrito.

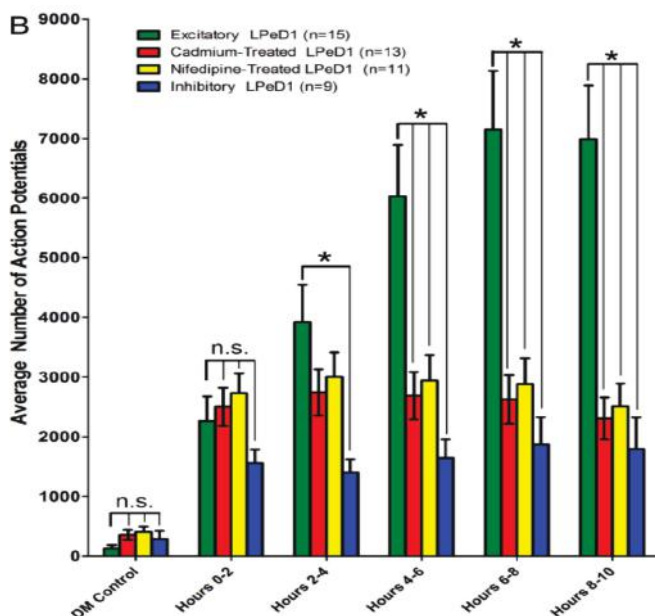
Selecionar os dados mais relevantes que sustentem, ou não, a hipótese do estudo é o primeiro passo para escrever esta seção. Portanto, deve-se evitar a apresentação de dados de todas as variáveis avaliadas, a não ser que haja boa razão para isso. Resultados não essenciais, mas úteis, podem ser enviados à revista em arquivo separado. Se aprovado pelos revisores, revistas de prestígio publicam esses resultados como *supplemental information* ou *appendices*, disponíveis apenas na versão *online* da revista. Logo, a versão em papel deve ser concisa, apenas com as evidências fortes que sustentam a conclusão. Segundo Day & Gastel (2006), a compulsão para incluir todos os dados no manuscrito não prova que os autores têm muitas informações; prova, sim, que não têm foco.

Dados que contradizem a hipótese do estudo devem ser apresentados. Suprimi-los seria antiético. Na seção Discussão, os autores terão oportunidade de explicar esses resultados inesperados.

Depois de escolher os dados para apresentar no manuscrito, o passo seguinte é escolher a forma de apresentá-los. Estude como os dados são apresentados na revista-alvo. Analise os tipos e quantidade de dados, a forma de apresentá-los (tabela, figura ou texto), os títulos e legendas de tabelas e figuras, etc.

Se a decisão for apresentar os dados em tabelas e figuras, numere-as separada e sequencialmente, e refira-se a elas nessa ordem no texto. Figuras/tabelas devem ser autoexplicativas: o leitor deve entendê-las sem consultar o texto. As informações necessárias para torná-las autoexplicativas aparecem na própria figura/tabela, no título/legenda ou em chamadas de rodapé.

Outra regra que deve ser observada no preparo de tabelas/ figuras é construí-las de forma simples. Isso implica dizer que se deve evitar obscurecer as figuras/tabelas com excesso de linhas, legendas, símbolos, números e escalas com muitas divisões nos eixos x e y. Erro comum é usar números com precisão exagerada (3050,2 kg/ha em vez de 3050 kg/ha). Apresentar resultados não significativos só se justifica em algumas situações, sobretudo em estudo com arranjo fatorial. No exemplo a seguir (*Nature* DOI:10.1038/srep09523), os autores apresentam os dados do fatorial 6 (tempo, eixo x) x 4 (barra). Embora não haja diferença significativa entre os níveis do fator "barra" dentro de dois níveis do fator "tempo" (DM control e Hours 0-2) quanto ao "average number of action potentials", as médias foram apresentadas, por motivo óbvio.



Em estudo com um fator (variável independente ou causa), o efeito não significativo da causa sobre o efeito geralmente pode ser informado apenas no texto. Nesse caso, o texto pode terminar com o valor de F e P , como nestes exemplos (*PLOS ONE* DOI: 10.1371/journal.pone.0033819):

- 1) "Although growth stage was affecting the fungal biomass, there were **no significant differences** between pre- and post-cropping situations ($F = 1.31$, $P = 0.25$)".
- 2) "Cultivar had **no significant contribution** to explanation of PC1 ($F = 1.83$, $P = 0.15$), PC2 ($F = 1.92$, $P = 0.12$) nor PC3 ($F = 0.88$, $P = 0.47$)".

No exemplo a seguir (*Nature* DOI:10.1038/ncomms7095), as figuras são econômicas em linhas, números e letras (ou palavras).

Repare que os eixos x e y (Fig. 1a) ou o eixo y (Fig. 1b) exibem escala com poucos números, que dá apenas ideia aproximada do valor da média. A razão disso é que o objetivo da figura é mostrar tendências e não valores exatos. Algum número exato, se necessário, pode ser apresentado no texto. Repare também que os tratamentos são identificados claramente com símbolos distintos (círculo, quadrado ou triângulo) (Fig. 1a) ou com cores (Fig. b), com detalhes na legenda. Nesses exemplos, apresentam-se a estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) (Fig. 1 a e b) e a estatística inferencial (*, na Fig. 1b) de forma clara, com detalhes na legenda.

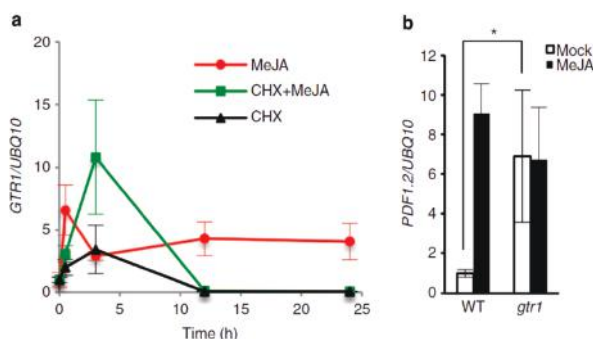


Figure 1 | GTR1 is induced by JA and regulates a JA-related gene. (a) Effect of cycloheximide (CHX) on MeJA induction. Ten-day-old liquid-cultured *Arabidopsis* Columbia WT was treated with or without 100 μ M CHX for 1 h before treatment with or without 20 μ M MeJA for the number of hours indicated, followed by quantitative RT-PCR of *GTR1* transcript levels. *UBQ10* was used as a reference gene. Relative gene expression was calculated by normalizing to the value of mock-treated plants (0.02% ethanol) for 0 h. Values are the mean \pm s.d. of three biological replicates. **(b)** Expression of *PDF1.2* in *gtr1* seedlings. Ten-day-old liquid-cultured *Arabidopsis* Columbia WT or *gtr1* seedlings were treated with 0.02% ethanol (white bars) or 20 μ M MeJA (black bars) for 24 h, followed by quantitative RT-PCR. *UBQ10* was used as a reference gene. Relative gene expression was calculated by normalizing to the value of WT plants treated with 0.02% ethanol. Values are the mean \pm s.d. of three biological replicates. * $P < 0.05$; Tukey-Kramer comparison test.

A escolha entre tabela, figura e palavras (no texto) depende do que se quer transmitir e do espaço que cada uma delas ocupa. Com raras exceções, não se deve colocar os mesmos dados, simultaneamente, em tabelas e figuras. Essas três formas de apresentar dados têm pontos fortes e fracos.

Em tabela, apresentam-se, com números exatos, médias de muitas variáveis. Entretanto, a tabela demanda leitura cuidadosa

dos números antes que o significado deles possa ser apreendido. Na figura, as tendências dos dados são rapidamente percebidas nas **alturas das barras** (variável independente é não numérica ou descontínua; Fig. 1b acima) ou nos **ângulos** e/ou **traçado das linhas** (variável independente é numérica e contínua; Fig. 1a acima). No entanto, a figura limita o número de variáveis apresentadas, e as médias exatas não são fornecidas. Por causa da rápida percepção das tendências na figura, apresentar pelo menos o resultado relevante do estudo na forma de figura geralmente é decisão acertada.

Evite frases que informem o que a figura/tabela contém: **“A Tabela 1 mostra os resultados ...”** ou **“Na Figura 1 são apresentados os resultados...”**. A alternativa é a objetividade: escreva os resultados relevantes e, no final da frase, indique onde (Figura, Tabela) o leitor pode visualizar os números ou tendências. Nestes dois exemplos (*Crop Protection* 54: 206, 2013), a figura/tabela que contém os resultados descritos é indicada no final da frase. No exemplo 1, apresentaram-se os valores de F e P e, entre eles, os graus de liberdade (df) do tratamento ($df = 1$) e do erro ($df = 151$ ou 154), porque essas informações não constam da figura.

- 1 “Defoliation in the upper canopy reduced yield more than defoliation in the lower canopy during the R3 and R5 growth stages (**Fig. 1**) (R3: $F = 18.85$, $df = 1, 151$, $P < 0.001$; R5: $F = 5.65$, $df = 1, 154$, $P = 0.019$).”
- 2 “However, the LAI was always lower for the whole plant defoliation compared to the upper or lower canopy defoliations (**Table 2, Fig. 3**).”

A apresentação em palavras (texto) de resultados simples ou de relevância secundária é comum em revistas científicas. São exemplos de apresentação de resultados apenas no texto: (a)

plantas que receberam nitrogênio pesaram 56 g, massa duas vezes maior que a das plantas que não receberam nitrogênio ($F = 21$, $P < 0,001$); (b) a redução de 12 para 4 plantas por metro na fileira causou diminuição da severidade do mofo-branco de 44 % para 29 %, de acordo com a equação $y = 21,26 + 1,893^{**}x$ ($r^2 = 0,98$).

Em revista com alto fator de impacto, fotografias são usadas com frequência. Quando as fotografias são de boa qualidade e facilitam o entendimento dos resultados, podem ser decisivas para a aceitação do manuscrito. Veja este exemplo (*Nature* DOI:10.1038/ncomms7095):

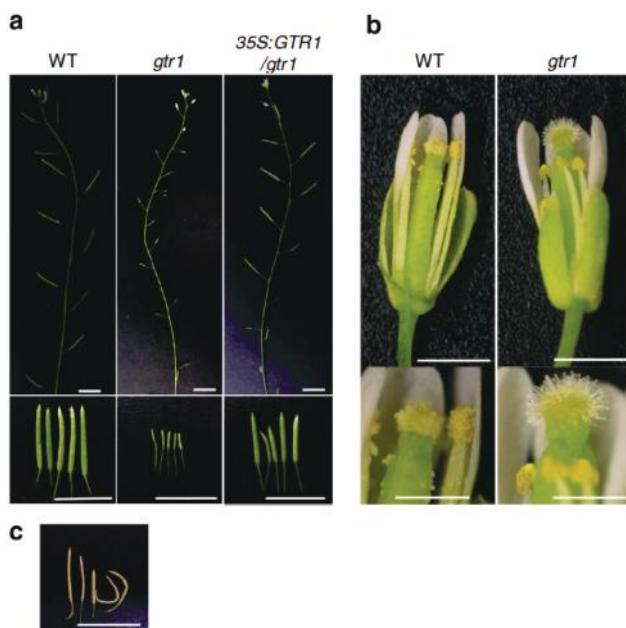


Figure 3 | *gtr1* phenotypes in flower. (a) The *gtr1* mutant exhibited decreased seed production. The top panel shows representative primary inflorescences. The bottom panel shows representative siliques. Scale bar, 10 mm. (b) Phenotypes of flowers. Scale bar, 1 mm (top panel) and 0.5 mm (bottom panel). (c) *gtr1* siliques pollinated with WT pollen. Scale bar, 10 mm.

Quando longa, a seção Resultados pode ser organizada em subseções, se possível com títulos semelhantes aos usados nas subseções do Material e Métodos, e na mesma sequência. É comum iniciar com subseção (3.1. a seguir) que contenha resultados ou informações gerais como neste artigo da *Field Crops Research* (DOI: 10.1016/j.fcr.2013.10.013):

“3.1. RAINFALL AND TEMPERATURE DURING THE EXPERIMENTAL PERIOD

Mean monthly precipitation and temperature for the study period are presented in Fig. 2. The long-term average annual (1957–2001) precipitation for the Changwu Agro-ecological Experiment Station site is 577 mm, of which 304 mm occurs from July to September. In both years, the growing seasons were warmer and drier than average (Fig. 2). Precipitation, was 17% (2005) and 11% (2006) less than the long-term mean over the growing season (October to June), and 18% (2005) and 31% (2006) less than the long-term mean during the grain-filling period (April to June) (Fig. 2), suggesting that the experiment was subject to mild drought and moderate drought, respectively, during the grain-filling periods in 2005 and 2006 “

Em seguida, escrevem-se as subseções seguintes com os resultados específicos. As demais subseções do artigo *Field Crops Research* mencionado acima são:

“3.2. Grain yield and yield components

3.3. Plant height, flag leaf area, leaf area index (LAI), tiller density and aboveground biomass

3.4. Root biomass, root:shoot ratio and root respiration

3.5. Rates of photosynthesis, transpiration and leaf water use efficiency

3.6. Soil water content and water use efficiency”

Os resultados são apresentados no passado: “O fungicida **aumentou** a produtividade do café em 20%”, “A correlação entre altura de planta e produtividade **foi** alta e significativa ($r = 0,75$)”,

“O aumento da população de plantas **causou aumento** linear da produtividade”.

Evite repetir no texto números visíveis em tabelas/figuras. Ou seja, não leia a tabela para o leitor. Para evitar a repetição dos números, é comum, nos artigos científicos, apresentar as diferenças entre médias em magnitude (15%, 23%, 2x, 3x; exemplos 1 a 4 a seguir). Outra forma de se evitar repetir os números da tabela é interpretar, em palavras (“**consistently**”; exemplos 3 e 8), o significado dos números, inclusive os de r (exemplos 5 e 6) e de P (exemplo 7).

- 1) “*Low phosphorus reduced root length by **60.1 %** in two-whorl genotypes vs. **44.5 %** in three-whorl genotypes*” (*Annals of Botany* DOI: 10.1093/aob/met164).
- 2) “*Total radiation interception over the whole growing season by cotton at 22.5 plants m^{-2} intercepted **1.7%** more lights than at 18.0 plants m^{-2} and **5.6%** more light than at 13.5 plants m^{-2}* ” (*Field Crops Research* 169: 132, 2014).
- 3) “**Consistently**, leaf and root dry weight data showed that AVP1D expressing lettuce lines developed at least **2-fold** more leaf biomass and about **3-fold** more root biomass than controls under limiting NO_3^- (Fig. 5, B and C)” (*Plant Physiology* 161: 1557, 2013).
- 4) “*Control group bees exhibited significantly higher longer-term memory by **1.3-1.8 fold** than pesticide-treated bees*” (*Nature* DOI: 10.1038/srep10989).
- 5) “*There was a **clear and consistent association** between NUE and UPE for all three species (Fig. 4)*” (*Crop Science* 46: 561, 2006).

6) *The association between renal failure and diclofenac residues was **very highly significant** (Nature DOI:10.1038/nature02317).*

7) *"Nitrogen treatment had also a **highly significant** effect on individual plant's grain DM" (Crop Science 46: 1860, 2006)*

8) *Pioneer 3893 had **consistently greater** SPAD values than Maizex (Table 3). (Crop Science 46: 1860, 2006).*

No exemplo 8 (acima), empregou-se "**consistently greater**" para indicar que o híbrido Pioneer 3893 apresentou média de SPAD (final da primeira coluna da tabela 3 a seguir) significativamente maior que a do Maizex em dois ensaios.

Table 3. Differences in yield and other parameters between two maize hybrids in two growing seasons averaged across four N and three density levels.

Parameters	2003		2004	
	Pioneer 3893	Maizex LF850 RR	Pioneer 3893	Maizex LF850 RR
No. of plants ha ⁻¹ at V3	72856a§	73281a	73165a	73360a
No. of plants ha ⁻¹ at harvest (R6)	71398b	74754a	72323a	72338a
No. of cobs ha ⁻¹	72659a	70912b	NR¶	NR
No. of barren plants ha ⁻¹	1139b	4039a	NR	NR
Leaf area at silking, cm ² plant ⁻¹ ‡	4000b	4786a	4820b	6020a
LAI at silking‡	2.91b	3.36a	NR	3.77a
Grain dry weight per plant, g	125.2a	111.1b	132.1a	130.9a
Grain yield, Mg ha ⁻¹	9.0a	8.4b	10.3a	10.4a
Silage DM, Mg ha ⁻¹	20.4a	20.9a	19.6b	21.4a
Harvest index (HI)	0.54a	0.49b	0.51a	0.47b
Grain moisture at harvest, %	23.5a	22.5a	22.9b	29.4a
Silage moisture at harvest, %	52.8b	58.8a	64.9a	62.8b
SPAD readings at silking	57.9a	50.7b	58.6a	53.8b

‡ Destructive leaf area measured in three plants per plot at silking stage.

‡ LAI measured at silking stage nondestructively using LI-COR Plant Canopy Analyser (Model: LI-2000).

§ Values followed by different letters within a row are significantly different at $P \leq 0.05$.

¶ NR, not recorded.

Não é regra rígida, mas, em estudos de causa e efeito, iniciar a frase com a variável independente (causa ou tratamento) em vez da dependente (efeito ou resultado) deixa o texto mais direto e conciso. Na frase "o fungicida **aumentou** a produtividade do café em 20%", "fungicida" é a causa e "produtividade", o efeito. Quando se inverte a posição dessas variáveis, colocando-se o efeito em frente da causa, a frase fica assim: "a produtividade do café foi aumentada em 20% pelo fungicida". Neste caso, emprega-se a voz passiva (foi

umentada), com inversão da lógica. Na frase 1 a seguir, a causa ("Seed Ni concentration") está antes dos efeitos ("germination rate" ou "seedling development"), com ganhos de clareza em relação à frase 2, que começa com os efeitos. Na frase 1, usou-se "did not affect" (mais direto e conciso) para unir a causa com o efeito; na frase 2 usou-se "were not affected by" (voz passiva) para unir os efeitos à causa.

- 1) "Seed Ni concentrations (causa) **did not affect** germination rate or seedling development (efeitos)" (Plant Soil DOI: 10.1007/s11104-012-1284-6).
- 2) Germination rate or seedling development (efeitos) **were not affected by** seed Ni concentrations (causa).

Nas frases 1 e 3 a seguir, colhidas em artigo da revista *Field Crops Research* (169: 132, 2014), os efeitos (*LAI*, *plant height*, *light distribution*) antecedem a causa (*plant density*). Repare que com a causa na frente do(s) efeito(s) as frases (exemplos 2 e 4) são mais claras e concisas.

- 1) "**LAI** of cotton was significantly ($P = 0.02$) increased with **plant density** (Fig. 5A and B), whereas cotton **plant height** was significantly decreased with **plant density** (Fig. 6A and B)."
- 2) Increasing cotton **plant density** increased **LAI** ($P = 0.02$) (Fig. 5A and B) and decreased **plant height** significantly (Fig. 6A and B).
- 3) "**Light distribution** within the canopy was affected by cotton **plant density** (Fig. 8)".
- 4) Cotton **plant density** affected **light distribution** within the canopy (Fig. 8).

No entanto, o efeito pode iniciar a segunda frase do parágrafo, se a intenção do redator é continuar a abordar a variável dependente (produtividade, no exemplo a seguir). A conexão da segunda frase com a primeira fica clara quando se inicia a segunda frase com “A produtividade...” (informação velha). Logo, a informação nova só aparece no final da segunda frase: “foi maior com o cultivar Catuaí que com o cultivar Mundo Novo”. Essa técnica (informação velha no início e informação nova no final da frase), associada ao uso de frases curtas (até 30 palavras), ajuda a manter o texto claro.

O **fungicida** (causa) aumentou a **produtividade** (efeito) do café. A **produtividade** (efeito) foi maior com o cultivar Catuaí que com o cultivar Mundo Novo.

DISCUSSÃO

Da mesma forma que Material e Métodos e Resultados são relacionados, também o são Introdução e Discussão. No entanto, enquanto o fluxo de informações na Introdução é do geral para o específico; na Discussão, o fluxo é do específico para o geral (Fig. 1). Na Introdução, abordam-se estudos existentes sobre o tema; na Discussão, interpretam-se os resultados em relação aos estudos citados na Introdução. Na Introdução, aponta-se lacuna no conhecimento; na Discussão, esclarece-se em que nível a lacuna foi preenchida. Na Introdução, indica-se o objetivo do estudo; na Discussão, a conclusão, que deve ser coerente com o objetivo.

