

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE *Luffa cylindrica*
BASEADO EM ANÁLISE MOLECULAR E CARACTERES
MORFO-AGRONÔMICOS.**

ARIEL DOTTO BLIND

Manaus, Amazonas

Março, 2016

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Programa de Pós Graduação em Agronomia Tropical – ATR / UFAM

ARIEL DOTTO BLIND

DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE *Luffa cylindrica* BASEADO EM
ANÁLISE MOLECULAR E CARACTERES MORFO-AGRONÔMICOS.

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em
Agronomia Tropical, da Universidade Federal do Amazonas, como
parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Dra. Maria Teresa Gomes Lopes

Co-orientador: Dr. Danilo F. Silva Filho

Área de Concentração: Produção Vegetal

Manaus, Amazonas

Março, 2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B648d	Blind, Ariel Dotto Diversidade genética em acessos de <i>Luffa cylindrica</i> baseado em análise molecular e caracteres morfo-agronômicos / Ariel Dotto Blind. 2016 95 f.: il. color; 31 cm.
	Orientador: Maria Teresa Gomes Lopes Coorientador: Danilo F. Silva Filho Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.
	1. Acessos de bucha. 2. Similaridade genética. 3. Caracterização morfo-agronômica. 4. Produtividade. I. Lopes, Maria Teresa Gomes II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE *Luffa cylindrica* BASEADO EM
ANÁLISE MOLECULAR E CARACTERES MORFO-AGRONÔMICOS

Ariel Dotto Blind

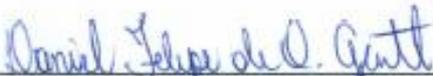
Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical, da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia Tropical.

Apresentação pública e aprovação em 3 de março de 2016.

Comissão examinadora:



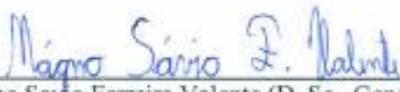
Prof. Pedro de Queiroz Costa Neto (D. Sc., Biotecnologia) – UFAM



Prof. Daniel Felipe Oliveira Gentil (D. Sc., Fitotecnia) – UFAM



Hiroshi Noda (D. Sc., Genética e Melhoramento) – INPA



Magno Sávio Ferreira Valente (D. Sc., Genética e Melhoramento) – UFV/UFAM



Prof.^a Maria Teresa Gomes Lopes (D. Sc., Genética e Melhoramento) – UFAM

Aos avós maternos Ciro Gaudino Dotto e Dilma Carlotto Dotto (*in memoriam*) agricultores da região de Caçador – SC.

Aos avós paternos Leopoldo Frederico Blind (*in memoriam*) e Hanni Cecilia Alice Blind mentores dos primeiros cultivos comerciais de bucha em Vilhena – Rondônia.

A meus Pais, Edgar e Aloysia, agricultores, por terem mostrado desde cedo a essência da vida, os caminhos a trilhar e a gratidão de cultivar plantas.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas dádivas da vida;

Aos meus Familiares, em especial a Suellem pela lealdade nos dias nublados e ensolarados, pelo amor, apoio e incentivo;

A UFAM e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado;

A UFAM – FAPEAM, por concessão de auxílio financeiro;

Ao INPA – Estação Experimental de Hortaliças, pela concessão de área e apoio para realização do experimento;

Ao Laboratório de Genética e Melhoramento – UFAM, pela permissão de efetuar análises moleculares aos finais de semana;

Ao Instituto Agronômico de Campinas, Embrapa Hortaliças, Instituto Agronômico do Paraná e Universidade Federal do Amazonas pela seção de germoplasma;

A professora Maria Teresa Gomes Lopes, pela amizade, ensinamentos, incentivo e orientação;

As colegas Fabiola e Franczy pela competência profissional e ajuda nas etapas moleculares AFLP;

Ao professor visitante Magno Savio, pelas sugestões e contribuições essenciais nas análises estatísticas;

Aos colegas de trabalho do INPA, José, Manoares e Danilo pelo apoio e incentivo;

A todos servidores da UFAM, INPA, FAPEAM pelos valiosos serviços prestados, pelo convívio e amizade.

Muito Obrigado!

Pensamentos

“Não adianta acumular títulos se você não souber ao menos, que o sol nasce para todos”

“A mente que se abre para um novo saber jamais se fechara do tamanho original”

“A única fonte de conhecimento e a experiência prática”

SUMÁRIO

Resumo	IX
Abstract	X
1.0 Introdução	1
2.0 Revisão Bibliográfica	4
2.1 Aspectos botânicos relacionados a bucha <i>Luffa cylindrica</i>	4
2.2 Aspectos agronômicos da bucha.....	6
2.3 Potencialidades da bucha.....	10
2.4 Divergência genética em recursos genéticos.....	12
2.4.1 Marcadores moleculares.....	13
2.4.2 Análise multivariada.....	15
3.0 Material e Métodos	19
3.1 Origem dos acessos.....	19
3.2 Área experimental.....	19
3.3 Tratos culturais	21
4.0 Capítulo 1 - Diversidade genética entre acessos de <i>Luffa cylindrica</i> utilizando marcador molecular AFLP	23
4.1 Resumo.....	23
4.2 Abstract.....	24
4.3 Introdução.....	25
4.4 Material e Metodos.....	27
4.5 Resultados e Discussão.....	34
4.6 Conclusões.....	39
4.7 Referências Bibliográficas.....	40
5.0 Capítulo 2 – Divergência genética entre acessos de <i>Luffa cylindrica</i> por descritores morfo-agronômicos	44
5.1 Resumo.....	44
5.2 Abstract.....	45
5.3 Introdução.....	46
5.4 Material e Métodos.....	48
5.5 Resultados e Discussão.....	51
5.6 Conclusões.....	62
5.7 Referências Bibliográficas.....	63
6.0 Capítulo 3 – Desempenho produtivo de bucha (<i>Luffa cilíndrica</i>) na Amazônia Central	67
6.1 Resumo.....	67
6.2 Abstract.....	68
6.3 Introdução.....	69
6.4 Material e Métodos.....	71
6.5 Resultados e Discussão.....	73
6.6 Conclusões.....	83
6.7 Referências Bibliográficas.....	84

7.0 Conclusões Gerais.....	87
8.0 Referências Bibliográficas.....	88
9.0 Apendices.....	96

Lista de Figuras	Pag.
Aspecto das mudas formadas em viveiro (A) plantas em desenvolvimento com 30 dias após o transplante (B) e plantas desenvolvidas com 90 dias após o transplante (C).	21
Dados médios de precipitação, temperatura máxima e temperatura mínima que ocorreram durante o desenvolvimento experimental no período de dezembro de 2013 á setembro de 2014. Fonte: BDMEP – INMET. Estação 82331.	21
Aspecto vegetativo da planta de bucha conduzida de forma orientada no sistema de espaldeira.	22
Sintomas de doenças fúngicas observadas em frutos de bucha cultivados na Amazônia Central.	22
Revelação do DNA dos 24 acessos de <i>Luffa cylindrica</i> em gel-agarose.	28
Amplificação seletiva dos fragmentos de DNA gerados nas matrizes de poliacrilamida A e B a partir de quatro combinações de oligonucleotídeos selecionados e empregados entre os 24 acessos de <i>Luffa cylindrica</i> .	35
Análise de agrupamento UPGMA, a partir da distância genética de Jaccard, em 24 acessos de <i>Luffa cylindrica</i> baseado nas análises de AFLP.	35
Análise de escalonamento multidimensional não-métrico das distâncias genéticas entre 24 acessos de <i>Luffa cylindrica</i> baseado nas análises de AFLP.	37
(A) Média dos logaritmos da função de verossimilhança para valores de K testados; (B) Valores de K mais prováveis obtidos pela amplitude de ΔK como função de K (média \pm DP superior a partir de 3 repetições).	37
Estrutura populacional em 24 acessos de <i>Luffa cylindrica</i> empregando o software Structure para diferentes valores de agrupamento (K).	38
Exemplo de características qualitativas observadas nas sementes (A) e aspectos biométricos medidos nos frutos de 24 acessos de <i>Luffa cylindrica</i> , posterior a lavagem e secagem da fibra (B e C).	49
Registro da presença de flores masculinas e femininas na mesma haste (A) e raízes aéreas (B e C) em <i>L. cilíndrica</i> .	52
Aspectos morfológicos de frutos maduros, produzidos entre 24 acessos de <i>Luffa cilíndrica</i> .	54
Apresentação morfológica de sementes (A, B, C, D) e da fibra (E e F) observada entre acessos de <i>L. cilíndrica</i> .	55
Dendrograma originado pelo método UPGMA, a partir das dissimilaridades de 24 acessos de <i>Luffa cylindrica</i> , baseado em caracteres morfológicos qualitativos. Coeficiente de correlação cofenética: $r = 0,6185$.	57
Dendrograma originado pelo método UPGMA, a partir das dissimilaridades de 24 acessos de <i>L. cylindrica</i> , baseado em caracteres morfológicos quantitativos. Coeficiente de correlação cofenética: $r = 0,7718$.	58
Dispersão gráfica dos escores em relação aos eixos representativos dos dois primeiros componentes principais (CP1, CP2), de oito caracteres quantitativos, em 24 acessos de <i>Luffa cylindrica</i> . Variância acumulada nos dois primeiros componentes de 87,12%.	60
Ponto de colheita dos frutos de bucha (A), retirada da casca e de sementes (B) aspecto da fibra após o enxague (C) e modo de secagem dos frutos fibrosos (D).	71
Comportamento das variáveis; Comprimento do Fruto (CF), Massa de Fibra (MF) e Número de Frutos (NF), produzidos entre os 24 acessos avaliados em período de seis meses.	77,78 79 e 80
Lista de Tabelas	Pag.
Propriedades tecnológicas da fibra de bucha (<i>Luffa cylindrica</i>) compatíveis a matrizes têxteis.	10
Composição estrutural de algumas fontes lignocelulósicas.	11
Lista dos acessos de <i>Luffa cilyndrica</i> e suas procedências.	19
Análise química do local onde os acessos de bucha foram cultivados.	20
Combinação de <i>Primers</i> utilizados para examinar as taxas de polimorfismo dos fragmentos amplificados de DNA em <i>Luffa cylindrica</i> .	29
Polimorfismo detectado por quatro combinações de oligonucleotídeos em acessos de <i>Luffa cylindrica</i> .	34
Lista dos descritores botânicos ponderados entre 24 acessos de <i>Luffa cylindrica</i> .	48

Caracterização de 24 acessos de <i>Luffa cylindrica</i> , considerando análise de 22 descritores morfológicos.	51
Agrupamento dos acessos de <i>L. cylindrica</i> pelo método de otimização de Tocher, baseado na distância genética proposta por Cole-Rodgers, considerando caracteres morfológicos qualitativos.	56
Agrupamento dos acessos de <i>Luffa cylindrica</i> pelo método de otimização de Tocher, baseado na distância genética de Mahalanobis, considerando caracteres morfológicos quantitativos.	57
Contribuição relativa dos oito caracteres morfológicos quantitativos para divergência entre 24 acessos de <i>Luffa cylindrica</i> , pela estatística (S.j) proposta por Singh (1981).	59
Matriz de correlação entre caracteres quantitativos avaliados durante seis meses de produtividade dentre acessos de <i>L. cilíndrica</i> .	61
Resumo da análise de variância para as características produtivas, avaliadas entre os acessos de bucha.	73
Rendimento acumulado de frutos e colheitas entre os acessos de bucha estudadas no período compreendido em 6 meses de produção.	74
Média dos caracteres de produtividade para 6 meses de produção entre acessos de bucha vegetal.	75
Apêndices	96
Medida de dissimilaridade genética entre 24 acessos de bucha, sendo expressa pela distancia de Jaccard.	97
Medida de dissimilaridade genética entre 24 acessos de bucha, sendo expressa pelo coeficiente proposto por Cole-Rodgers (Cole-Rodgers et al., 1997).	98
Medida de dissimilaridade genética entre 24 acessos de bucha, sendo expressa pela distância de Mahalanobis, média padronizada.	99

RESUMO

A bucha vem se destacando no mercado de fibras naturais pela facilidade de cultivo e aplicabilidade em diversos setores da agroindústria. O estudo da diversidade varietal ao nível molecular, morfológico e produtivo, dentro de uma coleção de germoplasma são atividades essenciais para o estabelecimento de um programa de seleção e reprodução que permita triagens de genótipos com características desejáveis, para diferentes finalidades. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi estudar a divergência genética de acessos de bucha a partir de dados binários, multicategóricos e dados de produtividade, além de análises paralelas de correlação, e análise de regressão sobre o desempenho produtivo durante seis meses. Os 24 acessos de bucha, foram do Banco Ativo de Germoplasma-UFAM e são provenientes dos estados do Amazonas, Rondônia, Pará, Distrito Federal, São Paulo, Paraná e Santa Catarina reunidos e cedidos institucionalmente por meio de cessão de germoplasma entre a Universidade Federal do Amazonas, Embrapa Hortaliças, Instituto Agrônomo do Paraná, e Instituto Agrônomo de Campinas. Os resultados obtidos sobre a diversidade a nível molecular e morfo-agronômica demonstra que existe diferentes configurações de agrupamentos ambos com ampla variabilidade potencial a ser explorada entre os acessos mesmo que dispersos geograficamente. Com relação aos dados qualitativos e quantitativos os resultados demonstraram que os acessos são fenotipicamente diferentes para 30 descritores analisados com diferentes conformações botânicas e biométricas sendo que a variável; comprimento de frutos (62,32%) foi o componente que mais contribuiu para divergência encontrada. Existe correlação positiva entre as variáveis; comprimento do fruto x massa de fibra x espessura da manta fibrosa. Com relação ao desempenho produtivo, a maioria dos acessos possui aptidão para plantio na região, podendo acumular em período de seis meses até 87 frutos por planta. A análise de regressão sobre o comportamento produtivo durante os seis meses, para o número de frutos, a massa de fibra e o comprimento de frutos, revelam melhor entendimento a partir da 4ª ordem na equação polinomial, evidenciando que entre uma colheita e outra existe sazonalidade moderadamente acentuada.

