ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Brunfelsia uniflora*

Sara Jane Marsola^a, Letícia de Cássia Tavares Thiesen^a, Ana Daniela Lopes^a, Fábio Aparecido Cordeiro^a, Lienine Luiz Zaghi Junior^b, Zilda Cristiani Gazim^c, Nelson Barros Colauto^c

^aDiscente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, sarajane_mar@hotmail.com; ^bMestre em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, ^cDocente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR

Os fungos endofíticos constituem um grupo diversificado de ascomicetos definidos por sua ocorrência assintomática nos tecidos vegetais¹. Dentre as características destes microrganismos, destaca-se a capacidade de produzir substâncias bioativas, como metabólitos secundários, além de apresentarem potencial uso como antibióticos, imunossuppressores, antiparasitários, antioxidantes e agentes anticancerígenos quando associados às plantas². Neste contexto, visando estabelecer uma coleção de culturas fúngicas com potencial atividade biotecnológica, o objetivo deste trabalho é isolar e preservar fungos endofíticos de *Brunfelsia uniflora* (Pohl.), verificar a atividade antioxidante e enzimática dos isolados e avaliar a estabilidade genômica das cepas por meio de marcadores moleculares RAPD. Para isso, partes aéreas de *B. uniflora* foram coletadas e lavadas em água corrente e água destilada por duas vezes. As estruturas botânicas (folhas, flores e caules) foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% e lavadas em água destilada. Em câmara de fluxo laminar, procedeu-se a desinfestação com etanol 70%, etanol 90% e água destilada estéril por duas vezes. Para verificar a desinfestação foi inoculado 100 µL da água da última lavagem da parte aérea da planta em meio de cultivo com ágar batata dextrose (BDA) e ágar batata dextrose adicionado de 0,2 g/L de ampicilina sal sódica e sulfato de estreptomicina (BDA+). A água foi espalhada com alça de Drigalski sobre o meio de cultivo e mantido a 25 °C no escuro. Após a limpeza superficial, folhas, flores e caule foram cortados em fragmentos de 3-5 mm², aproximadamente, e dispostos em placas de Petri com meio de cultivo BDA ou BDA+. Os fragmentos vegetais inoculados foram mantidos a 25 °C no escuro até o início do crescimento micelial, quando os fungos foram selecionados e transferidos para meio BDA+ visando à obtenção de cultura pura. A seleção dos isolados foi feita com o auxílio de microscópio estereoscópico e baseou-se em características morfológicas como coloração, ramificação e borda do micélio, e coloração do meio de cultivo após crescimento do fungo. Além disso, estruturas específicas foram levadas em consideração para separar morfotipos similares. Após a obtenção de culturas puras, os isolados foram inoculados em grãos de trigo IPR-136, conforme protocolo de MANTOVANI et al.³. Um total de 107 isolados de fungos foi obtido a partir das diferentes partes aéreas de *B. uniflora*. Destes, 87% cresceram a partir das folhas, 10% de flores e 4% do caule. Foram descritos 25 morfotipos, sendo a maioria proveniente das folhas (52%) e a minoria (16%) do caule. Os endófitos isolados foram preservados em grãos de trigo³. O experimento encontra-se em andamento.

REFERÊNCIAS

¹CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos bioativos e produtos naturais. **Revista Virtual Química**, Araraquara, SP, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2012.

²MOLINA, G.; PIMENTEL, M. R.; BERTUCCI, T. C. P. Application of fungal endophytes in biotechnological processes. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, p. 289-294, 2012.

³MANTOVANI, T. R. D.; TANAKA, H. S.; UMEO, S. H.; ZAGHI JR, L. L.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Cereal grains and cryoprotectants in *Lentinula edodes* cryopreservation at -70 °C. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR MUSHROOM SCIENCE, 18.; 2012, Beijing. Proceeding. Beijing: **China Agriculture**, 2012. p. 887-894.

FUNGOS ENDOFÍTICOS E SUA INFLUENCIA NA COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Brunfelsia uniflora*

Letícia de Cássia Tavares Thiesen^a, Sara Jane Marsola^a, Ana Daniela Lopes^a, Zilda Cristiani Gazim^b, Héliida Mara Magalhães^b, Nelson Barros Colauto^b

^aDiscente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, letithi@hotmail.com; ^bDocente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR

Os fungos endofíticos são fontes importantes de moléculas naturais bioativas provenientes de metabólitos secundários com potencial de uso na proteção de plantas, antibióticos, imunossuppressores, antiparasitários, antioxidantes e anticancerígenos². São simbiontes encontrados em plantas com capacidade de produzir substâncias bioativas semelhantes as das plantas hospedeiras¹. A maior parte dos estudos tem focado na atividade antimicrobiana e antioxidante destes fungos e menor atenção tem sido dedicada à capacidade dos microrganismos endofíticos afetarem a produção, composição e atividade antioxidante do óleo essencial de plantas de interesse biotecnológico³. O manacá [*Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. – Solanaceae] é um arbusto nativo do Brasil que possui propriedades antidiarréica, anti-reumática, anti-sifilítica entre outras⁴. Possui diversos compostos ativos como benzenóides, terpenos, lactonas, alcalóides e lipídeos⁸. Desta forma, o objetivo deste projeto é isolar e caracterizar fungos endofíticos de *Brunfelsia uniflora* e verificar o efeito destes microrganismos na produção, composição e atividade antioxidante do óleo essencial de *B. uniflora*. Um protocolo para cultivo de tecido *in vitro* e outro para limpeza clonal da planta serão desenvolvidos para posterior aclimatização em estufa⁷. As plantas com e sem os microrganismos endofíticos serão cultivadas em ambiente controlado e o óleo essencial das folhas de cada planta será obtido por hidrodestilação⁶. A produção, composição química e atividade antioxidante do óleo essencial de cada planta serão determinadas e comparadas para verificar o efeito da presença ou ausência da microbiota endofítica na planta⁸. Plantas lenhosas como esta apresentam baixa viabilidade e pequeno potencial de germinação. O rendimento do óleo essencial da *B. Uniflora* foi 10 µL/L de extração em processo de 3,5 h. A pesquisa está em fase de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- ¹AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**. Valparaíso – Chile, v. 3, n. 1, 2000.
- ²CHAPLA, V. M.; BIASSETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos bioativos e produtos naturais. **Revista Virtual Química**, Araraquara, SP, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2012.
- ³ESTRADA, C.; WCISLO, W. T.; BAEL, S. A. Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants. **New Phytologist**, v. 198, p. 241-251, 2013.
- ⁴FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926.
- ⁵GAZIM, Z. C.; RODRIGUES, F.; AMORIN, A. C. L.; REZENDE, C. M.; SOKOVIĆ, M.; TEŠEVIĆ, V.;
- ⁶LIBERMAN, R.; SHAHAR, L.; NISSIM-LEVI, A. et al. Shoot regeneration from leaf explants of *Brunfelsia calycina*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, n. 3, p. 345-348, 2010.
- ⁷ROCHA, S. C.; QUEIROZ, J. A. L.; QUISEN, R. C.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; ALTHAUS-OTTMANN, M. M. Enraizamento de estacas de manacá-de-cheiro (*Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don.) em diferentes concentrações de ácido indol butírico em solução e em talco. **Cultura Agronômica**, v. 13, n. 2, p. 68-77, 2004.
- ⁸VUČKOVIĆ, I.; KRSTIĆ, G.; CORTEZ, L. E. R.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A.; CORTEZ, D. A. C. New natural diterpene-type abietane from *Tetradenia riparia* essential oil with cytotoxic and antioxidant activities. **Molecules**, v. 19, p. 514-524, 2014.

ACÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE PAU D'ALHO SOBRE AS LARVAS E PUPAS DO *Aedes aegypti* L.

Keila Fernanda Raimundo^a, Marcel de Souza Brito^b, Eloísa Schneider Silva^b, Zilda Cristiani Gazim^c

^aDoutoranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, ke_fer25@yahoo.com; ^bDiscente do Curso de Farmácia, Unipar - PIC, Umuarama-PR; ^cDocente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR

Várias espécies nativas possuem grande potencial econômico devido à presença de óleos essenciais, os quais são utilizados em diversos setores industriais¹. Nesse contexto, a Floresta Atlântica apresenta-se como um dos maiores centros de biodiversidade, na qual encontra-se dentre as espécies o pau d'alho, *Galesia integrifolia* (Spreng.) Harms, uma espécie arbórea nativa do sul da América e pertencente à família Phytolaccaceae². Sua madeira possui cheiro característico de alho e é uma planta utilizada na medicina popular na preparação de chás para diversas finalidades³. Poucos estudos foram realizados sobre essa planta, mas alguns indicam que sua casca e folhas apresentam óleo essencial (OE), tendo como componente majoritário o 2,4,5,7-tetratiaoctano entre outros compostos⁴. Sendo assim, esse trabalho teve por objetivo investigar as atividades biológicas do OE das folhas de pau d'alho obtido por hidrodestilação sobre as larvas do terceiro estágio e pupas do *Aedes aegypti* L. A coleta das folhas de pau d'alho foi realizada no período da manhã e, em seguida, feita a extração por hidrodestilação, em que o material vegetal permaneceu por 3 h. Após a extração, o OE foi retirado do aparelho, seco com Na₂SO₄ anidro e armazenado a 4°C⁵. Para verificar a atividade sobre o *A. Aegypti*, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, foram separadas 10 larvas do terceiro estágio e 10 pupas e colocadas em frascos de 250 mL com 10 mL do óleo essencial diluído em polisorbato 80 a 2% nas concentrações que variaram de 250000 a 0,0058 µg mL⁻¹⁶. As larvas ficaram expostas ao OE por 24 e 48 h e foram consideradas mortas aquelas que apresentaram ausência de movimentos e não responderam aos estímulos⁷. O OE nas concentrações 1,5 e 0,0058 µg mL⁻¹ proporcionou 100% de mortalidade das pupas e larvas, respectivamente, num período de 6 h de exposição. O alto potencial larvicida num curto período de exposição (6 h) observado estimula a continuação dos estudos sobre o *A. Aegypti*, visto que existe uma alta resistência deste mosquito frente aos larvicidas químicos utilizados e hoje nos encontramos diante de uma epidemia de dengue.

REFERÊNCIAS

- ¹MITTERMEIER, R. A.; WERNER, T. B. **Wealth of plants and animals unites “megadiversity” countries**. *Tropics*, v. 4, n.1, p.4-5, 1990.
- ²MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G. A. B. & KENT, J. **Biodiversity hotspots for conservation priorities**. *Nature* 403: 853-858, 2000.
- ³NOGUEIRA, J. C. B. **Reflorestamento heterogêneo com essências indígenas**. São Paulo: Instituto Florestal, 1977. 71p.
- ⁴FRAGA, H. F. S.; ROSA, P. M.; MORAIS, A. A.; PINTO, A. C. REZENDE, C. M. Análise dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Galesia integrifolia* (Sprengel) Harms (Phytolaccaceae). In.: *29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia, 2006*.
- ⁵SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. **Farmacognosia da planta aomedicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. p. 397-425.
- ⁶BONATO, C. M.; CAVALCA, P. A. M.; LOLIS, M. R. B. Homeopathic and larvicide effect of *Eucalyptus cinerea* essential oil against *Aedes aegypti*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.53. p. 835–843, 2010.
- ⁷CARVALHO, A. F. U.; MELO, V. M. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; BANTIM, M. B.; RABELO, E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippiasidooidescham*. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 98. p. 569–571, 2003.

ACÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E FRAÇÕES ISOLADAS DAS FOLHAS DA MIRRA SOBRE AS LARVAS E PUPAS DO *Aedes aegypti*

^aLeticia Ferarrese, ^aAdriano Borges Meniqueti, ^aLais de Freitas Jorge, ^bBruna Karen Cardoso, ^cEloisa Schneider Silva, Zilda Cristiani Gazim^{d*}

^aMestrando(a) em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR, Umuarama-PR, leticiafera@hotmail.com; ^bDoutoranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR, Umuarama-PR; ^cDiscentado curso de Farmácia - PIC, UNIPAR – Umuarama-PR; ^dDocente do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR, Umuarama-PR.

Tetradenia riparia (Hochst.) Cood é uma planta originária da África do Sul, popularmente conhecida como falsa mirra.¹O transmissor da dengue é um dos principais problemas de saúde pública, o controle do mosquito é feito através de organofosforados químicos, no entanto esses organofosforados além da poluição ambiental favorecem a resistência dos mosquitos.O objetivo do presente trabalho foi obter o óleo essencial (OE), realizar o fracionamento deste em coluna cromatográfica e avaliar a atividade sobre as larvas e pupas do *Aedes aegypti*.A implantação da cultura de *T. riparia*, ocorreu no Horto Medicinal da UNIPAR, na cidade de Umuarama. As folhas foram coletadas manualmente no início da manhã, entre 7:30 e 9:00 h. O OE foi obtido por hidrodestilação, durante 3 h, seco com Na₂SO₄ anidro.² A técnica utilizada para o fracionamento do óleo de *T. riparia* foi a cromatografia clássica, utilizando a sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) como fase estacionária. Foram utilizados 4,0 gramas do óleo essencial o qual foi eluido com pentano; pentano: diclorometano (9:1; 8:2; 7:3; 1:1; 3:7); diclorometano; diclorometano: metanol (9:1; 7:3; 1:1); e metanol, sendo obtidas 11 FR.³ A atividade larvicida foi realizada pelo teste de imersão larval,⁴utilizando diferentes concentrações do OE e FR(62,50; 31,25; 15,60; 7,80; 3,90; 1,95; 0,0975mg/mL). As larvas permaneceram em contato com o OE e FR por 24 e 48 horas. A leitura consistiu na observação da motilidade das mesmas, sendo consideradas mortas as larvas e pupas que não apresentaram motilidade ao toque. Os resultados da ação do OE em 24 e 48 h sobre as larvas do *Aedes aegypti* evidenciaram que as concentrações de 31,25; 15,60; e 7,80 mg/mL proporcionaram uma taxa de mortalidade de 100; 80e 60%, respectivamente. Com relação a ação do OE sobre as pupas nas concentrações de 62,5 e 31,25 mg/mL, a taxa de mortalidade foi de 100 e 66,70%, respectivamente. As FR que proporcionaram melhores atividades sobre as larvas do *Aedes aegypti* foram a FR6 e FR8, ocasionando 100% de mortalidade das larvas nas concentrações que variaram de 31,25 a 1,95 mg/mL. A FR8 foi a que apresentou maior ação sobre as pupas, eliminando 100% destas, nas concentrações que variaram de 31,25 a 3,90 mg/mL e 66,67% em 1,95mg/mL. As FR 4,6 e 7 apresentou 100% da mortalidade das pupas na concentração que variou de 31,25 a 7,8 mg/mLNa concentração de 3,90 mg/mL constatou a mortalidade de 50% nas pupas na FR6. A FR5 apresentou uma menor ação sobre as pupas, comparando com as demais frações testadas, proporcionando a mortalidade de 100% das pupas na concentração de 15,60%. Os resultados são promissores devido à mortalidade das larvas e pupas frente ao OE e frações.

REFERÊNCIAS

- ¹DAVID, C. Q. A. J.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim.Nova**, v.33, p. 2202-2210, 2010.
- ²GAZIM, Z. C.; AMORIM, A. C. L.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M.; NASCIMENTO, I. A.; FERREIRA, G. A.; CORTEZ, D. A. G. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in southern Brazil, **Molecules**, v. 15, p. 5509-5524, 2010.
- ³GAZIM, C. Z.; RODRIGUES, F.; AMORIN, L. C. A.; REZENDE, M. C.; SOKOVIC, M.; TESEVIC, V.; VUCKOVIC, I.; KRSTIC, G.; CORTEZ, R. E. L.; COLAUTO, N. B.; LINDE, A. G.; CORTEZ, G. A. D. New Natural Diterpene-Type Abietane from *Tetradenia riparia* Essential Oil with Cytotoxic and Antioxidant Activities, **Molecules**, v. 19, p. 519-524, 2014.
- ⁴COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**.v.15. n. 4.p. 304–309, 2005.

ACÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Brunfelsia uniflora* SOBRE AS LARVAS E PUPAS DO *Aedes aegypti*

Elaine Yae Yamashita Sugauara^a, Herika Line Marko de Oliveira^b, Jessica Souza de Oliveira^b, Ana Caroline Cirilo^c, Laís de Freitas Jorge^d, Zilda Cristiani Gazim^e

^aDoutoranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar (elaine yae@bol.com.br) , ^bDiscente do Curso de Farmácia-PEBIC, Unipar; ^cDiscente do Curso de Farmácia-PIBIC, Unipar; ^dAluna PEBIC-Jr., Unipa; ^eMestranda em Biotecnologia Aplicada a Agricultura, Unipar; ^fDocente do Mestrado em Biotecnologia Aplicada a Agricultura, Unipar.