Basicamente, o objetivo da Discussão é explicar o significado dos resultados e informar as contribuições feitas com o presente estudo à área de conhecimento abordada (Annesley, 2010). Esse objetivo da Discussão também pode ser escrito assim: responder à pergunta feita na Introdução, informar como os resultados suportam

as respostas e comparar os resultados com os resultados de outros estudos sobre o tema (Foote, 2009). Esses são princípios básicos da Discussão, porém outros assuntos podem ser abordados durante o preparo desta seção: (a) importância do estudo, (b) resultados inesperados, (c) problemas que ocorreram, (d) pontos fortes e fracos do estudo, (e) melhoria da metodologia, (f) pontos fortes e fracos do estudo em relação a outros estudos, (g) explicações alternativas para os resultados, (h) mecanismos, (i) implicações práticas ou teóricas dos resultados, (j) perguntas que ficaram sem resposta, (k) sugestões para pesquisas futuras. Esses múltiplos assuntos, passíveis de serem abordados na Discussão, é que tornam essa seção difícil de escrever. Uma estruturação da Discussão poderia beneficiar os leitores e aumentar a chance de o redator não deixar de fora desta seção aspectos importantes do estudo.

Em revista médica, Dorchety & Simith (1999) apresentaram proposta para estruturar a Discussão. Aparentemente, essa proposta não teve repercussão. No entanto, a estrutura proposta por esses autores é útil para orientar pesquisadores jovens no preparo desta seção. Segundo essa proposta, a sequência na apresentação da Discussão é: (a) resultados relevantes; (b) pontos fortes e fracos do estudo; (c) pontos fortes e fracos em relação a outros estudos, discutindo diferenças nos resultados; (d) significado do estudo: mecanismos e implicações (teóricas e/ou práticas); e (e) perguntas não respondidas e pesquisas futuras. Repare que essa sequência condiz com o fluxo de informações que se espera nesta seção.

Resultados relevantes

Comece a Discussão pelos resultados relevantes (que respondam à pergunta feita na Introdução), como nestes três exemplos:

- 1) "Here **we show that** wild bee pollinators provide important pollination services to crops around the globe (Fig. 1a), with the economic value of this ecosystem service being on par with that provided by managed honey bees" (Nature DOI: 10.1038/ncomms8414).
- 2) "**The present study demonstrates** the protective effects of oral administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055) against influenza A virus infection. This effect enables mice to be resistant to a virus infection as shown by improvements in the survival rates (Figure 1) and by decrements in the virus titer in the lungs (Figure 2)" (Nature DOI: 10.1038/srep04638).
- 3) "Soybean plants grown from seeds containing 5.35 mg kg⁻¹ Ni **showed a significant** yield increase up to 25 % in response to external Ni supply, in spite of the fact that these plants were neither dependent on N₂-fixation nor treated with urea (Table 1A; Fig. 1a)" (Plant Soil DOI 10.1007/s11104-012-1284-6).

Também é comum começar a Discussão com algum assunto abordado na Introdução ou no Material e Métodos, antes de se apresentarem os resultados relevantes. Nos exemplos 1 e 2 a seguir, a Discussão inicia com informações gerais apresentadas na Introdução: "*Imidacloprid is a widely used...*", "*ABA is an essential phytohormone...*" Em seguida, os autores relembram a lacuna no conhecimento: "...*but no studies have previously examined...*", "...*has not yet been characterized in detail*". No exemplo 3, a Discussão começa por assunto abordado no Material e Métodos: "*In this study, two transgenic lettuce lines...*". No exemplo 4, os autores relembraram o objetivo citado na Introdução: "*The objective of this study was...*", seguido de informação retirada

do Material e Métodos: “*Genotypes were compared based on...*”
Nesses quatro exemplos, os resultados relevantes aparecem depois dessas informações iniciais: “...*we show that...*” (exemplo 1), “...*we found that...*” (exemplo 2), “...*this work demonstrate that...*” (exemplo 3), “*The results for...*” (exemplo 4). No exemplo 5, apresentam-se vários resultados (“*Our study showed...*”), depois de informar o paradigma atual (“*It is widely accepted now that...*”), as deficiências de estudos anteriores (“*However, most studies of...*”) e o ponto forte do presente estudo (“*We took advantage of...*”).

- 1) “**Imidacloprid is a widely used** neonicotinoid pesticide throughout China¹⁶, **but no studies have previously examined** its effect on olfactory learning, a key element in successful foraging, for an economically¹² and ecologically important¹¹ native bee species, *A. cerana*. In adult bees, **we show that** ingestion of 0.1 or 1 ng/bee reduced olfactory learning acquisition, which was 1.6-fold higher in control bees” (*Nature* DOI: 10.1038/srep10989).
- 2) “**ABA is an essential phytohormone** regulating seed maturation, germination, stomatal closure and various stress responses. However, the effect of ABA on cellular growth and morphogenesis **has not yet been characterized in detail**. Here, **we found that** epidermal cells developed ectopic protrusions in seedlings germinated and grown in the presence of ABA” (*Nature* DOI: 10.1038/srep11364).
- 3) “**In this study, two transgenic lettuce lines** (*AVPD1-2 and AVPD1-6*) with enhanced H^+ -PPase abundance and activity (Figs. 1 and 2) were used to evaluate the potential of this genetic manipulation for improving NO_3^- uptake efficiency in lettuce. The experiments described in **this**

work demonstrate that this technology was instrumental in improving lettuce N use efficiency under control and limiting NO₃⁻ regimens in laboratory, greenhouse, and field scenarios (Figs.3, 5, and 8; Table I). In all instances, more production (including marketable yield) was obtained per unit of N input for AVP1D-engineered lettuce versus controls” (Plant Physiology doi/10.1104/pp.112.212852).

- 4) “**The objective of this study was** to determine if there were genetic differences among common bean genotypes in the threshold at which N₂ fixation declined during soil drying. **Genotypes were compared based on** daily measurement of ARA over a soil drying cycle. **The results for** all cultivars were well-represented by a two-segment linear regression (Fig. 2, Table 3)” (Plant Soil 364:29, 2013).
- 5) “**It is widely accepted now that** vertebrates’ diet modulates the species composition of their symbiotic gut microbiota^{15,17}. **However, most studies of** dietary control of microbiota have either been conducted on populations fed non-natural diets (for example, laboratory mice, zebrafish and arguably humans)⁴⁴, or comparing disparate species¹³. **We took advantage of** naturally occurring within-population diet variation in two species of fish to test for diet–microbiota correlations. This represents one of only a very few studies, to date, of gut microbial variation within wild vertebrate populations. **Our study showed,** first, that there is substantial among individual variation in gut microbial composition in natural populations. Second, we found that... Third, and more profoundly, we found that...” (Nature DOI: 10.1038/ncomms5500).

Pontos fortes e fracos do estudo

Depois que se apresentam os resultados relevantes, Dorchety & Simith (1999) recomendam discutir os pontos fortes e fracos (limitações) do presente estudo, com igual ênfase para ambos. Na verdade, as revistas estão mais interessadas nas limitações do estudo, seguidas de explicações dos possíveis efeitos que essas limitações podem ter na conclusão. Sugestões para evitar que essas limitações se repitam em estudos futuros geralmente são bem-vindas. Nos três primeiros exemplos a seguir, os autores citaram as limitações (em negrito). No exemplo 4, os autores informaram que, apesar de terem tentado controlar uma variável interferente (“...we tried to control...”), o controle foi parcial. Logo, a variável interferente pode ter influenciado os resultados (limitação). No exemplo 5, os autores informaram os pontos fortes do estudo (“*This study has several strengths...*”), que permitiram generalizar a conclusão (“*Our results are therefore generalizable.*”).

- 1) ***“An important caveat for interpreting our study is that we used four-species mixtures, and four species per m² is lower than in most grasslands. A relatively small number of species was used in this study due to its focus on dominance and evenness, and further research should be done with more species-rich communities”*** (*Basic and Applied Ecology* 14:199, 2013).
- 2) ***“One limitation of this study is that the survey response rate is unknown. As stated in the methods, a variety of programs at 678 institutions were included in the study, resulting in a total of 8,353 emailed survey requests. Unfortunately, no method exists to reliably track the number of emails that were delivered, opened, deleted or forwarded.***

This is an unfortunate limitation of email-based surveys. A second limitation is the potential selection bias inherent in any form of subjective survey" (Journal of Medical Systems 36: 3135, 2012).

- 3) *"One inherent **weakness of this study** is its restricted temporal and geographic relevance. A single season of field data conducted at a single site in the northern portion of the plant's geographic range limits inferences that can be drawn from the data" (Environmental Entomology 42: 936, 2013).*
- 4) *"In this study, **we tried to control** for smoking behavior by including smokers in our control population. However, the number of cigarettes consumed was smaller in the controls, which may have somewhat influenced our results" (Journal of Applied Physiology 102: 1051, 2007).*
- 5) *"**This study has several strengths.** Medical conditions that could have confounded the relation of inflammatory markers and change in FG status were controlled for, and effect modification by BMI was considered. Participants in CHS were chosen to represent a cross-section of the U.S. population 65 years. **Our results are therefore generalizable"** (Diabetes 50: 2384, 2001).*

Pontos fortes e fracos em relação a outros estudos, discutindo diferenças nos resultados

Depois que o presente estudo é discutido quanto aos pontos fortes e fracos, o próximo passo é ampliar a discussão, ou seja, comparam-se os resultados do presente estudo com os de outros estudos. Neste ponto, se apropriado, indique pontos fortes e fracos do estudo em relação a outros estudos. Se os resultados do estudo diferirem dos de outros estudos, deve-se discutir a razão dessa

diferença. Muitas vezes os materiais ou os métodos usados nesses estudos diferem em determinados aspectos, o que pode levar a resultados distintos.

Nos exemplos 1, 2 e 3, os autores usam informações do Material e Métodos para justificar diferenças nos resultados: "*Pueyo et al. (2004) used three extraction procedures...*" (exemplo 1), "*Due to the intensive and extensive samplings used in this study...*" (exemplo 2), "*In these studies the field-testing conditions may have included...*" (exemplo 3). Nesses três exemplos, os autores também explicitam ponto(s) forte(s) do presente estudo: "*...the metals extracted with EDTA have shown most efficient...*" (exemplo 1), "*...our results are more reliable than...*" (exemplo 2), "*Our study was better controlled...*" (exemplo 3). No exemplo 4, o valor obtido (72.1%) é mais alto que o da literatura (58.5%). Por isso, seguem duas explicações para essa diferença: "*The higher average of N-resorption efficiency in this Stipa species seemed...*" e "*...this discrepancy may partly result from...*".

- 1) "**Pueyo et al. (2004) used three extraction procedures** (CaCl_2 , NaNO_3 , NH_4NO_3) for predicting trace metal mobility ($\text{Cd} > \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Pb}$) in the contaminated soil. They found that out of three, CaCl_2 extractions procedure seems to be the most suitable method for bioavailability of these metals. However in the present study, **the metals extracted with EDTA have shown most efficient** extractants for the bioavailability of metals" (*Chemosphere* 64: 161, 2006).
- 2) "**Due to the intensive and extensive samplings used in this study**, we think that **our results are more reliable than** those reported previously" (*Geoderma*195-196:48, 2013).
- 3) "*The studies by Shanahan et al. (1990) and Reynolds et al. (1994) were the only ones published thus far indicating*

*a positive association between cellular membrane thermostability and yield under heat stress in different field environments. **In these studies the field-testing conditions may have included** stresses other than heat, such as drought and various biotic stresses. **Our study was better controlled** to eliminate any drought or biotic stresses so that heat was the main yield-limiting factor under the summer test conditions" (Euphytica 117:117, 2001).*

- 4) *"The value of N-resorption efficiency (72.1%) for *S. krylovii* characterized in the present study **was higher than that of a large number of graminoids worldwide (58.5%) reported in the literature** (Aerts, 1996). **The higher average of N-resorption efficiency in this *Stipa* species seemed rather to be a consequence of its generally greater fitness to infertile habitats. Further, **this discrepancy may partly result from** differences in methods used for calculation of resorption efficiency" (Plant Soil 273: 257, 2005).***

SIGNIFICADO DO ESTUDO: MECANISMOS E IMPLICAÇÕES (TEÓRICAS E/OU PRÁTICAS)

Nesta parte da Discussão, vai-se além dos resultados do estudo. É o momento de explicar por que a causa provocou o efeito (mecanismos) e de discutir as implicações (ou aplicações) dos resultados. A apresentação dos mecanismos é feita nos exemplos 1, 2 e 3 a seguir. A(s) implicação(ões) aparece(m) nos exemplos 3, 4 e 5: "...an attractive target for preventing or treating...", "*This finding is likely to have practical consequences*" e "...provides an opportunity for conservation intervention".

- 1) "High fluence rate control could be mediated either through a **biochemical mechanism** acting as a Pr to Pfr flux counter or else via a **phyB-independent mechanism** such as photosynthesis" (Nature DOI: 10.1038/ncomms5848).
- 2) "The **mechanisms** that regulate soil organic matter concentration are however not well understood (McDowell, 2003). Generally, three classes of mechanisms are considered that stabilise organic matter in soils (Christensen, 1996; Sollins et al., 1996): (1) inherent recalcitrance of specific organic molecules against degradation by micro-organisms and enzymes; (2) chemical stabilization due to various interactions of organic molecules, surface condensation, or sorption, leading to a decreased availability of the organic substrate; and (3) physical protection of organic substrates against access by decomposers, caused by occlusion of substrate within aggregates" (Geoderma 128: 167, 2005).
- 3) "Thus, intestinal epithelial MyD88 acts as a metabolic sensor that switches host metabolism during diet-induced obesity via **mechanisms** involving the gut microbiota. These unique features render intestinal epithelial MyD88, **an attractive target for preventing or treating** diet-induced obesity and metabolic disorders" (Nature DOI: 10.1038/ncomms6648).
- 4) "**This finding is likely to have practical consequences.** First, studies of gut microbiota should habitually account for sex (and its interactions with other factors) even when there is no main effect of sex... If genotype-by-environment interactions prove to be common in diverse host species, as our results suggest, then therapeutic changes to

the environment will not work equally well for all host genotypes, or in both sexes. Consequently, treatment of microbially associated diseases might need to account for these interactions, potentially requiring therapies tailored to host sex and possibly other aspects of host genotype” (Nature DOI: 10.1038/ncomms5500).

- 5) *“The identification of diclofenac as the cause of the OWBV decline in Pakistan **provides an opportunity for conservation intervention**. The high rate of visceral-gout-associated vulture mortality in India^{3,22,23} as well as the widespread use of veterinary diclofenac in India (R. Risebrough, personal communication) suggests strongly that diclofenac may also be responsible for vulture declines in the rest of the Indian subcontinent wherever diclofenac is used for the treatment of livestock” (Nature 472: 310, 2004).*

PERGUNTAS NÃO RESPONDIDAS E PESQUISAS FUTURAS

Neste ponto, o assunto tratado é ainda mais alheio ao presente estudo. É o momento de discutir questões relacionadas ao tema que permanecem sem respostas. Algumas dessas questões podem ter ficado mais claras com o presente estudo. Logo, sugestões para estudos futuros são feitas como consequência dos resultados. Questões sem respostas estão explícitas (em negrito) nos exemplos 1, 2 e 3 a seguir. Nos exemplos 4 e 5, as questões não respondidas aparecem implícitas (“...LG2055 **might have other protective effects...**”, “...**would help in elucidating...**”). Após a menção das questões que ficaram sem respostas (exemplos 1 a 5), os autores fazem sugestões para estudos futuros (em negrito nos cinco exemplos).

- 1) "**A number of questions remain unanswered**, such as why the interaction was not detected at $S=3$. It is obvious, however, that **studying global changes simultaneously is essential**, as the responses to single changes are likely not additive as also evident from other multi-factorial studies (Reich et al., 2001; Wang, 2007)" (*Biogeosciences* 5: 585 2008).
- 2) "An important, but **unanswered, question** is how changes in plant architecture, such as those obtained here, will alter the competitive ability of kudzu. Reductions in above-ground and root biomass, in addition to shorter internodes and secondary vine lengths, for plants in the simulated herbivory treatment might limit kudzu's ability to produce adventitious roots at stem nodes, and slow the plant's spread by vegetative reproduction. **Additional research is needed** to understand how the changes in plant architecture documented here translate to overall plant performance and health" (*Environmental Entomology* 42: 936, 2013).
- 3) "**Many questions remain to be addressed** concerning how these changes influence plant competitive relationships and ecosystem function. **Further work** is clearly needed to determine how alteration of AMF communities influences plant competitive relationships during *C. maculosa* invasion and the role played by AMF community composition in determining seedling establishment and subsequent vigor" (*Plant Soil* 288: 81, 2006)
- 4) "Therefore, **LG2055 might have other protective effects** against influenza virus infection such as enhancement of IgA production. **Further investigation** is required to better understand the detailed functions of LG2055 to enable the

prevention of influenza” (Nature DOI: 10.1038/srep04638)

- 5) **“A more focused experimental design that would test both growth promotion and disease control in presence and absence of a pathogen would help in elucidating the relative primary to secondary beneficial effects of these microorganisms. Future work aimed at elucidating the relative benefits of the primary and secondary effects should also include a cost/benefit analysis that would be able to assess the added value of the secondary effects”** (*Soil Biology & Biochemistry* 40: 1733, 2008).

Uma vez terminada a discussão, finaliza-se o manuscrito com mensagem relacionada ao significado do estudo: a conclusão. Em inglês, essa mensagem, denominada *take-home message*, transmite o que os autores querem que os leitores lembrem após a leitura do artigo. Em geral, essa mensagem é a resposta à pergunta feita na Introdução e/ou a importância do estudo por intermédio de suas implicações ou aplicações (exemplos 1 a 6 a seguir) e recomendações. Ademais, se apropriado, pode-se sugerir estudo futuro na conclusão. Ou seja, qual o próximo passo a ser dado à luz dos resultados deste estudo?

No exemplo 1, os autores apresentam, na conclusão, a resposta à pergunta feita na Introdução (“The results obtained in this study clearly demonstrated *that...*”); seguida da implicação do estudo (“*This trait appears to be a good candidate for...*”). No exemplo 2, os autores respondem à pergunta feita na Introdução (“*Our results demonstrate that...*”), relembram a importância do tema (“*...Nr continues to be of greatest importance in China...*”) e fazem recomendações (“*Current environmental policy needs to focus more strongly on...*”). No exemplo 3, ressaltam a novidade do estudo (“*In conclusion, we discovered a novel function of...*”), que

é seguida das implicações (“*These unique features render intestinal epithelial MyD88, an attractive target for preventing...*”). No exemplo 4, os autores identificam os principais resultados (“*This research has identified...*”), seguidos da implicação deles (“*This knowledge will allow for...*”) e da necessidade de mais estudos (“*Increased knowledge of the critical period will also...*”). No exemplo 5, após a implicação do estudo (“...has a high potential to improve...”), os autores sugerem estudos futuros. No exemplo 6, a implicação do estudo (“...*potentially important for...*”) vem antes do mecanismo responsável pelo efeito (“...*via the ethylene signaling pathway...*”) e de estudos futuros necessários para preencher lacunas no conhecimento que persistem (“...*future work is needed...*”).

- 1) “**The results obtained in this study clearly demonstrated that** genetic variability exists in N₂ fixation resistance to drought. **This trait appears to be a good candidate for** exploitation in common bean breeding programs to enhance drought resistance of future common bean cultivars” (*Plant Soil* 364: 29, 2013).
- 2) “**Our results demonstrate that** deposition of reduced forms of N_r continues to be of greatest importance in **China** (which is responsible for approximately 2/3 of total deposition) but emission and deposition of oxidized N_r are increasing more rapidly. **Current environmental policy needs to focus more strongly on** reducing present NH₃ emissions from agricultural sources, whereas control of NO_x emissions from industrial and traffic sources will become more important in the near future. It is time for China and other economies to take action to improve N-use efficiency and food production in agriculture and reduce N_r emissions from both agricultural and non-agricultural sectors.

These actions are crucial to reducing N deposition and its negative impact locally and globally”(Nature doi:10.1038/nature11917).