ABSTRACT

The culture of the loofah has been outstanding in the market of natural fibers for easy manipulation and applicability in various sectors of agribusiness. The study of the molecular diversity varietal level, morphological and productive within a germplasm collection are essential for the establishment of a selection and playback program that allows screening of materials with desirable characteristics for different applications. In this sense the objective of this work was to study the genetic divergence loofah access from binary data, multicategorios and quantitative, in addition to parallel correlation analysis, estimates of genetic parameters and regression analysis on performance for six months. 24 loofah access, are in the BAG-UFAM and come from the states of Amazonas, Rondônia, Pará, Federal District, São Paulo, Paraná and Santa Catarina assembled and assigned institutionally through germplasm assignment of the Federal University of Amazonas, Embrapa vegetables, Institute Agronomic of Paraná, and the Campinas Agronomic Institute. The results of the diversity at the molecular level and morphological and agronomic demonstrates that there different groups of settings both with wide variability potencial to be explored between accesses. Regarding the qualitative and quantitative data results showed that the materials are phenotypically different for 30 descriptors analyzed with different botanical and biometric conformations of which the variable; fruit length (62.32%) was the component that contributed most to divergence found. There is a positive correlation between the variables; fruit length x fiber mass thickness x of the fibrous web. The fruit number was the parameter showed the lowest heritability (71.9%) among the analyzed carcteristicas. Regarding the productive performance, the most hits have aptitude for planting in the area may accumulate in period of six months up to 87 fruits per plant. Regression analysis on productive behavior for six months for the fruit number, the mass of fiber and the length of fruits, reveal better understanding from the fourth order in the polynomial equation, and between one harvest and another there is more seasonal or less marked.

1.0 INTRODUÇÃO

A bucha, também é conhecida popularmente como “esponja vegetal” [*Luffa cylíndrica* (Linn). Roem] e pode tornar-se uma importante planta industrial, no comercio de fibras naturais em nível mundial. O grande atrativo desse vegetal é que as fibras lignocelulósicas produzidas são biodegradáveis e atóxicas quando não tratadas, é recurso natural renovável e proporciona custo relativamente baixo de produção.

Na revisão “*Luffa cylíndrica* - an emerging cash crop” “*Luffa cylíndrica* - uma cultura emergente” realizada por Oboh e Aluyor (2009) comprovam a nobreza da fibra e potencialidade do vegetal, nas áreas da agricultura, medicina, engenharia de materiais e na biotecnologia.

Vários estudos evidenciam a aplicação da fibra da bucha para adesão e compatibilidade com polímeros (d’Almeida et al., 2005; Guimarães, 2010; Laidani et al., 2012); absorvente para remoção de agentes tenso ativos (Bal et al., 2004; Ye et al., 2013); filtros de óleo, estofamento automotivo e industrial (Mazali e Alvez, 2005; Carvalho, 2007); limpeza doméstica e higiene corporal além de palmilhas de calçados (Melo e Moreira, 2007; Ferreira et al., 2012); uso ortodôntico (Barra & Lima, 1990; Bottin et al., 1998; Leite et al., 2012); isolamento acústico, térmico e mecânico em determinados ambientes (Oliveira e Teodoro, 2005); incluindo emprego em artesanato (Ferreira et al., 2012) e fabricação de vasos e tubetes biodegradáveis (Vichiato et al., 2008).

Atualmente o emprego de fibras naturais em matrizes e compósitos biodegradáveis, tem sido alvo de instituições, empresas e centros de pesquisa no mundo todo. Isto porque as propriedades tecnológicas evidenciam a substituição e/ou incorporação em novos produtos e compósitos, como é o caso do uso da fibra de bucha (Davis, 1994; Dairo et al., 2007 Oboh e Alyor, 2009; Laidani et al., 2012). A exploração da biodiversidade da bucha pode permitir triagens para aplicações específicas em novos materiais, réplicas de inorgânicos em que predominam escalas micrométricas com baixo custo e fonte renovável.

O Instituto Brasileiro de Fibras (IBRAFIBRA) reportou uma estimativa, que o mercado de fibras naturais movimentou 18.8 bilhões de reais no ano de 2012 com crescimento previsto na ordem de 8% ao ano. Atualmente, é possível observar entre consumidores, uma tendência de consumo por produtos de origem vegetal e biodegradáveis e talvez isto venha a contribuir com a crescente demanda em diversos países. Conforme apontam Oboh e Alyuor (2009) a substituição de produtos sintéticos, principalmente os derivados de petróleo, por produtos

naturais é crescente nos países com acelerado crescimento, devido aos apelos ambientais para utilização de “produtos ecologicamente corretos”, além da oportuna chance de empresas *start-ups* pesquisar e desenvolver novos produtos com “selos e rótulos verdes” para este crescente público.

A caracterização de acessos de bucha pode sustentar pesquisas de aprimoramento genético para fins de cultivo, atendendo ainda a prospecção sócio-econômico-ambiental de diversas regiões do Brasil, incluindo a Amazônia. Além do mais, existe apelo governamental sobre uso de matrizes e compósitos biodegradáveis, com aplicações nas mais diversas áreas da agroindústria, aliada sobre tudo ao desenvolvimento, geração de emprego e renda ao setor primário.

A exploração comercial da bucha torna-se mais oportuna uma vez que seja conhecida a ampla variabilidade genética existente (Queiroz, 2004; Melo e Moreira, 2007; Zhang et al., 2008; Ferreira et al., 2009; Silva et al., 2012). A pouca informação bibliográfica acerca do desempenho produtivo institui a necessidade de estudos nos mais diversos campos da agronomia, a fim de conhecer e subsidiar informações tecnológicas adequadas para cultura e/ou visando o aprimoramento genético e cultivo em uma determinada região.

Até o momento os trabalhos desenvolvidos com bucha focaram principalmente as propriedades físicas, mecânicas e químicas da fibra (Tanobe et al., 2005; 2014) além da limitação de diferenciação arbitrária entre acessos (Ferreira et al., 2012). São pouco os trabalhos que geram conhecimento da variação genética em espécies do gênero (Tyagi et al., 2015) havendo a necessidade de estudos sobre a diversidade em acessos distanciados geograficamente, o que iria auxiliar na descoberta de possíveis amostras com potencial diferenciado para a agroindústria e fontes de genes de interesse para programas de melhoramento (Prakash et al., 2014).

Atualmente, os programas de melhoramento têm utilizado a associação de técnicas clássicas a ferramentas biotecnológicas como, por exemplo, o uso de marcadores moleculares (Zhang et al., 2008; Borem et al., 2012) sendo possível distinguir fielmente a divergência genética entre acessos de plantas pouco conhecidas (Ferreira e Grattapaglia, 1998), entretanto não evidencia o desempenho produtivo e sua interação ambiental.

Para contrastar materiais potenciais de bucha foi sugerido avaliar as características agronômicas (Davis, 1994; Lira et al., 2012) uma vez que fica evidente a aptidão produtiva tanto quantitativamente como qualitativamente entre acessos e assim classifica-los ao passo que

reúne-se subsídios importantes para condução de uma cadeia economicamente produtiva e viável para a espécie.

O manuseio simultâneo das múltiplas variáveis botânicas ajuizadas como descritores são ferramentas vantajosas na discriminação de acessos. Além disso a caracterização de acessos desconhecidos pode fornecer informações sob a variabilidade genética de modo eficiente, onde centenas de cruzamentos indesejáveis posteriormente podem ser evitados.

A divergência genética e o comportamento produtivo são importantes indicadores para melhorar o cultivo e aprimorar geneticamente uma espécie. A determinação da diversidade existente de uma coleção em um Banco Aivo de Germoplasma, pode ser eficiente na identificação de materiais superiores, permitindo concentrar esforços em uma ou em um conjunto de características desejáveis e predispor aqueles que reúnem melhores atributos para uso geral e específico.

Neste sentido o presente trabalho teve por objetivo avaliar acessos de bucha provenientes de diferentes regiões do Brasil, verificando a divergência genética entre os materiais via análise de marcador molecular AFLP, descritores morfo-agronômicos e o desempenho produtivo, visando identificar indivíduos adequados para o cultivo na região e superiores para serem utilizados em programa de melhoramento da espécie.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos botânicos relacionados a bucha *Luffa cylindrica*

O gênero *Luffa* possui espécies originárias na Ásia, África e América (Cruz et al., 1997) na ITIS – *Integrated Taxonomic Information System*, é citado apenas três espécies para o gênero *Luffa*, sendo elas: *Luffa acutangula* (L.) Roxb, *Luffa cylindrica* e *Luffa operculata* (L.) Cogn. Já no guia de descritores botânicos elaborado por Joshi et al. (2004) é referenciado ocorrência de mais duas espécies, endêmicas do Nepal: *L. graveolens* e *L. echinata*. No Brasil é comum encontrar a espécie *L. cylindrica*, vegetando de Norte a Sul do País com características rústicas de planta daninha (Queiroz, 2004; Melo e Moreira 2007). Alguns estudos apontam sua domesticação em regiões de clima tropical no continente Asiático, entretanto, atualmente a espécie esta dispersa no mundo todo com ampla variabilidade genética (Heiser e Schiling 1988; Cruz et al., 1997; Zhang et al., 2008; Ferreira et al., 2010).

Indícios apontam que a bucha surgiu no Brasil logo após a colonização pelos portugueses e posteriormente difundida para outras regiões neste País (Bisognim, 2002; Melo e Moreira, 2007). A bucha é bastante encontrada desde a região norte, nordeste ao sul do Brasil (Queiroz, 2004). O Estado de Minas Gerais é considerado maior produtor do país, particularmente o município de Bonfim (Ferreira et al., 2010). No Amazonas a produção comercial concentra-se nos municípios de Presidente Figueiredo, Rio Preto da Eva e Iranduba, restringindo-se a pequenas áreas caracterizadas na maioria das vezes, pelo baixo nível de técnicas no manejo e de qualificação profissional dos horticultores.

Pertencente à família botânica Cucurbitaceae, *L. cylindrica*, possui sinonímia botânica de *L. aegyptica* Muell, planta herbácea, geralmente monóica, hábito de crescimento ramador trepador (Bisognim 2002; Carvalho, 2007) apresenta frutos do tipo baga, fibrosos, cilíndricos ou trigonais alongados ou elipsóides que surgem em haste na axila foliar apresentando variações biométricas de acordo com materiais cultivados e sua procedência (Joshi et al., 2004; 2010). Os frutos geralmente são amarelo pálidos quando maduros, com dimensões variáveis de 20 até 160 cm, possuindo três a sete lóculos, flores amarelas masculinas e femininas na mesma planta (Ferreira et al., 2010; Silva et al., 2012). As sementes elipsoides apresentam variação da cor preta ao branco e possuem forma geralmente achatada (Joshi et al., 2004).

Para Cruz et al. (1997) Carvalho (2007) e Ferreira et al. (2010) os acessos de bucha de modo geral, apresentam folhas alternadas, são amplas e crescem espaçadas em volta do caule, podendo ser ovaladas, orbiculares, reniformes ou pontiagudas, lisas ou dentadas e ainda

conforme o genótipo, a coloração pode ocorrer em vários tons de verde. No Brasil a prática de propagação seminal de bucha, contribui para diversidade relatada, principalmente nos Estado de Minas Gerais e São Paulo (Melo e Moreira 2007; Ferreira et al., 2010).

O sistema radicular é muito ramificado, fasciculado e superficial, na ocasião em que a planta é transplantada, o sistema radicular explora os primeiros 30 centímetros do solo, sendo que através da sementeira direta a raiz pivotante pode atingir até 50 cm de profundidade (Siqueira, 2007).

Heiser e Schiling (1988) e Cruz et al. (1997) citam que as três espécies em *Luffa* sp podem diferir entre e dentre si, pelos tipos de folhas e frutos, tamanhos, formas, cores, texturas, densidades e propriedades bioativas, além dos rendimentos produtivos.

No Brasil, poucos esforços foram concentrados no estudo da bucha, desta forma a espécie até o presente momento consta com poucas variedades definidas, específicas para determinado uso. As variedades mais conhecidas são denominações institucionais de avaliações preliminares e de locais de coleta, tais como: IAC - Cylinder N° 3, IAC – Futohechima e MAF-263 que originaram-se de seleção sobre avaliações em caracteres morfo-agronômicos desejáveis conforme citam Melo e Moreira (2007), Carmo (2007), e Ferreira et al. (2009).