Brunfelsia uniflora é uma espécie pertencente à família Solanaceae conhecida popularmente como Manacá, é empregada em medicina popular e suas folhas são empregadas contra artrite, reumatismo, sífilis, picada de cobra, febre amarela, e ainda como diurética e antitérmica¹. A cultura de *B. uniflora* foi implantada no horto medicinal da Universidade Paranaense e a exsiccata está depositada no Herbário Educacional da Universidade Paranaense – HEUP, sob o nº 2855. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade do extrato bruto (EB) das folhas secas de *B. uniflora*, sobre larvas e pupas do *Aedes aegypti*. As folhas de manacá foram coletadas e expostas a secagem em ambiente natural, por aproximadamente 7 dias e pulverizadas. O material pulverizado foi submetido ao processo de maceração dinâmica com esgotamento do solvente (álcool a 96° GL). A seguir foi realizada a rota evaporação (Rota evaporador TE - 210) do solvente, obtendo o EB⁵. A atividade larvicida foi realizada pelo teste de imersão larval sobre larvas e pupas do *Aedes aegypti* L² oriundas do (Núcleo de Controle de Endemias Transmissíveis por Vetores - secretaria de vigilância sanitária do município de Umuarama, PR). O EB das folhas de *B.uniflora* foi testado em várias concentrações diferentes sendo eficaz nas concentrações de 0,3; 0,15; 0,075; 0,035; 0,0187; 0,009; 0,0047; 0,0023; 0,0011g/mL. Para o controle negativo foi utilizada uma solução com polissorbato 80 a 2% e como controle positivo um organofosforado a base de Temephós® na concentração de 400 mg/mL³. As larvas ficaram expostas nas diferentes concentrações por 24 horas⁴. Foram consideradas mortas, aquelas que apresentarem ausência de movimentos e não responderam aos estímulos⁵. Os resultados evidenciaram que houve 100% de mortalidade das larvas e pupas em todas as concentrações utilizadas. Estes resultados são promissores, visto que, o extrato eliminou não somente as larvas, mas também as pupas que são muito resistentes aos larvicidas convencionais⁶. Este é o primeiro estudo onde é mensurada a atividade sobre larvas e pupas do EB de *B.uniflora* (*Solanaceae*), frente ao *Aedes aegypti* L.

REFERÊNCIAS

- ¹MARTINS, M. B. G.; GRAF, R. D. R.; RODRIGUES, S. D. Caracterização anatômica, química e antibacteriana de folhas de *Brunfelsia uniflora* (manacá) presentes na Mata Atlântica. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 19, p. 106-114, 2009.
- ²FERNANDES, et al. Evaluation of activity of the crude ethanolic extract of *Magonia pubescens* St. Hil (Sapindaceae) against larvae of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1147–1152, 2008.
- ³CAMARGO, M.F., SANTOS, A.H., OLIVEIRA, A.W.S., ABRÃO, N., ALVES, R.B.N., ISAC, E. Avaliação da ação residual do larvicida temephós sobre o *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) em diferentes tipos de recipientes. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, p. 65–70, 1998.
- ⁴CARVALHO, A. F. U.; MELO, V. M. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; BANTIM, M. B.; RABELO, E. F. Larvicidal Activity of the Essential Oil from *Lippia sidoides* cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 569–571, 2003.
- ⁵BONATO, C. M.; CAVALCA, P. A. M.; LOLIS, M. R. B. Homeopathic and Larvicide Effect of *Eucalyptus cinerea* Essential Oil against *Aedes aegypti*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p. 835–843, 2010.
- ⁶BRAGA., I. A.; VALLE., D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.16, n. 4, p. 279-293, 2007.

ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA SOBRE O CARRAPATO BOVINO E *Aedes aegypti*

Wanessa de Campos Bortolucci^a, Hérika Line Marko de Oliveira^b, Jéssica Souza de Oliveira^c, Ana Caroline Cirilo^d, Zilda Cristiani Gazim^e, Orlando Seiko Takemura^f

^aMestranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, wanessaborto84@hotmail.com; ^bDiscente do curso de Farmácia-PEBIC-Unipar, ^cDiscente do curso de Farmácia-PIBIC-Unipar, ^dAcadêmica PEBIC Junior, ^eDocente do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, ^fDocente do curso de Farmácia, Unipar, Umuarama-PR.

A *Schinus terebinthifolius* Raddi, pertence à família Anacardiaceae¹, popularmente conhecida como pimenta rosa, pimenta brasileira, Aroeira-vermelha². Nativa da América tropical, no Brasil é encontrada na Mata Atlântica³. Mundialmente suas sementes são utilizadas como condimento alimentar, indicada para recuperação de áreas degradadas, na Europa e Ásia essa planta foi introduzida com fins ornamentais, sendo apreciada por sua beleza e porte⁴. Possui grande importância agroindustrial, seus óleos essenciais são extraídos de diversas partes da planta, com propriedades medicinais, cosméticas, alimentares, bem como compostos químicos com atividades farmacológicas de ação: antibacteriana, antioxidante e antifúngica entre outros⁵. No Óleo essencial de suas folhas já foram identificado mais de 37 constituintes químicos, os compostos majoritários foram germacreno D (25,0%), (E)- β -cariofileno (17,5%) e δ -elemeno (10,5%)⁶. Este trabalho tem como objetivo a extração do óleo essencial oriundo das folhas frescas de *S. terebinthifolius* Raddi, isolar e caracterizar seus compostos químicos, bem como realizar atividades acaricida e larvicida sobre o ácaro *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* e larvicida sobre as larvas e pupa do *Aedes aegypti*. As folhas serão coletadas nas primeiras horas da manhã entre as 7:30 e 9:00 horas, logo após será realizada a limpeza do material, descartando flores, frutos e galhos, deixando apenas as folhas, em seguida será realizada a obtenção do óleo essencial através do método de hidrodestilação⁷. Posteriormente será realizada a coluna cromatográfica para obter as frações majoritárias de compostos químicos do OE através de cromatografia gasosa com detector seletivo de massa (CG-EM) descrita por Adams⁸. A atividade acaricida e larvicida sobre a espécie *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, será realizada através do teste de imersão de adultos e para as larvas o teste de imersão larval⁹. A atividade larvicida será feita com larvas do terceiro estágio e pupas do *Aedes aegypti* por meio da metodologia descrito por Consoli et al.¹⁰. Este trabalho busca componentes bioativos no óleo essencial das folhas frescas da *S. terebinthifolius* para que venha futuramente ser uma alternativa aos larvicida e acaricidas que hoje são comumente tratados com larvicida e acaricidas a base de organofosforados⁵.

REFERÊNCIAS

- 1 CORRÊA. M. P; **Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, v.6, 1984.
- 2 OLIVEIRA, J. L. F. G. et al. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista brasileira de plantas medicinais**. Botucatu, v.15, n.1, p.150-157, 2013.
- 3 SOUZA, V.C; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Plantarum, Nova Odessa. p.640, c2005.
- 4 MENDONÇA, V. M.; MANN, R. S.; RABBANI, A. R. C. Prospecção tecnológica de óleo essencial de aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolia* Raddi). **GEINTEC**. v.4, p.704-7015. 2014.
- 5 SANTOS, A. C. A. et al. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista brasileira de farmacognosia**. v.20, n.2, p.154-159, 2010.
- 6 SANTOS, I. T. B. F. et al. Óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi como controle alternativo de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Lasiodiplodia theobromae*, fungos fitopatogênicos de pós-colheita. **Revista GEINTEC**. São Cristóvão/SE. v.4, n.4, p.1409-1417, 2014
- 7 OLIVEIRA, L. F. M. et al. Tempo de destilação e perfil volátil do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius*) em Sergipe. **Revista Brasileira de plantas medicinais**. Campinas, v.16, n.2, p.243-249, 2014.
- 8 ADAMS R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry**. Illinois: Allured Publishing Corporation, p.467, 1995.
- 9 DRUMMOND, R.O. et al. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus* (Acarine: Ixodidae) in natural and experimental conditions. **Folia Parasitology**. v.37. p.331-336, 1973.
- 10 CONSOLI, R. A. G. B.; Oliveira, R. L. 1.ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Eugenia pyriformis* SOBRE AS LARVAS DO *Aedes aegypti*

Jaqueline Pavelegini de Medeiros^a, Wanessa Bortolucci^a, Jessica Souza de Oliveira^b, Herika, Line Marko de Oliveira^c, Ana Caroline Cirilo^d, Zilda Cristiani Gazim^e

^aMestranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR; ^bDiscente do Curso de Farmácia-PIBIC Unipar; ^cDiscente do Curso de Farmácia-PEBIC-Unipar; ^dAluna PEBIC júnior; ^eDocente do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, cristianigazim@unipar, Unipar, Umuarama-PR

A espécie *Eugenia pyriformis* Cambess, pertencente à família *Myrtaceae*, é uma planta comum nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, conhecida pelo nome popular de uvaia, uvaieira, uvaia-do-campo ou uvalha¹ e os metabólitos secundários extraídos e ou encontrados na folha da *Eugenia pyriformis* apresentam poucos estudos. Nesse contexto, o objetivo desta pesquisa foi investigar a atividade larvicida sobre o *Aedes aegypti* do óleo essencial extraído de folhas da uvaia. As folhas foram coletadas, secas e o óleo essencial (OE) extraído pela técnica de hidrodestilação. A destilação ocorreu por 3 horas, o óleo retirado com sulfato de sódio anidro² e mantido sob refrigeração a 4 °C³. A atividade larvicida foi realizada pelo teste de imersão larval sobre larvas do terceiro estágio do *Aedes aegypti* L. oriundas do (Núcleo de Controle de Endemias Transmissíveis por Vetores - secretaria de vigilância sanitária do município de Umuarama, PR). O OE de uvaia foi testado em sete concentrações diferentes: 25000, 6250, 3120, 1560, 780, 390 e 190 µg.mL⁻¹. Dez larvas no terceiro estágio de *A. aegypti* foram separadas utilizando uma pipeta de Pasteur e colocados em frascos de 250 mL com 10 mL das diferentes concentrações do OE⁴. Para o controle negativo foi utilizada uma solução com polissorbato 80 a 2% e como controle positivo um organofosforado a base de Temephós® na concentração de 400 mg/mL⁵. As larvas ficaram expostas ao OE nas diferentes concentrações por 24 horas⁶. Foram consideradas mortas, aquelas que apresentarem ausência de movimentos e não responderam aos estímulos⁷. Os dados sobre o número de larvas vivas e de larvas mortas foram encontrados através de uma média das três repetições para cada uma das concentrações testadas. OE de uvaia apresentou maior atividade sobre as larvas (taxa de mortalidade %) nas seguintes concentrações: 25000 e 6250 µg.mL⁻¹ com uma taxa de mortalidade de (100 % ± 0,00); 3120 µg.mL⁻¹ (96,06% ± 3,03); 1560 µg.mL⁻¹ (77,78 % ± 4,00); 780 µg.mL⁻¹ (65,00% ± 15,00) ; 390 µg.mL⁻¹ (43,18% ± 6,82) e 190 µg mL⁻¹ (13,30 ± 0,00). Os resultados evidenciaram que o OE de uvaia foi ativo frente às larvas do *A. aegypti*. Este é o primeiro estudo onde é mensurada a atividade larvicida do OE de uvaia frente ao *Aedes aegypti* L. Os resultados são promissores, devido à resistência das larvas frente aos larvicidas convencionais utilizados no controle deste vetor.

REFERÊNCIAS

- ¹ARMSTRONG, L.; DUARTE, M. R.; MIGUEL, O. G. Morpho-anatomy of the leaf and stem of *Eugenia pyriformis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy, São Paulo**, v.22, n. 3, p. 475-481, Jan 2012.
- ²SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. p. 397-425.
- ³OMOLO, M. O. OKINYO, D.; NDIEGE, I. O.; LWANDE, W.; HASSANALI, A. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. **Phytochemistry**. v. 65, p. 2797-2802, 2004.
- ⁴COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.15. n. 4. p. 304–309, 2005.
- ⁵CAMARGO, M.F., SANTOS, A.H., OLIVEIRA, A.W.S., ABRÃO, N., ALVES, R.B.N., ISAC, E. Avaliação da ação residual do larvicida temephós sobre o *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) em diferentes tipos de recipientes. **Revista de Patologia Tropical**. v. 27. p. 65–70, 1998.
- ⁶CARVALHO, A. F. U.; MELO, V. M. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; BANTIM, M. B.; RABELO, E. F. Larvicidal Activity of the Essential Oil from *Lippia sidoides* cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 98. p. 569–571, 2003.
- ⁷BONATO, C. M.; CAVALCA, P. A. M.; LOLIS, M. R. B. Homeopathic and Larvicide Effect of *Eucalyptus cinerea* Essential Oil against *Aedes aegypti*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.53. p. 835–843, 2010.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO E DE FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Brunfelsia uniflora*

Lais de Freitas Jorge¹, Adriano Borges Meniqueti¹, Leticia Ferarrese¹, Jéssica Souza de Oliveira², Hérica Line Marlo de Oliveira², Nelson Barros Colauto³, Zilda Cristiani Gazim³, Giani Andrea Linde³

¹Mestrandos em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, laisfreitas_1987@hotmail.com;

²Alunas do Curso de Farmácia da Unipar, Umuarama-PR; ³Docentes do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR.

Brunfelsia uniflora (Pohl.) D. Don. pertence à família Solanaceae e é conhecida popularmente como Manacá. É encontrada com frequência em diversas regiões do Brasil, sendo a Mata Atlântica o principal local de ocorrência. É utilizada como anti-diarréica, anti-reumática, anti-sifilítica, depurativa, diurética, emética, vermífuga e purgativa¹. As folhas da *B. uniflora* possuem derivados do ácido caféico, um ácido fenólico, com atividade antioxidante². A obtenção de compostos naturais que tenham atividades biológicas como atividade antioxidante, abre novas fronteiras para a obtenção de novos compostos com potencial para aplicações nas indústrias de alimentos, químicas e farmacêuticas. Sendo assim, carece de novos estudos na descoberta de novas substâncias com atividade antioxidante para o extrato etanólico das folhas de *B. uniflora*. O presente trabalho teve como objetivo determinar a atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de *B. uniflora* utilizando o método de DPPH. As folhas de *B. uniflora* foram secas (35°C), pulverizadas e submetidas à maceração em etanol (96%) por 30 dias, concentrado em evaporador rotativo a 50 °C. O extrato foi submetido à separação em coluna cromatográfica em sílica gel com solventes de polaridades crescentes. O extrato bruto e as frações tiveram a capacidade antioxidante determinada pelo sequestro de radicais livres do DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil)³. Os resultados foram analisados por ANOVA e as diferenças entre as médias determinadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Os menores valores de IC₅₀ foram verificados para o extrato bruto, fração diclorometano (100%), fração acetato:metanol (3:7) de 1,95, 2,17 e 2,37 mg mL⁻¹, respectivamente. O valor intermediário foi de 5,18 mg mL⁻¹ para fração metanólica (100%). Já os maiores valores de IC₅₀ foram de 11,50 mg mL⁻¹ para fração acetato:metanol (9:1) e 14,87 mg mL⁻¹ para fração acetato:metanol (8:2). Assim, o extrato bruto e a fração diclorometano, apresentaram menores IC₅₀, e conseqüentemente melhores atividades antioxidantes, quando comparados com as demais frações. Para IC₅₀ são citados valores de 0,2 mg mL⁻¹ para o extrato bruto de *B. uniflora* e 0,090 mg mL⁻¹ para fração acetato de etila⁴. Comparando-se os valores de IC₅₀ descritos na literatura com os obtidos em nosso trabalho pode-se observar que, o extrato das folhas de *B. uniflora* apresenta uma moderada atividade antioxidante pelo método DPPH. O fracionamento do extrato conduziu a uma redução da atividade antioxidante, possivelmente indicando que se tratam de compostos, cuja atividade antioxidante é o resultado de uma ação sinérgica, a qual foi perdida com a separação dos mesmos. Futuros estudos de identificação dos compostos do extrato e das frações obtidas neste trabalho, estão em desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

¹AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.

²MARTINS, M. B. G.; GRAF, R. R.; CAVALHEIRO, A. J.; RODRIGUES, S. D. Caracterização anatômica, química e antibacteriana de folhas de *Brunfelsia uniflora* (manacá). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19. n. 1, p. 106-114, 2009.

³EMBRAPA (2007). **Metodologia Científica**: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH, EMBRAPA, 4p.

⁴QUEIROZ, G. S. **Análise de esteróides em extratos vegetais e estudo fitoquímico e biológico preliminar de *Brunfelsia uniflora***. Florianópolis: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS, 2009.p.45.

PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICELIAL E BIOACUMULAÇÃO DE FERRO POR *Pleurotus ostreatus* EM MEIO LÍQUIDO

Adriano Borges Meniquetti¹, Lais de Freitas Jorge¹, Luan Costa Cavalcante², Leticia Ferarrese¹, Nelson Barros Colauto³, Giani Andrea Linde³.

¹Mestrandos em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR, Umuarama-PR, adrianomeniquetti@hotmail.com; ²Acadêmico do Curso de Química Industrial da UNIPAR, Umuarama-PR; ³Docentes do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR, Umuarama-PR.