- 3) **“In conclusion, we discovered a novel function of intestinal epithelial MyD88. We show that targeting intestinal epithelial MyD88 confers protection or therapeutic effects against diet induced metabolic disorders. Thus, intestinal epithelial MyD88 acts as a metabolic sensor that switches host metabolism during diet-induced obesity via mechanisms involving the gut microbiota. These unique features render intestinal epithelial MyD88, an attractive target for preventing or treating diet-induced obesity and metabolic disorders”** (Nature DOI: 10.1038/ncomms6648).
- 4) **“This research has identified the critical period for yield determination and the associated critical periods for yield components. This knowledge will allow for more targeted stress mitigation practices, e.g. combining sowing date and cultivar phenology to reduce the likelihood of severe stress in the critical window. Increased knowledge of the critical period will also enhance the ability of breeders to screen for stress tolerance with more targeted stress impositions”** (Field Crops Research 156: 12, 2014).
- 5) **“All these results together with the proven and proposed roles of Ni in urea and amino acid metabolism indicate that Ni has a high potential to improve the utilization of N fertilizers by soybean and possibly other crops, which represents an important future research topic”** (Plant Soil DOI 10.1007/s11104-012-1284-6).
- 6) **“Taken together, our data indicate that plant defense mechanisms are potentially important for controlling**

*mycorrhizal development, and that its modulation occurs, at least partially, **via the ethylene signaling pathway**. However, **future work is needed** to fill in gaps in understanding how the ethylene signaling pathway is modified in mycorrhizal plants..."* (Symbiosis 60: 155, 2013).

Deve-se evitar na discussão: (a) interpretar os resultados além do que os dados permitem, (b) especular, (c) apresentar assuntos alheios ao objetivo do estudo, (d) criticar autores de outros estudos, e (e) incluir conclusão que não tem suporte nos resultados.

RESUMO

O Resumo (*Abstract*) tem como objetivo persuadir o leitor a ler o artigo completo e dar-lhe uma ideia do que encontrará no artigo. Por isso, o Resumo deve ser autoexplicativo: o leitor deve entender os pontos-chaves do estudo sem precisar ler o artigo completo. Um Resumo bem preparado, que cause boa impressão, pode ser decisivo para convencer editor e revisores a concordarem com a publicação do manuscrito e, posteriormente, para convencer o leitor a ler o artigo completo e citá-lo. O comprimento do Abstract é informado no *site* da revista-alvo; geralmente permitem-se entre 150 e 250 palavras.

O Resumo pode ser estruturado (Introdução/Material e Métodos/Resultado/Conclusão) ou focar um ou alguns aspectos do estudo (Material e Métodos/Resultados ou Introdução/Resultados). O exemplo abaixo é de um Resumo estruturado, o mais usado.

Neste exemplo, a primeira parte em negrito é a **Introdução** do Resumo. Nessa parte, destacam-se o problema de modo geral

("... doença danosa no outono-inverno..."), prática usada atualmente ("...10 a 16 feijoeiros por metro...") que pode mudar com os resultados deste estudo, o que se conhece sobre o tema ("Diminuir o número de plantas...") e o que se desconhece ("...mas essa prática não tem aumentado a produtividade."). Esta lacuna no conhecimento (o desconhecido) permite inferir o objetivo do estudo, que vem explicitado a seguir: "Nosso objetivo...". A estratégia de apresentar a lacuna na Introdução do Resumo é muito usada em revistas como *Nature* e *Science*. Em seguida, apresentam-se, resumidamente, informações relevantes do **Material e Métodos**: cultivar, tipo de irrigação, variáveis independentes (densidade de planta e fungicida) e época e local em que foram conduzidos os dois ensaios. As variáveis dependentes (produtividade, incidência e severidade do mofo-branco) são mencionadas a seguir, em **Resultados**. Esta é a parte mais importante do Resumo, geralmente mais longa que as outras partes. É comum iniciá-la com os resultados gerais ("Em média, a incidência do mofo-branco foi..."), seguidos de resultados específicos ("A redução da densidade de plantas diminuiu..."). Esses resultados devem dar suporte à **conclusão** apresentada no final do Resumo ("Nossos resultados indicam que...").

O mofo-branco (MB) é doença danosa no outono-inverno, quando se usam de 10 a 16 feijoeiros por metro. Diminuir o número de plantas na fileira reduz a intensidade do MB, mas essa prática não tem aumentado a produtividade. Nosso objetivo foi testar a hipótese de que a redução de feijoeiros do tipo III na fileira aumenta a produtividade em áreas com MB. O cultivar Pérola, irrigado por aspersão convencional, foi cultivado com 4, 8, 12 ou 16 plantas por metro, com ou sem aplicação de fungicida para o controle do MB, no outono-inverno de 2000 e 2001, em Viçosa,

MG, Brasil. **Em média, a incidência do MB foi 93 % em 2000 e 78 % em 2001; a severidade foi 69 % em 2000 e 40 % em 2001. A produtividade média foi 1656 kg ha⁻¹ em 2000 e 2542 kg ha⁻¹ em 2001. A redução de plantas na fileira diminuiu a intensidade do MB e aumentou a produtividade, ambos linearmente, independentemente dos níveis de fungicida.** Nossos resultados indicam que, em áreas com MB, o uso de densidades de feijoeiros do tipo III mais baixas que as em uso atualmente pode aumentar a produtividade, tanto em áreas de produção orgânica quanto em áreas de produção convencional.

REFERÊNCIAS

Annesley, T.M. The discussion section: your closing argument. **Clinical Chemistry**, v.56, p. 1671-1674, 2010.

Blackwell, J.; Martin, J. **A scientific approach to scientific writing**. New York: Springer, 2011. 112p.

Cargill, M.; O'Connor, P. **Writing scientific research articles: strategy and steps**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009.173p.

Day, R.A.; Gastel, B. **How to write and publish a scientific paper**. 6 ed. Westport: Greenwood Press, 2006. 302p.

Dorchety, M.; Smith, R. The case for structuring the discussion of scientific paper. **British Medical Journal**, v. 318, p.1224-1225, 1999.

Foote, M. The proof of the pudding. How to report results and write

a good discussion. **Chest**, v.135, p.866-868, 2009.

Glasman-Deal, H. **Science research writing for non-native speakers of English**. London: Imperial College Press, 2010. 257p.

Katz, M.J. **From research to manuscript: a guide to scientific writing**. 2 ed. La Vergne: Springer, 2009. 205p.

Matthews, J.R.; Matthews, R.W. **Successful scientific writing**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. 240p.

Peat, J. **Easy when you know how**. London: BMJ Books, 2002. 292p.

Pechenik, J.A. **A short guide to writing about biology**. 7 ed. New York: Longman. 2010. 288p.

Vieira, R.F. **Dicionário de dúvidas e dificuldades na redação científica**. Epamig: Viçosa. 2011. 320p.

Ferramentas moleculares utilizadas na identificação de fitopatógenos

Tiago Garcia da Cunha¹

Gustavo Ribeiro²

Liliane Evangelista Visôto³

Camila Rocha da Silva⁴

Pedro Ivo Vieira Good God⁵

INTRODUÇÃO

Os fitopatógenos são de grande importância para a produção agrícola mundial. Nas últimas décadas, a globalização e a intensificação do trânsito de espécies vegetais maximizaram ainda mais os problemas fitossanitários, fazendo com que estudos

¹ Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus* Bambuí, Caixa Postal 05, CEP 38900-000 Bambuí/ MG. E-mail: tcunha84@gmail.com

² Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Agrárias, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba/ MG. E-mail: gustavocrp@ufv.br

³ Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Agrárias, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba/ MG. E-mail: visotto@ufv.br

⁴ Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba/ MG. E-mail: camila.rocha@ufv.br

⁵ Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, Instituto de Agrárias, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba/ MG. E-mail: pedro.god@ufv.br

sobre as incontáveis espécies causadoras de doenças em plantas se multiplicassem (Munõz et al., 2015). As sementes, estacas, bulbos e tubérculos são órgãos de propagação vegetal e eficientes veículos de disseminação de fitopatógenos nos campos agrícolas. Além destes, diferentes organismos vetores, como insetos, ácaros, fungos e nematóides também contribuem para a disseminação de fitopatógenos no campo.

A espécie fitopatogênica, *Tobacco mosaic vírus*, alcançou distribuição mundial, infectando diferentes espécies vegetais (Kumar et al., 2013). Outro exemplo de amplo espectro de infecção é o fungo *Botrytis cinerea*, causador de infecções e perdas em mais de 200 culturas (Kumari et al., 2014). Patógenos de sementes, como *Xanthomonas axonopodis* sp. *phaseoli*, causam perdas na produtividade e restrições à comercialização da semente acarretando impactos econômicos severos (Boureau et al., 2013). Além disso, a grande diversidade de hospedeiros garante a propagação de inóculos no ambiente, onerando e dificultando o manejo das doenças e impactando a produtividade e o lucro.

As doenças são diagnosticadas principalmente pelos sintomas típicos induzidos nas folhas, raízes, nervuras, frutos e no desenvolvimento da planta como todo. Entretanto, a tarefa não é fácil, já que os sintomas podem ser confundidos com aqueles causados por outros patógenos e também pelas deficiências nutricionais, além da ocorrência no campo de plantas com ausência de sintomas, denominadas hospedeiros latentes. A correta diagnose de uma doença é considerada uma das principais medidas para seu controle. Ela permite ações de manejo imediatas e acertadas, restringindo a evolução da doença a custos e esforços menos onerosos.

Uma identificação segura requer o uso de testes realizados em laboratório. A taxonomia faz uso de características morfológicas,

provas bioquímicas e testes de infecção de hospedeiros para a classificação e identificação das espécies. Tais ferramentas são evidentemente úteis para identificação. No entanto, são demoradas, exigem conhecimentos mais aprofundados e nem sempre são suficientes para a completa identificação do patógeno. Ademais, as condições de crescimento podem influenciar significativamente as características morfológicas apresentadas pela espécie em estudo (Kumari et al., 2014). Nesse sentido, a biologia molecular, por ser bastante específica, pode superar tais dificuldades.

O presente capítulo visa explicar de forma sucinta as principais técnicas que têm sido utilizadas na identificação de fitopatógenos e os avanços tecnológicos disponíveis até o momento, dando ao leitor o alcance da contribuição dessa área na identificação de espécie fitopatogênicas de interesse agrícola.

METODOLOGIAS CLÁSSICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE FITOPATÓGENOS

Hospedeiros diferenciais

A técnica dos hospedeiros diferenciais é bastante utilizada na identificação de fitonematóides e de vírus causadores de doenças em plantas.

As plantas apresentam diferentes respostas aos diferentes fitopatógenos, como: suscetibilidade, reação de hipersensibilidade e diferenciação de sintomas. A partir do conhecimento da sensibilidade diferencial de determinadas plantas aos possíveis patógenos, o fitopatologista submete tais organismos a testes de infecção a essas plantas. Após o tempo necessário ao desenvolvimento da resposta, mediante a observação dos sintomas, é possível fazer a classificação do patógeno.

Análise microscópica

A microscopia promoveu avanços do conhecimento básico e mudanças de paradigmas muito expressivos para a ciência. As primeiras observações ocorreram no século XVII e, com a evolução de instrumentos e técnicas, grande volume de informações morfológicas foram sendo acumuladas. Ao longo desse período, com a evolução da física ótica e a expansão dos campos de aplicação foram desenvolvidos equipamentos cada vez mais eficientes. O desenvolvimento das técnicas de contraste e softwares de processamento de imagem tornaram-na indispensável para a ciência moderna.

A microscopia ainda é uma ferramenta de muita importância nos estudos taxonômicos e filogenéticos. Ela permite a compreensão e visualização das estruturas do organismo, respondendo a questionamentos e validando informações obtidas por meio de outras tecnologias. Os fungos geralmente são identificados a partir de características morfológicas (como hifas, esporos, conídio, conidióforo, etc). Para a identificação das espécies devem ser realizados estudos detalhados das características microscópicas e macroscópicas da colônia. Para isso são preparadas lâminas de microcultivo em diversos meios e as características dos isolados fúngicos, como coloração e morfologia, são observadas e comparadas com a disponível na literatura.

Provas bioquímicas

Alguns microrganismos podem ser identificados por características do seu metabolismo, como a capacidade de degradar determinados substratos e produzir gases. Sua aplicação consiste na verificação das transformações químicas sofridas por um substrato frente à ação das enzimas produzidas por um dado microrganismo. As provas bioquímicas utilizam meios de cultura e reagentes

específicos para detectar metabólitos resultantes da atividade microbiana, auxiliando na sua identificação. É possível identificar bactérias fitopatogênicas, mediante os resultados de um conjunto de provas bioquímicas.

- Motilidade
- Utilização de fontes de carbono
- Utilização de fontes de nitrogênio
- Produção de enzimas

(1) *Motilidade* - é observada através do aspecto do meio. Utiliza-se um meio semi-sólido o que permite o crescimento bacteriano no interior do meio, por todo o tubo. Se a bactéria for móvel (motilidade positiva), o aspecto do meio será turvo; se for imóvel (motilidade negativa), o crescimento só será observado no local de inoculação.

(2) *Produção de catalase* - A catalase é uma enzima antioxidante produzida naturalmente por praticamente todos os seres vivos. Esta enzima atua sobre o peróxido de hidrogênio desdobrando-o em oxigênio e água. A solução aquosa de peróxido de hidrogênio é colocada em contato com a amostra a ser analisada. A prova é considerada positiva quando há efervescência devido à liberação do oxigênio, conforme equação química dada a seguir:



O teste da catalase é extensivamente usado por microbiologistas em laboratórios para reconhecer e diferenciar espécies de bactérias. Na maioria das vezes, este teste é combinado a outros para identificar o microrganismo ao nível de espécie.

(3) *Prova da citocromo-oxidase* - Os microrganismos que produzem a enzima oxidase possuem o sistema de transporte de elétrons baseado no complexo citocromo-oxidase. A prova consiste em substituir aceptores eletrônicos naturais por substratos artificiais (reagente incolor). Na presença de oxigênio atmosférico, os substratos são oxidados pela citocromo oxidase, formando um composto colorido. A prova é considerada positiva quando na mistura do reagente com a massa bacteriana desenvolve-se a cor púrpura em até 1 minuto.

(4) *Prova da produção de indol* - O indol é o produto da reação de degradação do aminoácido triptofano pela triptofanase. Alguns microrganismos são capazes de degradar enzimaticamente o triptofano adicionado ao meio teste. A prova é positiva quando na porção superior, na interface da cultura e o reagente, desenvolver um anel de coloração rósea dentro de no máximo 5 minutos. Este resultado é devido à complexação do indol com o aldeído, em meio ácido, formando o composto colorido.



(5) *Prova da produção de gás sulfídrico* - Existem duas vias fermentativas principais através das quais alguns microrganismos podem produzir sulfeto de hidrogênio. Na primeira via, o gás sulfídrico é produzido por redução do enxofre orgânico presente no aminoácido cisteína (reação de hidrogenação), o qual é um componente das peptonas contidas no meio. Essas peptonas são degradadas pelas enzimas microbianas a aminoácidos. Através da ação da enzima cisteína desulfurase, o aminoácido cisteína perde

o átomo de enxofre, que por sua vez é reduzido pela adição de hidrogênio da água para formar o gás sulfídrico. Na segunda via, o gás sulfídrico é produzido pela redução de compostos inorgânicos de enxofre tais como o tiosulfato, sulfato ou sulfito. Os microrganismos capazes de produzir a enzima tiosulfato redutase convertem o tiosulfato em sulfito com liberação de sulfeto de hidrogênio. Os átomos de enxofre atuam como aceptores de hidrogênio durante a oxidação do composto inorgânico. Nas duas vias, o sulfeto de hidrogênio produzido reage com o metal pesado formando sulfetos que apresentam coloração negra.



(6) *Prova da fermentação de carboidratos* - Esta prova envolve a utilização de um meio com glicose ou outro açúcar e/ou álcool com pH neutro e um indicador de pH (Indicador de Andrade, púrpura de bromocresol). Além disso, utiliza-se um tubo de Durham, invertido, imerso no meio. O meio é inoculado com a cultura teste e incubado. A prova positiva é indicada pela alteração da cor do meio de incolor para vermelho ou amarelo, devido a produção de ácidos e conseqüente diminuição do pH. Além disso, se a bactéria possuir o sistema enzimático hidrogênio-fórmico-liase, o ácido fórmico é transformado em CO_2 e Hidrogênio, os quais são coletados pelo tubo de Durham.

Eletroforese

A eletroforese é uma técnica que se baseia na segregação diferencial de moléculas carregadas através de uma matriz porosa ou em gel submetida a um campo elétrico, que gera um diferencial de cargas elétricas. As moléculas são separadas de acordo com seu peso molecular e sua carga elétrica. O campo elétrico é gerado por dois eletrodos dispostos nas extremidades onde será formado um pólo positivo, para onde migram moléculas com carga negativa e um pólo negativo, para onde migram as moléculas positivas. Um sistema tampão permite a passagem uniforme da corrente elétrica (Figura 1). O meio físico de separação (matriz porosa), mergulhado no tampão, visa obstruir a passagem, onde as moléculas menores migram mais facilmente gerando o gradiente de segregação. Para leitura dos resultados, a matriz porosa deve ser corada ou marcada por radioisótopos.

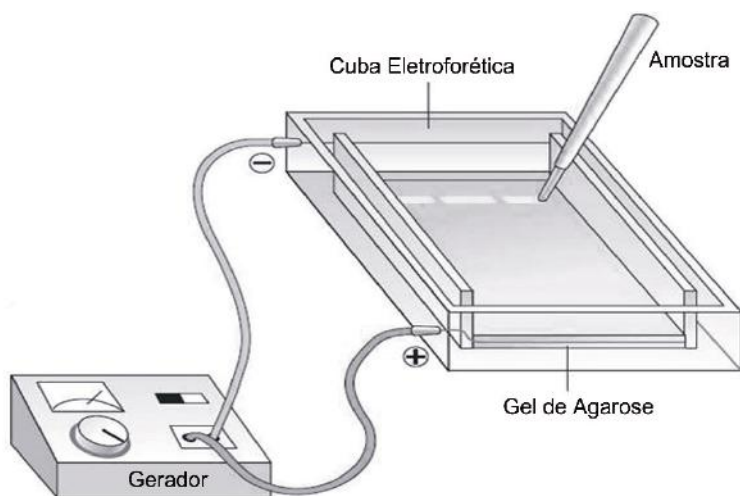


Figura 1. Eletroforese em gel agarose para separação de DNA.

Fonte: Adaptada de Quimicaline (2012).

Estudos bioquímicos, envolvendo proteínas solúveis, demonstraram que várias espécies de nematóides das galhas podem ser diferenciadas ao nível de espécie através de fenótipos enzimáticos que podem ser obtidos através de eletroforese em gel de poliacrilamida. As esterases foram definidas como enzimas mais precisas na identificação das espécies, após a conclusão do estudo envolvendo mais de 300 espécies originárias de vários países e continentes. A malato desidrogenase é usada como enzima auxiliar na diferenciação das espécies cuja esterases forem idênticas, como é o caso do *Meloidogyne nassi* e *Meloidogyne exigua* (Carneiro e Almeida, 2001).

Sorologia

O desenvolvimento da sorologia se deu com a descoberta de que os animais quando infectados produzem substâncias de combate ao agente infeccioso. Usando esse mecanismo é possível diagnosticar agentes infecciosos, determinar sua concentração e ainda detectar a presença de diversos compostos antigênicos em extratos vegetais ou cortes histológicos.

Diversos métodos sorológicos utilizados na fitovirologia estão descritos na literatura. Dentre eles pode-se citar a precipitação em meio líquido e sólido; a aglutinação e o uso de anticorpos conjugados. O uso de anticorpos em várias técnicas imunológicas tem se tornado uma importante ferramenta de diagnóstico para identificação de patógenos de plantas. A marcação enzimática de anticorpos foi adaptada para a detecção de fitopatógenos com grande sensibilidade, sendo o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) o método sorológico mais difundido na fitopatologia. O teste baseia-se no reconhecimento do antígeno pelo antisoro que lhe deu origem, formando o complexo anticorpo-antígeno, associado a propriedades

colorimétricas. As reações ocorrem em suporte sólido, conhecido como placa de ELISA (Meirelles et al., 2006).

A coloração do meio ocorre devido à ação de enzimas, como a fosfatase alcalina e peroxidase, sobre um substrato cromogênico. A enzima é previamente conjugada à um anticorpo, reage com substrato incolor, gerando um produto colorido ou quimioluminescente, permitindo a detecção do antígeno. Embora existam diversas variações do teste de ELISA, todas elas dependem de um princípio básico: aderência de macromoléculas a vários tipos de suportes físicos (plásticos, borracha, vidro, silicone e membranas de nitrocelulose ou náilon) através de adsorção (interações hidrofóbicas não covalentes).