Na concepção de Melo e Moreira (2007), Zhang et al. (2008) Lira et al. (2012) a seleção de acessos e desenvolvimento de híbridos em bucha podem ser obtidas para abranger um maior numero de características indispensáveis para que a planta possa expressar e exercer sua capacidade genética, tornando possíveis os melhores rendimentos econômicos e ainda com aplicabilidade específica.

O desenvolvimento de linhagens endogâmicas em espécies alógamas e posteriormente desenvolvimento de híbridos é hoje prática comum, e prioritária nos países em acelerado processo de desenvolvimento motivado pelas vantagens oferecidas aos produtores e consumidores, destacando-se: aumento da produtividade; maior uniformidade e melhor padronização; e melhor qualidade dos frutos/fibra.

Alguns aspectos são indispensáveis no desenvolvimento de novas variedades e/ou híbridos em cucurbitácea no Brasil, dentre estes, a rusticidade, boa produtividade, resistência e/ou tolerância múltipla a pragas e doenças, a fim de oferecer aos produtores genótipos, adaptados às condições prevalentes na maior parte do território nacional, além das

especulações agroindustriais para as propriedades mecânicas da fibra (Bisognin, 2002; Queiroz et al., 2004; Melo e Moreira 2007, Ferreira et al., 2009).

2.2 Aspectos agronômicos da bucha

Por ser uma espécie rústica e tolerante a adversidades físicas, químicas e biológicas de solo (Bisognin, 2002; Rizo et al., 2004, Aumond et al., 2011) plântulas de bucha podem servir como porta enxerto para outras cucurbitáceas, em virtude da resistência a determinados fitopatógenos (Ito et al., 2009) e pela eficiência na extração de nutrientes em solos de baixa fertilidade natural (Siqueira, 2007).

A bucha pode viver por até três anos, porém, quando em cultivo comercial é possível explorar economicamente por até dez meses, sem perdas significativas no rendimento em geral conforme Davis, (1994) e Carvalho (2007) atentando-se para a disponibilidade hídrica e nutricional.

A espécie requer bastante luz, no mínimo oito horas por dia, e temperaturas em torno de $26 \pm 12 \text{ C}^\circ$, o que torna as regiões tropicais potenciais ao cultivo (Cruz et al., 1997; Davis, 1994; Silva et al., 2012). Precipitações pluviométricas devem estar acima de 1.200 mm/anuais bem distribuídos ao longo do ano (Bal et al., 2004; Carvalho, 2007; Marouelli et al., 2013).

Da sementeira até a primeira colheita acumulam-se em média 120 dias, posteriormente é possível colher frutos semanalmente o que depende do potencial varietal de ramificação e pegamento de frutos, da variação sazonal das condições térmicas e hídricas, do manejo nutricional, além dos tratamentos culturais no sistema de cultivo adotado (Carvalho, 2007; Ferreira et al., 2010).

De maneira geral, a bucha é considerada uma planta de ampla adaptabilidade em clima subtropical ao equatorial, em regiões úmidas até áridas podem apresentar condições agroclimáticas favoráveis à sua produção (Davis, 1994; Oboh e Aluyor, 2009; Silva et al., 2012). Entretanto é passível de haver variações em suas características, nas taxas de crescimento, nos níveis de produtividade e na qualidade das buchas.

Variações do meio ambiente, principalmente daquelas prevalentes no habitat natural, conduzem a modificações nos indivíduos quanto aos perfis de rendimentos e conformações de forma muito dinâmica, sendo estes responsáveis pelas relações entre o indivíduo e o ambiente onde ele se encontra. A interferência dessas variações no fenótipo da planta é classicamente

representada pela localidade de cultivo, genótipos e anos diferentes, assim como pela interação entre os três fatores (Borem e Miranda, 2005).

Devido à superficialidade de seu sistema radicular a bucha produz bem e adapta-se melhor em solos de textura média destorroados, podendo ser areno-argilosos e/ou latossolos bem drenados, rico em matéria orgânica, exigindo disponibilidade de nutrientes nas camadas superficiais e pH entre 5,5 a 6,5 (Bal et al., 2004; Siqueira, 2007).

Apesar da bucha possuir rusticidade vegetativa independente dos níveis de fertilidade, torna-se indispensável à utilização de incrementos férteis para a cultura, quando o solo não possui condições naturais de suprir a necessidade mínima requerida pela espécie uma vez que veiculam níveis de rendimento e qualidade. Para tanto é necessário realizar uma análise química do solo na área pretendida para o cultivo, para efetivar se necessário, uma adubação correta e equilibrada (Malavolta, 1992).

Estudos realizados por Siqueira (2007), sobre crescimento e acúmulo de nutrientes em bucha evidencia que a espécie é pouco exigente no aporte nutricional do solo, porém extremamente influenciada pela fase de desenvolvimento x elemento disponível - exportado, sendo necessário em ordem de importância para o crescimento: o fósforo (P_2O_5) e o nitrogênio (N_2), posteriormente para desenvolvimento de ramas e frutos: potássio (K_2O) cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) integrados á disponibilidade e benefícios dos micronutrientes: cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn) molibdênio (Mo) e boro (B) porem estes últimos em proporções bem menores. O efeito benéfico destes elementos em cucurbitáceas são amplamente relatados por Malavolta (1992), Faquim (2004) e Filgueira (2008).

A deficiência de N e K determina todo incremento vegetativo e qualitativo de plantas em cucurbitáceas, pois o nitrogênio se apresenta e atua na planta como componente estrutural de macromoléculas e constituinte de enzimas, sendo precursores de hormônios vegetais (Acido Indol Acético e Etileno), clorofilas e citocromos (Grangeiro e Cecilio Filho 2005; Siqueira 2007). Tais elementos, devem ser disponibilizados para culturas em geral, parceladamente devido às perdas por volatilização e lixiviação (Malavolta, 1992).

Em cucurbitáceas, Grangeiro e Cecilio Filho (2005) e Filgueira (2008), descrevem que a deficiência de fósforo provoca retardamento no crescimento das plantas, má formação do sistema radicular, folhas e flores raquíticas. Siqueira (2007) considerou que para a bucha a

extração de fósforo é semelhante para cultura da melancia (*Citrullus lanatus*) denotando sua importância para o evento produtivo, e deve ser disponibilizado de forma equivalente.

Em relação à disponibilidade e benefícios dos micronutrientes, estes são considerados condicionadores e de extrema importância tanto para a assimilação dos quais a bucha vegetal é mais exigente, como desempenhar funções específicas no metabolismo vegetal, sendo necessitado de proporções inferiores (Siqueira, 2007).

Para a produção de bucha, a combinação de fertilizantes químicos e orgânicos pode ser relevante, influenciando no dispêndio para implantação da cultura, considerando a eficiência do adubo e os preços praticados dos insumos, no mercado local.

Para cucurbitáceas, experimentos comprovam que a irrigação, seja por aspersão, nebulização, gotejamento ou infiltração, durante todo desenvolvimento do vegetal, contribui para a qualidade da planta refletindo diretamente nos índices produtivos, desde que disponibilizada de forma equilibrada (Marouelli et al., 2013). A bucha contém um teor de umidade em torno de 20 % no pré amadurecimento dos frutos sendo pouco exigente em água (Zhang et al., 2008). O controle de plantas daninhas é essencial durante todo desenvolvimento das plantas, as quais competem por água, luz, gases e nutrientes do solo (Carvalho, 2007).

Outros aspectos devem ser considerados; o emprego de espaçamentos apropriados que permita melhor distribuição espacial do sistema radicular proporcionando melhor exploração do perfil do solo e o monitoramento e/ou controle de pragas e doenças que podem comprometer a lavoura em qualquer fase de desenvolvimento, quando estes atingem níveis de danos econômicos, são práticas indispensáveis (Ferreira et al., 2010) e devem ser considerados em estudos agronômicos.

O nível de emprego tecnológico para o cultivo da bucha é baixo, o que torna seu cultivo favorecida pela agricultura familiar, como é o caso do Estado do Amazonas, pois dispensa a utilização de fertilizantes e defensivos convencionais, sendo necessário um mínimo de operação, além de permitir que seu cultivo se de em áreas alteradas, tais como capoeiras “novas”, solo de várzea, pastagens abandonadas e áreas de constantes cultivos agrícolas, carecendo poucas práticas de manejo para seu cultivo.

A bucha é extremamente fácil de ser cultivada, possui expressiva rusticidade (Silva et al., 2012), e é encontrada em diversos ambientes, inclusive nascendo e produzindo esporadicamente em quintais e margens de estradas (Carmo, 2007; Melo e Moreira, 2007).

Pela espécie ter hábito de crescimento indeterminado ramador trepador é recomendável que seja cultivada em parreirais e /ou espaldeiras, a campo aberto no sistema convencional e/ou orgânico o que dependerá de análises de vantagens e desvantagens para cada sistema (Carvalho, 2007).

Os dois sistemas diferem entre si em vários aspectos no manejo da cultura bem como nos parâmetros agroeconômicos. Existem ainda os sistemas “caseiros” de cultivo, em que predominam a criatividade de condução de plantas em cercas, muros residenciais e até mesmo consorciado com outras espécies.

Cada planta de bucha rende em média para um ano de colheita, cerca de 4 dúzias de frutos, que são colhidos geralmente a partir do quarto mês, após a semeadura (Carvalho, 2007; Ferreira et al., 2010) mas isto depende da capacidade genética e do manejo agrônomo para cultura conforme apresentado anteriormente.

Atualmente o Estado de Minas Gerais é considerado o maior produtor de bucha do Brasil (Lira et al., 2012), com uma produção estimada em 100.000 (cem mil) dúzias no ano de 2010, com valor da dúzia das estilhas, sendo comercializado a R\$ 35,00 (Globo rural - em 03/06/2013). Não existem estatísticas sobre área cultivada e produção em nível nacional, contudo verifica-se forte interesse entre agricultores de diversas regiões do Brasil.

A colheita da bucha é realizada exclusivamente de forma manual, quando os frutos apresentam a coloração amarelo pálido (fase que as fibras apresentam-se fisiologicamente maduras) conforme apontam Zhang et al. (2007) posteriormente os frutos são descascados e lavados para que as fibras permaneçam com cristalinidade natural.

Após a retirada da casca e sementes, recomenda-se enxaguar novamente, pois elimina-se assim os resíduos e/ou sementes que por ventura ainda estiverem aderidos entre as fibras. Posteriormente ao enxágue, faz-se necessário “pendurar” as estilhas em varais, bancadas e/ou ripas com ganchos, com finalidade de secar as fibras podendo ser á sombra e/ou no sol, em local bem arejado por cerca de 48 h conforme Carvalho (2007).

Após a secagem, preferencialmente á sombra porque as fibras não ressecam excessivamente mantendo a maciez e cristalinidade (Zhang et al., 2007) pode-se estocar por longo período em local seco e arejado para posterior beneficiamento e ou comércio (Carvalho, 2007; Melo e Moreira 2007).

2.3 Potencialidades da bucha

Conforme já exposto, vários estudos comprovam as aplicabilidades domésticas, dermo-cosméticas e industriais da fibra da bucha, além disso os frutos verdes podem ser utilizados na fitomedicina por constituintes bioativos pertencentes a classe dos flavonóides, alcalóides, terpenóides e antioxidantes, os quais proporcionam tratamentos de enfermidades endócrinas, e ainda efeito antifúngico e bactericida (Dairo et al., 2007; Ismail et al., 2010; Partap et al., 2012). O consumo *in natura* de frutos procede particularmente da Ásia Oriental (Du et al., 2006). Das sementes extrai-se um óleo fino de cor e semelhança ao óleo de oliva, que pode ser usado sobre atividade antifúngica e antibacteriana (Devi et al., 2009).

Enquanto algumas espécies fibrosas têm sido amplamente estudadas e utilizadas em compósitos, muitas outras fibras menos conhecidas possuem aplicabilidade limitada, por exemplo, em confecção de cordas, tapetes, sacos e/ou tapeçarias (Tanobe et al., 2005; Oboh e Alyuor 2009).

Um dos entraves para encontrar novas utilizações para esta fibra natural é a falta de dados científicos disponíveis sobre a sua diversidade genética, estrutura e propriedades (Dairo et al., 2007; Oboh e Alyuor 2009; Silva et al., 2012). A maioria das fibras naturais têm resistência moderada a influências ambientais e mostram uma variabilidade intrínseca das suas propriedades e devem ser estudas empregadas em testes físicos-mecânicos e químicos como por exemplo os testes de d'Dalmeida et al. (2005) para acetilação da fibra com NaOH com vistas a aumentar a adesão, compatibilidade e/ou reforço a outras matrizes poliméricas empregadas em compósitos em geral.

O estudo das propriedades mecânicas e como ela se comporta entre diferentes épocas de colheita, constitui caráter importante porque evidenciam possíveis processamentos e modelagens e devem ser considerados em culturas cuja produção seja prioritariamente fibras.