Pleurotus ostreatus é um basidiomiceto comestível, fonte de proteínas e vitaminas e com capacidade de bioacumular minerais¹. O ferro é um micronutriente essencial ao funcionamento do organismo humano atuando principalmente no transporte do oxigênio para as células do corpo. A insuficiência de ferro no organismo provoca a anemia ferropriva. Este distúrbio nutricional está associado à mortalidade materna e infantil, à baixa resistência às infecções e alterações no metabolismo e produção hormonal². A capacidade de bioacumulação de metais de *P. ostreatus* pode ser uma ferramenta biotecnológica para a obtenção de alimentos funcionais enriquecidos com o ferro – um íon de alta relevância nutricional para a saúde humana e animal. O presente trabalho tem como objetivo a avaliação da produção de biomassa micelial e bioacumulação de *P. ostreatus* em meio de cultivo líquido adicionado de diferentes concentrações de ferro. Micélio de *P. ostreatus* linhagem (U2-9) pertencente à micoteca do Laboratório de Biologia Molecular – Unipar, com crescimento homogêneo e sem setoriamento foi selecionado como inóculo. O meio líquido (30 mL de extrato de malte 20 g L⁻¹) foi transferido para Erlenmeyer de 250 mL e autoclavado a 121 °C por 20 min e posteriormente adicionado de solução de Fe(SO₄)7H₂O afim de obter concentrações entre 0 e 100 ppm de Fe. O crescimento foi realizado durante 21 dias a 28 ± 1°C. Após o crescimento a biomassa foi separada através de centrifugação a 1699 g a 4°C por 15 min e a biomassa precipitada lavada 3 vezes com 30 mL de água ultra purificada e novamente centrifugada na mesma condição. A biomassa foi seca a 60 °C em estufa com circulação de ar forçada e a concentração de Fe foi determinado em espectrofotômetro de absorção atômica de chama. Os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas entre as médias pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O ferro adicionado ao meio de cultivo afetou a produção de biomassa micelial, sendo que em 90 e 100 ppm houve diminuição do crescimento fúngico ($p \leq 0,05$). A bioacumulação de ferro pela biomassa foi maior nos meios adicionados de 90 ou 100 ppm. Para estas condições a concentração de ferro passou de 0,168 mg Kg⁻¹_{seca} no meio controle para 2.071 mg Kg⁻¹_{seca} e 2.181 mg Kg⁻¹_{seca} respectivamente. Isto representa aumento de até 13 mil vezes em relação ao meio controle. As maiores eficiências de bioacumulação (15,07% e 14,17%) foram obtidas nos meios enriquecidos com 90 e 100 ppm ($p \leq 0,05$). Para biomassa micelial é citado na literatura o aumento de crescimento com adição de Fe até 150 ppm e concentração de Fe em 100 ppm de 1.500 mg Kg⁻¹³, sendo este valor próximo ao encontrado em nosso estudo. O enriquecimento do meio de cultivo líquido com sulfato ferroso promoveu redução da produção de biomassa micelial, em contrapartida aumentou a bioacumulação de Fe. Futuros estudos devem ser realizados para determinação da biodisponibilidade deste mineral para possíveis aplicações.

REFERÊNCIAS

¹PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: Edunisc, p.606, 1998.

²RAW, I.; MENNUCCI, L. **Bases Moleculares da Medicina: Anemias e Outras Doenças Moleculares**. São Paulo: Atheneu, p. 186, 1991.

³ALMEIDA, S. M.; UMEO, S. H.; MARCANTE, R. C.; YOKOTA, M. E.; VALLE, J. S.; DRAGUNSKI, D. C.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Iron bioaccumulation in *Pleurotusostreatus*mycelium. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v.46(1), 2015.

PRODUÇÃO DE LIGNINASES POR BASIDIOMICETOS CULTIVADOS EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Magali Ferreira Tavares^a, Juliana Silveira do Valle^b

^aMestranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR – Umuarama – PR, email: magaliftd@bol.com.br.

^bDocente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR – Umuarama – PR, email: jsvalle@unipar.br

Compostos com estruturas moleculares complexas podem ser degradados através da ação de enzimas fúngicas específicas. Os basidiomicetos degradadores de lignina são importantes devido a sua capacidade em produzir enzimas que atuam em ampla gama de substratos e que podem ser aplicadas na degradação de diferentes compostos¹. O objetivo deste trabalho foi selecionar fungos com potencial para a produção de enzimas ligninolíticas em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. Foram avaliados basidiomicetos pertencentes ao Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAR: *Lentinus crinitus* U9/1, *Lentinus* sp, *Pleurotus ostreatus* U6/9 e Isolado U13/4. A produção enzimática foi feita em meio com 4 g de bagaço de cana estéril, umedecido com 40 mL de solução de: extrato de levedura (6 g/L), KH₂PO₄ (1 g/L); MgSO₄ (0,5 g/L) e FeSO₄ (0,001 g/L). Todos os testes foram feitos em duplicata e mantidos à 28°C por 30 dias. As atividades de lacase², lignina peroxidase (LiP)³ e manganês peroxidase (MnP)⁴ foram determinadas a cada cinco dias. Foram avaliados diferentes métodos para extração enzimática. O bagaço colonizado foi homogeneizado com solução extratora 1:10 (tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5; solução salina NaCl 0,9% m/v; tween 80 0,1% v/v; ou água ultra-pura pH 7,7) em temperatura ambiente por 10 min. O filtrado foi utilizado para determinação das atividades enzimáticas. Avaliou-se a produção de lacase de *L. crinitus* U9/1 na presença de diferentes fontes de carbono (C). O cultivo foi realizado como descrito anteriormente, porém, a solução nutritiva foi suplementada com 1 g/L de: glicose, sacarose, glicerol e manitol. Com base nos resultados do teste anterior, avaliou-se a produção de lacase na presença de diferentes concentrações de glicose (1, 5, 10, 15 e 20 g/L). Todos os ensaios foram realizados em duplicata, a 28°C por 15 dias e a atividade de lacase determinada a cada 5 dias. Três linhagens produziram atividade máxima de lacase no 10º dia: *L. crinitus* U9/1 (4631,5 U/g), *Lentinus* SP (4270,2 U/g) e *P. ostreatus* U6/9 (1491,7 U/g). O Isolado U13/4 produziu 4533,11 U/g em 15 dias. Contudo, as diferenças não foram significativas. A maior atividade de LiP foi observada para *L. crinitus* U9/1 (11,4 U/g) no 25º dia, Isolado U13/4 (5,7 U/g) no 15º dia, *Lentinus* sp. (1,7 U/g) no 10º dia e *P. ostreatus* U6/9 não apresentou atividade. Também não houve diferença significativa ($p < 0,05$). Nenhuma das linhagens apresentou atividade de MnP. As linhagens apresentaram maior produção de lacase, sendo a enzima escolhida para a realização dos próximos testes e *L. crinitus* U9/1 a linhagem que apresentou a maior produção. O uso de diferentes extratores não afetou de forma significativa a produção da enzima, optando-se por usar tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5. *L. crinitus* U9/1 produziu atividade máxima de lacase no 15º dia e na presença de glicose (1679,2 U/g), seguido de manitol (1119,1 U/g), glicerol (1085,5 U/g) e sacarose (451,3 U/g). A produção foi maior que o controle (sem fonte de C), porém, 2,7 vezes menor que no teste de *screening* demonstrando possível perda de vigor do fungo. *L. crinitus* U9/1 apresentou maior atividade de lacase ($p < 0,05$) com 10 g/L (1602,8 U/g no 15º dia) e com 15 g/L de glicose (1296,16 U/g no 5º dia). Sabe-se que a resposta dos fungos à diferentes fontes de C e à sua concentração varia bastante⁵. Fontes de carbono facilmente metabolizáveis, como glicose e manitol, tendem a produzir mais lacase do que fontes lentamente assimiláveis, o que corrobora os resultados observados. Para muitos fungos a glicose é um repressor da produção de lacase e a produção da enzima tem início quando diminui a concentração de açúcar no meio⁵. Novos testes encontram-se em andamento.

REFERÊNCIAS

¹PEREIRA, A.R.B. et al. Biodegradação de corantes e efluentes têxteis por fungos. *Holos Environment*. v. 10, p. 165, 2010.

²HAN, M.J. et al. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, v. 43, p. 555-560, 2005.

³MAGALHÃES, D.B. et al. Colorimetric assay for lignin peroxidase activity determination using methylene blue as substrate. *Biotechnology Tech.* v. 10, p. 273-276, 1996.

⁴KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Letters*, v. 169, p. 247-250, 1984.

⁵MAJEAU, J. et al. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Biores. Technol.* v. 101, p. 2331-2350, 2010.

INFLUÊNCIA DO NITRÔGENIO NA ATIVIDADE DE LACASE DE DIFERENTES LINHAGENS DE *Agaricus blazei*

Genyfer Poline Neri de Souza^a, Juliana Silveira do Valle^b

^aMestranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR – Umuarama – PR, email: pooligp@hotmail.com.

^bDocente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR – Umuarama – PR, email: jsvalle@unipar.br

Lacases (EC 1.10.3.2) são polifenol oxidases capazes de oxidar grande variedade de compostos recalcitrantes e poluentes ambientais e com várias aplicações industriais¹. Basidiomicetos são conhecidos por sua capacidade de produzir lacases² e *Agaricus blazei* apresenta potencial para produção dessa enzima³. A produção de lacase pode ser influenciada pela fonte e concentração de nitrogênio(N), carbono e indutores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da concentração de N na atividade de lacase de linhagens de *A. blazei* em cultivo submerso. Cinco linhagens de *A. blazei* (U2/1, U2/2, U2/7, U7/1, U7/3) pertencentes ao Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAR foram cultivadas em duplicata em frascos (250 mL) contendo 100 mL de meio estéril composto por (g/L): KH₂PO₄ (1,5), MgSO₄ (0,5), KCl (0,5), FeSO₄.H₂O (0,036), ZnSO₄.H₂O (0,035), glicose (10) e ureia (6)⁴. Após inóculo, os ensaios foram mantidos por 30 dias a 28 °C, no escuro. A atividade de lacase foi determinada a cada três dias segundo Han et al.⁵. Duas linhagens (U7/1 e U2/2) com as maiores atividades de lacase foram analisadas quanto ao efeito da concentração de N, bem como do modo de cultivo (estático ou agitado). O cultivo foi feito como descrito anteriormente, porém, os ensaios foram mantidos por 45 dias com concentrações de ureia de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 g/L sob agitação (90 rpm) e em cultivo estático. A maior atividade de lacase ($p < 0,05$) foi observada para *A. blazei* U2/1 (6036 U/L no 30° dia). As linhagens U2/2, U7/1 e U7/3 também apresentaram elevada produção, com pico de atividade no 30° dia (5723 U/L, 5400 U/L e 5388 U/L, respectivamente). Contudo, a linhagem U7/1 apresentou produção elevada a partir do 18° dia (5076 U/L). *A. blazei* U7/1 produziu mais lacase ($p < 0,05$) com 2 g/L de ureia e sob agitação (23969 U/L no 30° dia), produção 4,4 vezes maior que o controle. A atividade de lacase observada para *A. blazei* U2/2 revelou-se totalmente diferente da observada para *A. blazei* U7/1. A produção em cultivo estático foi maior ($p < 0,05$) que sob agitação em todas as concentrações de N. No cultivo estático o meio sem adição de N teve pico de atividade de 36949 U/L em 40 dias, sob agitação o mesmo meio produziu 8961 U/L em 45 dias. Contudo, em cultivo estático, o meio com 8 g/L de ureia apresentou alta atividade de lacase (18473 U/L no 25° dia). O efeito da concentração de N na produção de lacase varia de acordo com a espécie e linhagem fúngicas⁶. Estudos anteriores observaram maior produção de lacase de *A. blazei* quando a concentração de N era menor (2 g/L)³ contudo, em meio de cultivo distinto, *A. blazei* U2/1 produziu mais lacase quando maiores concentrações de N eram fornecidas⁷. Sabe-se que o N afeta a produção de lacase em nível transcricional, porém, a quantidade de N no meio afeta de formas distintas a produção de lacase. Sequências consenso correspondentes a sítios de ligação de proteínas NIT2, envolvidas na regulação do metabolismo de N, foram localizadas em promotores de genes de lacase⁶ sugerindo seu envolvimento na expressão gênica. Os resultados para *A. blazei* U2/2 sugerem que esta linhagem possa estar expressando isoenzimas distintas, dependendo das condições de cultivo. O perfil isoenzimático de lacase será analisado posteriormente para as linhagens testadas de *A. blazei*.

REFERÊNCIAS

- ¹RODRÍGUEZ, S. et al. Tratamiento de efluentes industriales coloreados com *Pleurotus spp.* **Rev. Iberoam. Micol.** v.20, p.164–168,2003.
- ²FERNANDES, L. et al. In vitro wood decay of *Eucalyptus grandis* by the basidiomycete fungus *Phellinus flavomarginatus*. **Int. Biodeter. Biodegr.** v.55, p.187-193,2005.
- ³VALLE, J. S. et al. Optimization of *Agaricus blazei* laccase production by submerged cultivation with sugarcane molasses. **Afr. J. Microbiol. Res.** v. 8, p. 939-946, 2014.
- ⁴PONTECORVO, G. et al. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. **J. Gen. Microbiol.** v. 8, p. 198-210, 1953.
- ⁵HAN, M.J. et al. Purification and characterization of laccase from the whiterot fungus *Trametes Versicolor*. **J. Biotechnol.** v. 43, p. 555-560, 2005.
- ⁶GIARDINA, P. et al. Laccases: a never-ending story. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 67, p. 369–385, 2010.
- ⁷D'AGOSTINI, E.C. et al. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Sci. Agric.** v.68, p. 295-300, 2011.

ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL

Pâmela Marangon Rapachi^a, Juliana Silveira do Valle^b

^aMestranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR, Umuarama-PR, pamelamarangon@hotmail.com; ^bDocente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR, Umuarama-PR

Acredita-se que toda planta apresente relação de simbiose com fungos endofíticos, que são aqueles capazes de colonizar tecidos internos de um vegetal sem causar doença e, embora estudos tenham demonstrado que endofíticos podem produzir as mesmas substâncias bioativas das hospedeiras, apenas uma pequena quantidade tem sido analisada quanto ao seu potencial biotecnológico, especialmente para a produção de enzimas de interesse industrial¹. Enzimas derivadas de microrganismos são conhecidas e usadas desde a antiguidade principalmente na produção de alimentos e na manufatura de *commodities*². O setor têxtil representa um dos setores industriais mais poluidores, por meio do volume e da composição dos efluentes gerados³. A utilização de enzimas na descoloração e detoxificação de efluentes têxteis têm se tornado cada vez mais uma alternativa aos métodos convencionais, pois sua ação de biocatálise permite a reintrodução desse resíduo no meio ambiente⁴. *Brunfelsia uniflora*⁵ (Solanaceae), popularmente conhecida como manacá, é uma planta nativa do sul e sudeste do Brasil e de países como Bolívia, Peru, Equador, Venezuela. Não há estudos sobre o isolamento ou diversidade de fungos endofíticos dessa espécie. Para tanto, o objetivo do presente trabalho é estudar a comunidade de fungos endofíticos de *B. uniflora* com potencial para a produção de enzimas de interesse industrial bem como com capacidade para a degradação de corantes têxteis. Folhas de *B. uniflora* serão coletadas no Horto Medicinal da UNIPAR, Umuarama-PR, lavadas em água corrente e duas vezes em água destilada estéril. Em seguida terão as superfícies limpas em banho de etanol 70% (v/v) por 1 min, hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 3 min e etanol 90% (v/v) por 30 s. Em seguida serão lavadas duas vezes em água destilada estéril. Após, serão cortadas em fragmentos de 3-5 mm² em condições estéreis, transferidas para placas com meios de cultivo definidos contendo tetraciclina e fontes de carbono específicas para seleção de fungos produtores de proteases e lacase, e mantidas a 28 °C. Os isolados selecionados serão inoculados em meio líquido com fontes de carbono adequadas à produção de proteases e lacases e mantidos sob temperatura controlada para obtenção de enzima para os ensaios enzimáticos quantitativos. Para determinação da atividade proteolítica 0,5 mL do meio líquido filtrado serão misturados à caseína (2% m/v) e mantidos por 20 min em temperatura controlada. Após a hidrólise será adicionado 1 mL de ácido tricloroacético e a mistura será centrifugada para remoção do precipitado. Nosobrenadante serão determinados os peptídeos liberados pela reação de Lowry utilizando Folin Ciocalteu. A atividade de lacase será avaliada pela oxidação de solução (1 mM) de ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato). 0,2 mL do meio de cultivo serão misturados com 0,7 mL de água, 0,45 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0) e 0,15 mL de ABTS. A mistura será mantida a 30 °C por 10 min e a reação será interrompida pela adição de solução de ácido tricloroacético. A oxidação do ABTS será acompanhada pelo aumento da absorvância a 420 nm ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade (U) de atividade enzimática será definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto. Todos os ensaios serão realizados em triplicata e a diferença entre as médias determinadas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

REFERÊNCIAS

- ¹URAIUJ, C.; KHANONGNUCH, C.; LUMYONG, S. Lignolytic enzymes from tropical endophytic liliaceae. **Fungal Diversity**, v. 13, p. 209-219, 2003.
- ²AFAF, S. F. et al. Characterization of a cysteine protease from wheat *Triticum aestivum* (cv Giza164). **Bioresource Technology**, v. 91, n. 3, p. 297-304, 2004.
- ³KUNZ, A.; PERALTA-ZAMOTRA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de Efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.
- ⁴NIEBISCH, C. H. et al. Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extra cellular extract. **Journal of Hazardous Materials**, V. 180, p. 316-322, 2010.
- ⁵ALTHAUS-OTTMANN, M. M.; LEAL, L.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Propagação vegetativa de manacá (*Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 12, n. 1, p. 31-36, 2006.

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DELACASE EM *Lentinus crinitus*

Renan Alberto Marim^a e Juliana Silveira do Valle^b

^aMestrando em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR, Umuarama-PR, renan.marim@hotmail.com^b
^bDocente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR, Umuarama-PR.