Outra variação do teste é denominada DOT-ELISA, que tem a vantagem de não necessitar da leitora de placas, porém, não permite avaliações quantitativas. O antígeno é colocado na membrana utilizando-se um molde de plástico que prensa a membrana e direciona a posição dos orifícios onde é colocado o antígeno. A seguir, faz-se um bloqueio dos sítios da membrana, não ocupados pelo antígeno, adicionando-se, posteriormente, a IgG. Uma anti-IgG conjugada à enzima é adicionada. Ao se colocar a membrana sob uma solução de substrato apropriado, as manchas decorrentes da reação positiva são visualizadas.

Dentre as principais vantagens da técnica de ELISA estão a alta sensibilidade e especificidade, aliadas à facilidade na execução, permitindo a automatização do ensaio (Meirelles et al., 2006). Entretanto, este método apresenta algumas limitações, como a incapacidade de detectar vírus em baixas concentrações e viróides, uma vez que esses não possuem capa proteica, onde se liga o anticorpo.

FERRAMENTAS DE BIOLOGIA MOLECULAR UTILIZADAS NA IDENTIFICAÇÃO DE FITOPATÓGENOS

As principais técnicas de biologia molecular utilizadas na diagnose dos fitopatógenos e seus possíveis vetores envolvem a extração de DNA, RNA ou proteínas e sua análise simultânea. Dependendo do princípio e das condições de condução, os testes baseados em biologia molecular podem ser mais eficientes para discriminar gêneros, espécies, estirpes e subgrupos de fitopatógenos (Brioso et al., 2001).

DNA e RNA podem ser analisados por clivagem por enzimas de restrição, eletroforese e técnicas de hibridização molecular (*Blotting*). Além disso, fragmentos de DNA e RNA podem ser amplificados por técnicas de PCR e suas variantes. Microarranjos (*Microarray*) de DNA e RNA são utilizados para a análise de múltiplos locos gênicos e na determinação do perfil de expressão gênica. Atualmente, as tecnologias de sequenciamento e genotipagem em larga escala (*high-throughput*) permitem a diagnose mais precisa. Associados ao emprego de ferramentas computacionais e de biotecnologia, estas técnicas estão revolucionando a diagnose, controle de doenças e epidemiologia (Studolme, 2011; Massart et al. 2014).

Técnicas baseadas em hibridização de moléculas – Blotting

São utilizadas para identificar proteínas únicas ou sequências de ácidos nucleicos. Geralmente, consistem em quatro fases distintas: separação por eletroforese das moléculas-alvo; transferência e imobilização das moléculas-alvo em um suporte de papel; ligação das moléculas-alvo a sondas analíticas permitindo a visualização das proteínas ou ácidos nucleicos.

Após a transferência das moléculas-alvo para o anteparo, as proteínas ou os fragmentos de ácidos nucleicos imobilizados são localizados por meio de sondas (DNA, RNA ou anticorpos), que se ligam especificamente à molécula de interesse. Finalmente, a posição da sonda que está ligada à molécula de interesse é visualizada por autorradiografia. As três principais técnicas de Blotting são: Southern, Northern e Western e possibilitam a identificação de DNA, RNA e proteínas, respectivamente.

Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

PCR Convencional

Esse método, desenvolvido nos anos 80, é a ferramenta molecular de manipulação de DNA mais conhecida e utilizada. Sua descoberta provocou uma verdadeira revolução na ciência. A alta sensibilidade, a especificidade e a facilidade de execução fizeram sua aplicação se estender do desvendamento de crimes à identificação de patógenos de interesse agrícola.

A PCR promove a síntese de bilhões de cópias de DNA em poucas horas. Para a amplificação do DNA, a amostra passa por vários ciclos de três etapas sequenciais. Na primeira etapa, denominada desnaturação, as duplas fitas de DNA são dissociadas a alta temperatura (~94°C). Em seguida, a uma temperatura entre 50 a 60°C, as fitas dissociadas de DNA são pareadas a pequenas seqüências de nucleotídeos iniciadores (*primers*) presentes em solução, na etapa chamada de anelamento. A presença dos primers se faz necessária devida a incapacidade da DNA polimerase sintetizar a fita complementar sem essa seqüência iniciadora. Por fim, a 72°C, a enzima Taq DNA polimerase, resistente a alta temperatura, faz a polimerização do restante da seqüência, adicionando os nucleotídeos em uma etapa definida como extensão. As mudanças de

temperatura e o tempo a que a amostra é submetida em cada etapa são controlados por um equipamento automatizado, o termociclador (Figura 2).

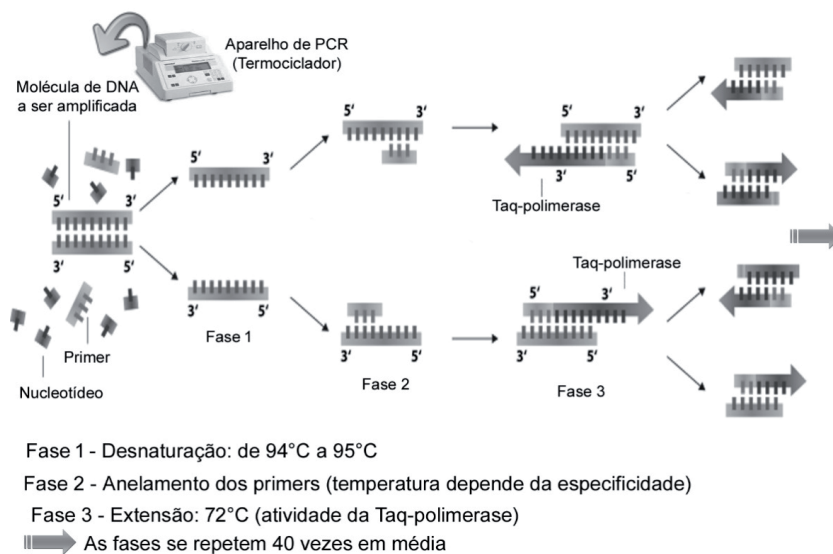


Figura 2. Termociclador e etapas envolvidas na técnica da reação em cadeia da polimerase.

Fonte: Adaptada de Wikimedia Commons (2014).

A aplicação do PCR com *primers* específicos na diagnose de fitopatógenos pode ter importante uso no caso de doenças que exibem um padrão assintomático ou quando há dificuldade na identificação do agente causal. Em cana-de-açúcar, por exemplo, muitas variedades são portadoras assintomáticas da escaldadura-das-folhas (*Xanthomonas albilineans*). A escaldadura-das-folhas é uma das principais doenças da cultura, devido ao dano que causa e à dificuldade da sua correta identificação. Como plantas infectadas não apresentam os sintomas visíveis, sua disseminação para outras áreas pode ocorrer através do plantio de partes vegetativas aparentemente

sadias. O diagnóstico molecular por PCR foi comparado a outras técnicas de identificação de *X. albilineans*, mostrando-se eficiente em 100 % das amostras de plantas doentes assintomáticas, consistindo em uma ferramenta importante na detecção da escaldadura-das-folhas (Urashima e Zavaglia, 2012).

Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Essa técnica consiste na utilização de uma fita simples de RNA como material genético. O primeiro passo é a obtenção de uma molécula de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA-molde, através da utilização da enzima transcriptase reversa. A técnica de RT-PCR é amplamente utilizada para verificar a expressão gênica, uma vez que analisa o mRNA, intermediário na expressão de genes e biossíntese de proteínas. Se há uma proteína específica, é porque há DNA sendo expresso e originando mRNA para síntese de tal proteína.

A técnica de RT-PCR pode ser útil na identificação de fitovírus de RNA. A diagnose de doenças virais é baseada, principalmente, em resultados obtidos nos testes de campo e nos testes laboratoriais. Entretanto a sintomatologia apresentada por plantas doentes no campo pode ser complexa, envolver diversos agentes virais e não ser característica de uma doença em particular. Dessa forma, vários trabalhos relatam o uso da transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para diagnóstico de vírus. É utilizado como molde o RNA viral. O processo envolve as enzimas transcriptase reversa e a DNA polimerase como já descrito. A reação é automatizada pela incubação em um termociclador programado para executar a transcrição reversa do RNA em DNA complementar e os múltiplos ciclos da PCR, que visam a produção de um grande número de cópias do fragmento alvo deste DNA.

Oliveira et al. (2014) analisaram, por meio de RT-PCR, a

presença de vírus em semente de alho. Os patógenos em estudo eram pertencentes aos grupos *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus*. A técnica foi utilizada para demonstrar o escape dos vírus mesmo após o tratamento térmico dos bulbos. O uso eficiente dessa tecnologia também contribuiu para a identificação da nova estirpe de vírus *Tobacco mosaic vírus* (TMV–SoyIn) infectando a soja, na Índia.

PCR-multiplex

O PCR-multiplex é uma técnica muito semelhante à técnica PCR convencional. Este método se diferencia do convencional devido ao uso de vários pares de *primers* usados simultaneamente. Assim, é feita a amplificação simultânea de segmentos de DNA correspondentes a cada par de *primer*. Os *primers* podem amplificar estirpes ou mesmo espécies diferentes no estudo, representando economia de recursos, tempo e mão-de-obra. O PCR-multiplex foi utilizado na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli*. No estudo, a presença simultânea de dois genes específicos caracterizou a ocorrência da espécie (Boureau et al., 2013). Na China, a técnica foi utilizada na detecção de cinco espécies viróticas ao tabaco: *Tobacco mosaic vírus* (TMV), *Cucumber mosaic vírus* (CMV), *Tobacco etch vírus* (TEV), *Potato virus Y* (PVY) e *Tobacco vein banding mosaic vírus* (TVBMV) (Figura 3). Os resultados foram comparados com PCR simples e confirmados por sequenciamento de DNA (Dai et al., 2012).

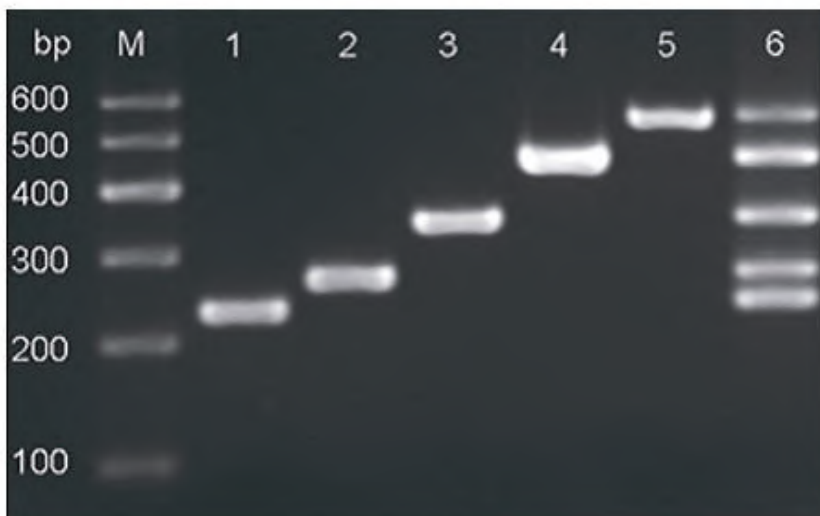


Figura 3. Diversidades de DNA obtidos por PCR multiplex. M, marcador molecular de 100pb; 1-5 TMV, CMV, TEV, PVY, e TVBMV, respectivamente; 6, mistura de controles positivos TMV, CMV, TEV, PVY e TVBMV.

Fonte: Adaptada de Dai et al. (2012)

PCR quantitativo em tempo real (qRT – PCR)

A técnica de PCR convencional permite a detecção dos produtos de reação apenas no final de todos os ciclos de termociclagem (entre 25 e 30 ciclos), momento no qual o DNA-alvo se encontra amplificado em condições de saturação. Assim, não é possível detectar diferenças reais na quantidade inicial de DNA molde. O PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR ou q-PCR) permite a detecção, ciclo a ciclo, das reações de amplificação, com elevada sensibilidade. A detecção em tempo real se dá pela especificidade da intensidade de fluorescência, emitida em decorrência da amplificação da sequência de DNA-alvo. Esta especificidade se dá pela análise comparativa entre amostras e um controle, que pode ser um gene de expressão constitutiva ou

um padrão de concentração conhecida. A quantificação de DNA se dá no início da fase exponencial de amplificação, em que não há saturação, eliminando um viés da técnica convencional.

O qRT-PCR é empregado largamente na quantificação da expressão de genes de interesse ou na quantificação de DNA molde inicial. Na área de apoio ao diagnóstico, o PCR quantitativo pode ser utilizado na distinção de sequências específicas dentro de uma mistura complexa de DNA. Desse modo, a técnica é utilizada na determinação da presença e quantidade de determinados vírus, bactérias ou fungos (Nascimento, et al., 2010).

Marcadores moleculares

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um ou mais segmentos específicos de DNA. A análise de locos moleculares de diferentes amostras de DNA permite revelar polimorfismos ao nível de DNA. Basicamente estes polimorfismos podem ser detectados em qualquer parte do genoma analisado, o que permite bastante versatilidade a aplicação de marcadores. Além disso, marcadores moleculares de DNA são mais estáveis à influência do meio, o que permite um diagnóstico mais preciso se comparadas à técnicas baseadas em produtos do metabolismo de plantas ou patógenos.

O polimorfismo detectado por marcadores moleculares indica a diferenciação genética entre as amostras de DNA. A análise do polimorfismo pode ser aplicada, por exemplo, na determinação da diversidade genética entre e dentro de espécies, na construção de filogenias moleculares, na caracterização de espécies e na diagnose de doenças fitopatogênicas.

Existem várias categorias de marcadores moleculares e muitas são desenvolvidas com o avanço de técnicas moleculares. A seguir

serão destacadas os principais tipos de marcadores moleculares utilizados no diagnóstico de doenças de plantas.

RFLP - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição

Essa técnica é capaz de produzir fragmentos de DNA com tamanhos variados, permitindo a diferenciação dos DNA das amostras e por consequente a identificação do biótipo em estudo. Tais fragmentos são obtidos pelo uso de enzimas de restrição que reconhecem sequências específicas de DNA e executam a clivagem nesse ponto identificado. Em indivíduos geneticamente distintos há variação nas sequências de nucleotídeos entre os pontos de clivagem gerando fragmentos de diferentes tamanhos, o polimorfismo.

O RFLP já foi utilizado para detectar a diferenciação de isolados de fungos do complexo *Fusarium*. A fusariose causa perdas severas na agricultura em diversas culturas. O manejo adequado muitas vezes depende da determinação de qual espécie de *Fusarium* está presente e sua variabilidade. Na Argentina, um estudo foi conduzido com marcadores RFLP com o objetivo de diferenciar isolados de *Fusarium* na cultura de trigo da região dos Pampas (Consolo et al., 2015). Os resultados apontaram que os isolados tratavam-se da mesma espécie, *Fusarium graminearum*. A técnica permitiu identificar a diversidade genética intraespecífica dos isolados e diferenciou 55 em 20 haplótipos distintos.

RAPD - Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

O RAPD é uma técnica simples, rápida e sensível e tem sido utilizada na identificação de vários patógenos. Baseia-se na capacidade de detectar os polimorfismos, por meio de PCR, em sequências de nucleotídeos sem a necessidade de informação prévia sobre a sequência analisada. Utiliza um primer único ao invés de um

par de *primers*, o que gera uma sequência arbitrária, e, portanto, sua sequência alvo é desconhecida. Uma vantagem da técnica RAPD é a possibilidade de se avaliar vários locos em uma mesma reação, o que permite criar um painel bastante representativo de polimorfismos com o uso de um pequeno número de primers. Por outro lado, a baixa especificidade dos locos alvo e problemas de reprodutibilidade tornam a técnica de uso limitado.

Marcadores RAPD foram utilizados em estudos sobre a variabilidade intraespecífica de *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo-branco em diversas plantas (Kumari et al., 2014). Os resultados apontaram para uma alta diversidade genética nos isolados, por detecção molecular. O comportamento patogênico dos isolados apresentou alta correlação com os resultados morfológicos e bioquímicos. Nenhum dos 23 primers testados apresentou produto amplificado comum nos isolados amostrados.

AFLP - Polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado

A análise AFLP representa uma combinação da análise de PCR com enzimas de restrição. Possui alto poder de discriminação, sendo capaz de detectar maior número de locos em pequenas quantidades de DNA. Divide-se em 4 fases: clivagem do DNA genômico; ligação de adaptadores aos fragmentos; amplificação seletiva por PCR com *primers* desenhados para reconhecer sequências dos adaptadores; e por fim separação em gel.

Em estudos com o complexo *Fusarium fujikuroi*, a análise AFLP revelou polimorfismos claros dentro e entre espécies. Outras técnicas moleculares empregadas confirmaram os dados de AFLP. As análises permitiram a identificação de nova espécie, *Fusarium ficicrescens*. As amostras foram coletadas em plantas de figo iraniano. Esse complexo é investigado por sua capacidade de produzir micotoxinas e ser potencial causador de intoxicações em humanos (Al-hatmi et al., 2015).

Microarranjos de DNA

Essa metodologia permite a varredura rápida de vários segmentos de DNA ao mesmo tempo. Sequências conhecidas de oligonucleotídeos são montadas, de maneira pré-planejada, em um anteparo sólido plano à semelhança de um microchip de computadores. Usualmente aparelhos robóticos fazem esse trabalho. Centenas de sondas de nucleotídeos com sequências diferentes podem ser imobilizadas dando ao arranjo a capacidade de identificação de várias espécies simultaneamente. As amostras de DNA, previamente marcadas com fluorocromo, são depositadas sobre o microarranjo. A hibridação do DNA ou cDNA com os oligonucleotídeos fixados permite a identificação das sequências de DNA na amostra (Figura 4).

A viabilidade de uso dos microarranjos foi estudada com a construção de um matriz de 150 sondas potencialmente capazes de detectar 52 vírus de plantas. Hibridizações com cDNA de plantas infectadas com 52 espécies diferentes de vírus mostrou que, do total testado, 49 foram positivas e identificaram corretamente ao nível de espécie. O autor relata, com base no desenvolvimento do trabalho, a possibilidade de construção de uma matriz capaz de detectar aproximadamente 600 vírus de plantas, o que alcançaria praticamente a totalidade de vírus de plantas de impacto econômico (Nicolaisen, 2011).

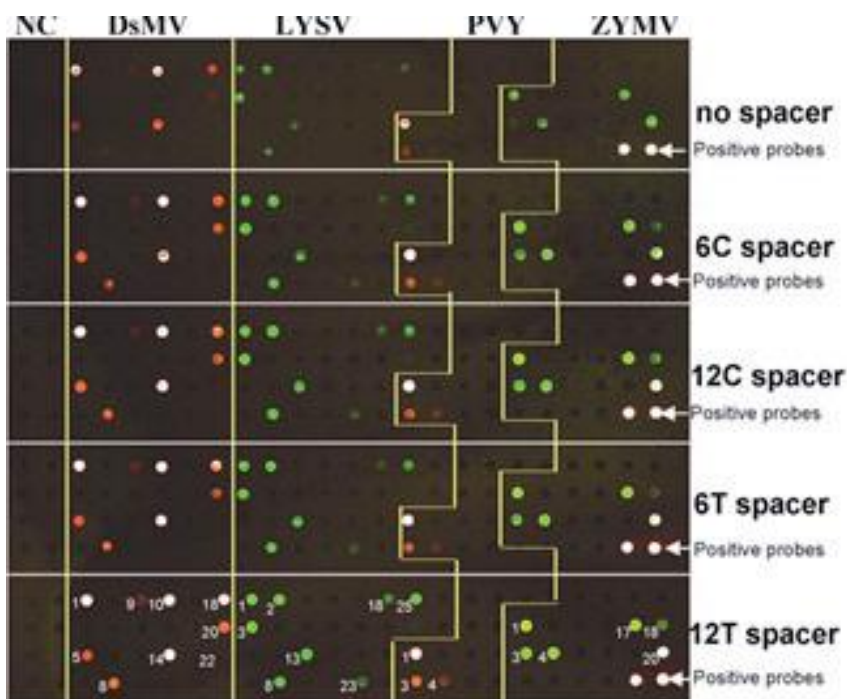


Figura 4. Resultados de microarranjos de hibridação com uma mistura contendo quatro *Potyvirus*. A coloração dos pontos advém da marcação fluorescente do DNA ou RNA da amostra.