Dentre as propriedades tecnológicas do complexo fibroso dos frutos da bucha destaca-se varias características que evidenciam e despertam o interesse agroindustrial desta fibra (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades tecnológicas da fibra de bucha (*Luffa cylindrica*) compatíveis a matrizes têxteis

Características	Item	Dados
-----------------	------	-------

Organolépticas	Cheiro	-
	Aparência	Macro e microporosidade (Altinisik et al., 2010)
	Cor	Cristalina e/ou tom creme, amarelado (Ferreira et al., 2010)
Físicas	Textura	Macia - ríspida (Tanobe et al., 2005)
	Densidade	Satisfatória com resultados igual ou superior a 0.82 g/cm ³ (Ghali et al., 2011)
	Teor de Umidade	Pós secagem á sombra padrão de 7.9 % a 9.5 % (Boynard e D'Almeida 1999)
Químicas	Toxidade	Reação tóxica nula (Partap et al., 2012)
	Degradabilidade Aeróbica	Lenta (Krupp e Jewell, 1992)
Mecânicas	Elasticidade	Boa elasticidade, não apresenta casos de rompimento brusco (Mazali e Alves, 2005)
	Flexibilidade	Alta flexibilidade em testes de manuseio (Boynard et al., 2003; Siqueira et al., 2010)
	Resistência	Ao calor até 200 ° C (Tanobe et al., 2005)
	Ruptura	Boa resistência a tração com variação media de 53.1 ± 19 MPa (Siqueira et al., 2010)

Além dos interesses agroindustriais, diversas espécies lignocelulósicas são exploradas de maneira econômica, movimentando macro e micro regiões, em virtude de apresentarem atributos nobres com finalidades operacionais abrangentes, pela presença de celulose, hemicelulose e lignina (Tanobe et al., 2005; Siqueira et al., 2010). Na tabela 2, são apresentadas algumas destas espécies e a comparação estrutural da fonte.

Tabela 2. Composição estrutural de algumas fontes lignocelulósicas

Fibra	Celulose %	Hemicelulose %	Lignina %	Referência
Sisal	60 - 75.2	10 - 16.5	7.6 - 12	(Satyanarayana et al., 2007)
Rami	68.6 - 85	3 - 13.1	0.5 - 0.6	(Bledzki e Gassan 1999)
Algodão	82.7 - 90	5.7 - 6	-	(Satyanarayana et al., 2007)
<i>Luffa cylindrica</i>	60 - 63	19.4 - 22	10.6 - 11.2	(Tanobe et al., 2005; Hanini e Bouaziz 2003)
Madeira dura	40 - 45	32 - 33	17 - 26	(Hanini e Bouaziz 2003)

Fonte: Adaptado de Siqueira et al., (2010).

Outra vantagem competitiva refere-se aos cultivos realizados nos Estados da Amazônia Brasileira comparados aos plantios dos Estados do Sul e Sudeste, pela possibilidade de ser explorada o ano inteiro, pois naquelas regiões, a estação fria contribui com drásticas reduções na produtividade das plantas (Melo e Moreira 2007). Outro ponto favorável é o extenso período chuvoso na Amazônia (cerca de 2.500 mm ao longo do ano) o que pode favorecer a formação de frutos e melhorar significativamente a rentabilidade das plantas, inclusive conta com o Instituto de Fomento à Produção de Fibras Vegetais na Amazônia (IFIBRAM), sediada em Belém – PA, e que visa apoiar/subsidiar projetos que contemplem a exploração de plantas produtoras de fibras.

Ainda nesta diretriz de competitividade e sustentabilidade de cultivo e produção, o uso de matrizes energéticas biodegradáveis tem-se constituído cada vez mais a bandeira de diversos países, preocupados com os fatores antrópicos da ação do homem e aumento do consumo de bens. Neste quesito, a fibra da bucha pode potencializar o uso racional de recursos naturais frente à utilização de elementos inorgânicos em diferentes setores da atuação industrial do Brasil e da Amazônia, proporcionando, além disso, um desenvolvimento microrregional, beneficiando tanto o homem do campo, a cadeia empreendedora e até polos industriais.

2.4 Divergência genética em recursos vegetais

O conhecimento da variabilidade genética em espécies vegetais e como ela se apresenta, contribui para o uso racional e sustentável dos recursos genéticos nativos e/ou naturalizados (Nass, 2007). Em virtude da perda de algumas espécies e plantas nos últimos séculos e seu impacto negativo sobre os valores ambientais e socioeconômicos, ultimamente diversos setores da pesquisa vem despertando a sociedade para estudos e conservação de recursos vegetais pouco conhecidos.

As estimativas de divergência entre acessos de plantas ou populações que são utilizadas para quantificar a variabilidade em germoplasmas, além de fomentar o conhecimento das relações filogenéticas, permitem identificar, caracterizar e avaliar o nível de dissimilaridade entre diversos indivíduos.

Quantificar a similaridade genética torna-se um importante parâmetro a ser utilizado para conservação e aprimoramento de plantas com características desejáveis à prospecção

economica. Este parâmetro pode ser embasado em uma série de particularidades, provenientes de dados moleculares, morfo-agronômicos, biométricos e sobre o desempenho produtivo em uma determinada região. Esta abordagem de estudo que considera a combinação de várias características, tem-se mostrado mais eficiente na identificação e seleção de materiais mais promissores (Clement, 2012). No Brasil a maioria dos estudos genéticos com espécies pouco conhecidas baseia-se na importância econômica, ou seja, nos dados quantitativos, o que torna o melhoramento menos eficiente.

Em cucurbitáceas, diversas técnicas moleculares ou descritivas são empregadas para caracterização da variabilidade genética de modo adequado, com finalidades de subsidiar programas de melhoramento e vistas ao uso agrônomico (Zhang et al., 2008; Joshi et al., 2010; Borem et al., 2012).

Para bucha, existe diversos estudos caracterizando geneticamente acessos via dados morfológicos x tecnológicos dos frutos de diversos países como Turquia (Altinisik et al., 2010), Filipinas (Cruz et al., 1997) Tunísia (Ghali et al., 2009) China (Zhang et al., 2008) Algéria (Laidani et al., 2012) e Nepal (Joshi et al., 2010). Em todos os trabalhos citados, constata-se grande variabilidade entre os acessos avaliados, confirmando possibilidade de seleção de indivíduos superiores com características de interesse para cada localidade.

2.4.1 Marcadores moleculares

O uso de marcadores moleculares vem tornando-se cada vez mais comum no estudo da diversidade vegetal, pois permitem detectar polimorfismos na molécula de DNA, cobertura do genoma de modo eficiente e tempo reduzido. O aprimoramento das técnicas de detecção do polimorfismo diretamente no DNA, teve impulso com o surgimento do DNA recombinante e a amplificação da molécula de DNA, por PCR *Polimerase Chain Reaction*, evidenciando ainda mais a potencialidade do uso de marcadores.

Dentre as técnicas mais utilizadas, por motivos de confiabilidade, particularidades e vantagens de aplicação, o AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*, o RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*, o SCAR - *Sequence-Characterized Amplified Regions*, o RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism DNA*, e Microssatélites permitem, quantificar o DNA genômico e predispor a variabilidade de polimorfismo existente sem interação ambiental (Vos et al., 1995). Estes sinalizadores de polimorfismo baseiam-se nas alterações elementares da molécula de DNA, que são abundantes em genomas de plantas

alógamas, isto é, ocorre mais variação nas bases nitrogenadas da cadeia (Adenina, Citosina, Timina e Guanina) (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O AFLP e RAPD, são marcadores dominantes que foram propostas como métodos mais sensíveis, rápidos e relativamente simples de revelar diversos locos que estão dispersos pelo genoma, sem ser necessário o conhecimento prévio da informação de sequências-alvo como é o caso dos Microsatélites, estes métodos não requerem um sistema especial para a revelação destes polimorfismos (Lopes et al., 2002). Estas técnicas não são capazes de expressarem, se o genoma é homozigótico ou heterozigótico, pois a única distinção apresentada é o alelo estar amplificado (1) ou não estar amplificado (0), não sendo levado em conta o motivo pelo qual o fragmento não foi amplificado.

O AFLP, é robusto, e possui custo relativamente baixo pois baseia-se na amplificação de um subconjunto de fragmentos que são gerados a partir da combinação de enzimas de restrição de corte raro (*ApaI*, *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*) e de corte frequente (*MseI*, *TaqI*), que clivam o DNA genômico em sítios específicos (Lopes et al., 2002). Esta clivagem pode ser feita em apenas uma etapa, desde que tenha-se disponível um tampão adequado para as duas enzimas (corte raro / corte frequente). A principal importância da utilização dessa combinação de enzimas é a digestão completa da molécula de DNA, pois uma digestão parcial pode levar a uma caracterização de falsos polimorfismos, sendo que a alta pureza desse DNA amostral é um fator essencial para o sucesso da digestão total, exigindo um excelente método de extração e quantificação de DNA (Creste et al., 2001).

O processo de digestão pela combinação das enzimas de corte raro e de corte frequente vai gerar três tipos diferentes de fragmentos, que são: os fragmentos de corte frequente/frequente, frequente/raro e raro/raro. Haverá uma predominância dos fragmentos de corte frequente/frequente, se comparada com os fragmentos de corte raro/raro, porém já os fragmentos de corte frequente/raro são preferencialmente amplificados pois há uma baixa eficiência na hibridização dos iniciadores da enzima de corte frequente comparando-a com a hibridização dos iniciadores da enzima de corte raro, somado ao fato de que os fragmentos de corte frequente/frequente possuem uma extremidade terminal invertida (amplificado por um único iniciador) o que vai favorecer a formação de uma sequência, sendo que este último competirá com os iniciadores pelo anelamento (Lopes et al., 2002).

As enzimas de restrição deixam extremidades coesivas de sequência conhecida, após a clivagem do DNA, em que será possível a construção de sequências nucleotídicas de fita dupla (adaptadores) que irão se ligar às extremidades dos fragmentos de restrição. Partindo do conhecimento das sequências dos adaptadores e do sítio de restrição é possível construir iniciadores específicos para estas sequências como é o caso dos Microsatélites e com isso pré-amplificar os fragmentos de restrição (Vos et al., 1995). Os *primers*, por sua vez, são construídos a partir de uma sequência complementar ao do adaptador seguida de outra sequência específica para o sítio de restrição da enzima e ainda uma extensão de nucleotídeos seletivos na região terminal 3' (Ferreira e Grattapaglia, 1998). O resultado da digestão e da pré-amplificação podem ser verificados a partir de uma eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), sendo uma etapa importante, pois evita que possíveis erros na digestão ou na pré-amplificação, posteriormente sejam detectados no final de todo procedimento (Vos et al., 1995). A análise final dos resultados é feita por meio de leitura em gel de poliacrilamida desnaturante corado com nitrato de prata, observando-se a presença ou ausência de bandas polimórficas (sinais).

A grande vantagem da utilização da técnica AFLP, além da reprodutibilidade, é a detecção de um maior número de locos, se comparada às demais técnicas de identificação dos marcadores moleculares, possibilitando ainda, uma ampla cobertura do genoma e um custo reduzido por loco obtido (Lopes et al., 2002).

A estratégia de exploração genômica em cucurbitáceas com marcador AFLP predominante na literatura, contribui para a confecção de dendogramas, evidenciando a diversidade genética em diversas espécies, e isto cria oportunidades para ação integrada com outras equipes envolvidas com a mesma prospecção, da mesma possibilidade que pode surgir com a bucha.

2.4.2 Análise multivariada

Paralelamente ao uso de análises moleculares para estudar a diversidade entre acessos ou genótipos, sugere-se considerar as características morfo-agronômicas (Allard, 1971; Davis, 1994), uma vez que fica evidente a aptidão produtiva e assim classifica-los por meio de agrupamentos, dendogramas, dispersões gráficas e figurações filogenéticas.

A técnica de análise multivariada tem sido muito utilizada, e permite aferir existência de correlação positiva ou negativa entre múltiplas variáveis avaliadas (Cruz, 1990), proporcionando maior oportunidade de escolha de materiais potenciais. Dentre as mais

empregadas citam-se as técnicas de bioinformática, análise por componentes principais, e pelos métodos de agrupamento por algum método de otimização e que dependem de medidas de dissimilaridade (Cruz, 1990; Cruz e Regazzi, 2001). A escolha do método mais adaptado à determinada cultura depende, sobretudo, da precisão experimental desejada, como também da facilidade de análise e pela forma de obtenção dos dados (Cruz e Carneiro, 2003).

O emprego da técnica dos componentes principais para estudos sobre divergência genética em plantas, tem sido realizado com o propósito de manusear acessos em bancos de germoplasma, identificar parentais divergentes, estimar a variabilidade disponível em grupos geneticamente relacionados, e avaliar a importância de cada caráter (Cruz, 2006). A grande vantagem deste procedimento é gerar a eliminação daqueles caracteres que contribuem pouco, em termos de variação, sob um conjunto de indivíduos avaliados.