As lacases (EC 1.10.3.2, benzenodiol: oxigênio oxido redutase) são enzimas encontradas em fungos da podridão branca da madeira. Essa enzima catalisa reações de oxidação, na ausência de H₂O₂ utilizando a redução de oxigênio à água e uma grande variedade de compostos fenólicos como doadores de elétrons. Isso torna a lacase uma enzima interessante para diversas aplicações industriais como na indústria de alimentos, no tratamento de efluentes, descoloração de corantes entre outras. Muitos genes codificadores dessa enzima têm sido isolados e caracterizados. Vários genes de lacase organizados em famílias gênicas são comuns em várias espécies de fungos, além da produção de diferentes isoenzimas¹. A expressão isoenzimas de lacase é diferencialmente regulada e depende das condições de cultivo e de estados fisiológicos. Sabe-se que o basidiomiceto *Lentinus crinitus* é capaz de produzir grandes quantidades desta enzima, quando cultivado em diferentes condições e na presença de diversos resíduos agroindustriais². Visando esclarecer aspectos da expressão gênica de lacases de *L. crinitus*, este trabalho tem como objetivo realizar a análise da expressão de genes de lacase de *L. Crinitus* em diferentes condições de cultivo. A linhagem *L. crinitus* U9/1, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Paranaense (UNIPAR) será analisada. A produção de lacase será realizada em diferentes condições de cultivo e na presença de diferentes resíduos agroindustriais: casca de café, polpa cítrica³, vinhaça de cana-de-açúcar⁴ e melaço de cana-de-açúcar², segundo as condições descritas pelos autores. O RNA total será isolado a partir do micélio do fungo com auxílio do Ki tRNeasy plant mini kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e pureza do RNA serão determinadas pela absorbância a 260nm e 280nm em espectrofotômetro (unidade de densidade óptica = 40 mg/RNA/L). A integridade e distribuição de tamanho do RNA total extraído serão verificadas por eletroforese em gel de agarose (1,2% m/v) previamente corado com brometo de etídeo. A síntese de cDNA será realizada com o uso do kit Qiagen One Step RT-PCR Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante e serão utilizados primers específicos para a amplificação de genes de lacase⁵. Como controle interno será utilizada a amplificação dos cDNAs expressos do gene de β-tubulina⁶. A análise semi-quantitativa da expressão de lacase será realizada em gel de agarose 1,2%(m/v) previamente corado com brometo de etídeo empregando-se alíquotas das reações de RT-PCR⁶. A quantificação dos produtos de amplificação obtidos será realizada por análise de densitometria (de cada banda obtida a partir das amplificações) sob luz UV com o uso do programa LabImage1D (Loccus Biotecnologia).

REFERÊNCIAS

- ¹PISCITELLI, A. et al. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 4, p. 252-262, 2010.
- ²VALLE J. S.; Optimization of *Agaricus blazei* laccase production by submerged cultivation with sugarcane molasses. **African Journal of Microbiology Research**. v.8 p. 939-946. 2014
- ³ALMEIDA, P. H., VALLE, J. S. **Produção de Lacase por *Lentinus crinitus* cultivado em diferentes resíduos agroindustriais**. Dissertação de mestrado. Universidade Paranaense. Umuarama, 2014.
- ⁴SANTANA, T. T., VALLE, J. S. **Produção de Lacase de *Lentinus crinitus* com vinhaça de cana e seu potencial na descoloração de corantes**. Dissertação de mestrado. Universidade Paranaense. Umuarama, 2015.
- ⁵SODEN, D.M.; DOBSON, A.D.W. The use of amplified flanking region-PCR in the isolation of laccase promoter sequences from the edible fungus *Pleurotus sajor-caju*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 553-562, 2003.
- ⁶CHOQUER, M.; BOCCARA, N.; VIDAL-CROS, A. A semi-quantitative RT-PCR method to readily compare expression levels within *Botrytis cinerea* multigenic families *in vitro* and *in planta*. **Current Genetics**, v. 43, p. 303-309, 2003.

FATORES QUE AFETAM O RENDIMENTO E A COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO TOMILHO (*Thymus vulgaris*)

Elisângela Melato^a, Everton Merlin^a, Rayane Monique Sete da Cruz^b, Stéfany Meneguetti^c, Túlio de Souza Santos^c, Elizeu Junior da Silva^c Odair Alberton^d

^aMestranda(o) em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, elisangelamelato@hotmail.com; ^bDocente do Curso de Química Industrial, Unipar, Umuarama-PR; ^cDocente do Curso de Agronomia, Unipar, Umuarama-PR; ^dDocente do programa de pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR.

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é uma planta medicinal, aromática e condimentar, pertencente à família Lamiaceae, originária da Europa e cultivada no sul e sudeste do Brasil¹. A família Lamiaceae possui 150 gêneros, com aproximadamente 2800 espécies, distribuídas no mundo inteiro, das quais destacam as espécies utilizadas como condimentos, como a sálvia (*Salvia officinalis*), o manjeriço (*Ocimum basilicum*), o orégano (*Origanum vulgare* L.), a manjerona (*Origanum majorana* L.), entre outras². Este trabalho tem como objetivo fazer uma revisão sobre a atividade biológica do óleo essencial de tomilho na qual estão relacionados com o timol e o carvacrol, seus principais constituintes. O timol tem demonstrado efeitos antibacterianos, antifúngicos e anti-helmínticos, enquanto o carvacrol tem sido estudado por seus efeitos bactericidas³. As atividades antifúngicas, pesticidas e antibacterianas do óleo essencial de tomilho foram demonstradas por diversos estudiosos. O timol é o composto majoritário, seguido pelo carvacrol^{1,3,4}. Desta forma pode se observar que o seu rendimento e sua composição química pode variar significativamente assim depende de diversos fatores que influenciam na qualidade do óleo essencial das plantas medicinais aromáticas e condimentares, tais como variações climáticas, solo, época de colheita, características genéticas da planta, condições de secagem e armazenamento⁴. A etapa de secagem merece atenção especial, porque o seu manejo afetará a preservação do produto e, conseqüentemente, a sua qualidade comercial. Dado que o processo de secagem influencia diretamente a qualidade e a quantidade dos condimentares, na qual seu objetivo é avaliar a influência de diferentes temperaturas do ar de secagem sobre a qualidade do óleo essencial das folhas de tomilho, visando a encontrar condições ótimas de processamento dessa importante planta utilizada como condimento⁴. Com a influência de diferentes tipos de adubos orgânicos deve se determinar a composição do crescimento e a sua produtividade relacionada ao tomilho essa planta submeteu se a esse tipo de fertilização para que possa se ter um melhor rendimento junto ao teor de óleo essencial². O acúmulo de biomassa aérea e da quantidade e qualidade de óleos essenciais que podem ser obtidos a partir de tomilho sob adubação orgânica e mineral deve ser baseada em dias de colheita⁵. A colheita das folhas deve começar quando a planta estiver bem desenvolvida, o que ocorre geralmente de 60 a 90 dias após o plantio, mas o ideal é colher quando a planta está florescendo, pois é quando a concentração dos óleos essenciais é máxima, e as flores também podem ser utilizadas como condimento^{1,4}.

REFERÊNCIAS

- ¹JAKIEMI, E.A.R.; SCHEER, A.P.; OLIVEIRA, J.S.; CÔCCO, L.C.; YAMAMOTO, C.I.; DESCHAMPS, C. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 683–688, 2010.
- ²BORGES, A.M.; PEREIRA, J.; CARDOSO, M.G.; ALVES, J.A.; LUCENA, E.M.P. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Plants Medicinai**. v.14, p.656–665, 2012.
- ³HENDAWY, S.F.; AZZA, A.; EL-DIN, E.; AZIZ, E.E.; OMER, E.A. Productivity and oil quality of *Thymus vulgaris* L. under organic fertilization conditions. **Ozean Journal of Applied Sciences**. v. 3, p. 203–216, 2010
- ⁴ROCHA, R.P.; MELO, E.C.; BARBOSA, L.C.A.; CORBIN, J.B.; BERBEI, P.A. Influência do processo de secagem sobre os principais componentes químicos do óleo essencial de tomilho. **Revista Ceres**. v. 59, p. 731–737, 2012
- ⁵JUAREZ-ROSETE, C.R.; AGUILAR-CASTILHO, J.A.; RODRIGUEZ-MENDOZA, M.N. Fertilizer source in biomass production and quality of essential oils of thyme (*Thymus vulgaris* L.). **European Journal of Medicinal Plants**. v. 4, p. 865–871, 2014.

MICORRÍZA, ÁCIDO HÚMICO E FÓSFORO NO CRESCIMENTO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum gratissimum*

Fabiola Bogoni Mundstock Mohr^a, Caroline Lermen^b, Odair Alberton^c

^aMestranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, fabih_bm@hotmail.com;

^aDoutoranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR; ^cDocente do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR

A planta *Ocimum gratissimum*, popularmente conhecida como alfavaca, alfavacão ou alfavaca cravo, pertence a família Labiatae (Lamiaceae). Caracteriza-se por ser um arbusto de até um metro de altura e suas folhas apresentam-se ovaladas e de bordos dentados e flores de coloração arroxeada, dispostas em ramos. Utilizada como planta aromática, condimento para alimentos, estimulante, diurética, antisséptica, antifúngica e antibacteriana¹. Observa-se em sua constituição química a presença de óleo essencial (OE), o qual detém como composto majoritário o eugenol². Para que a produção de OE ocorra em maior quantidade, pode-se utilizar a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), associados a adição de fósforo (P) e ácido húmico (AH) ao solo. O uso de OE pode ser uma alternativa para o controle de microrganismos, pois o uso de agentes químicos está intimamente ligado à contaminação do meio ambiente e a resistência aos antimicrobianos utilizados^{3,4}. Sendo assim o objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos da inoculação de FMA, com e sem a adição de P e ao AH e determinar a densidade de esporos e a colonização radicular por FMA, o desenvolvimento da planta, índice de clorofila, além do rendimento e, composição química do OE e sua ação antimicrobiana. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 6 repetições por tratamento em um fatorial de 2x2x2 (Com e sem FMA, P e AH no solo), num total de 48 unidades experimentais. A quantidade de P utilizada foi de 200 mg de P kg⁻¹ e AH foi de 0,6 mL nos vasos com 6 Kg de solo autoclavado e adicionado duas mudas de alfavaca por vaso⁵. O experimento encontra-se em casa de vegetação, localizada no campus da faculdade UNISEP, no município de Dois Vizinhos – PR. As plantas são irrigadas diariamente em três períodos do dia e apresentam-se em período de desenvolvimento. O experimento encontra-se em fase de execução e tem expectativa de ótimos resultados e conclusões.

REFERÊNCIAS

¹FARIA, T.J. FERREIRA, R.S; YASSUMOTO, L.; SOUZA, J. R. P.; ISHIKAWA, N. K.; BARBOSA, A. M. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Brazilian archives of biology technology**, v. 49,n. 6, p.867-871. 2006

²LORENZI,H.; MATOS, F.J. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008

³FREITAS, M. S. M.; MARTINS, M. A.; VIEIRA, I. J. C. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v, 39, no 9, 2004.

⁴PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Trans. Br. Mycol. Soc.** v. 55 p. 157–160, 1970.

⁵QUAGGIOTTI, S.; RUPERT, B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V.; NARDI, S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). **J. Experimental Botany**, no 55, p.803-813, 2004.

RENDIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* INOCULADA COM MICORRHIZA SOB DIFERENTES DOSES DE CHUMBO

Caroline Lermen^a, Fabíola Bogoni Munstock Mohr^b, Odair Alberton^c

^aDoutoranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, carolinelernen@hotmail.com;

^bMestranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, ^cDocente do Programa de pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR.

O capim limão, *Cymbopogon citratus* Stapf é uma planta utilizada para fins medicinais e aromáticos, porém pouco se conhece sobre o efeito da associação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e como a presença de metais pesados (MPs) como o chumbo (Pb) pode afetar seu metabolismo^{1,2,3,4}. O objetivo deste estudo foi avaliar o rendimento e a composição do óleo essencial (OE) de capim limão inoculado ou não com o FMA *Rhizophagus clarus* sob cinco níveis de Pb no solo. O experimento foi conduzido em casa de vegetação durante seis meses. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições em fatorial (5 doses de nitrato de Pb II: 0, 50, 100, 500 e 1000 mg de Pb kg⁻¹ de solo, com ou sem a inoculação de FMA) num total de 50 unidades experimentais⁴. Foram determinados o rendimento do OE e a avaliação dos seus constituintes químicos através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os metabólitos secundários sofreram influência tanto pela presença de Pb no solo, como pela presença do FMA *R. clarus*, alterando o rendimento e a composição química do OE. A adição de 500 a 1000 mg de Pb kg⁻¹ de solo e a inoculação do FMA aumentou o rendimento do OE para até 0,69%. Foram identificados 21 componentes no OE e à medida que as doses de Pb foram aumentando, a planta alterou seu metabolismo, ocorrendo a mudança do composto majoritário. Quando a planta não estava inoculada com FMA, o constituinte majoritário foi o citral, variando em concentração de 36,66 a 45,08% em baixa dose de Pb, já quando a planta foi inoculada com FMA o constituinte majoritário passou a ser o geranial, variando em concentração de 39,27 a 58,97% e em doses maiores de Pb a planta apresentou o geranial entre 43,43 a 62,95% não importando se a planta estava ou não inoculada com FMA. Maiores níveis destes constituintes, citral e geranial são de interesse comercial para as indústrias de aroma e fragrância¹. Além disso, o citral é matéria prima para a síntese de iononas e vitamina A.

REFERÊNCIAS

¹COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 956–959, 2005.

²AUDET, P.; CHAREST, C. Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. **Environment Pollution**, v. 147, p. 609–14, 2007.

³GARG, N.; AGGARWAL, N. Effect of mycorrhizal inoculations on heavy metal uptake and stress alleviation of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Genotypes grown in cadmium and lead contaminated soils. **Plant Growth Regulation**, v. 66, p. 19–26, 2012.

⁴LERMEN, C.; MOHR, F. B. M.; ALBERTON, O. Growth of *Cymbopogon citratus* inoculated with mycorrhizal fungi under different levels of lead. **Scientia Horticulturae**, v. 186, p. 239–246, 2015.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DO TOMILHO (*Thymus vulgaris*)

Everton Merlin^a, Elisangela Melato^a, Rayane Monique Sete da Cruz^b, Stéfany Meneguetti^c, Túlio de Souza Santos^c, Elizeu Junior da Silva^c, Odair Alberton^d

^aMestranda(o) em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, evertonmerlin@hotmail.com;

^bDocente do Curso de Química Industrial, Unipar, Umuarama-PR; ^cDocente do Curso de Agronomia, Unipar, Umuarama-PR; ^dDocente do programa de pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR.

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é uma planta da família Lamiaceae que compreende cerca de 350 espécies¹. Muitas das espécies introduzidas no Brasil são plantas medicinais, aromáticas e produtoras de óleos essenciais^{1,2}. Este trabalho tem como objetivo revisar a eficácia do óleo essencial de tomilho na atividade antimicrobiana. A utilização de óleo essencial de tomilho como agente antifúngico mostrou-se eficiente como inibidores de *Aspergillus niger* e *A. Flavus*, dois fungos importantes na indústria de alimentos^{2,3,4}. Quando estudado o *A. niger*, o óleo essencial de tomilho reduziu o crescimento fúngico, quando utilizou-se 2 mL / 18 mL de meio de cultura, embora o total de inibição foi apenas quando 8 mL foi usado. Para inibir crescimento *A. flavus*, óleo essencial de tomilho reduziu o crescimento micelial a 2,4 e 6 mL. A inibição foi total em 8 mL, isso significa que *A. Flavus* é sensível ao óleo essencial de tomilho⁵. Este óleo essencial pode ser utilizado como agente antifúngicos, sendo a principal razão para a sua adequação, a sua origem natural, que os consumidores encontrar reconfortante e que é benéfico para o meio ambiente, e possui um risco muito baixo de patógenos que irão desenvolver resistência à mistura de componentes que fazem o óleo com sua aparente diversidade de mecanismos de antifúngicos³. O óleo essencial de tomilho mostrou 60% de inibição a concentração 10 mL⁻¹ contra *Alternaria brassicicola* e apresentou quase 100% de inibição em 1 mL⁻¹ contra a algumas espécies de fungos². O mais prevalente composto de tomilho é o timol (44,60%), sendo o timol e carvacrol são isômeros posicionais com os seus grupos hidroxilo fenólicos em diferentes locais⁶. Estes resultados confirmam o potencial uso do óleo essencial de tomilho na indústria para a preservação de alimentos contra fungos e bactérias, além de aumentar a vida de prateleira de gêneros alimentícios⁷.

REFERÊNCIAS

¹MAKSIMOVIC, Z.; STOJANOVIC, D.; SOSTARIC, I.; DAJIC, Z.; RISTIC, M. Composition and radical-scavenging activity of *Thymus glabrescens* Willd. (Lamiaceae) essential oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 88, p. 2036–2041, 2008.

²MATUSINSKY, P.; ZOUHAR, M.; NOVY, P. Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of cereals. **Industrial Crops and Products**. v. 67, p. 208–215, 2015.

³JAKIEMI, E.A.R.; SCHEER, A.P.; OLIVEIRA, J.S.; CÔCCO, L.C.; YAMAMOTO, C.I.; DESCHAMPS, C. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 683–688, 2010.

⁴PESAVENTO, et al. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**. v. 54, p. 188–199, 2015.

⁵ROCHA, R.P.; MELO, E.C.; BARBOSA, L.C.A.; CORBIN, J.B.; BERBEI, P.A. Influência do processo de secagem sobre os principais componentes químicos do óleo essencial de tomilho. **Revista Ceres**. v. 59, p. 731–737, 2012.

⁶Rota et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**. v. 19, p. 681–687, 2008.

⁷VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. **Journal of Food Safety**. v. 27 p. 91–101, 2007.

FUNGOS NEMATÓFAGOS COMO AGENTES BIOCONTROLADORES DE NEMATOIDES

^aElizeu Junior da Silva, ^bSimone Melo Santana Gomes

^aAcadêmico do Curso de Engenharia Agrônômica, UNIPAR, Umuarama-PR; elizeujunior17@gmail.com;

^bDocente do Curso de Engenharia Agrônômica, UNIPAR, Umuarama-PR.