Fonte: Adaptada de Wei et al. (2009).

Sequenciamento e tecnologias High-Throughput

A partir da obtenção dos fragmentos de DNA por uma das técnicas descritas nos subitens anteriores é possível determinar as sequências de pares de base de DNA. Dos primeiros métodos desenvolvidos, o método enzimático de Sanger (1977), por sua facilidade técnica, foi o mais difundido. Para a separação do DNA, o método usa eletroforese de alta resolução, capaz de diferenciar fragmentos por um único nucleotídeo. O uso de um análogo aos nucleotídeos, o dideoxirribonucleotídeo, interrompe a síntese da

fitas em reação de PCR, produzindo fitas de diferentes tamanhos. A revelação em eletroforese permite identificar a exata posição do nucleotídeo terminal e, por consequente, mapear o DNA. É necessária a combinação destes testes para cada base nitrogenada para o completo sequenciamento.

Recentemente, inovações nas tecnologias de sequenciamento têm promovido simplificações no processo que garantem maior celeridade e capacidade de geração de informações. O pirosequenciamento é uma dessas inovações mais difundidas. A reação de adição de nucleotídeos à fita molde libera pirofosfato que é convertido em ATP por enzima adicionada ao meio, a sulfúrilase. Outra enzima presente no meio, a luciferina, usa o ATP e catalisa uma reação com o substrato luciferina gerando ondas de luz. Adicionando as bases uma de cada vez, e degradando o excesso de bases não utilizado, é possível correlacionar a luz produzida às sequências de bases nitrogenadas no DNA.

A partir da sequência nucleotídica determinada em um fragmento de DNA, ou de um genoma completo, é possível empreender uma série de estudos que envolvem a bioinformática e conceitos de genética que podem ser aplicados ao processo de diagnose. As sequências são então comparadas com banco de dados genéticos que permitem o alinhamento e comparação de sequências conforme sua homologia com outras sequências depositadas. O sequenciamento de DNA foi utilizado em estudos realizados por Muñoz et al. (2015) com *Botrytis* em plantas ornamentais (*Paeonia lactiflora* Pall). O sequenciamento dos fragmentos de DNA gerados a partir de PCR gerou informações que permitiram construção de uma árvore filogenética e a distinção dos isolados em 3 espécies.

Outros métodos de análise em larga escala são empregados como novas tecnologias de diagnose com aplicações promissoras. O sequenciamento de DNA em larga escala e análise completa

de genomas (genômica), permite a detecção de polimorfismos de base única do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), cujo alcance é quase ilimitado e na diagnose de doenças. Várias plataformas de genotipagem em larga escala envolvem a aplicação de pirosequenciamento, *beads* de DNA (microarranjos de alta densidade) e análise espectral de moléculas acopladas à cromatografia (MALDI-TOF/MS).

Além da genômica, a análise de transcritos de RNA (transcriptoma), proteínas (proteoma) e metabólitos (metaboloma) tem importante papel na classificação de patógenos e nos estudos da interação planta-hospedeiro, processo fundamental no controle e epidemiologia de doenças. Estas técnicas estão na vertente de novas tecnologias para a diagnose de doenças de plantas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diagnose baseada nas avaliações morfológicas e bioquímicas são mais influenciadas pelas condições ambientais, por isso tendem a ser mais subjetivas ou resultar em erros de avaliação. Além disso, características morfo-anatômicas demandam conhecimento detalhado do organismo em estudo por parte de técnico envolvido.

A descoberta das técnicas moleculares já prestou grande contribuição para a ciência. Elas têm proporcionado o elevado acúmulo de informações sobre patógenos e a relação patógenos-hospedeiros. As ferramentas moleculares podem ser mais exatas e pouco subjetivas, permitindo elevada confiabilidade. No entanto, ainda há muito a ser pesquisado e disponibilizado em bancos de dados gênicos. Assim, fitopatologistas se utilizam das tecnologias clássicas para a identificação e validação dos resultados dos métodos moleculares.

É certo que a classificação taxonômica adequada é alcançada pela comparação das semelhanças ou diferenças quer seja das estruturas, das capacidades bioquímicas ou das características moleculares. À medida que informações de sequências de DNA vão sendo geradas e armazenadas nos bancos de dados, novos atributos de comparação com fins de diagnose serão produzidos. Há que considerar o fato dessas tecnologias serem recentes quando comparadas a outras de uso mais convencional. Entretanto, o seu atual estágio de desenvolvimento já lhes garante lugar de destaque como ferramenta de trabalho útil e prática. Certamente os esforços realizados por pesquisadores promoverão novos avanços nas soluções tecnológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HATMI, A.M.S.; MIRABOLFATHY, M.; HAGEN, F.; NORMAND, A.; STIELOW, J.B.; KARAMI-OSBO, R.; DIEPENINGEN, A.D.V.; MEIS, J.F.; HOOG, G.S. DNA barcoding, MALDI-TOF, and AFLP data support *Fusarium ficicrescens* as a distinct species within the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Fungal Biology* (online), Manchester, Ago. de 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.001>>. Acesso em: 10 set 2015.

BOUREAU, T.; KERKLOUD, M.; CHHEL, F.; HUNAUT, G.; DARRASSE, A.; BRIN, C.; DURAND, K.; HAJRI, A.; POUSSIER, S.; MANCEAU, C.; LARDEUX, F.; SAUBION, F.; JACQUES, M.A. A multiplex-PCR assay for identification of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Journal of Microbiological Methods*, v.92, n.1, p.42-50, 2013.

BRIOSO, P.S.T.; POZZER, L.; MONTANO, H.G.; PIMENTEL, J.P. Uso atual e futuro da Biologia Molecular na Fitopatologia. Parte I - Aplicações em fitopatógenos e vetores. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v.9, p.79-118, 2001.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas nos nematóides de galhas para identificação de espécies. Nematologia Brasileira, v.25, n.1, p.35-44, 2001.

CONSOLO, V.F.; ORTEGA, L.M.; SALERNO, G.; ASTORECA, A.L.; ALCONADA, T.M. Genetic diversity of *Fusarium graminearum* sensu lato isolates from wheat associated with *Fusarium* Head Blight in diverse geographic locations of Argentina. Revista Argentina de Microbiología (online), Buenos Aires, Set. de 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.05.004>> Acesso em: 14 set 2015.

DAI, J.; CHENG, J.; HUANG, T.; ZHENG, X.; WU, Y. A multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of five tobacco viruses in tobacco plants, Journal of Virological Methods, v.183, n.1, p.57-62, 2012.

KUMAR, A.; SHILPI, S.; YOGITA, M.; LAL, S.K.; MANDAL, B. Identification of a new strain of *Tobacco mosaic virus* infecting soybean in India based on host reactions and 3' end genome sequence. Crop Protection, v.53, p.20-22, 2013.

KUMARI, S.; TAYAL, P.; SHARMA, E.; KAPOOR, R. Analyses of genetic and pathogenic variability among *Botrytis cinerea* isolates. Microbiological Research, v.169, n.11, p.862-872, 2014.

MASSART, S.; OLMOS, A.; JIJAKLI, H.; CANDRESSE, T. Current impact and future directions of high-throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Research*, v.188, p.90-96, 2014.

MEIRELLES, P.G.; BIAZON, L.; ONO, M.A.; HIROOKA, E.Y.; ONO, E.Y.S. Imunoensaios: uma alternative para detecção de fungos toxigênicos em alimentos. *Semina: Ciências Agrárias*, v.27, n.4, p.617-628, 2006.

MUÑOZ, G.; CAMPOS, F.; SALGADO, D.; GALDAMES, R.; GILCHRIST, L.; CHAHIN, G.; ANDRADE, O. Molecular identification of *Botrytis cinerea*, *Botrytis paeoniae* and *Botryti spseudocinerea* associated with gray mould disease in peonies (*Paeonia lactiflora* Pall.) in Southern Chile. *Revista Iberoamericana de Micología (online)*, Bilbao, Ab. de 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2015.02.002>>. Acesso em: 10 set 2015.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E.R.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica / Real time PCR and RT-PCR technology and its applications in the medicine. *Revista Brasileira de Medicina (online)*, Rio de Janeiro, v.67, (supl.10), nov. 2010. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=4499>. Acesso em: 10 set. 2015.

NICOLAISEN, M. An oligonucleotide-based microarray for detection of plant RNA viroses. *Journal of Virological Methods*, v.173, n.1, p.137-143, 2011.

OLIVEIRA, M.L.; NARDINI, J.P.C.; DE MARCHI, B.R.; MITUTI, T.; BAMPI, D.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. Análise da presença

de vírus em alho semente da segunda e quarta gerações, produzidos por termoterapia e cultura de tecido. *Summa Phytopathologica*, v.40, n.1, p.75-77, 2014.

QUIMICALINE. **Brometo de Etídeo... Até quando?** Desenvolvido por Aline, 2012. Blog de comunicação acerca de química e outros assuntos, com conteúdo da imagem utilizada para ilustrar eletroforese. Disponível em: <<https://quimicaline.wordpress.com/>>. Acesso em: 29 out 2015.

STUDHOLME, D.J. Application of high-throughput genome sequencing to intrapathovar variation in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant Pathology*, v.12, n.8, p.829-838, 2011.

WEI, T.; PEARSON, M.N.; BLOHM, D.; NÖLTE, M.; ARMSTRONG, K. Development of a short oligonucleotide microarray for the detection and identification of multiple potyviruses. *Journal of Virological Methods*, v.162, n.1-2, p.109-118, 2009.

WIKIMEDIA COMMONS. File: Polymerase chain reaction.svg. Fundação Wikimedia, 2014. Apresenta esquema ilustrativo de Reação em Cadeia de Polimerase. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction.svg> Acesso em: 29 out 2015.

URASHIMA, A.S.; ZAVAGLIA, A.C. Comparação de dois métodos diagnósticos de escaldadura-das-folhas (*Xanthomonas albilineans*) da cana-de-açúcar. *Summa Phytopathology*, v.38, n.2, p.155-158, 2012.

Biorreguladores, bioestimulantes e bioativadores na agricultura tropical

Willian Rodrigues Macedo¹

Paulo Roberto de Camargo e Castro²

HORMÔNIOS VEGETAIS E MOLÉCULAS SINALIZADORAS

As formas e funções dos organismos multicelulares não são possíveis sem uma comunicação eficiente entre células, tecidos e órgãos, essa ideia surgiu com o Botânico alemão Julius von Sachs, no século XIX, o qual defendia que os sinais químicos são responsáveis por realizar a comunicação entre partes diferentes das plantas (Taiz et. al., 2015). Esses sinais são em sua maioria pequenas moléculas que a baixas concentrações permitem a regulação e coordenação do desenvolvimento vegetal, em face as mudanças internas (fatores endógenos) e externas (fatores ambientais) (Rigal et. al., 2014).

Dentre as moléculas com efeito sinalizador nos vegetais temos o destaque para cinco metabólitos considerados os hormônios vegetais clássicos: Auxinas, Giberelinas, Citocininas, Etileno e Ácido

¹Prof. Adjunto – Instituto de Ciências Agrárias – UFV/CRP (wrmacedo@ufv.br)

²Prof. Titular – Departamento de Ciências Biológicas – ESALQ/USP (prcastro@usp.br)

Abscísico, que tem suas descrições iniciais datadas do início do século passado. E atualmente com a crescente investida em novas ferramentas tecnológicas, pesquisadores ao redor do mundo tem descrito novas moléculas com potencial sinalizador nos vegetais, dentre essas podemos destacar: Ácido Salicílico, Ácido Jasmônico, Brassinoesteróides, Estrigolactonas, Poliaminas e Polissacarídeos.

Com relação aos seus efeitos Davies (2010) descreve o modo de ação de alguns desses hormônios:

Auxina – promove o crescimento celular e o alongamento do caule; estimula a divisão no cambio e, em associação com a citocinina, em meios de cultura; promove a diferenciação em tecidos vasculares (floema e xilema), propicia a iniciação radicular em estacas caulinares (propagação vegetativa); media as respostas trópicas em parte aérea e no sistema radicular, reprime o crescimento de gemas laterais (dominância apical); atrasa a secescência foliar; pode inibir ou promover (via ação do etileno) a abscisão de folhas e frutos; induz a frutificação e crescimento de alguns frutos; particiona os assimilados em direção a sua concentração (um efeito no transporte de floema); atrasa o amadurecimento de tecidos vegetais e promove o florescimento e crescimento de algumas partes florais.

Outros efeitos descritos para moléculas auxinícas estão relacionados ao seu potencial efeito herbicida, sendo que a destaque para as moléculas de: 2,4-D, picloran e dicamba, com eficácia para o controle de plantas daninhas de folhas largas, com exceção do herbicida quinclorac, o qual possui efeito herbicida em folhas estreitas (gramíneas), sua seletividade encontra-se no fato dessas moléculas apresentarem restrita translocação em plantas de folhas estreitas.

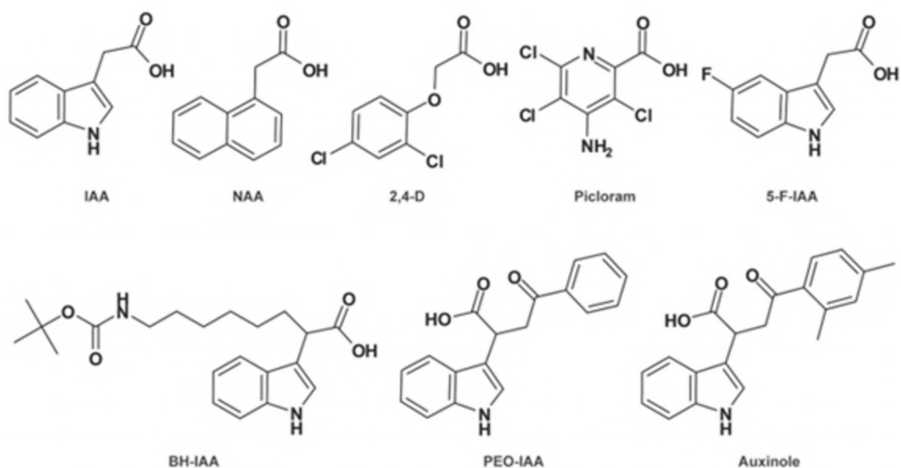


Figura 1. Compostos correlatos a auxina (adaptado de Rigal et. al., 2014).

Citocinina – hormônio responsável pela divisão celular (sua utilização em meio de cultura adicionada a auxina induz a divisão celular), é responsável por formação de tumores celulares em tecidos vegetais; induz o crescimento de gemas laterais; promove a expansão celular; atrasa a senescência foliar; pode aumentar a abertura estomática em algumas espécies; pode incrementar o acúmulo de clorofilas e redirecionar o dreno de carboidratos do vegetal.

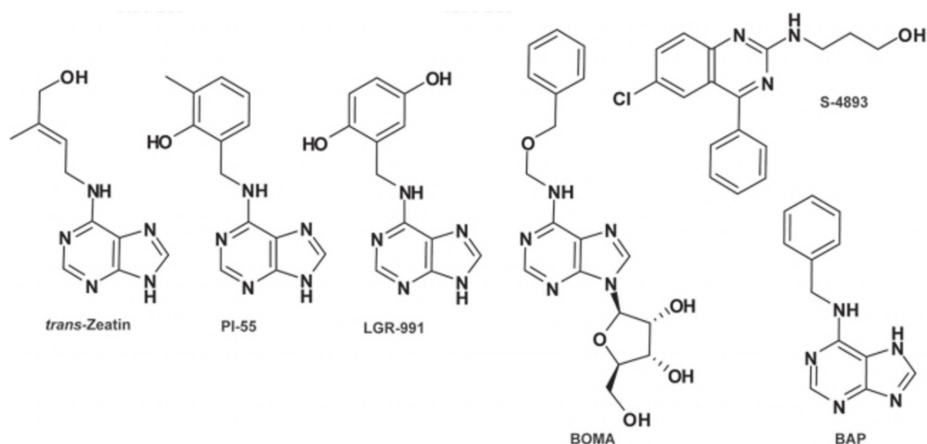


Figura 2. Compostos correlatos a citocinina (adaptado de Davies, 2010).

Giberelina – promove o crescimento caulinar (GA_1 causa hiperalongamento de caules, por estimular a divisão e expansão celular); induz a germinação de sementes e sinaliza para a síntese de algumas enzimas hidrolíticas (α -amylase) e induz a frutificação e o crescimento de frutos quando aplicado exógenamente.

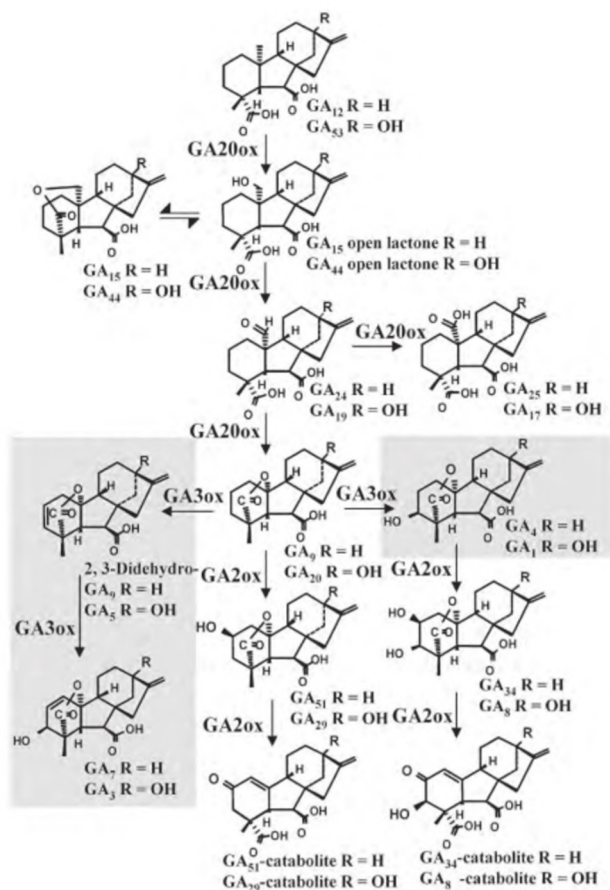


Figura 3. Compostos correlatos a giberelina (adaptado de Davies, 2010).

Etileno – único hormônio gasoso, tem por característica primordial a triplece resposta: redução no alongamento do caule, aumento do crescimento lateral (intumescimento) e crescimento horizontal anormal; mantém o gancho plumular em plântulas de eudicotiledôneas; estimula numerosas respostas de defesa (injúria e doenças); tem função reguladora sobre a dormência em sementes; auxilia na formação de raízes adventícias; controla a

abscisão de folhas e frutos; induz a formação de flores e controla o amadurecimento de flores e frutos

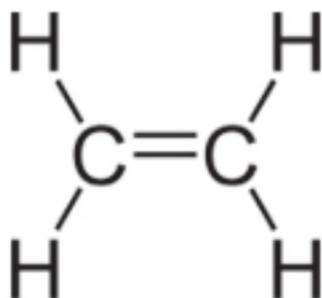


Figura 4. Molécula de etileno (adaptado de Davies, 2010).

Ácido abscísico – o ABA tem grande relevância no fechamento estomático (sob condições de escassez hídrica há um aumento de ABA nas folhas, o que promove o fechamento estomático); inibe o crescimento da parte aérea ou pode estimular o crescimento de sistema radicular; induz a síntese de proteínas de armazenamento em sementes; apresenta efeito antagônico à giberelina sobre a síntese de α -amylase e induz ou afeta a manutenção de dormência em sementes ou plantas perenes.

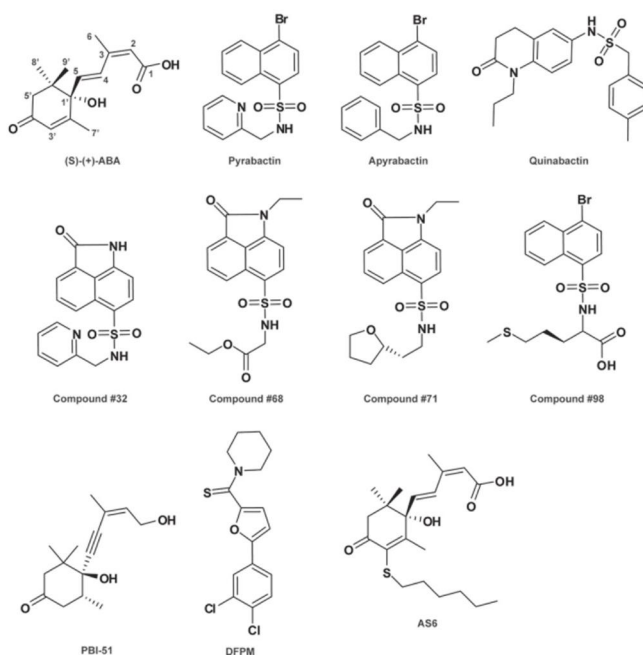


Figura 5. Compostos correlatos ao ácido abscísico (adaptado de Rigal et. al., 2014).