A eficácia de utilização dos componentes principais em estudos sobre divergência genética dependerá da probabilidade de resumir o conjunto de variáveis originais em poucos componentes, o que resultará na divergência genética entre os materiais. Com base no princípio de que a importância ou variância dos componentes principais decresce do primeiro para o último, tem-se que os últimos componentes explicam uma fração muito pequena da variância total. O interesse nesta avaliação reside na possibilidade de selecionar caracteres que contribuem para a discriminação do material avaliado, reduzindo, dessa forma, mão-de-obra, tempo e custo despendidos nos ensaios experimentais.

O conhecimento sobre o desempenho produtivo, isto é analisar variáveis quantitativas sob determinadas condições ambientais, constitui-se em fator importante a considerar para a compreensão varietal e como ela interage com o ambiente (Queiroz, 2011).

O estudo da diversidade genética em coleções de germoplasma também pode ser alcançada através de dados multicategóricos, ajuizados pela presença/ausência, formas, cores e/ou posições, envolvendo flores, frutos, folhas, ramas e/ou sementes em espécies de cucurbitáceas (Ramos et al., 2000; Torres Filho, 2008; Queiroz, 2011). O objetivo é considerar a combinação de diversas variáveis com classificação ordinal é obter uma matriz única que traduza a distância genética entre materiais por meio de agrupamento, seguindo algum critério de similaridade ou dissimilaridade (Cruz e Regazzi, 2001). Esta técnica de classificação exige olhar acurado e apresenta custo relativamente barato, pois envolve diretamente a observação e/ou mensuração de vários caracteres em um mesmo acesso e/ou genótipo.

As técnicas de análise de agrupamento, considera dividir um grupo original de observações em diversos grupos, seguindo algum critério de similaridade ou dissimilaridade, que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos (Cruz et al., 2004). Na análise de agrupamento, algumas decisões devem ser tomadas entre elas, a adequação arbitrária de partição e o tipo de medida de similaridade a ser ponderada. Com relação ao número de grupos desejados, o mais comumente, é utilizar vários números de grupos e, por algum critério de otimização, selecionar o (s) mais conveniente (s) (Cruz et al., 2004).

Para escolha da adequação da partição, é comum a utilização da análise discriminante e com relação às medidas de similaridade, as mais empregadas no melhoramento são as distâncias Euclidianas e a de Mahalanobis (Cruz e Carneiro, 2003). Há grande número de métodos de agrupamento disponível, cabendo decidir qual o mais adequado ao trabalho, uma vez que as várias técnicas podem evidenciar diferentes padrões de agrupamentos (Cruz et al., 2004). Dentre os métodos de agrupamento mais empregados no estudo de variáveis quantitativas em plantas, citam-se os métodos baseados em distâncias, a exemplo dos hierárquicos, e os de otimização (Cruz e Carneiro, 2006). Entre os hierárquicos, destacam-se os métodos do vizinho mais próximo, vizinho mais distante, e UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic*). Já entre os métodos de otimização o mais empregado é o proposto por Tocher, pois permite facilidade na visualização de divergência genética e formação de grupos.

A caracterização por meio de descritores botânicos, pode fornecer informações sob a variabilidade genética de modo eficiente, onde centenas de cruzamentos indesejáveis posteriormente podem ser evitadas. Além disso a quantificação da divergência entre acessos pode ter mais significado em uma coleção, quando a diversidade fenotípica refletir sobre a divergência calculada.

Na lista dos descritores para a espécie *L.cylindrica*, proposta por Joshi et al. (2004) desenvolvida em parceria interinstitucional com *Nepal Agricultural Research Council* NARC, *Local Initiatives for Biodiversity, Research and Development* LIBIRD e o *International Plant Genetic Resources Institute* IPGRI constam 60 descritores qualitativos sugeridos para estudo da divergência da bucha. Entre estes, os morfo-agronômicos envolvendo o vegetativo e o reprodutivo das plantas representa maior importância. Nesta diretriz, Cruz et al. (1997), identificaram grupos distintos entre acessos de *L. cilíndrica* e *L. acutangula*, na Ásia Central favorecendo o pré-melhoramento destas espécies para agroeconomia daquela região. Os autores comparam a divergência genética, baseada na presença e frequência de descritores morfo-

agronômicos e posteriormente agrupamento pelo método da distância média UPGMA e coeficientes de correlação. Da mesma forma, Joshi et al. (2010) realizaram cultivos com acessos de bucha vegetal considerando a diversidade de nomes e micro regiões de cultivo, agrupando correlações entre 25 caracteres qualitativos, para formação de grupos varietais e posterior conservação do germoplasma para três distritos no Sudeste da Ásia.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS (GERAL)

Estas etapas serviram para extrair os dados referentes aos três estudos desenvolvidos, portanto decidiu-se apresentar uma metodologia geral e uma metodologia específica com suas particularidades para cada trabalho realizado.

3.1 Origem dos acessos

Os acessos de bucha analisados, foram cedidos pelo Banco de Germoplasma da Universidade Federal do Amazonas, e são provenientes de sete Estados Brasileiros (Tabela 3).

Tabela 3. Lista dos acessos de *Luffa cylindrica* e suas procedências. Manaus, AM. 2016

Acesso*	Ident**	Procedência	Acesso*	Ident**	Procedência
1	FBVAR - 15	São José - SC	13	IAC - 86	Campinas - SP
2	FBVAR - 44	Tomé Açu - PA	14	IAC - 82	Campinas - SP
3	FBVAR - 20	Palotina - PR	15	IAC - 69	Embrapa Hortaliças - DF
4	IAC - 9	Monte Alegre do Sul - SP	16	FBVAR - 06	P. Figueiredo - AM
5	IAC - 27	Umuarama - PR	17	FBVAR - 13	Manacapuru - AM
6	IAC - 30	Campinas - SP	18	FBVAR - 19	Manaus - AM
7	IAC - 42	Presidente Prudente - SP	19	FBVAR- 34	Irاندuba - AM
8	IAC - 12	Campinas - SP	20	FBVAR - 03	P. Figueiredo - AM
9	IAC - 92	Eldorado - SP	21	FBVAR - 10	Porto Velho - RO
10	IAC - 20	Umuarama - PR	22	FBVAR - 28	Porto Velho - RO
11	IAC - 47	Monte Alegre do Sul - SP	23	FBVAR - 29	Manaus - AM
12	IAC - 55	Embrapa Hortaliças - DF	24	FBVAR- 07	Vilhena - RO

* Numeração utilizada para identificação dos acessos nos trabalhos desenvolvidos.

** Ident. = Identificação do material genético no Banco de Germoplasma.

Ao todo 24 acessos foram estudados, os quais inicialmente foram reunidos institucionalmente por meio de cessão de germoplasma entre a Universidade Federal do Amazonas, Embrapa Hortaliças, Instituto Agrônomo do Paraná e Instituto Agrônomo de Campinas, representando diversas localidades do Brasil. Estes acessos foram selecionados pelo histórico de manutenção seminal com preceitos de variedades crioulas, as quais foram doadas inicialmente por agricultores de cada localidade.

3.2 Área experimental

Os acessos foram cultivados na região metropolitana de Manaus, na Estação Experimental de Hortaliças “Alejo vom der Pahlern” 1°56’30’’ - 1°56’00’’S e 60°02’15’’ -

60°01'45''W, situado no acesso perimetral “Km 14”, com topografia moderadamente plana, altitude de 82 m, em solo tipo: Argissolo Amarelo distrófico, de textura arenosa.

Desde o ano de 1980 esta área foi cultivada com diversas espécies olerícolas, sendo que nos últimos dez meses encontra-se em pousio o local utilizado. O clima da região é caracterizado no esquema de Köppen, como “Afi” equatorial quente e úmido, com precipitação anual média de 2700 mm (INMET, 2013). A temperatura do ar, média anual é de 26.5 ± 1 °C variando entre mínima e máxima na ordem de 22,5 e 38 °C (INMET, 2013).

A semeadura de cada acesso foi realizada em copos descartáveis de 180 ml perfurados e preenchidos com substrato Topstrato Hortaliças HP®. As mudas foram mantidas em ambiente protegido (viveiro), até atingirem o ponto ideal com 20 dias, com 4 folhas definitivas e ± 25 cm. Antecedendo o transplante das mudas, a área experimental foi arada duas vezes com micro trator, incorporando a matéria orgânica existente sobre no solo.

Amostra composta de solo da camada de 0 – 20 cm do local de cultivo teve sua composição química analisada, de acordo com a metodologia proposta pela Embrapa (1999), e realizadas no Laboratório Temático de Solos e Nutrição Mineral de Plantas da CSAS/INPA (Tabela 4).

Tabela 4. Análise química do local onde os acessos de bucha foram cultivados. Manaus, AM. 2016

Identificação	Análise Química do Solo												
	pH agua	C	M.O	P	Ca	Mg	K	A + H	Fe	Zn	Mn	Cu	V
LTSP/ariel-2013	-	-	-	mg/Kg	cmolc/Kg	-	-	-	-	mg/Kg	-	-	%
	6,22	10,88	18,75	174,5	3,02	0,56	0,09	2,32	165,02	12,3	9,7	3,9	61,26

Diante dos resultados da análise química do solo, foi realizado adubação de plantio referente a uma população de 1.500 plantas ha⁻¹ adequando sugestões de Cardoso (2007), e Filgueira, (2008) para cucurbitáceas, sendo 200 kg ha⁻¹ do formulado NPK 8-20-10 + 5 g micros FTE BR12 planta⁻¹.

O plantio foi a campo, com espaçamentos de 1,50 m entre linhas x 2 m entre plantas, utilizando o sistema de cultivo tipo espaldeira (Figura 1). O delineamento experimental foi em blocos casualizados, sendo 24 tratamentos (acessos) 4 repetições e 3 plantas por parcela.

Em cada parcela foi cultivado três plantas. O cultivo das plantas compreendeu o período de Janeiro de 2014 a Setembro de 2014, considerando que 6 meses, serviram para estudar as variáveis botânicas e quantitativas entre os acessos.

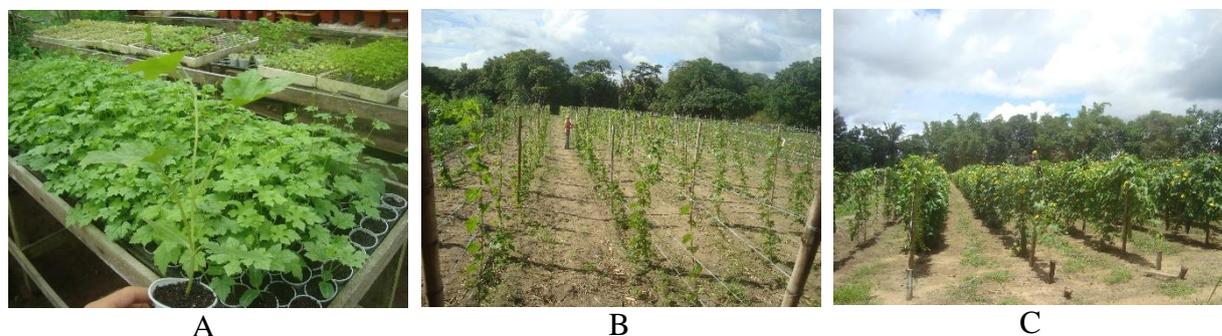


Figura 1 - Aspecto das mudas formadas em viveiro (A) plantas em desenvolvimento com 30 dias após o transplante (B) e plantas desenvolvidas com frutos, 90 dias após o transplante (C). Manaus, AM. 2016. Fotos: A.D. Blind, 2014.

Durante as etapas de formação de mudas, transplante, desenvolvimento e produção, foram anotados dados meteorológicos incidentes em cada período, conforme apresenta a figura 2.

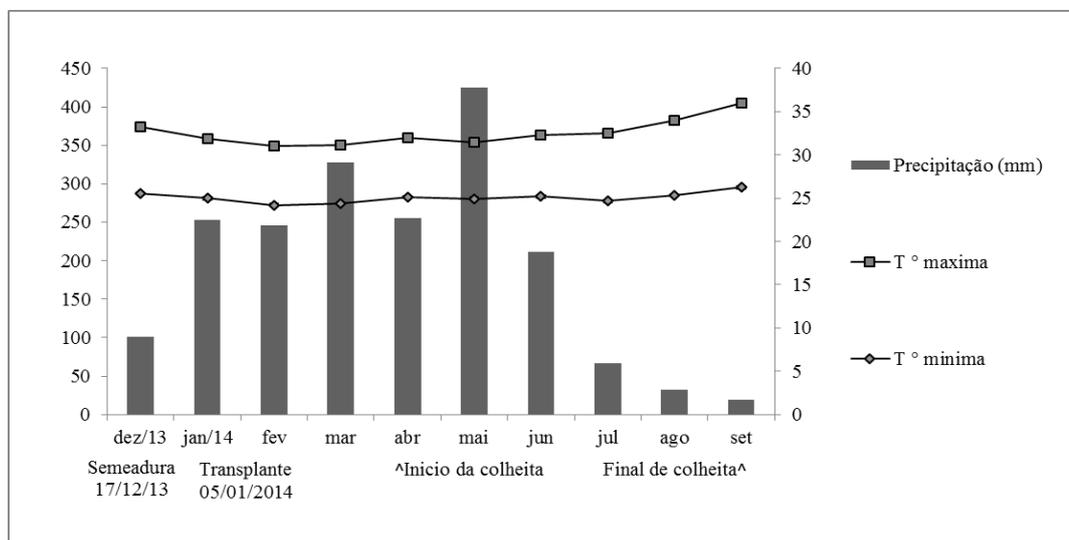


Figura 2. Dados médios de precipitação, temperatura máxima e temperatura mínima que ocorreram durante o desenvolvimento experimental no período de dezembro de 2013 á setembro de 2014. Fonte: BDMEP – INMET. Estação 82331. Manaus, AM. 2016.