O desenvolvimento da agricultura moderna, associado ao manejo das culturas, ao uso indiscriminado de agrotóxicos e a monocultura, originaram vários tipos de pragas. Buscando solucionar tal questão de maneira eficiente sem causar prejuízos ambientais tem-se empregado o controle biológico. Esse método quando comparado a outros métodos de controle apresenta inúmeras vantagens. Uma das alternativas dentro desse tipo de controle é a utilização de agentes biológicos para o controle de fitonematoides. Diversos são os inimigos naturais dos fitonematoides CARNEIRO (1992)¹. Os fungos nematófagos recebem maior destaque pelo fato de possuírem a capacidade de capturar, matar e digerir os nematoides e/ou ovos (LOPES et. al. 2007)². Vários estudos têm demonstrado o potencial destes organismos como agentes biocontroladores de nematoides. O presente trabalho tem por objetivo destacar os princípios básicos da utilização de fungos nematófagos como agentes no controle biológico de fitonematoides por meio de uma pesquisa bibliográfica. Segundo Jatala(1986)³, aproximadamente 75% dos antagonistas já identificados, são fungos encontrados normalmente nos solos e inofensivos às culturas. Naturalmente os solos apresentam uma grande variedade e população de fungos nematófagos. Dentre esses são conhecidos cerca de 70 gêneros e 160 espécies capazes de utilizar nematoides em sua alimentação (QUADRI, 1989)⁴. Os fungos nematófagos são divididos em três grupos de acordo com a sua estratégia de parasitismo. São ectoparasitos ou predadores quando capturam os nematoides utilizando hifas modificadas na forma de armadilha. Recebem o nome de endoparasitos aqueles que penetram pelas aberturas naturais do corpo dos nematoides utilizando pequenos conídios. Os oportunistas ou ovicidas parasitam ovos e cistos e, por último, aqueles que produzem metabólitos tóxicos aos nematoides (MORGAN-JONES; RODRIGUEZ-KÁBANA, 1987)⁵. Em geral, esses fungos são mitospóricos. Para Gray (1988)⁶, os fungos nematófagos predadores são os mais promissores, destacando-se pela facilidade de se estabelecerem no solo, pelas suas habilidades saprofíticas, além da facilidade de crescimento *in vitro*. As espécies do gênero *Arthrobotryss* são consideradas um dos grupos mais importantes de fungos nematófagos predadores, sendo citada por diversos autores. Todavia, a utilização de somente uma espécie de fungos não vem demonstrando a mesma eficiência encontrada no uso de duas ou mais espécies. Recomenda-se então que se faça um coquetel de fungos nematófagos para tal aplicação. INOMOTO (2009)⁷, destaca a importância de se conhecer a espécie de nematoide a ser controlada, pois o manejo está em função das características de cada espécie.

REFERÊNCIAS

- ¹CARNEIRO, R.D.G.; Princípios e tendências do controle biológico de nematoides com fungos nematófagos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, s/n, p.113-121, abr.1992.
- ²LOPES, E. A., S. Ferraz, P. A. Ferreira, L. G. Freitas, Dhingra, O. D., Gardiano, C.G. & Carvalho, S. L.; Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia brasileira**, Piracicaba, Vol. 31(2),p. 20-26, 2007.
- ³JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 453-489, 1986.
- ⁴QADRI, A. N. **Fungi associated with sugarbeet cyst nematode in Jerash**, Jordan. Master's thesis, University of Jordan, 1989.
- ⁵MORGAN-JONES, G.; RODRÍGUEZ-KABANA, R. Fungal biocontrol for the management of nematodes. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (Eds.). **Vistas on Nematology**. Hyattsville: Society of Nematologists Inc., 1987. p. 94-99.
- ⁶GRAY, N. F. Fungi attacking vermiform nematodes. In: POINAR JUNIOR, G. O.; JANSSON, H. G. **Disease of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988, v. 2, p. 3-38.
- ⁷INOMOTO, M. M. Importância do manejo de *Pratylenchus brachyurus*, como manejar nematoides em soja. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 108, p. 4-9, 2009.

PREPARO DE SOLO PROFUNDO LOCALIZADO EM CANA-DE-AÇÚCAR: RELAÇÃO DA ESTRUTURA DO SOLO COM PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

Caroline Zanella Cagnini^a, Adriana Pereira da Silva^b.

^aMestranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, carolcagnini@hotmail.com; ^bDocente do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância na economia do país, e vem ganhando força impulsionada pela crescente demanda de combustível renovável como é o caso do etanol. O Brasil deverá ter um aumento na produção de 3,1% em relação à safra passada, produzindo em torno de 654,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar¹. Desse modo, há uma busca constante por técnicas que garantam a sustentabilidade dos sistemas agrícolas e melhorem a qualidade do solo². O manejo do solo pode influenciar características físicas, químicas e microbiológicas principalmente nas camadas superficiais, fazendo com que áreas idênticas submetidas a diferentes manejos, apresentem variabilidade quanto à estrutura do solo, com efeito direto na produtividade das culturas³. Os microrganismos respondem rapidamente a essas alterações no solo sendo comumente utilizados como indicadores de qualidade de solo. A microbiota desempenha papel importante na formação e manutenção da estrutura do solo, sendo que o carbono da biomassa microbiana apresenta forte correlação com a estabilidade de agregados. O objetivo do presente trabalho será avaliar o impacto de diferentes sistemas de manejo na qualidade de um Latossolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar, através da análise do estado físico-estrutural do solo a campo e da quantificação de parâmetros microbiológicos. O estudo será estabelecido em uma área agrícola na cidade de Cidade Gaúcha, região Noroeste do estado do Paraná. Será analisado o efeito do preparo de solo profundo localizado (PSPL) com o uso do implemento penta em talhões de cana-de-açúcar com e sem adição de vinhaça. Para avaliação da estrutura do solo será utilizada a metodologia do perfil cultural⁴. Será utilizado o método de fumigação-extração para a análise do carbono da biomassa microbiana⁵ (CBM), e com o mesmo extrato será realizada a análise do nitrogênio da biomassa microbiana (NBM)⁶. As análises serão realizadas em solo úmido com a capacidade de campo previamente ajustada. Cinco repetições de cada tratamento serão usadas para as análises do CBM e NBM. Serão realizadas duas reações de amplificação do DNA total do solo para a região que codifica o gene 16S rRNA, a fim de se verificar a composição da comunidade bacteriana do solo⁶. O gel será preparado em um aparato de DGGE (Bio-Rad DCode). A corrida eletroforética será realizada a 100 V por 16 h. Após a corrida, os géis serão corados com brometo de etídio e fotografados sob radiação. As amostras de solo também serão destinadas à análise química, e para isso, serão secas em estufa ventilada a 60°C por 48 h, desagregadas e peneiradas em malha de 2mm. O carbono orgânico do solo (COS) e o nitrogênio total do solo (NT) serão determinados por combustão no FLASH 200 NC Analyzer (Thermo Scientific). O experimento encontra-se em fase de planejamento e será iniciado no segundo semestre de 2015.

REFERÊNCIAS

¹Companhia Nacional de Abastecimento. CONAB. **Avaliação da safra agrícola de cana-de-açúcar – 1º estimativa – Abril de 2014**. Disponível em: (http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_09_39_02_boletim_cana_portugues_-_1o_leve_-_15-16.pdf)>. Acesso em: 14 de Abril de 2015.

²BAUDRON, F.; JALETA, M.; OKITOI, O.; TEGEGN, A. Conservation agriculture in African mixed crop-livestock systems: Expanding the niche. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 187, p. 171-182, 2014.

³CORÁ, J.E., ARAÚJO, A.V., PEREIRA, G.T., BERARDO, J.M.G. Variabilidade espacial de atributos do solo para adoção de sistemas de agricultura de precisão na cultura da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.1013-1021, 2004.

⁴TAVARES FILHO, J.; RALISCH, R.; GUIMARÃES, M.F.; MEDINA, C.C.; BALBINO, L.C.; NEVES, C.S.V.J. Método do perfil cultural para avaliações do estado físico de solos em condições tropicais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p. 393-399, 1999.

⁵VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry**, v.19, p.703-707, 1987.

⁶BABUJIA, L.C.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; BROOKES, P.C. Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 2174-2181, 2010.

EFEITO DE PLANTAS DE COBERTURA EM ALTERAÇÕES FÍSICAS E MICROBIOLÓGICAS DO SOLO DECORRENTE DO PREPARO DE SOLO PROFUNDO LOCALIZADO NA REGIÃO DO ARENITO CAIUÁ

Ivana Kelly Cintra Reinisz^a, Patricia Fernanda Augusto da Motta Novello^a, Adriana Pereira da Silva^b.

^aMestranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, ivanakcr@hotmail.com; ^bDocente da Pós Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR.

A região Noroeste do Paraná apresenta solos derivados do arenito Caiuá, os quais representam 71,4% da área da região e, em sua maioria, são caracterizados por apresentarem textura superficial franco-arenosa, com baixos teores de argila e reserva mineral, bem como baixos teores de matéria orgânica, o que confere aos solos dessa região elevada suscetibilidade à erosão¹. O manejo do solo é um componente fundamental do sistema de produção e uma importante ferramenta para uma atividade agrícola sustentável. A cana de açúcar é uma cultura de destaque na região noroeste do Paraná devido às condições edafoclimáticas e ao grande número de usinas instaladas na região. O sistema de preparo de solo mais comumente utilizado no cultivo da cana-de-açúcar é o preparo convencional (subsolagem + aração + gradagem). Porém, atualmente uma nova tecnologia vem sendo utilizada no plantio da cultura, o chamado preparo de solo profundo localizado (PSPL) que tem como finalidade favorecer o crescimento radicular em profundidade. Na busca por um sistema sustentável de produção, tem havido uma demanda crescente para a identificação de parâmetros que avaliem precocemente a qualidade do sistema produtivo, identificando os manejos adequados afim de preservar o ambiente do solo². Dessa forma, o objetivo do trabalho será avaliar o efeito do PSPL e das plantas de cobertura, milheto e crotalaria, na estrutura do solo, bem como correlacionar possíveis modificações da estrutura com alterações em propriedades microbiológicas. O estudo será estabelecido em uma área agrícola na cidade de Cidade Gaúcha, pertencente à região Noroeste do estado do Paraná. Será analisado o efeito do PSPL com o uso do implemento penta em talhões de cana-de-açúcar com e sem plantas de cobertura (milheto e crotalaria). Para avaliação da estrutura do solo será utilizada a metodologia do perfil cultural³. Essa avaliação permite conhecer a morfologia dos horizontes antropizados servindo como meio de análise e de diagnóstico do estado estrutural do solo a campo, particularmente na análise dos efeitos da exploração agrícola do solo. Nesse contexto, parâmetros microbiológicos têm sido utilizados com sucesso como indicadores de qualidade do solo, por serem indicadores rápidos e sensíveis aos impactos provocados pelo manejo. Será utilizado o método de fumigação-extração para a análise do carbono da biomassa microbiana⁴ (CBM), e com o mesmo extrato será realizada a análise do nitrogênio da biomassa microbiana (NBM)⁵. A respiração basal será determinada em solução de NaOH 0,5N para capturar o CO₂ liberado⁶. Será avaliada a atividade de enzimas do solo associadas ao ciclo do carbon (β -glucosidase); do fósforo (fosfatase ácida) e do enxofre (arilsulfatase). Esses métodos baseiam-se na determinação colorimétrica do *p*-nitrofenol (coloração amarela) após a adição de substratos incolores específicos para cada enzima avaliada⁷. Para cada cinco repetições de campo serão realizadas três repetições analíticas no laboratório.

REFERÊNCIAS

- ¹AULER, P.A.M.; FIDALSKI, J.; PAVAN, M.A.; NEVES, C.S.V.J. produção de laranja 'pêra' em sistemas de preparo de solo e manejo nas entrelinhas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p.363–374, 2008.
- ²SILVA, A.P.; BABUJIA, L.C.; FRANCHINI, J.C.; RALISCH, R.; HUNGRIA, M.; GUIMARÃES, M.F. Soil structure and its influence on microbial biomass in different soil and crop management systems. **Soil & Tillage Research**, v.142, p. 42–53, 2014.
- ³TAVARES FILHO, J.; RALISCH, R.; GUIMARÃES, M.F.; MEDINA, C.C.; BALBINO, L.C.; NEVES, C.S.V.J. Método do perfil cultural para avaliações do estado físico de solos em condições tropicais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p. 393–399, 1999.
- ⁴VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry**, v.19, p.703–707, 1987.
- ⁵BABUJIA, L.C.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; BROOKES, P.C. Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 2174–2181, 2010.
- ⁶ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K. NANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology in Biochemistry**. London: Academic Press, p. 214–219, 1995.
- ⁷TABATABAI, M.A. **Soil enzymes**. In: WEAVER, R.W., ed. **Methods of soil analysis**. Madison, Soil Science Society of America, 1994. p.775–833. (SSSA Book Series, 5).

PRODUÇÃO DE MUDAS DE PEPINO E MELANCIA INOCULADAS COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Cristine Bonacina^a, Adriana Pereira da Silva^b

^aMestranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, cristinebonacina@hotmail.com;

^bDocente do Mestrado de Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR;

O crescente interesse em tecnologias que promovam o desenvolvimento sustentável vem ao encontro das necessidades da sociedade global. Uma das alternativas à dependência da agricultura por fertilizantes minerais e por agroquímicos é o aumento da oferta de insumos biológicos de alta eficiência. As bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) promovem o crescimento vegetal pela produção de ácido cianídrico, fitohormônios, enzimas, mineralização de nutrientes, solubilização de fosfatos, fixação de nitrogênio e aumento da absorção pelas raízes¹. O objetivo do trabalho será avaliar a resposta do pepino e da melancia à inoculação com bactérias potencialmente promotoras do crescimento vegetal. As bactérias serão fornecidas pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina. O efeito da inoculação dos diferentes isolados de bactérias será avaliado através de experimento com delineamento experimental inteiramente casualizado, com 15 repetições, constando de cinco isolados de bactérias e uma testemunha. A semeadura será realizada no mesmo dia para todos os tratamentos, colocando-se quatro sementes de pepino ou melancia em cada célula da bandeja. Uma semana após a emergência, será realizado o desbaste, deixando-se uma planta por célula. As mudas serão coletadas após 30 dias, avaliando-se altura das plantas e diâmetro do caule à altura dos cotilédones. A parte aérea e raízes serão coletadas, e em seguida determinado o volume radicular, após lavagem em água corrente, as mesmas serão imersas em proveta graduada contendo 100 ml de água destilada. O excedente de água que ultrapassar o limite da proveta será retirado com auxílio de uma pipeta graduada, sendo esse considerado o volume das raízes. Posteriormente, a parte aérea e raízes serão lavadas em água destilada e colocadas para secar em estufa com ventilação forçada a 65 °C, até atingir massa constante. Após secagem em estufa, será determinada a massa seca da parte aérea e do sistema radicular. Será realizada a moagem e digestão nitroperclórica da parte aérea para determinação dos nutrientes²: P⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Fe⁺⁺, Cu⁺⁺ e Mn⁺⁺. O N⁺ será determinado após digestão sulfúrica, pelo método de Kjeldahl². A produção de amilases pelas bactérias será determinada no meio ágar amido, constituído de 0,2% de amido solúvel³. A produção de quitinase será determinada utilizando quitina coloidal como substrato⁴. A atividade celulolítica e xilanolítica será avaliada utilizando-se meio de sais minerais-ágar^{5,6}, contendo celulose e xilana como fontes de carbono, respectivamente. A produção de lipases será avaliada usando-se Tween 80 como substrato^{7,8}. Serão também avaliadas a produção de ácido indolacético e capacidade de solubilização de fosfatos. Os dados serão analisados pelo programa estatístico SISVAR, através de análise de variância com comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O trabalho encontra-se em fase de planejamento e levantamento bibliográficos.

REFERÊNCIAS

¹GOMES, A.M.A., MARIANO, R.L.R., SILVEIRA, E.B.; MESQUITA, J.C.P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 21, p. 699-703, 2003.

²EMBRAPA - **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes** / Embrapa Solos, Embrapa Informática Agropecuária. In: SILVA, F.C. (Org.). Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370p.

³COON, H.J.; JENNISON, M.W.; WEEK, O.B. Routine tests for the identification of bacteria. In: SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. **Manual of Microbiological Methods**. New York: McGraw-Hall, 1957. p.239-262.

⁴RENWICK, A.; CAMPBELL, R. COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, London, v.40, p.524-532, 1991.

⁵LEWIS, K.J. **Biological control mechanism of the mycoparasite *Phytium oligandrum* Dreschler**. PhD Thesis. Sheffield. University of Sheffield, 1988.

⁶TUITE, J. **Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria**. Minneapolis: Burgess Publishing, 1969. 239p.

⁷SIERRA, S.A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, p. 15-22, 1957.

⁸BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid in so assay for indolacético acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 535-538, 1991.

EFEITO DO PREPARO DE SOLO PROFUNDO LOCALIZADO NA QUALIDADE DO SOLO

Dayane Maldonado Garcia^a, Adriana Pereira Da Silva^b

^aMestranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, dayagarcia1990@gmail.com;

^bDocente do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR.