Ácido Salicílico – apresenta papel crucial na resistência a patógenos, por induzir a produção de proteínas relacionadas a patogenicidade, o que envolve a resposta de resistência sistêmica adquirida (SAR), a qual consiste na intercomunicação entre tecidos vegetais maduros sinalizando os tecidos vegetais novos contra um potencial ataque de pragas ou doenças; induz termogenia em flores de *Arum*; aumenta a longevidade de flores; inibe a síntese de etileno e germinação de sementes e pode promover resistência a estresses abióticos em algumas espécies vegetais.

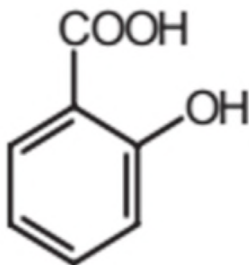


Figura 6. Molécula de ácido salicílico (adaptado de Davies, 2010).

Ácido jasmônico (jasmonatos) – assim como ácido salicílico, esse metabólito apresenta função primordial na defesa vegetal, controlando a biossíntese de proteínas; inibe o crescimento e germinação de sementes. Promove a senescência, abscisão e formação de tubérculos, o amadurecimento de frutos, a formação de pigmentos e o enrolamento de gavinhas.

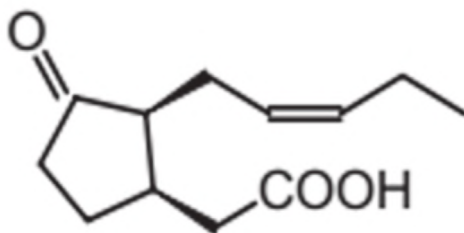


Figura 7. Molécula de ácido jasmônico (adaptado de Davies, 2010).

Poliaminas – esse grupo de moléculas pode ser considerado como hormônio vegetal, pois: são comuns em todas as células e podem exercer o controle regulatório sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal em concentrações micromolares; nas

plantas em que o teor de poliaminas é geneticamente alterado o seu desenvolvimento é afetado; em níveis baixos de poliaminas só ocorre o desenvolvimento de calo, mas quando os níveis são altos ocorre a formação de embriões. Dentre as poliaminas de interesse na regulação vegetal temos: a putrescina, a espermina e espermidina.

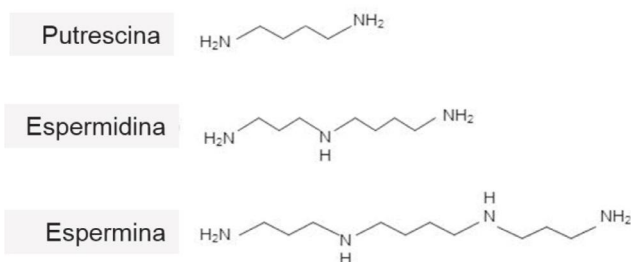


Figura 8. Moléculas de putrescina, espermidina e espermina (adaptado de Davies, 2010).

Brassinoesteróide – Esse hormônio está envolvido com a divisão e expansão celular; promove o alongamento celular e a diferenciação vascular; inibe o crescimento e o desenvolvimento radicular e promove a biosíntese de etileno e a epinastia.

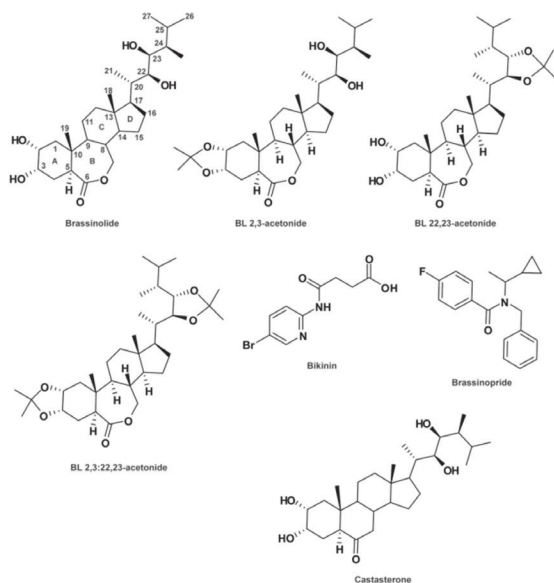


Figura 9. Compostos correlatos ao brassinoesteróide (adaptado de Rigal et. al., 2014).

Estrigolactona – As strigolactones são compostos necessários para a germinação de sementes de espécies parasitas (*Striga* ou *Orobancha*), mas também agem como inibidores do desenvolvimento de ramificações da parte aérea de plantas, ainda vale ressaltar que sua ação pode estar relacionada ao desenvolvimento radicular de algumas espécies vegetais, por ser um composto recém classificado como hormônio vegetal ainda há necessidade de maiores estudos sobre seu potencial efeito nos vegetais.

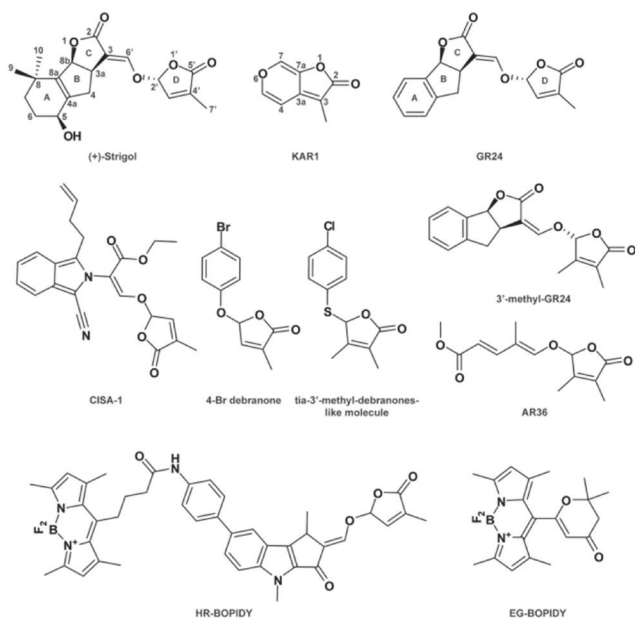


Figura 10. Compostos correlatos a estrigolactona (adaptado de Rigal et. al., 2014).

BIORREGULADORES NA AGRICULTURA

Biorregulador é classificado como um composto orgânico, não nutriente, aplicado na planta, que a baixas concentrações, promove, inibe ou modifica processos morfológicos e fisiológicos do vegetal. Pertencem ao grupo dos biorreguladores os hormônios vegetais: auxinas, giberelinas, citocininas, retardadores, inibidores e etileno. Além dos brassinosteróides, jasmonatos, salicilatos e poliaminas, com efeitos similares aos dos biorreguladores.

No que se refere às aplicações agrícolas dos biorreguladores, deve-se considerar que algumas plantas cultivadas já atingiram no Brasil estágios de evolução que exigem elevado nível técnico para alcançar melhor produtividade. Essas culturas já não se apresentam condicionadas por limitações de ordem nutricional e hídrica, além

de serem protegidas adequadamente com defensivos. Nessas condições, a economicidade da utilização de tecnologia avançada tem levado ao emprego dos biorreguladores, que podem freqüentemente mostrar-se altamente compensadores.

Dentre os diversos ensaios conduzidos, seguem abaixo alguns experimentos com a utilização dos biorreguladores em diversas condições agrícolas:

2.1 Auxinas

O uso de auxinas na agricultura está diretamente relacionado a práticas de cultivos de espécies hortícolas, o uso de Exubérone (IBA) no enraizamento de estacas de videira muscadinia 'Dixon', via tratamento lento, 24h de imersão de estacas medianas com 10 mL L⁻¹ de Exubérone e de estacas basais com 20 mL L⁻¹ do produto (Figura 11), mostraram-se eficientes no enraizamento dessas estacas. E para o cultivo de morango a aplicação de ácido indolilacético (IAA) 10 mg L⁻¹ em morangueiro 'Monte Alegre' na antese floral e repetindo-se duas vezes com intervalos de 7 dias, levou a maiores produções de morango (Castro et al., 2009).



Figura 11. Produção de mudas de videira muscadinia 'Dixon' a partir de estacas tratadas com auxina (Castro et al., 2009).

Aplicação de 3,5,6-TPA (Maxim) 15 mg L⁻¹ e Fenotiol 20 mg L⁻¹, após a queda fisiológica dos frutos (21/11), aumentou o diâmetro dos frutos do tangor 'Murcott', assim como a massa média e o número de frutos de maior classe comercial. Pulverização de lima ácida 'Tahiti' com Fengib 1 mL L⁻¹, na antese floral, aumentou a fixação dos frutos (Castro et al., 2009). O uso de 2,4-D, na concentração de 8 mg L⁻¹, também aumenta a fixação de frutos de citros.

Giberelinas

As giberelinas tem apresentado grande efeito fisiológico sobre a germinação de sementes, onde já foi constatado que a imersão de sementes de algodoeiro 'IAC-17' em giberelina (GA) 100 mg L⁻¹

por 22 horas acelerou o processo germinativo originando plântulas mais desenvolvidas. Tratamento similar com GA 100 mg L⁻¹ aumentou a germinação de sementes de braquiária, siratro, soja perene e panicum verde; sendo que esse tratamento também incrementou o crescimento das plântulas de crotalária, lablab e estilosantes.

Também há relatos que seu uso em tubérculos-semente, via imersão, em cultivar Bintje por 10 minutos em GA 10 mg L⁻¹ (Figura 12) promoveu precocidade e melhorou o estande na emergência das brotações (Castro et al., 2009).



Figura 12. Plantio mecanizado de batatas-sementes 'Bintje' previamente tratadas com giberelina para melhorar o estande (Castro et al., 2009).

A pulverização da cana-de-açúcar 'CB 51-22' com GA 60 mg L⁻¹ em 20/05 (início das condições inverniais) promoveu aumento no crescimento da região apical e incremento na fitomassa de colmo, sem alterar os valores de pol % cana (Castro et al., 2009).

A imersão de frutos de lima ácida 'Tahiti' em GA 20 mg L⁻¹ manteve a coloração da casca em nível aceitável para transporte e comercialização até 40 dias de armazenamento refrigerado (Tavares et al., 2004).

Citocininas

Grupo de biorreguladores envolvidos na divisão celular, e sua interação com auxina tem sido relatada como uma excelente ferramenta para o cultivo de tecidos, possibilitado a proliferação celular na morfogênese e organogênese de numerosas espécies vegetais em cultura de tecidos, visando a micropropagação.

Sua ação fisiológica também está relacionada a sua capacidade de mudanças na relação fonte-dreno, onde foi possível constatar que pulverizações com Benzilaminopurina (BA), nas doses de 5 a 10 mg L⁻¹, em pré-colheita auxiliaram na manutenção da alface fresca e verde por três a cinco dias extras, após sua embalagem.

Imersão de hastes recentemente colhidas de aipo verde e dourado, em solução de BA 10 mg L⁻¹, ampliou a duração do material fresco, manteve a coloração foliar e aumentou a aceitabilidade de mercado para ambos os cultivares (Castro et al., 2009).

Etileno

O etileno, comumente conhecido por homônio do amadurecimento, tem sua estrutura ativa na forma gasosa. Na agricultura moderna têm-se utilizado o produto comercial ethephon, pois esse tem potencial de liberar o etileno nos tecidos onde é aplicado.

Aplicação de ethephon 300 mg L⁻¹ em tangor 'Murcott', no período de florescimento (Figura 13), promoveu abscisão floral e

aumentou significativamente a massa dos frutos remanescentes, evitando a produção de excesso de frutos de pequenas dimensões e a possibilidade da quebra de galhos da árvore de citros. Em café a pulverização de ethephon $0,25 \text{ mL L}^{-1}$ em 16/04 dobrou a quantidade de frutos cereja de cafeeiro na colheita do cultivar 'Catuaí Vermelho' (Castro et al., 2009). Já em cana-de-açúcar a pulverização de ethephon 2 L ha^{-1} , na variedade 'SP 70-1143', promoveu uma antecipação da maturação e incrementos no teor de sacarose nos colmos, diminuindo significativamente a isoporização.



Figura 13. Distribuição adequada dos frutos de citros obtida pelo desbaste prévio com ethephon (Castro et al., 2009).

Inibidores e retardadores

Inibidores e retardadores de crescimento têm sido utilizados extensivamente no controle do desenvolvimento de gramados, cercas vivas e árvores; sendo que também têm sido aplicados para a manutenção de tubérculos e bulbos dormentes, durante o armazenamento.

A ação inibidora de crescimento da hidrazida maleica (HM) foi observada 30 dias após a poda da cerca viva de *Murraya paniculata* (Falsa Murta), quando se aplicou 1250 mg L^{-1} de HM e esse manteve a mesma sem necessidade de uma nova poda por maior período de tempo com relação ao controle somente podado.

Em ensaios com gramíneas tropicais, com metabolismo C4, e de crescimento altamente vigoroso, constatou-se que aos 62 DAP (dias após pulverização) os três tratamentos: Moddus (5 ml L^{-1}); Cultar (6 ml L^{-1}) e a associação Moddus (5 ml L^{-1}) + Cultar (6 ml L^{-1}), reduziram a altura da vegetação em relação ao controle (Figura 14).



Figura 14. Inibidores de crescimento em gramados, controle (direita) e inibidor (esquerda) (foto arquivo pessoal).

Pulverização da cana-de-açúcar 'SP 70-1143' com glifosate $0,3 \text{ L ha}^{-1}$ ou hidrazida maleica (HM) 2 L ha^{-1} antecipou significativamente a maturação dessa. Foi verificado que aplicação de Fusilade $0,4 \text{ L ha}^{-1}$ em cana-de-açúcar 'SP 70-1143' promoveu sua maturação precocemente (Castro et al., 2009).

A pulverização com o ácido 2,3,5-triodobenzóico (TIBA), na dose de 30 mg L⁻¹ em plantas de soja fizeram com que essas apresentassem um fenótipo mais compacto, evitando potenciais perdas por acamamento (Castro et. al., 2009).

BIOESTIMULANTES NA AGRICULTURA

Bioestimulantes podem ser definidos como misturas de biorreguladores ou mistura de um ou mais biorreguladores com outros compostos de natureza química diferente (aminoácidos, vitaminas, sais minerais, etc.). Existem uma vasta quantidade de bioestimulantes aplicados nas condições tropicais, muito em função da legislação vigente, especificamente, no Brasil. Dentre os produtos mais estudados encontra-se o Stimulate[®], o Promalin e o GA + 2,4-D, sendo possível encontrar diversos trabalhos que avaliaram o uso da associação entre biorreguladores nos mais variados cultivos.

Stimulate[®] é um bioestimulante da Stoller, constituído de 50 mg L⁻¹ de giberelina (GA), 50 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (IBA) e 90 mg L⁻¹ de cinetina (CK).

Quando se avaliou o tratamento de sementes com o Stimulate[®] foi observado que na cultura do feijoeiro o bioestimulante incrementou a massa seca das raízes das plantas até a concentração de 10 mL kg⁻¹ de sementes. O bioestimulante também aumentou o número de vagens por planta, o número de grãos por planta e a massa seca de grãos por planta, na concentração de 5 mL kg⁻¹ de sementes. Enquanto para a cultura da soja verificou-se que aplicação de Stimulate 10 mL kg⁻¹ de sementes aumentou o número de grãos por planta de soja 'IAC 8-2' (Castro et al., 2009).

Em sementes de milho 'Cargill C-929' a aplicação de Stimulate 10 mL L⁻¹, via sementes, aumentou a germinação e incrementou o número de plântulas normais, reduzindo conseqüentemente a

porcentagem de plântulas anormais. Esse resultado é importante, uma vez que cultivares, com ótimo potencial mercadológico, mas com problemas de germinação, poderiam ser resolvidos com a aplicação do bioestimulante (Castro et al., 2009).

Enquanto a aplicação foliar de Stimulate 3 mL L⁻¹ aumentou a massa de vagens e a massa de grãos do feijoeiro 'IAC - Carioca Tybatã'. A concentração de 5,4 mL kg⁻¹ de sementes também produziu os mesmos resultados (Castro et al., 2009).

Em estudo com tomate, Cato et al. (2013) avaliaram o sinergismo entre os biorreguladores constituintes do Stimulate através da aplicação dos mesmos isoladamente, em dupla ou todos em conjunto, como controle foi aplicada somente água, foi utilizado como planta-modelo o tomateiro *Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom. Os resultados possibilitaram aferir que que aplicação combinada de GA₃, IBA e CK ou Stimulate®, aumentaram significativamente o acúmulo de massa seca em raízes e a massa fresca e seca de frutos, em relação ao controle, caracterizando o efeito bioestimulantes do uso associado e equilibrado entre esses biorreguladores.



Figura 15. Crescimento de tomateiros 'Micro-tom' submetido ao bioestimulantes (Cato et al., 2013).

Promalin trata-se de uma combinação de GA₄, GA₇ e Benziladenina. Refere-se, portanto a uma associação de duas giberelinas e de uma citocinina, a qual apresenta ação distinta de seus constituintes, promovendo uma nova resultante. Promalin tem sido utilizada em macieiras com a finalidade de melhorar a forma e a qualidade dos frutos de maçã.

A associação de moléculas biorreguladoras, encontra-se em fase de experimentação em centros de pesquisas e universidades, sendo que o uso desses novos bioestimulantes ainda é restrito. Em fruticultura, especificamente na cultura de espécies cítricas foi observado que em plantação de laranja 'Pera', com sintomas iniciais de Clorose Variegada dos Citros (CVC), pulverizada no verão (dezembro e março) com GA 50 mg L⁻¹ + 2,4-D 8 mg L⁻¹, em Pirassununga, SP, apresentou aumentos no número de frutos produzidos. Em outro ensaio, com árvores de laranja 'Pera' tratadas com GA 20 mg L⁻¹ + 2,4-D 8 mg L⁻¹ observaram-se aumentos na ramificação e também incrementos no número de frutos produzidos (Castro et al., 2009).

Em experimentos conduzidos no município de São Miguel Arcanjo, SP, Macedo et al. (2011) observaram que o uso associado de 5 mg L⁻¹ de forchlorfenuron + 5 mg L⁻¹ de GA₃, proporcionaram as maiores médias de massa e largura das bagas, com incrementos de 13 e 2,5%, respectivamente, em relação ao controle. Os autores ainda constataram que o uso desses biorreguladores associados não prejudicou o processo pós-colheita, ou seja, não aumentou o índice de desbagoamento (ID) dos cachos. Entretanto, foi constatado um atraso na maturação dos frutos, indicando que esses compostos (especialmente GA), prolongaram a atividade metabólica nos frutos, fato decorrente da redução dos valores de sólidos solúveis e da relação sólidos solúveis e acidez total, observados.



Figura 16. Área experimental e cacho de uva 'Centennial Seedless' sob aplicação de bioestimulante (Macedo et al., 2011).

BIOATIVADORES NA AGRICULTURA

Bioativadores são substâncias orgânicas complexas promotoras de crescimento e vigor, capazes de induzir a síntese de auxinas. Podem atuar em fatores de transcrição da planta e na expressão gênica, em proteínas de membrana, alterando o transporte iônico e em enzimas metabólicas capazes de afetar o metabolismo secundário, de modo a modificar a nutrição mineral, produzir precursores de hormônios vegetais, levando a síntese hormonal e a resposta da planta a nutrientes e hormônios (Figura 17). Dois potentes inseticidas sistêmicos têm demonstrado esse efeito, o aldicarb e o thiametoxam, além do agente brotante cianamida hidrogenada.