3.3 Tratos culturais

Houve necessidade de condução das ramas na espaldeira uma vez por semana (Figura 3) e capinas esporádicas durante o período de avaliação. No início da colheita, em meados de

Abril de 2014, foi realizada uma adubação de cobertura, especificamente de nitrogênio (N - Uréia) e potássio (K - Cloreto de Potássio) 10 g planta⁻¹ de cada fonte, conforme proposta de Siqueira (2007).



Figura 3. Aspecto vegetativo da planta de bucha conduzida de forma tutorada no sistema de espaldeira. Manaus, AM. 2016. Fotos: A.D. Blind, 2014.

Durante todo o desenvolvimento experimental, desde a formação de mudas, foi monitorado a ocorrência de fitopatógenos que poderiam causar danos indiretos e diretos às plantas. Apenas dois casos foram relatados durante todo ciclo avaliado, em que (frutos maduros) com sintomas de doença fúngica, foram fotodocumentados e analisado junto ao Laboratório de Fitopatologia/INPA, para caracterização do (s) sintoma (s), isolamento e identificação do (s) agente (s) causal (is) (Figura 4). Não foi necessário adotar medidas de controle tanto para insetos, quanto para doenças, mediante inspeção sobre o nível de dano econômico.



Figura 4. Sintomas de doenças fúngicas observadas em frutos de bucha cultivados na Amazônia Central. Manaus, AM. 2016. Fotos: A.D. Blind, 2014.

Capítulo 1

Diversidade genética entre acessos de *Luffa cylindrica* utilizando marcador molecular AFLP

Resumo - O conhecimento da similaridade varietal em bucha vegetal ao nível de DNA genômico, pode evidenciar a estrutura populacional entre acessos existentes e contribuir para o aprimoramento e uso da espécie. Neste sentido, o presente estudo buscou ponderar a diversidade entre 24 acessos de bucha provenientes de sete Estados do Brasil, utilizando dados gerados pela análise molecular de marcadores AFLP. Foram testados oito combinações de *primers* em testes de pré amplificação e selecionados as quatro combinações mais eficientes nas taxas de polimorfismo; E+ATC/M+CAT, E+AGT/M+CAT, E+AAC/M+CTC, E+ACA/M+CAT. Foi contabilizado a porcentagem de *locos* polimorficos, construído matrizes de dissimilaridade para formação grupos pelo método UPGMA, análise de escalonamento multidimensional não-métrico das distâncias genéticas, e análise da estrutura populacional por meio de uma abosrdagem bayesiana de agrupamento. Entre os 241 locos revelados, 161 foram polimórficos, representado 66,8 % do polimorfismo total encontrado. O dendograma originado, revelou a formação de quatro grupos distintos e foi eficiente em separar os acessos da região norte daqueles acessos prospectados da região centrosul do Brasil. A análise multidimensional agrupou os indivíduos em praticamente quatro eixos representando a relação de similaridade entre os acessos e corroborou com os resultados obtidos na analise de estrutura populacional obtida peo software structure. Os marcadores AFLP foram eficientes na geração de dados para detectar e discriminar divergência genética entre acessos de bucha, o que pode contribuir para uso e conservação da espécie. A maioria dos acessos oriundos da região norte do Brasil possuem certa irmandade entre acessos da região centrosul mesmo que distanciados geograficamente, fortalecendo a hipótese de dispersão seminal entre agricultores.

Palavras-chave: similaridade genética, AFLP, acessos de bucha

Abstract - Knowledge of varietal similarity in loofah level of genomic DNA, may show the population structure of existing access and contribute to the improvement and use of the species. In this sense, this study sought to examine the diversity 24 among loofah from different parts of Brazil, using data generated by AFLP molecular analysis technique. There were tested eight combinations of primers in amplification assays pre and selected combinations of the four most efficient polymorphism rates; E+ATC/M+CAT, E+AGT/M+CAT, E+AAC/M+CTC, E+ACA/M+CAT. It was recorded at loci percentage generated, built dissimilarity matrices for training groups by UPGMA method, multidimensional scaling analysis of non-metric genetic distances, and groups of consistency analysis L(K) and ΔK . Between 241 revealed loci, 161 were polymorphic, represented 66.8% of the total polymorphism found. The dendrogram originated through differentiation between accessions revealed the formation of four distinct groups $r = 0.9428$, distributed unevenly. The multidimensional analysis grouped the individuals in nearly four pillars representing the relationship of similarity between accesses $R^2 = 0.999$. The consistency of the four groups formed by cluster analysis was confirmed by the population structure and consideration of different grouping values (K). The markers studied by AFLP technique, were efficient in generating data to detect and discriminate between genetic divergence loofah among, which can contribute to the use and conservation of the species.

Keywords: genetic similarity, AFLP, loofah among

Introdução

O mercado de materiais e compósitos biodegradáveis desenvolvidos com fibra vegetal é crescente em diversos países (Bledzki e Gassan, 1999; Ghali et al., 2011) ao passo que a facilidade de cultivo, beneficiamento da fibra e empregabilidade tornam diversas espécies bastante competitivas, a exemplo da bucha vegetal (Oboh e Aluyor, 2009). A bucha vem se destacando no mercado de fibras naturais em nível mundial, pois trata-se de uma espécie alógama, de origem Asiática (Bisognin, 2002) dispersa em todo território Brasileiro (Queiroz, 2004), bastante rústica a condições edafoclimáticas, produzindo facilmente em diversas condições ambientais (Davis, 1994; Ferreira et al., 2012). A qualidade e durabilidade das fibras da bucha, também contribuem para elevar a demanda em diversos polos industriais (Boynard et al., 2003; Satyanarayana et al., 2007; Siqueira et al., 2010).

O conhecimento da diversidade genética em espécies vegetais de uma população qualquer em Bancos de Germoplasma, é essencial e se constitui como base em programas de melhoramento genético no Brasil (Nass, 2007) podendo ser realizada por método específico ou ainda por uma combinação de métodos, com ou sem influencia ambiental. No Brasil a exploração comercial da bucha pode ser mais oportuna, uma vez que seja estudado a variabilidade existente entre acessos (Ferreira et al., 2012; Silva et al., 2012) de modo a evidenciar similaridades (Cruz et al., 1997; Lira et al., 2012) e assim, classifica-los por meio de agrupamento (s) e suas relações de parentesco (Cruz e Carneiro, 2006; Zhang et al., 2008).

Estudos de diversidade que baseiam-se de técnicas e dados moleculares surgiram como ferramentas rápidas e eficazes por detectarem variações diretamente ao nível de DNA, sem interferência ambiental.

Dentre técnicas moleculares, a análise do Polimorfismo de Comprimento em Fragmentos Amplificados (AFLP) pode ser utilizada em qualquer espécie vegetal, permitindo detectar alto número de *loci* e ampla cobertura do genoma (Lopes et al., 2003) sendo possível analisar centenas de fragmentos de DNA amplificados simultaneamente, decorrente principalmente da variação nos sítios de restrição para enzimas de corte raro e frequente (Mba e Tohme 2005; Bonin et al., 2007). Esta técnica não requer sequenciamento do DNA ou construção de bibliotecas genômicas com informações prévias (Vuylsteke et al., 2007) apenas há necessidade de testar e selecionar previamente sequências de *primers* que apresentem melhor taxa de amplificação de locos para espécie em estudo.

Os dados obtidos a partir dos marcadores moleculares comumente são usados na construção de matriz de dissimilaridade por meio do complemento aritmético do coeficiente de

Jaccard (D_j), considerando presença e ausência de bandas polimórficas reveladas do DNA, admitindo posteriormente medir a distância genética e o relacionamento entre indivíduos por diversos métodos de agrupamento.

Entre os métodos de agrupamento para espécies vegetais, destaca-se o UPGMA (Método de Agrupamento Hierárquico da Ligação Média entre Grupos), (Curi, 1983). Pelo UPGMA a distância entre os grupos é determinada pela média das distâncias entre pares de indivíduos pertencentes aos diferentes grupos. Paralelamente a este método, sugere-se o cálculo do coeficiente cofenético proposto por Sokal e Rohlf (1962), para estimar o ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendograma gerado.

Além de formalizar grupos e verificar sua integração, é possível acomodar indivíduos em um número de eixos predeterminados, de modo a melhor representar a relação de parentesco entre os acessos por meio da análise de escalonamento multidimensional não-métrico (Oksanen et al., 2013).

A abordagem bayesiana, possui importância similar, por determinar e revelar o arranjo da estrutura populacional (Pritchard et al., 2000), identificação de migrantes e de indivíduos que apresentam genoma de duas ou mais populações. Para Falush et al. (2003) esta abordagem permite a inclusão de informações, como a origem geográfica ou distâncias de adaptação e de marcador molecular, o que tende a tornar as análises e a formação de grupos mais precisos sendo apropriada ao estudar espécies com ampla distribuição.

Desta forma, o presente estudo teve por objetivo evidenciar a diversidade genética entre acessos de bucha presentes no Brasil por métodos de agrupamento e configurações, a partir de dados originários da análise molecular AFLP.

Material e Métodos

Folhas jovens e sadias de cada acesso cultivado (Tabela 3), foram colhidas, acondicionadas em sacos de papel Kraft e levadas instantaneamente ao Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LAB-MGV) da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM, para extração do DNA e posteriormente, análise utilizando marcadores AFLP.

O DNA genômico de cada acesso foi extraído segundo protocolo CTAB descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). De cada amostra, macerou-se aproximadamente 60 mg de tecido foliar fresco sem a nervura principal em cadinho contendo 700 μ L de tampão de extração (CTAB 20%, NaCl 1,4 M, Tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, 2- β -mercaptoetanol 0,8%, PVP-Polivinilpirrolidona 1% e água ultrapura).

O macerado foi colocado em microtubo de plástico de 1,5 μ L e mantido em recipiente com gelo até o término do processo de maceração de todas as amostras. As amostras foram homogeneizadas mecanicamente por trinta segundos e incubadas em banho-maria a 60 °C por trinta minutos com homogeneização a cada dez minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 600 μ L da mistura gelada de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) na amostra, que foi suavemente homogeneizada por cinco minutos e centrifugada a 14.500 rpm por dez minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para novos tubos, aos quais foram adicionados 450 μ L de isopropanol gelado e após homogeneização suave, foram incubados a -20 °C por 24h.

Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas por dez minutos a 7.500 rpm e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% por cinco minutos duas vezes e uma vez com 1 mL de etanol absoluto, ambos gelados. Após a retirada do etanol o precipitado foi deixado para secar à temperatura ambiente por uma hora para então ser ressuscitado em 30 μ L de tampão TE (Tris - EDTA) acrescido de RNase (39:1), incubado em banho-maria por trinta minutos a 37 °C e posteriormente estocado a -20 °C.

Para algumas amostras foi necessário uma etapa de limpeza em que foi acrescentado 500 mL de NaCl 2M ao precipitado, que após vortexado foi incubado a 4 °C por trinta minutos. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para novo tubo acrescido de 400 mL de isopropanol gelado. Após duas horas de armazenamento a -20 °C, os tubos foram centrifugados a 7500 rpm por dez minutos e o sobrenadante foi descartado. Realizou-se a limpeza com etanol conforme feito anteriormente para as demais amostras com folhas frescas, bem como o restante dos procedimentos.

Para a quantificação, 2 μL de DNA ressuspenso foi diluído em solução contendo 3 μL do corante azul de bromofenol e 1 μL de gel Red. Este volume, 6 μL , foi aplicado em gel de agarose 0,8 % (p/v). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese, em tensão de 100 V por dez minutos para a saída do poço e 60 V por cinquenta minutos para o restante da corrida. A quantidade de DNA extraída dos 24 acessos foi avaliada por análise comparativa entre o DNA extraído de cada amostra e um DNA de concentração conhecida (Marcador - DNA lambda-Invitrogen) visualizados em transluminador de UV e fotodocumentados por sistema digital Vilber Lourmat (Figura 1). Após quantificação, as amostras foram diluídas em água ultrapura para ajustar as suas concentrações para condição de trabalho (10 ng/ μL) conforme sugestões de Vos et al. (1995).

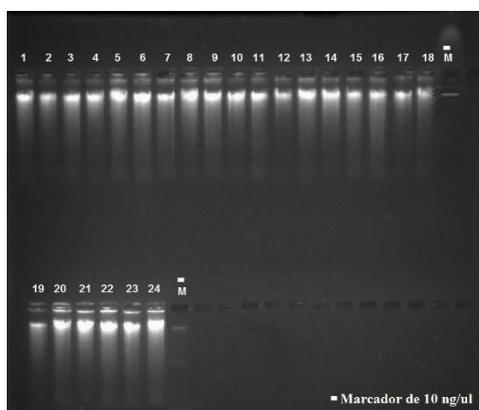


Figura 1. Revelação do DNA dos 24 acessos de *Luffa cylindrica* em gel-agarose. Manaus, AM. 2016.