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma gramínea, rica em sacarose, sendo matéria-prima para indústria sucroalcooleira. O noroeste do Paraná é o segundo maior produtor de cana-de-açúcar, com 8% de toda cana processada no país. Esta região apresenta solo derivado do Arenito Caiuá, sendo estes propensos aos processos de degradação. A sustentabilidade dos agroecossistemas é diretamente influenciada pelo efeito de diferentes práticas agrícolas na estrutura do solo¹. Assim, este trabalho teve por objetivo quantificar as unidades morfológicamente homogêneas (UMHs) de um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, submetido ao preparo de solo profundo localizado, com o implemento penta, bem como ao preparo com grade pesada visando avaliar a qualidade física do solo, através de sua análise morfoestrutural. Para avaliação da estrutura do solo foi utilizada a metodologia do perfil cultural². Os perfis de preparo de solo profundo localizado feitos com o implemento penta apresentaram UMHs contínuas, com aspecto homogêneo e coeso, sem fissuras, porosas, correspondente à estrutura C_{μ} , resultantes da intensa desagregação do solo provocada pelo implemento. Em média essa estrutura ocupou mais que 50% da área total do perfil alterado pelo manejo. Notou-se também, a presença de agregados com estado interno variando de indícios de compactação até aqueles considerados compactos ($C_{\mu\Delta} < C_{\Delta\mu} < C_{\Delta}$), decorrentes da pressão do rodado da máquina, que saiu de sua trajetória original atingindo os canteiros de cultivo. Os perfis submetidos ao preparo com grade pesada apresentaram na camada superficial de 0-30 cm um grande volume de solo fissurado com presença de médios e grandes torrões, correspondente a estrutura $F \text{ mtgt } \Delta_{\mu}$. Ainda nestes perfis, houve a presença de um grande volume de solo de porosidade intermediária, correspondentes à estrutura $C_{\mu\Delta/\Delta_{\mu}}$, que pode ser observada por toda extensão dos perfis. O revolvimento intenso do solo desagrega os macroagregados, que são importantes para a proteção e a preservação da matéria orgânica, resultando em sua rápida oxidação e, conseqüentemente, diminuição da qualidade do solo^{3,4}. A maior desagregação provocada no solo dessa região pode trazer sérias conseqüências à sustentabilidade do sistema de produção, uma vez que esse solo apresenta textura superficial franco-arenosa, o que lhe confere elevada suscetibilidade à erosão. Apesar do foco do trabalho não ser a macrofauna (cupins, minhocas, corós, formigas, etc), não foram observados a presença desses organismos no solo. Esta ausência pode residir no fato da intensa ação antrópica provocada pelo sistema de manejo da cultura da cana-de-açúcar. Entretanto, a macrofauna é considerada um indicador sustentável do sistema produtivo, por influir na agregação e estrutura do solo, na fragmentação de resíduos orgânicos e na dinâmica da matéria orgânica⁵. O experimento encontra-se em andamento, sendo que parâmetros microbiológicos serão analisados e relacionados com as alterações físicas, visando o entendimento dessas práticas na qualidade do solo.

REFERÊNCIAS

¹BALL, B.C.; BATEY, T.; MUNKHOLM, L.J. Field assessment of soil structural quality – a development of the Peerlkamp test. **Soil Use Management**, v. 23, p. 329–337, 2007.

²TAVARES FILHO, J.; RALISCH, R.; GUIMARÃES, M.F.; MEDINA, C.C.; BALBINO, L.C.; NEVES, C.S.V.J. Método do perfil cultural para avaliações do estado físico de solos em condições tropicais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p. 393-399, 1999.

³FREGONEZI, G.A.F.; BROSSARD, M.; GUIMARÃES, M.F.; MEDINA, C.C. Modificações morfológicas e físicas de um latossolo argiloso sob pastagens. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 1017-1027, 2001.

⁴GIAROLA, N.F.B.; SILVA, A.P.; TORMENA, C.A.; GUIMARÃES, R.M.L.; BALL, B. On the visual evaluation of soil structure: the Brazilian experience in Oxisols under no-tillage, **Soil & Tillage Research**, v. 127, p. 60-64, 2012.

⁵FRANCHINI, J.C.; COSTA, J.M.; DEBIASI, H.; Torres, E. Importância da rotação de culturas para a produção agrícola sustentável no Paraná (Importance of crop rotation to sustainable agricultural production in Paraná), Embrapa Soja, Londrina/PR, Brazil, 2011, p. 52 (**Documentos**, 327).

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE ARAUCÁRIA (*Araucaria angustifolia*) NO ESTADO DO PARANÁ

Patrícia Fernanda Augusto da Motta Novello^a, Ivana Kelly Cintra Reinisz^a, Sílvia Graciele Hülse de Souza^b

^aMestranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR, Umuarama-PR, patriciamottanovello@yahoo.com; ^bDocente da Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR, Umuarama-PR

A conservação dos recursos genéticos é uma condição prévia para a manutenção a longo prazo de espécies florestais. A *Araucaria angustifolia* é um espécie florestal nativa importante devido a sua endemidade e longevidade ocorrendo majoritariamente na região Sul do Brasil¹. Entretanto, a área de ocorrência dessa espécie foi reduzida e níveis insignificantes. A redução no tamanho das populações nos fragmentos é uma situação preocupante, uma vez que essa situação leva ao aumento do cruzamento entre aparentados e a perda de alelos devido ao efeito de deriva genética, comprometendo a sustentabilidade das espécies e de organismos associados³. Uma das principais preocupações dos programas de conservação é a manutenção de níveis adequados de diversidade genética. Os marcadores moleculares são uma importante ferramenta para estudos de genética populacional, mapeamento e análises de distância genética². Desta forma, o objetivo desse trabalho será avaliar a estrutura genética de populações de *A. angustifolia* do estado do Paraná através dos marcadores molecular SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism*), para verificar a divergência genética entre as populações e avaliar se os eventos de estrangulamento influenciam na fragmentação do habitat e ameaçam os recursos genéticos e potencial evolutivo das espécies. Para isso, plantas de araucária de duas populações serão coletadas e armazenadas em freezer -80 °C até o momento das análises. O DNA será extraído e as reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) serão realizadas em termociclador. Os fragmentos amplificados serão separados em gel de poliacrilamida. A partir dos produtos da amplificação será construída uma matriz binária, com a presença de um fragmento a ser representado por (1) e a sua ausência por (0). Essa matriz será utilizada para realizar a análises estatísticas. Os dados gerados nesse trabalho fornecerão informações relativas à distribuição e dinâmica de alelos entre as populações e avaliar as consequências genéticas da fragmentação e degradação de populações naturais, visando auxiliar no desenvolvimento de estratégias de conservação e utilização racional dos núcleos restantes de diversidade natural dessa espécie.

REFERÊNCIAS

¹BUSO, G.S.C.; BRONDANI, R.V.; AMARAL, Z.P.S.; REIS, A.M.M.; FERREIRA, M.E. Desenvolvimento de primers SSR para análise genética de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) utilizando biblioteca genômica enriquecida. **Boletim de pesquisa. Embrapa Cenargen**, Brasília, n.15, p.1-27, 2000.

²CARVALHO, PAULO ERNANI RAMALHO; MEDRADO, MOACIR JOSÉ SALES & HOEFLICH, VITOR AFONSO. **Cultivo do pinheiro-do-paraná**. Embrapa Florestas, Sistemas de Produção, 7. Versão Eletrônica, Jan./2003

³FERREIRA, D.K.; NAZARENO, A.G.; MANTOVANI A.; BITTENCOURT R.; SEBBENN A.M.; REIS, M.S. Genetic analysis of 50-year old Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) plantations: implications for conservation planning. **Conservation Genetics**, v.13, p. 435-442, 2012.

ANALISE *IN SILICO* DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO WRKY EM *Citrus sinensis*

Eduardo Goiano da Silva^a, Silvia Graciele Hülse de Souza^b

^aMestrando em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, eduardogoiano@gmail.com;

^bDocente da Pós Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR;

No Brasil, nas áreas destinadas ao cultivo de *citrus*, é comum ocorrer deficiência hídrica limitando sua produtividade¹. As respostas aos diferentes estresses são resultados de múltiplas vias de sinalizações que frequentemente interagem uma com a outra. A sinalização envolvida no controle da tolerância a estresses é governada por fatores de regulação gênica em nível transcricional, os quais são induzidos pelos fatores de transcrição WRKY³. O objetivo deste trabalho é identificar e caracterizar “*in silico*” os fatores de transcrição WRKY em *Citrus sinensis* a fim de compreender a tolerância ao estresse biótico e abiótico nessa espécie. Portanto, para realização das análises, sequências proteicas da família WRKY já identificados na planta modelo *Arabidopsis thaliana* *Information Resource* (<http://www.arabidopsis.org>) foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados do genoma de *Citrus sinensis*, *Phytozome* (<http://www.phytozome.net>) utilizando o (BLASTP)². Para realizar a busca das sequências proteicas. Para realizar o alinhamento das sequências proteicas foi utilizado o ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), com os parâmetros, matriz de proteína GONNET, gap open 10, gap extension 0,1 e o método Neighbor Joining (NJ). As sequências resultantes foram organizadas em uma árvore filogenética utilizando o software MEGA v. 6.0.6, processado com 1000 réplicas de bootstrap. Como resultado preliminar foram identificados 82 genes da família WRKY no genoma de *Citrus sinensis*. Os quais estão divididos em 3 grupos principais, contendo 39, 37 e 6 genes WRKY nos grupos I, II e III, respectivamente. Foi realizada a comparação dos genes WRKY presentes em *Arabidopsis Thaliana* e *Oryza sativa* e foi observado que o grupo I apresenta dois domínios WRKY e um motivo de ligação de zinco C₂H₂. Os Grupos II e III apresentam apenas um domínio WRKY, onde o que os diferem são os motivos de ligação de zinco, sendo que o motivo de ligação do grupo II é C₂H₂, enquanto que no grupo III é C₂-H-C. Os resultados iniciais e parciais obtidos nesse trabalho fornecem entendimento para serem utilizados em programas de melhoramento e informação genética básica do genoma de *citrus* para obtenção de laranjeiras mais tolerantes aos estresses biótico e abiótico.

REFERÊNCIAS

¹MEDINA, C. L.; MACHADO, E. C.; GOMES, M. M. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranja ‘Valência’ sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, n.1, p.29-34, 1999.

²Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25: 3389-3402..

³SHARMA, M. K. et al. Identification, phylogeny, and transcript profiling of ERF family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 284, n. 6, p. 455-475, 2010.

CARACTERIZAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO ERF NO GENOMA DE *Phaseolus vulgaris*

Polyana Barros Polido^a, Silvia Graciele Hülse de Souza^b

^aDoutoranda em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, polypolido@gmail.com; ^bDocente da Pós Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a segunda cultura de leguminosas mais importantes no mundo, pois compõe a base da alimentação da maior parte da população, devido ao seu alto conteúdo de proteínas, fibras e minerais^{1, 2}. Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial, estima-se que a produção deve chegar a 3,406 milhões de toneladas na safra 2015³. No entanto, a produtividade e a qualidade dessa leguminosa é adversamente afetada por diferentes estresses. Tais estresses, são caracterizados por condições ambientais adversas que afetam o crescimento e a produtividade de leguminosas importantes para o consumo humano, com isso provocam respostas de defesa da planta baseados na ativação e regulação da expressão de vários genes⁴. Os fatores de transcrição *ethylene response factor* (ERF) desempenham papel crucial no desenvolvimento e na expressão dos genes que regulam as respostas a estresses bióticos e abióticos de plantas⁵. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar *in silico* os fatores de transcrição ERF presentes no Banco de dados ESTs de *Phaseolus vulgaris*. Para isso, foram realizadas buscas no banco de dados Phytozome Database de *Phaseolus vulgaris*, utilizando o domínio AP2 proveniente da planta modelo *Arabidopsis thaliana*. As sequências protéicas contendo o domínio AP2 completo foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW versão 2.0⁶. A árvore filogenética foi construída utilizando-se o método neighbor-joining (NJ) usando a opção *pair-wise deletion* com a ajuda do programa MEGA versão 6.0⁷. Foram identificados 219 genes em *Phaseolus vulgaris* L. da família AP2/ERF e a reconstrução filogenética a partir do domínio conservado AP2/ERF demonstrou que a família ERF está dividida em 10 grupos principais. Além disso, a análise dos motivos resultou na identificação dos domínios conservados fora do domínio AP2 e foram distribuídas entre grupos específicos, no qual desempenham funções específicas. Com base na sequência do domínio AP2/ERF os 219 membros atribuídos à família ERF, foram classificados em duas subfamílias, 50 ERFs foram atribuídos à subfamília DREB e os outros 169 foram identificados como membros da subfamília ERF. Uma árvore filogenética foi construída a partir das 219 proteínas *P. vulgaris* utilizando o método *neighbor-joining*. A partir da classificação da família ERF em *Arabidopsis*, as 219 proteínas ERF de *P. vulgaris* foram identificadas como pertencentes aos 10 principais grupos, nomeados como grupos I-X. Os dados gerados nesse trabalho ajudarão na identificação de possíveis genes candidatos que auxiliarão na compreensão dos determinantes genéticos da tolerância a estresses bióticos e abióticos, que constitui um passo importante nos programas de melhoramento genético do feijoeiro.

REFERÊNCIAS

- ¹PROLLA, I.R.D. **Características físico-químicas de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e efeitos biológicos da fração fibra solúvel**. Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica. Universidade Federal de Santa Catarina, RS, 2006.
- ²MESQUITA, F. R.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade proteica. **Ciênc. agrotec.** Lavras, v. 31, n. 4, 2006.
- ³Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2015. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Noticias/noticia/2015/02/ibge-previsao-para-safra-2015-atende-consumo-de-arroz-e-feijao.html>>. Acesso em 02 fev.
- ⁴PEREIRA, A. C. V. Z. **Análise Funcional de transcrição DREB6A de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pela superexpressão em *Arabidopsis thaliana***. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP. F.177. 2014.
- ⁵NAKANO, T.; SUZUKI, K.; FUJIMURA, T.; SHINSHI, H. Genome-Wide Analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and *Rice*. **Plant Physiology**, February 2006, Vol. 140, pp. 411–432,
- ⁶LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatic**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.
- ⁷TAMURA, K. et al. Mega 6: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

RESPOSTA DE PLANTAS DE PEPINO SUBMETIDAS AO ESTRESSE AO CALOR

Crislaine Emidio Vieira^a, Andressa B. Nascimento^a, Héliida Mara Magalhães^b e Silvia Graciele Hülse de Souza^b

^a Acadêmica discente do Curso de Engenharia Agrônômica, Unipar, Umuarama – PR, crislaine_emidio@hotmail.com; ^b Docente da Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama – PR, silviahulse@unipar.br

O pepino (*Cucumis sativus* L.), pertencente à família das cucurbitáceas, é uma importante hortaliça que possui grande importância econômica e nutricional que é cultivada no mundo inteiro¹. As temperaturas extremas têm sido uma séria ameaça a agricultura, incluindo a produção de pepino, devido à sua sensibilidade ao calor e frio². A cada 1°C de incremento na média temperatura durante a estação de crescimento pode reduzir e seu colheita rendimento de até 17%. A temperatura ideal para o crescimento de pepino é 20-26/15-20°C dia e noite. A prevalência de temperaturas elevadas durante o crescimento e desenvolvimento pode ser um problema crucial à produção de pepino. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o desenvolvimento de plantas de pepino sob o estresse ao calor. Genótipos de pepino híbrido Caipira Magnum foram plantadas em vasos plásticos em solo composto na proporção de 2:1:1 seguindo a proporção de 2 partes de terra, 1 de substrato e 1 de areia. O experimento foi regado semanalmente com solução nutritiva de Hoagland. Plantas com 30 dias de idade foram utilizadas para o trabalho. Foram divididas as amostras em controle e estresse, onde o controle foi mantido a temperatura de 25 °C durante o dia e 18 °C à noite, enquanto as plantas submetidas ao calor foram mantidas a temperatura de 37°C dia e noite. Foram realizadas as seguintes amostragens: dias 0,1,3,7 e 15. A cada tratamento foi realizada medição do teor de clorofila das folhas, a pesagem (grs) e medição (cm) das partes aéreas e radiculares. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR. O teor de clorofila em plantas submetidas ao calor decresceu a partir do 3º dia de estresse enquanto o teor de clorofila das plantas sem estresse se mantiveram constante durante todo o período. Foi observado que a partir do terceiro dia de estresse há uma diminuição drástica no desenvolvimento radicular e aéreo comprovado pela diminuição no peso e tamanho das amostras. Isso era esperado uma vez que quando as plantas são submetidas a altas temperaturas o crescimento das mesmas é reduzido. Isso é explicado devido à inibição da fotossíntese, o que conseqüentemente não há síntese de carboidratos e ATP o que pode levar a planta morte. Este trabalho mostrou que o teor de clorofila, o tamanho e peso das partes aérea e radicular diminuíram em função dos estresses térmicos do genótipo avaliado em plantas de pepino. No estresse as altas temperaturas a planta pode apresentar sintomas que quando percebidos a tempo com boas técnicas de manejo pode ser revertido a fim de manter níveis adequados de produtividade.

REFERÊNCIAS

¹HU, Lifang; LIU, Shiqiang. Genome-wide identification and phylogenetic analysis of the ERF gene family in cucumbers. **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 624-634, 2011.

²Hall, A.E., 2001. **Crop Responses to Environment**. CRC Press LLC, Boca Raton, FL, pp. 197–208.

ASSEPSIA EM EXPLANTES DE *Curcuma zedoaria* REALIZADA POR DIFERENTES PRODUTOS QUÍMICOS

Meire Pereira de Souza Ferrari^a, Dirlane Antoniazzi^a, Andressa Bezerra Nascimento^b, Héliida Mara Magalhães^c

^aMestrandas em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, meiresouzaferriari@hotmail.com;

^bAcadêmica do Curso de Engenharia Agrônômica; ^cDocente do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR.