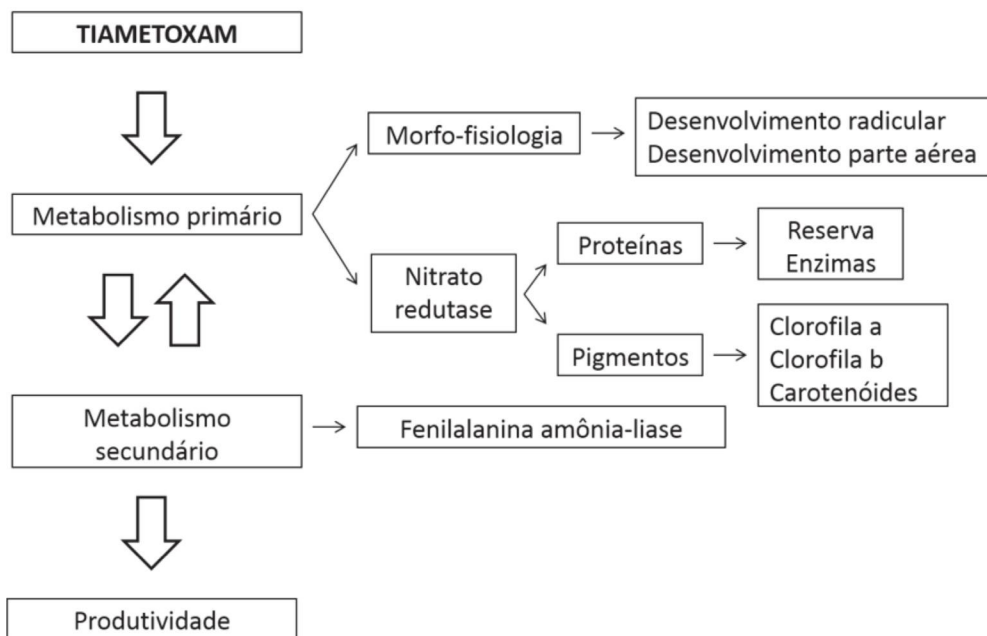


Figura 17. Modelo de ação fisiológico e metabólico do thiamethoxam em monocotiledônes (Macedo, 2013).

O aldicarb (Temik), 2-metil -2 (metiltio) propionaldeído Q-(metil carbamoyl) oxime, é um inseticida utilizado extensivamente, principalmente no controle de pragas iniciais do algodoeiro. Plantas tratadas com aldicarb aumentaram o vigor e acumularam mais fitomassa no início do período vegetativo com relação ao controle. Algodoeiros tratados com aldicarb apresentaram taxas fotossintéticas mais altas durante a estação de crescimento da cultura. Aos 56 dias após a emergência (DAE) as plantas tratadas com aldicarb mostraram incremento na massa seca total. O Aldicarb promoveu aumento significativo na massa seca das raízes em maiores profundidades do solo, com aumento no número de radículas funcionais, no comprimento total das raízes e na densidade das raízes. As plantas tratadas podem explorar mais uniformemente a

totalidade do perfil do solo para água e nutrientes com relação ao controle (Castro et al., 2009).

O thiametoxan (Cruiser), 3-(2-cloro-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-[1,3,5] oxadiazinan -4-ilideno-N-nitroamina, é um inseticida sistêmico do grupo neonicotinóide, da família nitroquanidina que atua no receptor nicotínico acetilcolina da membrana de insetos, lesando o sistema nervoso e levando-os à morte. É utilizado com sucesso no controle de pragas iniciais de diversas culturas.

Devido aos numerosos relatos de observações de campo descrevendo aumentos em vigor, desenvolvimento e produtividade da soja tratada com thiametoxan, mesmo na ausência de pragas, considerou-se que o produto possuía um efeito fitotônico.

Em trabalho de Macedo (2013) foram conduzidos 4 ensaios com 4 espécies de monocotiledôneas (braquiária, milho, trigo e arroz), objetivando avaliar a resposta dessas a aplicação de thiamethoxam, via tratamento de sementes, na realização dos experimentos foram mensuradas características biométricas: índice de emergência; altura de plantas; índice de clorofilas (SPAD); massa seca da parte aérea; comprimento, área e volume radicular. Parâmetros bioquímicos como: atividade de nitrato redutase; fenilalanina amônia-liase; conteúdo de proteína total; pigmentos fotossintéticos e conteúdo de nutrientes foliares. Parâmetros sobre a qualidade nutricional da braquiária também foram analisadas. E ao final do ciclo reprodutivo dos cereais, foram determinados alguns parâmetros relacionados à produção. Foi constatado que o thiamethoxam interferiu sobre diversos parâmetros bioquímicos, em todas as culturas testadas, com destaque para a potencial ação dessa molécula sobre atividades de nitrato redutase e fenilalanina amônia-liase, bem como sobre o conteúdo de proteína total em trigo e braquiária, além de alterar o teor de pigmentos fotossintéticos foliares em arroz e milho. Para as culturas do trigo e da braquiária foram notadas modificações

severas sobre a fisiologia e produção. Concluiu-se que a aplicação de thiametoxam, via tratamento de sementes, foi responsável por moderar o metabolismo e o desenvolvimento da planta, até o final do ciclo dos vegetais, de maneira que as plantas submetidas a essa molécula expressaram maior vigor e, conseqüentemente, apresentaram maior aptidão para incrementar sua produção.

Outro bioativador importante é a cianamida hidrogenada, bastante conhecida pela sua utilização como agente brotante para videiras podadas, possibilitando uma brotação precoce e conseqüentemente uma antecipação da produção de uvas. Esse produto, quando aplicado em videiras, mostrou levar a síntese de ácido indolilacético endógeno, caracterizando-se perfeitamente no conceito de bioativador.

REFERÊNCIAS

CASTRO, P.R.C.; SERCILOTO, C. M.; PEREIRA, M. A.; RODRIGUES, J. L. M. ROSSI, G. **Agroquímicos de controle hormonal, fosfitos e potencial de aplicação dos aminoácidos na agricultura tropical**. Piracicaba: ESALQ – Divisão de biblioteca e documentação, 2009. 89p.

CATO, S. C.; MACEDO, W. R.; PERES, L. E. P.; CASTRO, P. R. C. Sinergism among auxins, gibberellins and cytokinins in tomato cv. Micro-Tom. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 549-553, 2013.

DAVIES, P. J. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* 3rd Ed. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 2010. 802p.

MACEDO, W. R. **Bioativador em culturas monocotiledôneas: avaliações bioquímicas, fisiológicas e da produção.** 2013. 80p. Tese (Dr.) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MACEDO, W. R.; TERRA, M. M.; TECCHIO, M. A.; PIRES, E. P. P.; FERNANDES, G. M.; VILLAR, L.; MOURA, M. F. Aplicação de reguladores vegetais em uva apirena 'Centennial Seedless'. **Ciência Rural**, v. 40, 1714-1719. 2011.

RIGAL, A.; MA, Q.; ROBERT, S. Unraveling plant hormone signaling through the use of small molecules. **Frontiers in Plant Science**. V.5, p.1-20, 2014. doi: 10.3389/fpls.2014.00373

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. (Ed.). **Plant Physiology and Development**. 6th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2015. 761p.

TAVARES, S.; CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; JACOMINO, A.P. Uso de fitorreguladores para a conservação pós-colheita da lima ácida 'Tahiti'. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 25, p. 209-224, 2004.

Publicação científica de qualidade

José Cola Zanuncio¹

Angelica Plata¹

Flávio Lemes Fernandes²

O artigo científico é a principal maneira de comunicação da ciência e sua publicação como resultado de uma pesquisa é parte do processo de produção científica que não é concluída até que os resultados sejam publicados (Mantilla-Villarreal et al.,2010). A publicação tornou-se importante, por uma grande variedade de razões, incluindo progressão na carreira, regulamentações governamentais, maior oportunidade para colaborações internacionais e incentivos monetários sob a forma de auxílios (Dixon, 2001)

Os leitores devem ter acesso a informações suficientes de uma publicação científica para que possam entender, repetir os experimentos e avaliar os processos que levaram os autores a produzir aquele trabalho. O(s) autores devem ter em mente que seu objetivo, ao produzir um artigo, é levar de forma eficaz o resultado

¹ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Entomologia, Viçosa, MG, CEP: 36570-000, zanuncio@ufv.br, angelicaplata@yahoo.com.mx

² Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba, Instituto de Ciências Agrárias, Rio Paranaíba, MG, CEP: 38810-000, flaviofernandes@ufv.br

e a importância de sua pesquisa. Em razão disto, os artigos seguem um padrão de organização que busca auxiliar no entendimento da pesquisa, com um resumo seguido de uma introdução, material e métodos, resultados, e discussão (Santos, 2013; Novales et al., 2014).

TITULO

A principal recomendação é que o título seja curto, relevante e atraente, com 15 a 18 palavras. O título deve ser claro, compreensível aos especialistas em outros campos, refletir o conteúdo do artigo e ser específico sem ser genérico ou vago. O título deve dar uma ideia clara do conteúdo do trabalho, ser preciso e conciso, colocando as palavras em uma ordem correta e lógica (Fierro & Gonzalez, 2004). Um artigo com título inadequado pode não atingir o público ao qual se destina. Além disso, o título é o primeiro contato do leitor com o trabalho e, por isto, deve ser escrito com a sintaxe perfeita.

O título não deve conter abreviaturas, fórmulas químicas, nomes comuns ou inventados pelos autores, pois isto dificulta a busca do artigo em páginas especializadas e confunde o leitor que não está familiarizado com esses termos. De forma semelhante, o título é importante para atrair o leitor quando analisa o índice das revistas. O autor poderá incluir o local de realização do estudo caso seja relevante. Informações fornecidas no título não precisam ser necessariamente repetidas no resumo.

O título de um artigo é um rótulo, não uma sentença gramatical. Como não é uma sentença com sujeito, verbo e complemento, pode ser mais curta. O significado e a ordem das palavras no título são importantes para o leitor em potencial se interessar pelo trabalho e ser uma forma adequada para sistemas de indexação como Chemical Abstracts, Index Medicus, Scopus, Web of Science, etc.

O título é colocado na primeira página da publicação, acima dos nomes do autor ou autores com chamada em sobrescrito para indicar em nota de rodapé, a instituição, endereço, e-mail, etc dos autores.

O título é o primeiro contato do leitor com o artigo científico, cujo download depende das expectativas provocadas pelo mesmo durante as buscas em bases com milhões de trabalhos.

Na Idade Média, o arauto era o mensageiro real que fazia publicações solenes, declarava a guerra e proclamava a paz e, por isto, quando aparecia em público, era motivo de atenção e respeito. No contexto das revistas científicas, o título, apesar de não ser pessoa, tem função semelhante (Caramelli, 2011).

A aceitação de publicações é importante e artigos são citados pelo mérito científico e/ou pela reputação dos pesquisadores e de suas instituições. Isto ajuda a entender por que alguns artigos são citados com maior frequência, cuja consulta pode ajudar no preparo de outros (Van Wesel et al. 2014).

A publicação dos resultados é parte integrante da pesquisa. Os manuscritos devem ser bem escritos, mas isto é difícil para muitos autores, especialmente aqueles em início de carreira. As revistas têm diferentes normas e estilos, mas todas exigem que a escrita científica seja clara, concisa e coerente. Além disso, cada revista tem suas próprias instruções aos autores, que devem ser seguidas durante o preparo dos manuscritos e estes devem ser revisados pelo maior número possível de colegas antes de submetido à revista (Nair, 2005).

O autor deve usar o título de forma a convencer o editor e os leitores da revista escolhida. Por esta razão, o título deve ser curto e ao mesmo tempo completo, de fácil compreensão e transmitir a proposta do trabalho científico (Nahas & Ferreira, 2005).

O título precisa atrair e informar o leitor (Lewison & Hartley, 2005; Brumback, 2012) para a escolha de trabalhos que, realmente, mereçam ser lidos (Mack, 2012).

O título e o resumo são as partes mais importantes de artigos científicos, pois em muitos países apenas o título, resumo e as palavras chaves são de livre acesso aos leitores (Cals & Kotz, 2013). Por isto, o título deve conter indicações completas (Thrower, 2007; Peh & Ng, 2008) e refletir o objetivo e a abordagem do trabalho científico (Mack, 2012).

O título deve responder a seguinte questão (Mack, 2012): *O título do seu manuscrito, lido isoladamente, fornece uma indicação completa, ainda que concisa e específica do trabalho relatado?*

O título e o resumo devem conter todos os termos importantes para que os leitores possam encontrar o artigo em suas buscas em bases de dados (Pub Med, Web of Science, Scielo, etc) e, também, saberem como o artigo se relaciona com outros (Cals & Kotz, 2013).

O objetivo da escrita científico é transmitir pensamentos ou idéias de maneira que o público ou, pelo menos, aqueles com conhecimento moderado da ciência possam entender o material apresentado. Isto torna necessário o uso de palavras de forma clara com o título refletindo o significado real do artigo (Carraway, 2007).

Estrutura dos títulos

A estrutura do título de um artigo científico pode ser títulos simples, com subtítulos ou com o uso de dois pontos; e tipos informativo, descritivo ou interrogativo.

O título precisa ser curto (Lewison & Hartley, 2005; Brumback, 2012), mas seu número de palavras varia entre as áreas da ciência. Na biologia, 15 palavras são usadas em média e na Matemática, oito (Lewison & Hartley, 2005). O tamanho dos títulos não se relaciona

com o número de citações que recebem (Didegah & Thelwall, 2013).

O título ideal deve ter uma linha. A pergunta, baseada no objetivo do trabalho, pode facilitar a criação do título. Esse tipo de título traduz, em geral, a idéia do estudo e chama mais a atenção do leitor (Nahas & Ferreira, 2005).

Uma pesquisa na área de Psicologia mostrou que títulos mais curtos recebem um maior número de citações em revistas de alto fator de impacto (Subotic & Mukherjee, 2014). Artigos publicados em 1998 e 2012 em *Astrofísica* mostraram tendência de mudança de títulos longos e com alta complexidade para títulos curtos e mais simples (Mendez, et al., 2014).

Títulos simples ou com dois pontos

Subtítulos podem tornar o título mais informativo e ser mais facilmente localizado nos bancos de dados (Lewison & Hartley, 2005).

O uso de dois pontos para separar título e subtítulo varia entre as áreas da ciência. Na Engenharia e Tecnologia, 6% dos títulos apresentaram dois pontos, enquanto isto foi de 23% na medicina clínica (Lewison & Hartley, 2005). Entretanto, títulos com dois pontos são, aceitos, normalmente para artigos publicados em série (Thrower, 2007).

As regras ou instruções aos autores sobre os tipos de títulos que a revista prefere variam, podendo aceitar títulos simples, com subtítulos ou, mesmo, com dois pontos (Cals & Kotz, 2013).

Informativos

Títulos informativos apresentam ao leitor uma visão do estudo realizado e publicado, podendo ser melhores que os descritivos (Alexandrov & Hannerieri, 2007). Por exemplo: *A droga X é efetiva na redução do colesterol* (Cals & Kotz, 2013).

Interrogativos

O uso de perguntas no título **eh menos** comum, mas este tipo de título **e** muito citado. No entanto, alguns editores e revisores sugerem evitar títulos com perguntas como “A cirurgia muda a história da doença?” (Caramelli, 2011).

AUTORES

No artigo científico, é recomendável a preparação de uma lista inicial e ordem de autores, baseada em uma ordem estabelecida de acordo com a contribuição estimada de cada autor. Esta lista irá garantir que todas as pessoas a serem envolvidas na pesquisa compreendam de início a sua contribuição.

A lista de autores deve incluir as pessoas que participaram do planejamento do estudo e da coleta, análise, interpretação dos dados e escrita do trabalho. Os nomes dos autores, no trabalho, devem ser acompanhados com suas filiações (durante o estudo) e endereço atual do autor se necessário, com endereços e e-mail de todos os autores para facilitar contato com os mesmos.

Qual é a ordem correta de autorias? Infelizmente, não há padrões definidos. Algumas revistas exigem que os nomes dos autores sejam ordenados alfabeticamente.

Uma tendência mais moderna têm sido a de definir o primeiro autor como principal executor do artigo científico, geralmente um estudante de pós-graduação, sendo o último o orientador. Desta forma, o primeiro autor, normalmente, fez a maior parte da coleta de dados. Além disso, o número de autores pode aumentar durante o desenvolvimento da pesquisa por ser uma atividade colaborativa. A utilização de técnicas e equipamentos cada vez mais específicos tem aumentado o número de autores por trabalho.

A lista de autores deve incluir aqueles que, realmente, contribuíram para a concepção geral e execução dos experimentos. Além disso, os autores devem ser listados em ordem de importância, reconhecendo o primeiro como autor principal, os intermediários com menor participação e o último como o mentor da ideia da pesquisa que originou o trabalho.

O autor de um artigo deve assumir a responsabilidade pelos resultados da pesquisa, considerando que seria irrealista pensar que todos os autores podem defender todos os aspectos de um artigo escrito por colaboradores a partir de várias disciplinas.

RESUMO

Após o título do artigo, a leitura do resumo ou abstract dará ao leitor a primeira opinião sobre o mesmo. Um bom resumo, com qualidade e clareza, deverá ser escrito apenas após a finalização do manuscrito em, aproximadamente, 250 palavras representando não mais que 3% do artigo. Como regra básica, o resumo não deve conter figuras, tabelas ou siglas e jargões, mas deve ter respostas para perguntas como: Sobre o que foi pesquisa?; Porque foi feita?; Como foi conduzida?; O que essa pesquisa significa para sua linha de conhecimento? (Carraway, 2009).

O resumo é uma versão curta da informação contida no artigo e deve ser escrito no tempo passado. "Um bom resumo é seguido por um bom artigo; um resumo ruim é seguido por um artigo ruim" (Gómez, 2007).

O resumo deve ser elaborado após todo o trabalho ter sido escrito com o máximo de detalhes e maior objetividade possível, O título deve respeitar a seqüência dos itens do trabalho, abrangendo a introdução, métodos, resultados, discussão e conclusão. Isto é importante para induzir o leitor a ler o artigo em sua totalidade,

pois o resumo é, muitas vezes, a única parte do estudo lida. Publicações em línguas que não o inglês, geralmente, incluem o resumo em inglês que deverá ter a maior fidelidade possível a esta língua. Sua compreensão será fundamental para citações em revistas internacionais (Nahas & Ferreira, 2005).

O resumo é uma curta amostra do conteúdo do artigo e deve permitir a identificação da pesquisa de forma rápida e precisa, ser de fácil entendimento e conter o objetivo ou hipótese no primeiro parágrafo. A metodologia deve estar presente no segundo parágrafo com descrição clara do desenho experimental. No terceiro parágrafo devem ser apresentados os principais resultados e no quarto parágrafo, as conclusões. O resumo não deve ir além de 250 palavras, não ter abreviaturas, siglas, figuras ou tabelas. Resumo e abstract devem ser auto-explicativos e terem as mesmas informações (Fierro & Gonzalez, 2004).

O resumo deve apresentar o contexto do estudo, os objetivos, os procedimentos básicos, os principais resultados e conclusões, além de enfatizar os aspectos novos e importantes do estudo. Um resumo bem preparado permite aos leitores identificar, com rapidez e precisão, os conteúdos do documento, determinar a relevância de seus interesses e decidir se lerão todo o trabalho (Gómez, 2007). O resumo permite ao leitor o acesso à sinopse e o entendimento do conteúdo do artigo científico, sem precisar realizar o download e ler todo o documento. (Bhatia & Mitra, 2012).

Sugestões sobre a visão de editores e revisores que irão avaliar os textos submetidos (Caramelli, 2011):

- Prefira um título rápido, direto e curto.
- Não coloque nomes próprios, de cidades ou países no título, a menos que o texto seja de interesse regional ou específico. Se for de interesse global, em uma publicação internacional, esse cuidado pode ser importante, porque os revisores tendem a achar

- que o manuscrito não interessa ao público de outros países.
- Tente inserir uma palavra-chave para facilitar a recuperação (e futuras citações) do texto por parte das ferramentas de busca.
 - Não use abreviaturas no título.
 - Evite usar muitas frases. Utilize no máximo duas delas.
 - Evite usar perguntas no título (exemplo: A cirurgia muda a história natural da doença?).
 - Procure inserir no título sua mensagem ou conceito principal, o que alguns denominam a “cereja do bolo”.
 - Elabore um texto fácil, interessante e atraente.
 - Não tenha pressa, pense alguns dias sobre a idéia e mostre aos colegas, para que opinem.

PALAVRAS-CHAVE

As palavras chaves devem ser selecionadas entre aquelas vinculadas ao objetivo ou hipótese de trabalho; podem ser substantivos compostos, porém nunca frases e recomenda-se selecionar palavras vinculadas ao problema, aos métodos e aos resultados (López-Leyva, 2013).