A análise de marcadores AFLP foi realizada segundo os procedimentos propostos por Vos et al., (1995), com modificações de Lopes et al. (2003), conforme a sequência:

Digestão do DNA

As reações de digestão foram realizadas utilizando 200 ng de DNA genômico, 5,0 μL do tampão One Phor All-OPA 10X (Pharmacia), 0,5 μL de solução Albumina de Soro Bovino-BSA (10 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), 1,0 μL da enzima *MseI* (5 U μL^{-1}) e 0,4 μL da enzima *EcoRI* (12 U μL^{-1}), ambas fornecidas pelo New England Biolabs e água ultrapura completando o volume final para 50 μL . O material foi incubado em termociclador ESCO® PCR Thermal Cyclers por três horas a 37 °C para as reações de restrição e, em seguida, por quinze minutos a 70 °C para inativação das endonucleases.

Preparo e ligação dos adaptadores

Foram preparados adaptadores específicos de *EcoRI* e *MseI* que possuem terminais complementares às extremidades resultantes da digestão pelas enzimas de restrição. O

adaptador *EcoRI* foi preparado utilizando 5,6 µL de adaptador *EcoRI forward*, 4,8 µL de adaptador *EcoRI reverse*, 6 µL de tampão OPA (Amersham®) e água ultrapura esterilizada para o volume final de 120 µL. O adaptador *MseI* foi preparado utilizando 64 µL de adaptador *MseI forward*, 56 µL de adaptador *MseI reverse*, 7 µL de tampão OPA (Amersham®) e água ultrapura esterilizada para o volume final de 140 µL. Ambos os adaptadores foram incubados no termociclador ESCO® PCR Thermal Cyclers, a temperaturas subsecutivas de 65, 37 e 25 °C, com duração de dez minutos cada.

Para a reação de ligação dos adaptadores foi utilizado 1,0 µL de adaptador *EcoRI*, 1,0 µL de adaptador *MseI*, 1,0 µL de tampão para a enzima T4 DNA Ligase (10X), 0,33 µL da enzima T4 DNA Ligase (3 U/µL) (Promega®) e água ultrapura esterilizada completando o volume para 10 µL. Este mix foi adicionado a 50 µL do DNA digerido com as enzimas de restrição. As amostras foram incubadas em termociclador a 23 °C por três horas e estocadas a -20 °C.

Reações de amplificação

Foram utilizados 0,6 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo contendo um nucleotídeo seletivo adicionado à extremidade 3': oligo *EcoRI* (25 ng/µL) + A e oligo *MseI* (25 ng/µL) + C, 1,0 µL de tampão da enzima Taq DNA polimerase (10X) (Fermentas®), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) (Fermentas®), 2,5 µL de DNA digerido e ligado, e água ultrapura para completar o volume para 10 µL. As amostras foram incubadas em termociclador a 94 °C por dois minutos, seguidos de 26 ciclos de 94, 56 e 72 °C, com duração de um minuto para cada temperatura, e uma extensão final de 72 °C por cinco minutos. Terminada a reação de PCR foram acrescentados 40 µL de água ultrapura a cada amostra, as quais foram armazenadas a -20 °C. A seleção das sequências dos oligonucleotídeos usados na reação de pré-amplificação encontram-se na Tabela 1.

Na segunda reação de amplificação, conhecida como amplificação seletiva, os iniciadores utilizados possuíram mais dois nucleotídeos arbitrários adicionais, o que torna a seleção bem mais significativa. Para esta etapa, utilizou-se três amostras aleatórias dos acessos combinadas com oito pares de *primers*, testados com base no polimorfismo apresentado por Priori et al. (2013) em *Cucurbita pepo*, para ajuizar a qualidade de amplificação e o número de locos polimórficos amplificados.

Tabela 1. Combinação de *Primers* utilizados para examinar as taxas de polimorfismo dos fragmentos amplificados de DNA em *Luffa cylindrica*. Manaus, AM. 2016

Enzimas de corte	Etapa	Combinação do <i>Primer</i>	Especificação
<i>EcoRI</i> / <i>MseI</i>	Pré amplificação seletiva	E/AAC + M/CTC	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAA C + GAT GAG TCC TGA GTA ACT C 3'
		E/AGC + M/CTC	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAG C + GAT GAG TCC TGA GTA ACT C 3'
		E/ATC + M/CTC	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAT C + GAT GAG TCC TGA GTA ACT C 3'
		E/AGT + M/CTC	5' GAC TGC GTA CCA ATT GAG T + GAT GAG TCC TGA GTA ACT C 3'
		E/ACA + M/CTC	5' GAC TGC CTA CCA ATT CAC A + GAT GAG TCC TGA GTA ACT C 3'
		E/ATC + M/CAT	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAT C + GTA GAG TCC TGA GTA ACA T 3'
		E/AGT + M/CAT	5' GAC TGC GTA CCA ATT GAG T + GTA GAG TCC TGA GTA ACA T 3'
		E/ACA + M/CAT	5' GAC TGC CTA CCA ATT CAC A +GTA GAG TCC TGA GTA ACA T 3'

Para as reações de amplificação seletiva foram utilizados 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 1,0 µL do oligo *EcoRI* (25 ng/µL) + ANN, 1,2 µL do oligo *MseI* (25 ng/µL) + CNN (Em que N é o nucleotídeo arbitrário usado na amplificação seletiva), 2,0 µL de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (10X) (Fermentas®), 0,2 de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL) (Fermentas®), 1,5 µL de DNA das amostras pré-amplificadas, e água ultrapura para completar o volume de 20 µL. As amostras foram incubadas em termociclador à temperatura 94 °C por dois minutos, seguida de 12 ciclos de 94, 65 e 72 °C com duração de 30, 30 e 60 segundos, respectivamente, mais vinte e três ciclos de 94, 56 e 72 °C com duração de 30, 30 e 60 segundos, respectivamente, e uma extensão final de 72 °C por dois minutos afim de manter amostras previamente preparadas para as reações de eletroforese e armazenados a -20 °C.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (acrilamida/bis-acrilamida (19:1 v/v)). Para o preparo da matriz de poliacrilamida foram utilizados 50,40 g de ureia, 0,36 g de bis-acrilamida e 7,20 g de acrilamida e tampão 1X TEB

(Tris base, Ácido bórico e EDTA) para completar o volume de 120 mL. Foi usado o sistema de gel de sequenciamento "Sequi-Gen GT" (Biorad), fonte de 3.000 V.

As placas foram limpas duas vezes com etanol 95%. Em seguida, na placa maior foram aplicados 1,5 mL de Repel químico e na placa menor foi aplicada uma solução contendo 1 mL de etanol 95 %, 5 µL de ácido acético glacial e 5 µL de Bind químico. Após cinco minutos as placas foram limpas mais duas vezes com álcool 95%, neste caso com leves movimentos apenas para a retirada do excesso das soluções. Foram utilizados lenços de papel, tanto na limpeza das placas como na aplicação e retirada do excesso das soluções.

Para o preparo do gel de poliacrilamida, utilizou-se 150 mL da matriz, 150 µL de Tetrametiletilenodiamina - TEMED e 1 mL de persulfato de amônia (95 mg/mL). O gel permaneceu, no mínimo, por quatro horas em processo de polimerização. Na parte superior da cuba foi utilizado aproximadamente 1,2 L TEB 1X e na parte inferior 350 mL de TEB 1X adido de 50 mL de acetato de sódio 3M.

Antes da aplicação das amostras, foi realizada uma pré-corrída conduzida sob potência constante de 80 W durante uma hora, para aquecimento e limpeza do gel.

Às amostras receberam adição de 8 µL de loading buffer (formamida 98%, EDTA 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,002% (p/v) e xilenocianol 0,002% (p/v) e incubadas no termociclador por cinco minutos à temperatura de 95 °C para desnaturação. Em seguida, foram aplicados 20 µL da amostra desnaturada no gel para eletroforese sob potência constante de 80 W durante 150 minutos.

Revelação do gel

Para a revelação do gel, usou-se o método de coloração com nitrato de prata segundo o protocolo proposto por Creste et al. (2001).

A placa com o gel foi imersa em 3 L de solução para fixação (etanol 10% e ácido acético glacial 1%) durante dez minutos, seguida de lavagem em 3 L de água destilada por um minuto. Realizou-se então um pré-tratamento com solução de oxidação (ácido nítrico 1,5% - 3 L) durante 2,40 minutos e uma lavagem em 3 L de água destilada por um minuto. Para a impregnação foram utilizados 3 L da solução de nitrato de prata (AgNO₃ 0,2%) por 20 minutos, seguida de duas lavagens de 30 segundos em 3 L de água destilada cada. A revelação foi feita em duas etapas, ambas utilizando 1,5 L de solução para revelação (Na₂CO₃ 3% e formaldeído

0,02%), durando a primeira etapa o tempo de surgimento das primeiras bandas e a segunda até a obtenção do padrão de revelação desejado. Por fim, a placa foi colocada em 3 L de solução bloqueadora (ácido acético glacial 5%) por cinco minutos e lavada em 3 L de água destilada durante um minuto e mantida à temperatura ambiente para secar. Todos os procedimentos foram realizados dentro de bandejas plásticas sob agitação em mesa agitadora orbital MA-140.

Análises Estatísticas

Após a revelação dos fragmentos de DNA gerados pelos marcadores AFLP, foi contabilizado locos polimórficos revelados, mediante atribuição dos respectivos scores; (1) presença e (0) ausência, considerando orientação em linhas a sequência dos pares de bases. Com base no levantamento dos dados resultante da amplificação dos locos, foi construída uma matriz de dissimilaridade por meio do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard (D_j),

através da expressão: $DJ(ij) = \frac{a}{(a+b+c)}$ Sendo: $DJ(ij)$ é a medida da dissimilaridade entre

indivíduos i e j ; a é o número de bandas polimórficas que são compartilhadas por i e j (ambos acessos); b é o número de bandas presentes em i e ausentes em j ; c é o número de bandas presentes em j e ausentes em i . Optou-se pelo uso deste coeficiente, pois além de suas propriedades matemáticas, possibilita evidenciar diferenças intraespecíficas e desconsidera a ausência de bandas como sinônimo de similaridade genética. Os dados gerados pela matriz de dissimilaridade foram empregados na obtenção do dendograma, pelo método UPGMA.

No método UPGMA a distância entre os grupos é determinada pela média das distâncias entre pares de indivíduos pertencentes aos diferentes grupos, sendo uma expressão geral para este método: $d_{(ij)k} = \frac{n_i}{n_i+n_j} d_{ik} + \frac{n_j}{n_i+n_j} d_{jk}$ em que: $d_{(ij)k}$ é a distância entre o grupo (ij) , com tamanho interno n_i e n_j , respectivamente, caracterizando i , j e k como indivíduos ou grupos (Cruz e Carneiro, 2006). Desta forma, a construção do dendograma é constituída pelos acessos de maior similaridade, previsto assim o primeiro grupo de acessos mais similares, em seguida calcula-se a distância entre este grupo e os demais acessos formando posteriormente novos grupos também de maior similaridade.

Tanto as matrizes de dissimilaridade como os dendogramas foram obtidos com o auxílio do software estatístico R (R Development Core Team v. 2014). O software R também foi empregado para gerar a matriz dos valores cofenéticos e testar a adequação da análise de agrupamento aos dados originais.

Para a obtenção das análises de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) foi utilizado o pacote *vegan* (Oksanen et al. 2013) do software R. Nesta análise o objetivo foi acomodar os indivíduos em um pequeno número de eixos predeterminados, de modo representar a relação de similaridade entre os materiais de bucha. Deste modo, foi utilizado o algoritmo *isoMDS* visando representar cada indivíduo em duas dimensões de tal forma que as distâncias entre eles fossem preservadas ao máximo. O procedimento partiu de uma organização inicial que, interativamente, reorganizou os indivíduos de maneira a diminuir o stress (STandard RESiduals Sum of Squares). O stress (S) é uma função que informa a magnitude da perda de informação na matriz de similaridade com a utilização do procedimento, sendo esta uma medida do quanto as posições dos indivíduos em uma configuração n-dimensional desviam-se das reais distâncias (similaridades) após o escalonamento. O stress pode ser interpretado pelo valor de $R^2 = 1-S^2$.

A abordagem bayesiana implementada no software *Structure* v.2.4 foi utilizada para revelar a estrutura das populações (Pritchard et al. 2000). Neste trabalho o número de interações utilizadas no *burn-in* e MCMC (Markov Chain Monte Carlo) foram de 100.000 e 200.000, respectivamente. Foi considerado o modelo de mistura com frequências correlacionadas e testados valores de K variando de 1 à 10 com cinco repetições idênticas para cada valor de K testado. O valor mais provável de K foi determinado pelo critério ΔK descrito por Evanno et al. (2005). Para o cálculo do valor ΔK foi utilizado o programa *Structure Harvester* (Earl e Vonholdt, 2011).