Curcuma zedoaria Roscoe conhecida popularmente como açafrão-da-índia, pertence à família *Zingiberaceae* é utilizada para fins ornamentais, medicinais e na indústria de alimentos. A assepsia dos explantes na cultura de tecidos é uma condição essencial, pois a contaminação por microorganismos é responsável por grandes perdas de plântulas. Sendo assim, objetivou-se com esse trabalho avaliar diferentes métodos de assepsia dos explantes de *C. zedoaria*. Propágulos de 1,5 cm foram inoculados em meio Murashige e Skoog (MS) acrescido de 4,4 µM de BAP, 1,08 µM de ANA, 30 g de sacarose, 6,5 g/L de ágar e pH ajustado para 5,8. Antes de ser inoculado os explantes foram submetidos aos seguintes tratamentos 1) imersão em solução hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos e lavagem em água destilada por 3 vezes; 2) imersão em solução hipoclorito de sódio 2% por 40 minutos e lavagem em água destilada por 3 vezes; 3) imersão em carbendazim 200 g/L + tebuconazole 100 g/L + cresoxim-metílico 125 g/L (Locker), na proporção de 100µl, azoxistrobina: 200.00 g/L (20% m/v) ciproconazol: 80.00 g/L (8% m/v) (Priori xtra), na proporção de 100µl, e iprodiona 500 g/L (Rovral), também na proporção 100µl, por 30 minutos, mais 20 minutos no hipoclorito 2% e lavagem em água por 3 vezes; 4) imersão em carbendazim 200 g/l + tebuconazole 100 g/l + cresoxim-metílico 125 g/L (Locker), na proporção de 100µl, azoxistrobina: 200.00 g/L (20% m/v) ciproconazol: 80.00 g/L (8% m/v) (Priori xtra), na proporção de 100µl, e iprodiona 500 g/L (Rovral), também na proporção 100µl, por 60 minutos, mais 20 minutos no hipoclorito 2% e lavagem em água por 3 vezes; 5) imersão em carbendazim 200 g/l + tebuconazole 100 g/l + cresoxim-metílico 125 g/l (Locker), na proporção de 300µl, azoxistrobina: 200.00 g/L (20% m/v) ciproconazol: 80.00 g/L (8% m/v) (Priori xtra), na proporção de 300µl, e iprodiona 500 g/L (Rovral), também na proporção 300µl, por 60 minutos, mais 20 minutos no hipoclorito 2% e lavagem em água por 3 vezes; 6)) imersão em carbendazim 200 g/l + tebuconazole 100 g/l + cresoxim-metílico 125 g/l (Locker), na proporção de 300µl, azoxistrobina: 200.00 g/L (20% m/v) ciproconazol: 80.00 g/L (8% m/v) (Priori xtra), na proporção de 300µl, e iprodiona 500 g/L (Rovral), também na proporção 300µl, por 120 minutos, mais 20 minutos no hipoclorito 2% e lavagem em água por 3 vezes. Não houve diferença estatística para os tratamentos para as seguintes características: comprimento e massa fresca e seca da parte aérea da planta, comprimento e massa fresca da raiz, número de brotações, número de folhas, diâmetro da base, contaminação e oxidação. Apenas para a variável massa seca da raiz. Nesse caso o melhor método de esterilização dos explantes foi o tratamento 1. Tratamentos 2 e 3 foram iguais entre si. E os tratamentos 4,5 e 6 propiciaram os mesmos valores de massa seca da raiz. Sendo assim, sugere-se a esterilização dos explantes de *C. zedoaria* utilizando a da imersão dos propágulos em solução hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos, uma vez que, não há gasto com o fungicida e economia de tempo.

REFERÊNCIAS

GUENTHER, E. The essential oils. **Toronto: D. Van Nostrand**, 1952.

NAVARRO, D.D.; SOUZA, M.M.; NETO, R.A.; GOLIN, V.; NIERO, R.; YUNES, R.A.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL, V. Phytochemical analysis and analgesic properties of *Curcuma zedoaria* grown in Brazil. **Phytomedicine**, v.9, p.427-432, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, Minneapolis, v. 15, p. 473-497, 1962.

ESTABELECIMENTO *in vitro* E ESTABILIDADE GENÉTICA DE *Curcuma zedoaria* Roscoe

Dirlane Antoniazzi^a, Meire Pereira de Souza Ferrari^a, Andressa Bezerra Nascimento^b, Larissa Franz^b, Helida Mara Magalhães^c

^aMestrandas em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, dirantoniazzi@hotmail.com; meire.ferrari@ifpr.edu.br ^b Acadêmicas curso de graduação em Engenharia Agrônômica e Farmácia, Unipar, ^cDocente do Curso do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR;

Curcuma zedoaria Roscoe, pertencente à família *Zingiberacea*, se reproduz geralmente por rizomas, partes estas também empregadas para fins terapêuticos por serem ricos em terpenóides. Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de reguladores de crescimento na propagação *in vitro*. Para isso, diferentes concentrações foram testadas em meio de cultura MS: (1) testemunha; (2) BAP 4,44 $\mu\text{M L}^{-1}$; (3) BAP 4,44 + CIT 0,46 $\mu\text{M L}^{-1}$; (4) BAP 4,44 $\mu\text{M L}^{-1}$ + ANA 1,08 $\mu\text{M L}^{-1}$; (5) BAP 4,44 $\mu\text{M L}^{-1}$ + CIT 0,46 $\mu\text{M L}^{-1}$ + ANA 1,0 $\mu\text{M L}^{-1}$; (6) BAP 8,88 $\mu\text{M L}^{-1}$; (7) BAP 8,88 $\mu\text{M L}^{-1}$ + CIT 0,92 $\mu\text{M L}^{-1}$; (8) BAP 8,88 + CIT 0,92 $\mu\text{M L}^{-1}$ + ANA 2,16 $\mu\text{M L}^{-1}$. O meio utilizado foi o Murashige e Skoog (MS) acrescido de 30 g de sacarose, Agar 6,5 g e pH ajustado para 5,8. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, contendo dois frascos por repetição. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura de 25 C° com presença de luz 24 horas. As características avaliadas foram: número de brotações, de folhas, comprimento e peso da parte aérea e da raiz, massa fresca e massa seca da parte aérea e da raiz e o diâmetro da base das plantas. Os tratamentos T3 e T7 obtiveram os melhores resultados para o parâmetro comprimento da raiz. Com relação ao peso da matriz, o maior valor verificado foi no tratamento T2. O tratamento T8 foi o mais efetivo, tanto para o peso da raiz quanto à massa seca da raiz. Para todas as outras características, os dados analisados não diferem estatisticamente entre si.

REFERÊNCIAS

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MIACHIR, J. I.; ROMANI, V. L. M.; AMARAL, A. F. C.; MELLO, M. O.; CROCOMO, O. J.; MELO, M. Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoaria* Roscoe. *Scientia Agricola*, v.61, n.4, p.427-432, 2004.
- CHEN, C.; CHEN, Y.; HSI, Y.; CHANG, C.; HUANG, L.; HO, C.; WAY, T.; KAO, J. Chemical constituents and anticancer activity of *curcuma zedoaria* Roscoe essential oil against non-small cell lung carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 61, n. 47.p. 11418–11427, 2013.

UTILIZAÇÃO DE ELICITORES PARA AUMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CULTURA DE TECIDOS (*in vitro* e *ex vitro*) DE *Ocimum basilicum*

Jéssica Rezende Trettel^a, Flávio Julian^a, Héliida Mara Magalhães^b

^aMestrando em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, jrtrettel@gmail.com; ^bDocente do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR

O Manjeriçõ (*Ocimum basilicum*) originário da Índia, África e do Sul da Ásia. Atualmente é cultivado em todo mundo. É uma erva popularmente utilizada na culinária, para fins comerciais como fragrância, aromas, é amplamente utilizada na medicina tradicional e para aumentar a vida de prateleira de alimentos¹. O objetivo do presente trabalho é induzir, utilizando elicitores, o aumento nas concentrações de metabólitos secundários, principalmente os pertencentes às classes dos terpenos e fenóis, com ênfase no Eugenol e Metil Eugenol. Com finalidade de comparação de eficácia e técnica, serão realizados testes *in vitro*, micropropagação, e *ex vitro*, cultivo em casa de vegetação. Para tanto serão empregados os seguintes tratamentos: Tratamento controle, tratamento com 50, 100, 150 e 200 mg de NaCl. Tratamento com diferentes concentrações de CuSO₄ 25; 75; 125; 175 e 200 mg. O material vegetal utilizado será sementes que serão esterilizadas em álcool 70% por um minuto e em hipoclorito de sódio 50% por 20 minutos, seguida de lavagem em água autoclavada por três vezes. O meio utilizado para germinação de sementes *in vitro* será Murashige e Skoog (MS) acrescido de 30g de sacarose, 6,5gL⁻¹ de ágar com pH ajustado para 5,8. O Delineamento utilizado será o inteiramente casualizado. As sementes serão semeadas em frascos de vidro contendo 50 mL de meio e serão utilizadas quatro repetições com 4 frascos por parcela. Para avaliação dos testes serão processadas amostras de extrato, tanto nos tratamentos *in vitro* quanto nos tratamentos *ex vitro*, para submeter à análise em cromatografia por CG-MS e identificação dos metabólitos. Como resposta a estes tratamentos é esperada uma elevação nas concentrações dos compostos das classes dos terpenos e fenóis.

REFERÊNCIAS

¹Phuong M. Nguyen, Eileen M. Kwee, Emily D. Niemeyer. Potassium rate alters the antioxidant capacity and phenolic concentration of basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. **Food Chemistry** v.123 p.1235-1241, 2010.

²GENGMAO, Zhao et al. Salinity stress increases secondary metabolites and enzyme activity in safflower. **Industrial Crops And Products**, v. 64, p.175-181, 2015.

³ PEROTTI, Janieli Cristina et al. Produção de betacianina em erva-de-jacaré cultivada *in vitro* com diferentes concentrações de sulfato de cobre. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p.1874-1880, set. 2010.

PRODUÇÃO DE METABOLITOS SECUNDARIOS EM MANEJRIÇÃO ROXO UTILIZANDO ÁCIDO SALICÍLICO

Flávio Julian^a, Jéssica Rezende Trettel^a, Héliida Mara Magalhães^b

^aMestrandos em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, flavio_julian@outlook.com;

^bDocente do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR

Metabólitos secundários em vegetais são produzidos com o objetivo de defesa contra ataques de herbívoros e até microrganismos causadores de doenças promovendo então a sobrevivência da espécie, esses produtos secundários atuam como antifúngicos antibióticos e antivirais¹. O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) da família *Lamiaceae* tem grande importância industrial pela vasta variabilidade de substâncias que são utilizadas em perfumarias para obter óleos essenciais (Simon et al.,1999). Os compostos fenólicos são compostos de grande importância, pois são responsáveis por desencadear reações em planta². O objetivo desse trabalho será avaliar o aumento de compostos fenólicos como flavonóides com a utilização de ácido salicílico (AS) como elicitador *in vitro*. Para tanto, sementes serão sanitizadas em álcool 70% por um minuto e em seguidas adicionadas em hipoclorito de sódio 50% por 20 minutos, sendo posteriormente lavadas três vezes em água autoclavada. O meio utilizado será o Murashige e Skoog (MS) acrescido de 30g de sacarose, 6,5g/L de Agar e pH ajustado para 5,8 .O tratamento utilizado será diferentes concentrações de ácido salicílico de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mM no meio de cultura. O delimitamento utilizado será o inteiramente casualizado sendo quatro tratamentos, cinco repetições e quatro frascos por parcela³. Espera-se como resultado encontrar um aumento da concentração de flavonóides como ácido cafeico e monoterpenos como linalool tanto cultivado em *in vitro*..

REFERÊNCIAS

¹FUMAGALI, et al. Produção De Metabólitos Secundários Em Cultura De Células E Tecidos De Plantas: O Exemplo Dos Gêneros *Tabernae Montanae* *Aspidosperma*. **Revista Brasileira Farmacognosia** v.18, N.4, P.627-641,2008.

²PEREZ, M. G. F. et al. Effect Of Chemical Elicitors On Peppermint (*Mentha Piperita*) Plants And Their Impact On The Metabolite Profile And Antioxidant Capacity Of Resulting Infusions. **Food Chemistry**.v.156, p.273-278, 2014.

SIMON, J. E. et al. **Basil: A Source Of Aroma Compounds And A Popular Culinary And Ornamental Herb**. *ASHS PRESS*. V4. P. 499–505. 1999.

³TECIL, I. et al, Variability In Essential Oil Composition Of Turkish Basils (...).**Biochemical Systematics And Ecology**. V.34, P.489-497, 2006

MAPEAMENTO DE QTLs DE RESISTÊNCIA DA SOJA AO NEMATÓIDE DE CISTO *Heterodera glycines Ichinohoe* por DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

Diorgenes Leonam Modernel da Silveira^a, Tatiane Dalla Nora Montecellib^b, Ivan Schuster^c

^aMestrando em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, modernel2@hotmail.com; ^bpesquisadora da Coodetec, Cascavel – PR, ^c Professor do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada a Agricultura, UNIPAR, Umuarama-Paraná.

O Nematóide de Cisto da Soja (NCS), *Heterodera glycines Ichinohoe*, é um dos principais patógenos da soja. O NCS pode causar perdas de rendimento de até 100% (Agrios, 1998). O método mais prático e econômico de controlar este parasita é o uso de cultivares resistentes. A obtenção de cultivares resistentes ao NCS é um processo complexo, e devido a grande variabilidade genética NCS, geralmente resulta em uma vida curta da resistência das cultivares. A detecção de QTLs (Quantitative Loci Traits) em mapas de ligação genéticos baseada em marcadores moleculares oferece uma refinada visão da arquitetura genética de caracteres quantitativos e é uma ferramenta potencial para melhoramento efetivo por meio de seleção assistida por marcadores moleculares (YOSHIMARU et al., 1998; LING et al., 2000). Mais de 15 anos de mapeamento de QTLs para NCS são justificados por prejuízos na produção de soja (Winter et al., 2006) pela diversidade do patógeno (Nblack et al., 2002) e pelas limitações na avaliação fenotípica. O mapeamento de QTLs em populações controladas apresenta a limitação de explorar apenas os alelos que estão presentes nos genitores da população. Já no mapeamento por associação, não é necessário utilizar uma população estruturada, de forma que todos os alelos de uma determinada região genômica podem ser observados. Neste trabalho, foi utilizado um conjunto de 168 cultivares de soja, com o objetivo de realizar mapeamento por associação para a resistência ao NCS. Em casa de vegetação com ambiente controlado, as 168 linhagens foram semeadas em tubetes de 25 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro contendo substrato solo:areia 1:2. Os tubetes foram colocados dentro de baldes contendo areia, utilizando-se 14 tubetes por balde. Os baldes foram colocados em um tanque tipo banho-maria, para manter a temperatura em 28° C no interior dos tubetes. Foi utilizada uma planta por tubete com sete repetições de cada variedade. Após 10 dias, inoculou-se com ovos e juvenis das raças 1 e 3 do NCS. Vinte e oito dias após a inoculação, as plantas foram retiradas dos tubetes, sem danificar as raízes com os cistos. As raízes foram lavadas com jato de água em peneira de malha 20 mesh, acoplada sobre outra de 60 mesh. Cistos retirados foram contados em lupa estereoscópica. A raça será identificada/confirmadas conforme o IP obtido em um conjunto de variedades diferenciadoras utilizadas no mesmo ensaio. Em função do IP obtido cada variedade será classificadas em resistentes (IP<10%), moderadamente resistentes (10<IP<30%) e suscetíveis (IP>30%). Os dados serão utilizados para a mapeamento de associação com um conjunto de 6 mil marcadores SNPs, cujos dados genotípicos já estão disponíveis.

REFERÊNCIAS

LING, P. Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics, New York**, n. 7, v. 100, p. 1010-1017, May 2000

NIBLACK, t.I. ARELLI, P.R.; NOEL, G.R.; OPPERMAN, C.H. ; ORF, J.H.; SCHMITT, D.P.; SHANNON, J.G.; TYLKA, G.L. A revised classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v. 34, n. 4, p. 279-288, 2002.

OSHIMARU H, Detection of quantitative trait loci for juvenile egrowth, flower bearing and rooting ability based on a linkage map of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don). **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.45-50, 1998.

WINTER, S.M.J; RAJCAN, I, SHELPS, B.J, Soybean cyst nematode: Challenges and opportunities. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86.p.25-32,2006.