INTRODUÇÃO

O propósito da introdução é dar ao leitor a informação essencial para entender o porquê daquele estudo. Esta parte estabelece o contexto do trabalho resumindo a literatura e os pontos de vista atuais sobre o problema pesquisado. A introdução deve permitir que os leitores entendam a lógica de seu estudo e deve ser adaptado às normas da revista onde os autores pretendem publicar. Uma boa introdução terá a função de convencer editores e revisores sobre a importância de sua pesquisa (Sengupta et al., 2013; Novales et al., 2014).

A introdução deve ser baseada em temas-chave do estudo inseridos em diferentes pontos da mesma (Cals & Kotz, 2013). O primeiro aspecto deve ser a descrição da magnitude do problema, seguida por uma breve descrição do conhecimento atual e lacunas que existem na literatura. É fundamental definir, com base na literatura, a parte que seu trabalho vai preencher, o que deve ser conectado com a discussão, mas deve-se evitar o excesso de referências (Santos, 2013).

A introdução não possui um limite total de palavras como o resumo de um artigo, mas deve ser o mais concisa possível e não representar mais que 10 a 15% do total de palavras do artigo, devendo incluir: domínio da pesquisa; especificidade sobre partes não investigadas, fundamentos para pesquisas futuras; elementos que indiquem a necessidade de uma melhor compreensão do problema; componentes que fornecem os objetivos e o propósito da pesquisa e uma justificativa para a realização do estudo (Cargill e O' Connor, 2009; Mantilla-Villareal et al., 2010).

Técnicas indicadas para a introdução de um artigo científico incluem: linguagem clara, limpa e sem emoção; verbos na voz ativa; escrita no tempo presente para fatos estabelecido e pretérito perfeito ou presente para os resultados que o autor não considera completamente definidos; indicações de resultados importantes com referências, citar as fontes originais dos dados: escolher referências relevantes com preferência para as mais atuais (Sengupta et al., 2013). Os editores preferem citações de trabalhos relevantes em seu trabalho, por demonstrarem a importância e a atualidade do assunto estudado.

MATERIAIS E METODOS

A escrita correta da metodologia é tão importante quanto a dos resultados e conclusão, por permitir aos revisores e leitores decidirem se o estudo pode ser repetido (Schein et al. 2000). A metodologia deve ser direcionada para a hipótese e a realização dos objetivos (Blasco et al. 2013). A escrita do material e métodos é o núcleo da publicação científica e deve ser elaborada de forma que outros pesquisadores consigam reproduzir toda a pesquisa da mesma maneira que o primeiro autor e se, nas mesmas condições, poderia atingir seus resultados (Henz, 2003; Lin & Kuo, 2012).

A escrita do material e métodos deve ser coerente com os pressupostos e objetivo inserido no último parágrafo da introdução (Bordage, 2001). O tópico deve detalhar fatores importantes como o tipo de estudo, amostra, erro de amostragem, controle de variações, métodos de medição, fonte de dados, período de coleta de dados, recrutamento e acompanhamento da pesquisa, etc, especificando-se, também, questões éticas e de confidencialidade (Pierson, 2004; Happell, 2008).

Os métodos estatísticos devem ser descritos em nível de detalhes que permitam reproduzir as análises. Evitar o uso de palavras como "significativo", "correlação", "relacionamento", "parceria", etc especificar o valor "p" de corte (Kotz & Cals, 2013; Nahata, 2008).

A escrita adequada do material e métodos é importante, por suportar a credibilidade dos resultados e indicar os mecanismos, formas e meios utilizados para a coleta e tratamento de dados que permitiram chegar aos resultados e à discussão (Neill, 2007; Cook et al., 2009). O material e métodos deve conter até 640 palavras evitando-se a descrição detalhada de técnicas de uso corrente ou bem conhecidas. A repetibilidade deve ser evitada e, por isso, é

recomendável solicitar a outra pessoa, de preferência de outra área de conhecimento, que leia o que foi escrito e diga se compreende a execução do experimento pela descrição apresentada (Henz, 2003; Masic, 2011).

Os materiais e métodos devem ser escritos durante a condução do experimento mesmo que os resultados não estejam claros (Gump, 2010). O tamanho da amostra e os procedimentos devem ser identificados e descritos com as dimensões de medida utilizadas por variável e os instrumentos de medição; esclarecer o contexto de pesquisa, onde se conseguiu e as circunstâncias que cercam o processo; definir as variáveis dependentes e usar voz passiva nesta parte; evitar a mistura com resultados e discussão; rever e seguir as instruções fornecidas pelo periódico selecionado (Kotz & Cals, 2013).

Os material e métodos devem demonstrar:

- População e amostra e critérios de inclusão e/ou exclusão; menção a termo de consentimento livre e esclarecido e aprovação pelo comitê de ética;
- População e amostra II e descrição de subgrupos amostrais específicos ou quando necessário para explicar mais detalhadamente procedimentos relacionados ao acompanhamento e eventuais perdas;
- Métodos principais- variável ou procedimento mais importante;
- Protocolo do estudo - detalhamento do que foi feito e como foi feito;
- Protocolo do estudo II - dados adicionais quando necessários e justificados;
- Análise estatística – métodos descritivos e inferenciais;
- Análise estatística II – software e nível de significância (Araújo, 2014; Jenkins, 1995).

As escolhas metodológicas e por que foram as melhores opções devem ser discutidas (Anaya-Prado et al., 2006). A credibilidade dos métodos pode ser demonstrada citando uma referencia. Ao terminar a metodologia, pergunte a si mesmo se "outro pesquisador pode reproduzir meu estudo com as informações apresentadas nesse tópico?" (Lin, 2011; Kotz & Cals, 2013).

A análise dos dados deve ser suficientemente detalhada para que o leitor ou revisor possa repita-la, se necessário (Bordage et al., 2001; Liunbruno et al., 2013). A análise dos dados deve ser apropriada ao projeto de pesquisa, a hipótese e ao modelo (Chernick, 2012). Os dados devem cumprir os pressupostos para a utilização da estatística tais como normalidade (Kelly, 2012).

A estrutura dos dados depende das características das variáveis, podendo ser qualitativas ou quantitativas. As variáveis qualitativas ou categóricas podem ser dicotômicas (insalubre/saudável, masculino/feminino), multinomial (homossexuais/bissexuais/ heterossexual) ou ordinais (estágio da doença-inicial, intermediária, final) e representadas pelo percentual de cada categoria (Bagatin & Miot, 2013). As variáveis quantitativas podem ser descritas por números e sempre têm uma escala proporcional entre os valores. Os revisores esperam uma descrição clara e completa das amostras de pesquisa e procedimentos precisos de análise de dados (McGaghie & Crandall, 2001).

Os testes estatísticos devem ser adequados à população do estudo e tipo de dados, considerando a natureza das variáveis dependentes, independentes, normalidade e a homogeneidade dos dados (Bagatin & Miot, 2013). Estes pressupostos devem ser satisfeitos para uma análise correta. Por outro lado, métodos estatísticos não paramétricos podem ser usados para se avaliar diferenças entre grupos ou correlações entre as variáveis quando as medições de pesquisa são de categorias (feminino-masculino,

trabalhando-aposentado). Dados normais ou paramétricos implicam distribuição seguindo uma curva de distribuição normal. Se houver dois grupos e dados contínuos, numéricos e normais, o teste t é adequado, mas se os dados não têm distribuição normal, um teste estatístico não paramétrico (por exemplo, o teste U de Mann-Whitney) deve ser usado. Conjuntos de dados não independentes (por exemplo, pontuação em pré-teste e pós-teste para o mesmo grupo de alunos) devem ser submetidos a teste não paramétrico, como teste-pares combinados de Wilcoxon (Kelly, 2012).

Métodos estatísticos mais comuns podem ser incluídos sem referência, mas aqueles avançados ou incomuns devem ser referenciados. Métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos em detalhes e as razões de sua escolha apresentadas e justificadas (Ng & Peh, 2008).

Os autores devem declarar e referenciar o pacote e procedimento(s) estatísticos utilizados, pois a forma de análise varia entre os mesmos. Isto permite que os leitores julguem a adequação das medidas estatísticas e as conclusões obtidas a partir dos dados (Knight, 2010). O valor da probabilidade (p) considerado para indicar diferenças significativas deve ser deixado claro (Kallet, 2004; Blasco et al., 2013).

RESULTADOS

Esta seção deve ser o mais simples de ser escrita do artigo, mas não deve ser redigida de forma superficial por ter que apresentar a maior contribuição do conhecimento. Basicamente deve cumprir duas funções: 1) mostrar os resultados das pesquisas descritas nos materiais e métodos e 2) dados que suportem as conclusões. O primeiro ponto pode ser atendido com uma descrição dos resultados sem colocar dados dos materiais e métodos. O segundo inclui tabelas

e figuras com os resultados seguidas pelo texto descrevendo os principais. Mais uma vez, o tempo deve ser utilizado no passado.

A seção de resultados deve começar descrevendo o que foi encontrado. Os autores devem escrever os resultados relevantes da pesquisa sem serem repetitivos, para não confundirem o leitor e mostrarem as descobertas mais importantes. Frequentemente, esta seção é geralmente a mais curta de artigo e deve ter os dados que serão discutidos.

Esta parte deve referenciar todas as tabelas e figuras incluídas no trabalho na ordem mencionada no texto. Verifique se a análise estatística é apropriada. Não invente ou distorça os dados e não exclua os importantes. Além disso, não descrever as figuras pode diminuir a importância do trabalho.

DISCUSSÃO

A discussão deve responder às questões de trabalho ou pesquisa (formulada no fim da introdução) e comparar os resultados com dados publicados, o mais objetivamente possível. Discutir suas limitações e destacar suas descobertas principais, considerando os resultados do ponto de vista oposto. No final da discussão ou em uma seção separada, enfatizar a maioria das conclusões significativas e importância do seu estudo.

A seção de discussão dos artigos científicos abriga os comentários sobre o significado dos resultados, a comparação com outras pesquisas, destaca os pontos fortes, limitações e as implicações do estudo e a posição do autor sobre o assunto (Cals & Kotz, 2013; Pereira, 2013). Na discussão, o autor fundamenta e interpreta os resultados da pesquisa, indicando como eles suportam a hipótese do estudo e como podem contribuir para o avanço da ciência (Cetin & Hackam, 2005). O objetivo da discussão é dar ao

leitor um resumo dos principais resultados, comparando-os com trabalhos publicados, discutindo futuras implicações e eventuais deficiências (Carls & Kotz, 2013) e a importância científica da pesquisa (Drotar, 2009). A discussão cria uma perspectiva para as descobertas da pesquisa (Sengupta et al., 2013). No entanto, a necessidade de sintetizar e interpretar os resultados, para convencer o leitor de que os dados da pesquisa são válidos e que sustentam as conclusões, torna desafiadora a tarefa de escrever esta seção (Volpato, 2007; Drotar, 2009).

A discussão deve fornecer uma argumentação crítica para os objetivos e resultados do estudo, incluindo: Por que o pesquisador começou o estudo? O que ele fez? Que respostas ele conseguiu? Quais são os resultados, as evidências, as contraprovas; e o que isso tem de relevante? (El-Serag, 2006). Além do mais, esta seção deve ser consistente e integrada com as outras do manuscrito (Drotar, 2009), pois nela os autores devem validar seus resultados e metodologia, além de fundamentar as justificativas, hipóteses e objetivos do estudo (Volpato, 2007; Drotar, 2009).

Os dados expostos nos resultados devem ser comparados com aqueles de referências citadas na introdução e se seus dados são semelhantes ou não aos de outros autores. A discussão deve tentar explicar o que mais lógico e coerente possível dos dados. Deve-se, também, expor as limitações do estudo e os problemas metodológicos enfrentados durante o desenvolvimento do trabalho. Outras considerações podem ser a inclusão de recomendações que facilitem o trabalho de outros pesquisadores.

REFERÊNCIAS

Alexandrov, A. V., and Hennerieri, M. G. 2007. Writing good abstracts. *Cerebro vascular Diseases*, **23(4)**: 256-259.

Araújo, C. G. S. D. 2014. Detalhando a redação do artigo científico: 25 a 30 Parágrafos. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 102: 21-23.

Anaya-Prado R., Toledo A. H., Toledo-Pereyra L. H. 2006. The surgeon as a scientific writer. *Journal of Investigative Surgery*, 19: 335-339.

Bagatin, E., Miot, H. A. 2013. How to design and write a clinical research protocol in Cosmetic Dermatology. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88: 69-75.

Bhatia, S. and Mitra, P. 2012. Summarizing figures, tables and algorithms in scientific publications to augment search results. *ACM Transactions on Information Systems*, 30(1): 1-24.

Blasco, J. M., González, M. F. G., Barragán, R. C., Veiga-Cabo, J. 2013. Estructura y contenidos de la comunicación y redacción de artículos científicos. *Medicina y Seguridad del Trabajo*, 59: 159-170.

Bordage G. 2001. Reasons reviewers reject and accept manuscripts: The strengths and weaknesses in medical education reports. *Academic Medicine*, 76: 889-896.

Brumback, R. A. 2012. "3.. 2.. 1. Impact [factor]: target [academic career] destroyed!": just another statistical casualty. *Journal of Child Neurology*, 27(12): 1565-1576.

Cals, J. W. L. and Kotz, D. 2013. Effective writing and publishing scientific papers, part II. Title and abstract. *Journal of Clinical Epidemiology*, 66 (6): 585-585.

Caramelli, B. 2011. O título -arauto da comunicação científica. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 57(4): 359-359.

Cargill, M., O'Connor, P. 2009. Writing scientific research articles. Strategy and steps (La escritura de artículos de investigación científica. Estrategias y pasos). West Sussex: Wiley-Blackwell.

Carraway, L. N. 2007. Improve scientific writing and avoid perishing. *American Midland Naturalist*, 155 (2): 383-394.

Carraway, L. N. 2009. Content and organization of a scientific paper. *American Midland Naturalist*, 157 (2): 412-422.

Cetin, S.; Hackam, D. J. 2005. An approach to the writing of a scientific manuscript. *Journal of Surgical Research*, 128 (2): 165-167.

Cook, C., Brismee, J. M., Courtney, C., Hancock, M., May, S. 2009. Publishing a scientific manuscript on manual therapy. *The Journal of Manual e Manipulative Therapy*, 17: 141-147.

Didegah, F., and Thelwall, M. 2013. Which factors help authors to produce the highest impact research? Collaboration, journal and document properties. *Journal of Informetrics*, 7(4): 861-873.

Chernick, V. 2012. How to get your paper accepted for publication. *Paediatric Respiratory Reviews*, 13: 130-2.

Dixon, N. 2001. Writing for publication: A guide for new authors. *International Journal Quality Health Care*, 13: 417-421.

Drotar, D. 2009. Editorial: How to write an effective results and discussion. *Journal of Pediatric Psychology*, 34(4): 339-343.

Fierro, E. H., and Gonzalez, M. I. Z. 2004. Elaboración de un artículo científico de investigación. *Ciencia y Enfermería X*, (1): 17-21.

Gómez, J. H. D. 2007. Cómo escribir un artículo de investigación clínica original para publicación científica? *Iatreia*, 20(1): 74-81.

Gump, S. E. 2010. Writing your journal article in 12 weeks: a guide to academic publishing success (review). *Journal of Scholarly Publishing*, 41: 246-252.

Happell, B. 2008. Writing for publication: a practical guide. *Nursing Standard*, 22: 35-40.

Henz, G. P. 2003. Como aprimorar o formato de um artigo científico. *Horticultura Brasileira*, 21: 145-148.

Jenkins, S. 1995. How to write a paper for a scientific journal. *Journal of Physiotherapy*, 41: 285-289.

Kallet, R. H. 2004. How to Write the Methods Section of a Research Paper. *Respiratory Care*, 49: 1229-1232.

Kelly, A. M. 2012. Evaluating and writing education papers compared with noneducation papers. *Academic Radiology*, 19: 1100-1109.

Knight, K. L. 2010. Study experimental research design: much more than statistics. *Journal of Athletic Training*, 45: 98-100.

Kotz, D., Cals, J. W. L. 2013. Effective writing and publishing scientific papers, part IV: methods. *Journal of Clinical Epidemiology*, 66: 817.

Lewis, G., and Hartley, J. 2005. What's in title? Number of words and the presence of colons. *Scientometrics*, 63(2): 341-356.

Lin, J. C. 2011. Writing manuscripts for publication in scientific journals. *Bioelectromagnetics*, 32: 1-3.

Lin P., Kuo Y. 2012. A guide to write a scientific paper for new writers. *Microsurgery* 32: 80-85.

Liumbruno, G. M., Velati, C., Pasqualetti, P., Franchini, P. 2013. How to write a scientific manuscript for publication. *Blood Transfusion*, 11: 217-226.

López-Leyva, S. 2013. El proceso de escritura y publicación de un artículo científico. *Revista Electrónica Educare*, 17(1): 05-27.

Mack, C. 2012. How to write a good scientific paper: title, abstract, and keywords. *Journal of Micro/Nanolithography MEMS and MOEMS*, 11(2):020101.

Mantilla- Villareal, A., Medina-Fontalvo, J., Velasco-Bayuelo, C. A., Algarín-Gregory, J., Rodelo-Salcedo, E., De la Rosa-Barranco, D., Caballero-Urbe, C. V. 2010. "Guía práctica para publicar un artículo en revistas latinoamericana". *Salud Uninorte*, 26(2): 311-324.

Masic, I. 2011. How to search, write, prepare and publish the scientific papers in the biomedical journals. *Acta Informatica Medica*, 19: 68-79.

McGaghie, W. C., Crandall, S. 2001. Data analysis and statistics. *Academic Medicine*, 76: 936-937.

Mendez, D. I., Alcaraz, M. A., Salanger-Meyer, F. 2014. Titles in English - medium astrophysics research articles. *Scientometrics*, 98(3): 2331-2351.

Nahas, F. X., and Ferreira, L. M. 2005. Analysis of the topics of a scientific paper. *Acta Cirurgica Brasileira*, 20 Suppl. 2: 13-6.

Nair, P. K. R. 2005. How (not) to write research papers in agroforestry. *Agroforestry Systems*, 64(1): 5-16.

Nahata M. C. 2008. Tips for writing and publishing an article. *Annals of Pharmacotherapy*, 42: 273-277.

Neill, U. S. 2007. How to write a scientific masterpiece. *Journal of Clinical Investigation*, 117: 3599-602.

Ng, K. H., Peh, W. C. G. 2008. Writing the materials and methods. *Singapore Medical Journal*, 49: 856-859.

Novalés, C. I. P., Padrón, N. Q., Murguía, A. P., Riveiro, P. L. G., Hondares, L. E. M. 2014. Important aspects of scientific writing. *Revista de Ciencias Médicas*, 18, 362-380.

Peh, W. C. G., and Ng, K. H. 2008. Pointers to getting your article published – Title and title page. *Singapore Medical Journal*, 49(8): 607-608.

Pereira, M. G. 2013. A seção de discussão de um artigo científico. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 22(3):537-538.

Pierson, D. J. 2004. The top 10 reasons why manuscripts are not accepted for publication. *Respiratory Care*, 49: 1246-1252.

Sagi, I., and Yechian, E. 2008. Amusing titles in scientific journals and article citation. *Journal of Information Science*, 34(5): 680-687.

Santos, L. L. 2013. El proceso de escritura y publicación de un artículo científico. *Revista Electrónica Educare*, 17(1): 5-27.

Schein M., Farndon J. R., Fingerhut A. 2000. Why should a surgeon publish? *British Journal of Surgery*, 87:3-5.

Sengupta, S., Shukla, D. Ramulu, P., Natarajan, S., Biswas, J. 2013. Publish or perish: The art of scientific writing. *Indian Journal of Ophthalmology*, 62(11): 1089-1093..

Subotic, S. and Mukherjee, B. 2014. Short and amusing: the relationship between title characteristics, downloads, and citations in psychology articles. *Journal of Information Science*, 40 (1): 115-124.

Thrower, P. A. 2007. Writing a scientific paper: I. Titles and abstracts. *Carbon*, 45(11): 2143-2144.

Van Wesel, M. Wyatt, S., ten Haaf, J. 2014. What a difference a colon makes: how superficial factors influence subsequent citation. *Scientometrics*, 98(3): 1601-1615.

Volpato, G. L. 2007. Como escrever um artigo científico. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, 4: 97-115.



Universidade Federal de Viçosa
CAMPUS DE RIO PARANAIBA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