DETERMINAÇÃO DOS CONTEÚDOS DE ÓLEO E PROTEÍNA EM SOJA, EM DIFERENTES AMBIENTES, PARA ANÁLISE DE GENÉTICA DE ASSOCIAÇÃO

Damião do Nascimento^a, Rodrigo C. Neves^b, Leandra Teixeira^c, Ivan Schuster^d

^aDoutorando em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR, damdonasci@gmail.com; ^bAssistente de Pesquisa do Núcleo de Biotecnologia, COODETEC, Cascavel-PR; ^cPesquisadora COODETEC Desenvolvimento, Produção e Comercialização Agrícola Ltda., Cascavel-PR; ^dDocente do Doutorado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Unipar, Umuarama-PR

A soja é uma planta da família Fabaceae, do gênero *Glycine* da espécie *Glycine max* (L.) Merrill, sendo originária da China, possui um cariótipo $2n = 40$ cromossomos¹. Seu grão é rico em proteínas com cerca de 40%, e contém ainda 20% de teor de óleo. O consumo da soja se estende desde a alimentação (humana e animal) passando pela indústria farmacêutica, siderúrgica e até os lubrificantes de automotivos². O Brasil é o segundo maior produtor e exportador de soja do mundo, com grande participação socioeconômica, constituindo um dos players mais relevantes do agronegócio mundial de *commodity*³. Fatores genéticos e ambientais afetam a composição química das sementes, que são compostos determinantes da qualidade da soja⁴. Por esta razão os programas de melhoramento genético têm se preocupado, em identificar os componentes de produção. A utilização de marcadores moleculares em especial SNPs têm levado a identificação de QTLs envolvidos no controle genético de diversas características de interesse, sobretudo, na determinação de quantidade e qualidade dos conteúdos de óleo e proteína em soja⁵. O presente resumo refere-se a um projeto de pesquisa ainda em andamento desenvolvido pela COODETEC em conjunto com a UNIPAR. Tendo como principal objetivo de estudo, determinação dos conteúdos de óleo e proteína em soja, em diferentes ambientes, de um conjunto de 169 cultivares brasileiras para posterior uso em análises de genética de associação com marcadores SNPs. O estudo contou com a safra 2012/13, implantada no campo da COODETEC no município de Cascavel, PR, e safra 2013/14 proveniente do município de Rio Verde, GO. Para proporcionar granulometria, as sementes foram trituradas em um moinho Udy (*modelo Cyclone Sample Mill*), sendo utilizado cerca de 20g de grãos de soja. Depois do grão moído em farinha, foi colocada uma porção próxima 5g, para cada cuba, quantidade adequada para análise espectroscópica. A leitura do conteúdo de óleo e proteína foi expressa em porcentagem sobre a matéria seca, realizada por um espectrômetro infravermelho FT-NIR, Agrosystem, modelo Instalab 600 product analyzer (*Dickey John Corporation, Auburn, Illinois, USA*). Os dados obtidos foram submetidos à análise de média, amplitude, desvio e correlação entre proteína e óleo para cada experimento. As correlações entre óleo e proteína apresentaram valores de -0,64 para safra de Cascavel 2012/13, -0,51 para safra de Rio Verde 2013/14 e -0,66 na média das duas safras. Já a correlação entre os experimentos de Cascavel e Rio Verde apresentou valores de 0,42 e 0,51 para proteína e óleo respectivamente. Os dados obtidos serão ainda avaliados em comparação com os dados já obtidos dos SNPs, a fim de identificar QTLs associados a estas duas características, e sua interação com o ambiente. O experimento encontra-se em fase de execução.

REFERÊNCIAS

¹COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, sétimo levantamento. Brasília, 2013.

²**Perspectivas do investimento 2015-2018 e panoramas setoriais**. BNDES, Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, Rio de Janeiro, p. 196, 2014.

³HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **Evolução e perspectiva de desempenho econômico associados com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro** 3ª ed. Londrina, Embrapa Soja, n. 319, 2011.

⁴KANTOLIC, A. G.; SLAFER, G. A. Development and seed number in indeterminate soybean as affected by timing and duration of exposure to long photoperiods after flowering, **Journals Annals of Botany**, Oxford University Press, Editorial Board, v. 99, p. 925-933, 2007.

⁵LAFER, C. **Investindo no futuro: o programa Jovens Pesquisadores**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. São Paulo, FAPESP, p. 432, 2010.

IMPORTÂNCIA DO POTENCIAL NUTRICIONAL PROTEICO DO FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris*) NO CENÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA

Luma de Fátima Louro Aita^a, Eláyne Oliveira da Silva^a

^aMestranda em Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama-PR

O cultivo do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) tem sido praticado amplamente por pequenos e grandes produtores em todo o território nacional¹, sendo o feijão considerado uma cultura de grande importância econômica, alimentar e social, especialmente por fornecer excelentes qualidades nutricionais e servir como fonte expressiva de proteínas². Dessa forma, analisando a produção de feijão no Brasil, e como ela tem se destacado nos últimos anos, chegando a 3.713,9 toneladas na safra de 2013/2014, podemos conferir sua importância no cenário das grandes culturas, sendo que a sua produção tem sido suficiente para suprir a demanda interna do país³, sendo assim, o feijoeiro pode ser considerado uma leguminosa de importância fundamental para a agricultura brasileira. Dentre os aspectos nutricionais do feijão destacam-se algumas características vantajosas como o alto teor de proteínas, sendo estas especialmente ricas no aminoácido lisina. Entretanto o feijão possui algumas limitações quanto ao fator digestibilidade proteica⁴ que devem ser observadas durante a seleção da cultivar, o que constitui um aspecto de interesse para os programas de melhoramento genético. Segundo a tabela de composição química dos alimentos fornecida pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), comparando 100g de cada alimento, o teor de proteínas da carne de boi crua (mecanicamente separada) chega a 14,97g, enquanto a mesma quantidade da semente madura e crua de feijão chega a apresentar 4,2g de proteínas⁵, o que ilustra seu potencial como alimento substituto para a obtenção significativa de proteínas na alimentação do brasileiro. Dentre os principais motivos e fatores emergentes que incentivam o consumo de feijão como fonte alternativa de proteínas em relação às fontes proteicas comumente utilizadas (de origem animal), destaca-se a sua importância em especial para a população de menor poder aquisitivo, devido ao custo relativamente baixo e sua alta disponibilidade. Além disso, as propriedades nutricionais e funcionais do grão de feijão incluem propriedades terapêuticas e oncológicas apresentadas devido ao seu baixo teor de gorduras e alto teor de fibras, o que juntamente com os problemas sanitários recorrentes com os produtos de origem animal tem aumentado a importância do feijão como fonte proteica de qualidade sanitária elevada. Desta forma, destaca-se a importância do feijão como fonte proteica na dieta humana dos países em desenvolvimento, e especialmente no Brasil, um país marcado pela alimentação tradicional como forma de identidade cultural, no qual o cultivo dessa leguminosa é bastante difundido, servindo também como cultura de subsistência.

REFERÊNCIAS

- ¹YOKOYAMA, L. P. Cultivo do Feijoeiro Comum: Importância econômica. **Embrapa Arroz e Feijão**. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/importancia.htm>>. Acesso em: 02 Maio. 2015.
- ²CARNEIRO, P. T.; PARRÉ, J. P. Importância do setor varejista na comercialização de feijão no Paraná. **Revista de Economia e Agronegócio**. 3:277 - 298, 2005.
- ³CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, safra 2013/2014**.
- ⁴FERREIRA, C. M.; DEL PELOSO, M. J.; FARIA, L. C. Feijão na economia nacional. **Embrapa Arroz e Feijão**. Santo Antônio de Goiás, 2002.
- ⁵FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed.Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. 307p.

CONTRIBUIÇÕES DOS PROGRAMAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO PARA O CULTIVO DO FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris*)

Luma de Fátima Louro Aita^a, Eláyne Oliveira da Silva^a

^aMestranda em Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama-PR

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) tem sido cultivado por pequenos e grandes produtores nas mais diversas regiões brasileiras, apresentando grande importância econômica e social¹, sendo que a sua cultura tem passado por grandes mudanças tecnológicas considerando os interesses dos agricultores. Dessa forma, o feijoeiro tem sido alvo de muitos programas de melhoramento genético, visando obter genótipos com características de interesse agrônomo e mercadológico, sendo que o objetivo direto de grande parte dos programas de melhoramento está no desenvolvimento de cultivares de feijão com qualidade nutricional e elevado rendimento², considerando que as suas características agrônomicas e a aceitação do consumidor impactam diretamente em seu valor comercial e de varejo¹. Os programas de melhoramento levam em conta que os teores nutricionais do grão de feijão variam conforme a interação de genótipo e ambiente, fatores que norteiam a seleção de cultivares com maior qualidade nutricional, sendo a influência do ambiente um fator bastante expressivo que afeta diretamente a composição nutricional dos grãos obtidos, portanto, torna-se necessário a avaliação do desempenho, resultado de produtividade e qualidade nutricional dos grãos provenientes das linhagens obtidas por melhoramento em maior número de locais possíveis antes do lançamento da nova cultivar, visando o desenvolvimento de cultivares com elevado rendimento². Os programas de melhoramento visam também aprimorar os aspectos mercadológicos do feijão, relacionados à aceitabilidade do consumidor, sendo assim, as variações apresentadas pelos diferentes genótipos, como a cor, tamanho e intensidade de brilho do grão e a forma como são recebidas pelo consumidor orientam a pesquisa tecnológica de melhoramento vegetal, direcionando também a produção e comercialização das cultivares de acordo com a preferência definida pelo consumidor de cada região, além de nortear a pesquisa e a obtenção de novas cultivares¹. Além disso, a obtenção de cultivares nutracêuticas representa um grande benefício à população brasileira que tem o feijão como fonte nutricional primária, o que melhora a qualidade de vida dos consumidores, já que a utilização dessas cultivares na alimentação, como parte da dieta contribui para a manutenção da saúde, podendo prevenir ou minimizar doenças³. Outro aspecto importante dos programas de melhoramento está na obtenção de maior resistência do vegetal aos diferentes tipos de stress, com a compreensão dos mecanismos gênicos envolvidos selecionando os genótipos através da análise fisiológica de fatores como o desenvolvimento das raízes e da parte aérea e a resposta a patógenos, sendo em longo prazo possível minimizar muitos problemas relacionados ao clima e a disponibilidade de água, melhorando o desenvolvimento da planta em situações de stress⁴, o que mostra o valor potencial do melhoramento genético para a agricultura sustentável.

REFERÊNCIAS

- ¹YOKOYAMA, L. P. Cultivo do Feijoeiro Comum: Importância econômica. **Embrapa Arroz e Feijão**. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivadoFeijoeiro/importancia.htm>>. Acesso em: 02 Maio. 2015
- ²RIBEIRO, N. D. et al. **Composição de microminerais em cultivares de feijão e aplicações para o melhoramento genético**. *Bragantia* [online]. 2008, vol.67, n.2, pp. 267-273.
- ³RIBEIRO, N. D. Potencial de aumento da qualidade nutricional do feijão por melhoramento genético. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 31, suplemento 1, p. 1367-1376, 2010.
- ⁴BEEBE, S.; RAMIREZ, J.; JARVIS, A.; RAO, I. M.; MOSQUERA, G.; BUENO, J. M.; BLAIR, M. W. Chapter 16: Genetic improvement of common beans and the challenges of climate change. In: **Crop adaptation to climate change**. Wiley-Blackwell. 2011.

PRINCIPAIS CORRETIVOS DE ACIDEZ UTILIZADOS NA AGRICULTURA BRASILEIRA

Eláyne Oliveira da Silva Alves^a, Luma de Fátima Louro Aita^a, Antonio Nolla^b

^aMestranda em Ciências Agrárias, UEM, Campus de Umuarama-PR, elayne.oli@hotmail.com

^bDocente do Mestrado em Ciências Agrárias, UEM, Campus de Umuarama-PR nolla73@hotmail.com

Introdução: Os solos brasileiros apresentam na maioria das vezes algumas limitações de produtividade causadas pelo efeito da acidez¹. Solos ácidos apresentam pH-H₂O abaixo de 5,5, V% menor que 50%, m% maior que 20% e Al⁺³ maior que 0,5 cmolc/kg⁻¹ ². Para neutralizar a acidez, são utilizados corretivos de acidez, produtos capazes de liberar hidroxilas (OH⁻), que reagem e neutralizam o Al⁺³ e H⁺, além de fornecer Ca⁺² e Mg⁺² em solução³. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre os principais corretivos de acidez utilizados na agricultura brasileira. Desenvolvimento: O corretivo de acidez do solo mais utilizado na agricultura brasileira é o calcário, produto originado da moagem da rocha calcária⁴. Sua reação no solo depende da presença de água e apresenta uma baixa reatividade, corrigindo em 5 anos uma camada de 10 cm num período de 3-5 anos quando o corretivo é aplicado superficialmente². Além da correção da acidez do solo, por neutralizar o Al⁺³ e H⁺ tóxico, o calcário fornece Ca⁺² e Mg⁺², sendo por isso considerado um fertilizante cálcico e magnésiano¹. Os teores de MgO variam em relação aos calcários comercializados². Desta forma o calcário é classificado em Calcítico (0-5% MgO) e Dolomítico (>5% MgO)³. Assim, a escolha do calcário a ser aplicado dependerá do nível crítico de Ca (1,5 cmolc dm⁻³ – solo arenoso) e Mg (0,5 cmolc dm⁻³ – solo arenoso)⁴. A cal virgem agrícola é outro corretivo de acidez, obtida pela calcinação ou queima completa do calcário, composta por óxidos de cálcio e magnésio, apresentando-se em forma de um pó mais fino e possui a mesma ação de neutralização do calcário⁵. A cal hidratada agrícola é obtida pela hidratação da cal virgem, constituída pelos hidróxidos de cálcio e magnésio, esta hidrata-se utilizando a água presente no solo, liberando a hidroxila que neutraliza os elementos tóxicos H⁺ e Al⁺³ do solo³. As escórias siderúrgicas, conhecidas como silicato de cálcio ou silicato de cálcio e magnésio são outros corretivos de acidez do solo utilizados na agricultura, capazes de neutralizar a acidez do solo, fornecer Ca e Mg e também o silício (Si) elemento benéfico capaz de aumentar a resistência das plantas e estresses biótico e abióticos, o que pode melhorar a produtividade das culturas comerciais⁶. **Conclusão:** Todos os corretivos supracitados são eficientes na correção da acidez dos solos, mas em relação ao custo-benefício o calcário é o produto mais usado, pois além de ser eficiente é mais acessível e rentável em relação aos demais.

REFERÊNCIAS

¹SOUSA, D.M.G.; MIRANDA, L.N.; OLIVEIRA, S. A. Acidez do solo e sua correção. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ,V.H.; BARROS, N.F. FONTES, R.L.F; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. 1017p.

²NOLLA, A.; SCHLINDWEIN, J.A.;AMARAL, A.S.; ANGHINONI, I. Indicadores para a tomada de decisão de calagem no Sistema Plantio Direto. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas: v. 11, n. 4, 2005. p. 471-476p.

³ALCARDE, J.C. **Corretivos da acidez dos solos: características e interpretações técnicas**. São Paulo: ANDA, 2005. 24p.

⁴NOLLA, A.; ANGHINONI, I. Métodos utilizados para a correção da acidez do solo no Brasil. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 42, n. 1, 2004.

⁵COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – CQFS RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Núcleo Regional Sul, 2004. 400p.

⁶KORNDÖRFER, G.H.; PEREIRA, H.S.; CAMARGO, M.S. **Silicatos de cálcio e magnésio na agricultura**. Uberlândia: GPSilICIAG-UFU, 2003. 53p. (Boletim técnico, 1).

CORREÇÃO DA ACIDEZ DE SOLOS SOB SISTEMA DE PLANTIO DIRETO

Eláyne Oliveira da Silva Alves^a, Luma de Fátima Louro Aita^a, Antonio Nolla^b

^aMestranda em Ciências Agrárias, UEM, Campus de Umuarama-PR, elayne.oli@hotmail.com;

^bDocente do Mestrado em Ciências Agrárias, UEM, Campus de Umuarama-PR nolla73@hotmail.com

RESUMO

Introdução: A acidez do solo limita a produtividade das culturas¹. Dentre as principais características de um solo ácido está a presença de elementos fitotóxicos como o Alumínio (Al⁺³) e o Manganês (Mn), baixo pH-H₂O (<5,5), baixa saturação por bases (<50%) e alta saturação por Al (>20%)². Para a neutralização desta acidez são utilizados corretivos agrícolas como o calcário, que deve ser aplicado em quantidades adequadas para atender as necessidades do solo de acordo com o sistema de manejo de solo adotado³. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre a correção da acidez de solos sob sistema de plantio direto. **Desenvolvimento:** Dependendo do tipo de manejo do solo são utilizados critérios diferentes para a calagem⁴. No SPC (Sistema de Plantio Convencional) devido a baixa solubilidade do calcário o mesmo é incorporado ao solo, visando corrigir a camada arável (0-20 cm)¹. No SPD (Sistema de Plantio Direto), a aplicação de calcário é realizada superficialmente na área total, porque os resíduos culturais são mantidos em superfície e ocorre a mobilização somente na linha de cultivo⁴. Neste sistema a ação do calcário aplicado superficialmente se restringe à camada de 10 cm, o que gera a necessidade de alteração na dosagem de calcário a ser utilizado, porque os métodos (fórmulas) de recomendação de calagem se baseiam na correção da acidez do solo com o corretivo sendo incorporado, corrigindo 20 cm de profundidade³. Assim, no SPD, a recomendação da calagem deve ser a metade (1/2) daquela recomendada para o SPC, evitando-se desta maneira uma super calagem, o que pode promover uma redução na disponibilidade de micronutrientes, além de um desequilíbrio entre os nutrientes, o que pode reduzir o potencial produtivo⁴. Além disso, a aplicação de doses recomendadas (1/2) para aplicação de calcário superficial racionaliza o uso deste insumo, o que aumenta a lucratividade das lavouras². A aplicação superficial neste sistema tem sido satisfatória na neutralização da acidez das primeiras camadas do solo¹. **Conclusão:** A correção da acidez em solos sob SPD é realizada superficialmente, possui eficiência e neste são utilizados os mesmos critérios do SPC, mas com o valor da dose dividido ao meio.

REFERÊNCIAS

¹SOUSA, D.M.G.; MIRANDA, L.N.; OLIVEIRA, S. A. Acidez do solo e sua correção. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ,V.H.; BARROS, N.F. FONTES, R.L.F; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. 1017p.

²MARTINS, C. E. **Práticas agrícolas relacionadas á calagem do solo**. Comunicado Técnico, 47: Juiz de Fora, 2005.

³NOLLA, A.; SCHLINDWEIN, J.A.;AMARAL, A.S.; ANGHINONI, I. Indicadores para a tomada de decisão de calagem no Sistema Plantio Direto. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas: v. 11, n. 4, 2005. p. 471-476p.

⁴NOLLA, A.; ANGHINONI, I. Critérios de calagem para a soja no Sistema Plantio Direto consolidado. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. Vol. 30, 2006. 475-483p.

⁵CANTARUTTI, R.B.; BARROS, N.F.; PRIETO, H.E.; NOVAIS, R.F. Avaliação da fertilidade do solo e recomendação de fertilizantes. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ,V.H.; BARROS, N.F. FONTES, R.L.F; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. 1017p.