Resultados e Discussão

Entre oito combinações de oligonucleotídeos testadas, quatro foram selecionadas para a análise de todas as amostras por exibirem maior número de locos polimórficos e melhor qualidade de amplificação das bandas (tabela 2).

Tabela 2. Polimorfismo detectado por quatro combinações de oligonucleotídeos em acessos de *Luffa cylindrica*. Manaus, AM. 2016.

Combinações de oligonucleotídeos	Total de locos	Locos Polimórficos	Polimorfismo (%)	Gama de tamanho (bp)
E+ATC/M+CAT	55	31	56,36	50 - 500
E+AGT/M+CAT	75	56	74,67	
E+AAC/M+CTC	56	40	71,43	
E+ACA/M+CAT	55	34	61,81	
Total	241	161	66,80	-

Do total observado de 241 locos gerados, 161 foram polimórficos, ou seja, 66,8 % de polimorfismo total encontrado. Estes percentuais de polimorfismo, podem ser comparados com trabalhos de Hoque e Rabbani (2009) ao estudarem as relações de parentesco entre acessos de *Luffa acutangula* do Germoplasma CVFB-Bangladesh, utilizando marcadores RAPD. Estes autores foram os primeiros a relatar a variabilidade genética ao nível molecular, contribuindo para conservação e utilização da espécie. O polimorfismo obtido é comparável ao observado por Tyagi et al. (2015) a partir de marcadores SRAP em 45 acessos de *L. cylindrica* presentes em diferentes regiões geográficas da Índia (72,8%), mas sensivelmente menor ao detectado por Prakash et al. (2014) avaliando a diversidade genética de 37 acessos selvagens do gênero *Luffa*. Neste estudo, os autores obtiveram 97,3% de polimorfismo usando marcadores dominantes ISSR.

O padrão de revelação dos locos na matriz de poliacrilamida pode ser visualizado na figura 2. O padrão de amplificação é variável, pois depende das condições laboratoriais, dos reagentes, a combinação de *primers* analisada e também da habilidade do laboratorista em manusear a técnica dos marcadores AFLP. Não obstante, diversos trabalhos tem relatado que o protocolo de extração do DNA pode influenciar e determinar a qualidade do DNA de trabalho e etapas consequentes (Vuylsteke et al., 2007).

Combinações de primers

E+ATC + M+CAT

E+AGT + M+CAT

E+AAC + M+CTC

E+ACA + M+CAT

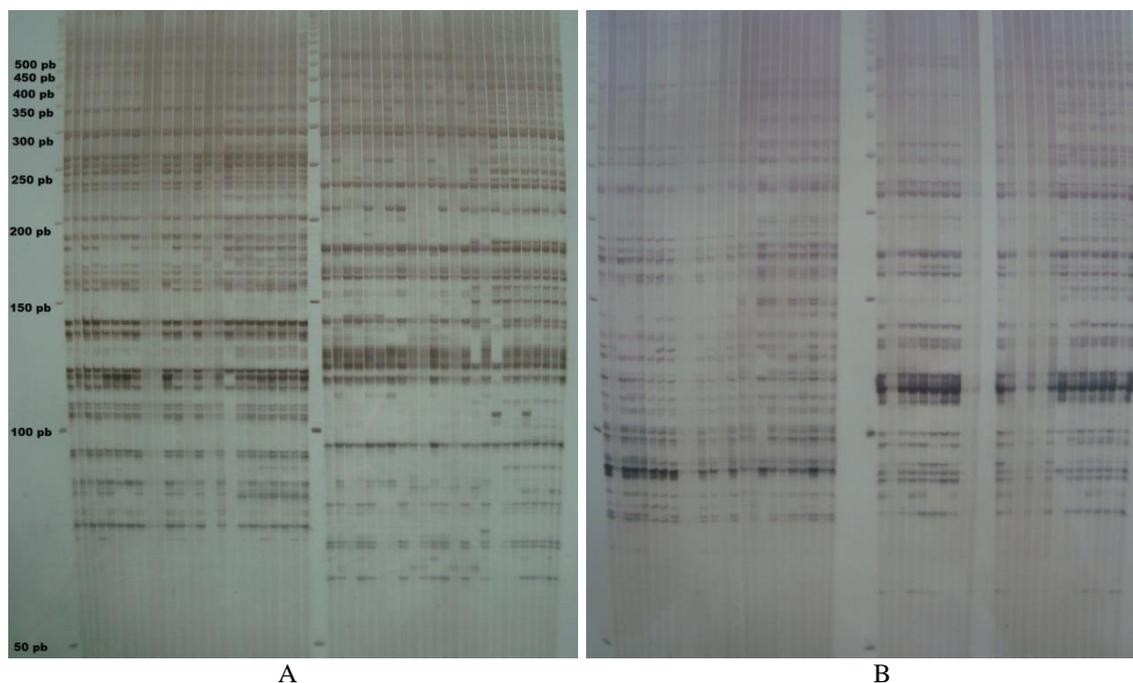


Figura 2. Amplificação seletiva dos fragmentos de DNA gerados nas matrizes de poliacrilamida (A e B) a partir de quatro combinações de oligonucleotídeos selecionados e empregados entre os 24 acessos de *Luffa cylindrica*. Manaus, AM. 2016. Foto: A.D. Blind, 2015.

A expectativa de que a dispersão e os agrupamentos gerados corresponderiam a procedência dos acessos em estudo foram confirmadas pelo relacionamento observado entre os materiais (figura 3). É importante destacar que o coeficiente de correlação cofenética ($r = 0,943$) indicou bom ajuste da representação simplificada da matriz de distâncias genéticas por meio do dendrograma.

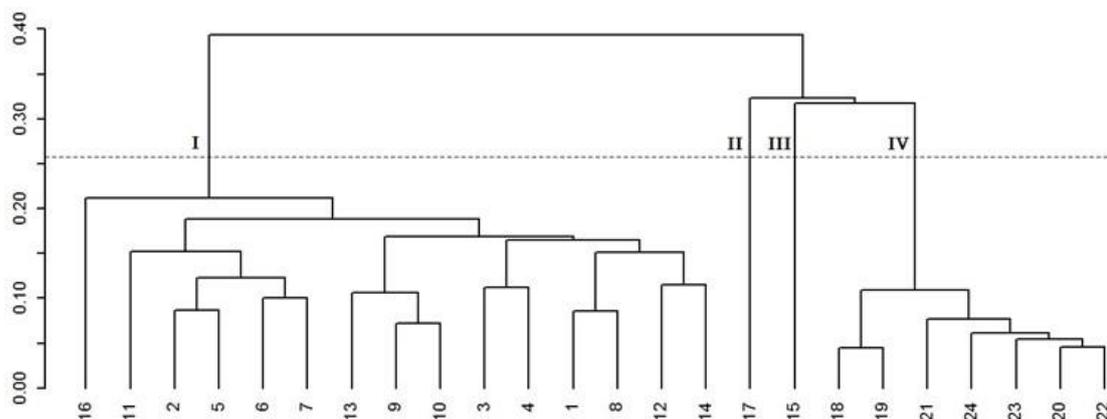


Figura 3. Análise de agrupamento UPGMA, a partir da distância genética de Jaccard, em 24 acessos de *Luffa cylindrica* baseado nas análises de AFLP. Coeficiente de correlação cofenética: $r = 0,9428$. A linha horizontal tracejada representa o corte estimado pelo método de Mojema (1977). Manaus, AM. 2016.

É possível verificar que os acessos 15 e 17 apresentam-se isolados dos demais grupos formados I e IV. Considerando a origem destes acessos, fica evidente que a distância geográfica influenciou diretamente a constituição do genoma desses materiais. Pelo BAG, o acesso 15 é oriundo da Embrapa Hortaliças - DF, e o acesso 17, oriundo de Manacapuru – AM. A compreensão da dissimilaridade encontrada dentro dos grupos está relacionada com o grau de parentesco, principalmente em espécies alógamas, porque a troca de genes pode ter ocorrido em determinado momento (Falush et al. 2003; Zhang et al. 2008). O acesso 16, oriundo de Presidente Figueiredo - AM, apesar de estar no grupo I que é representado pela maioria dos acessos da região Sul e Suldeste do Brasil, possui certa irmandade com os demais. Contudo, apesar de apresentarem distância genética próxima, este acesso possa ter sido trazido da região sul, pelos primeiros colonizadores agrícolas deste local. Estas considerações assemelham ao relatado por Zhang et al. (2008) e Silva et al. (2012) ao verificarem alto grau de parentesco entre acessos de bucha presentes em diferentes regiões da Ásia.

Pela dispersão multidimensional não-métrica das distâncias genéticas, foi possível acomodar os acessos estudados em eixos, e também confirmar a formação de 4 grupos (Figura 4).

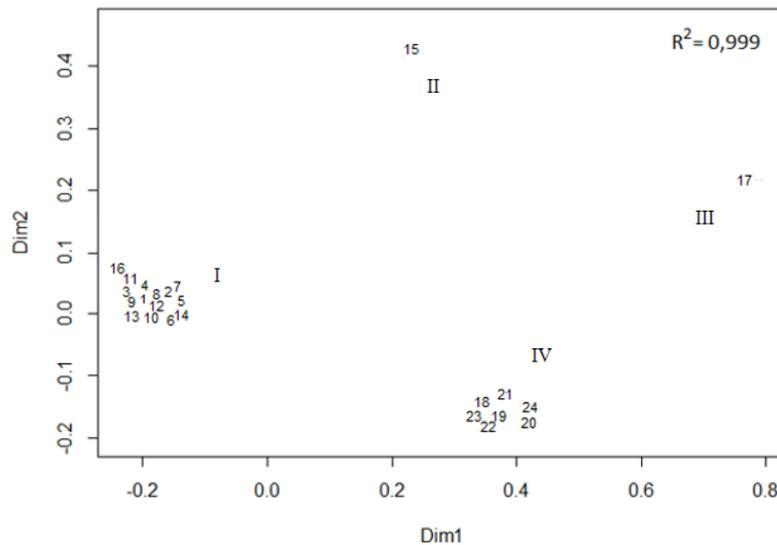


Figura 4. Análise de escalonamento multidimensional não-métrica das distâncias genéticas entre 24 acessos de *Luffa cylindrica* baseado nas análises de AFLP. Manaus, AM. 2016.

Esta análise mostrou resultado idêntico ao dendograma apresentado pela figura 3, em que os acessos 15 e 17 apresentaram-se mais dissimilares com origem não compartilhada com os demais indivíduos.

Pela análise Structure, também foi possível comprovar a formação de grupos (K), pelo valor calculado mais provável de ΔK conforme proposto por Evano et al. (2005) (Figura 5).

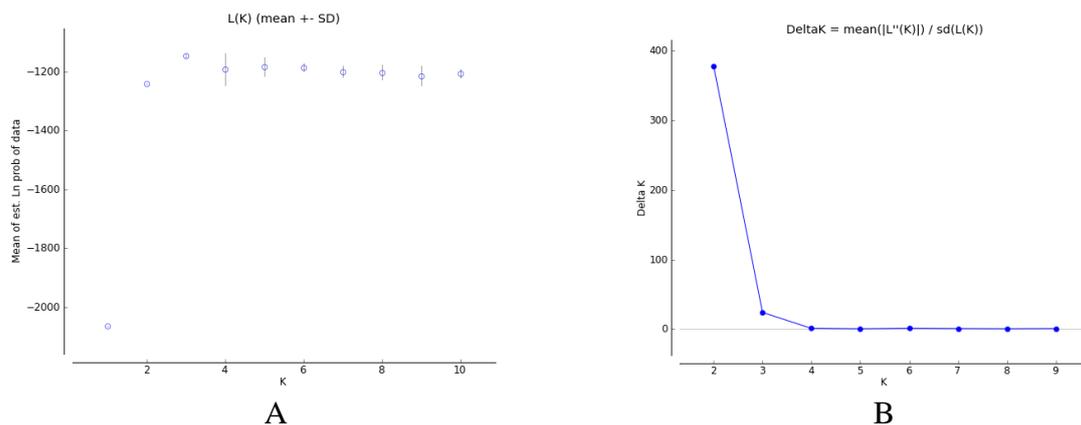


Figura 5. (A) Média dos logaritmos da função de verossimilhança para valores de K testados; (B) Valores de K mais prováveis obtidos pela amplitude de ΔK como função de K (média \pm DP superior a partir de três repetições). Manaus, AM. 2016.

Para determinar os padrões genéticos de diferenciação e subestruturação populacional, foi feita a análise bayesiana de agrupamento pelo software *Structure* (Figura 6). O critério ΔK

descrito por Evanno et al. (2005) apontou $K = 2$ como o número mais provável de agrupamentos. Este resultado corrobora com a ideia de que os acessos 15 e 17 terem origem compartilhada, sendo resultado de um intercâmbio de genes entre as regiões analisadas. No entanto, o método Iplateau, indica que o número mais provável de agrupamentos é $K = 3$, neste caso, os acessos 15 e 17 formariam um grupo independente, com origem não compartilhada com os demais acessos. Independentemente do número de grupos considerados, observa-se a tendência da separação dos acessos coletados no norte com aqueles prospectados nas demais regiões brasileiras.

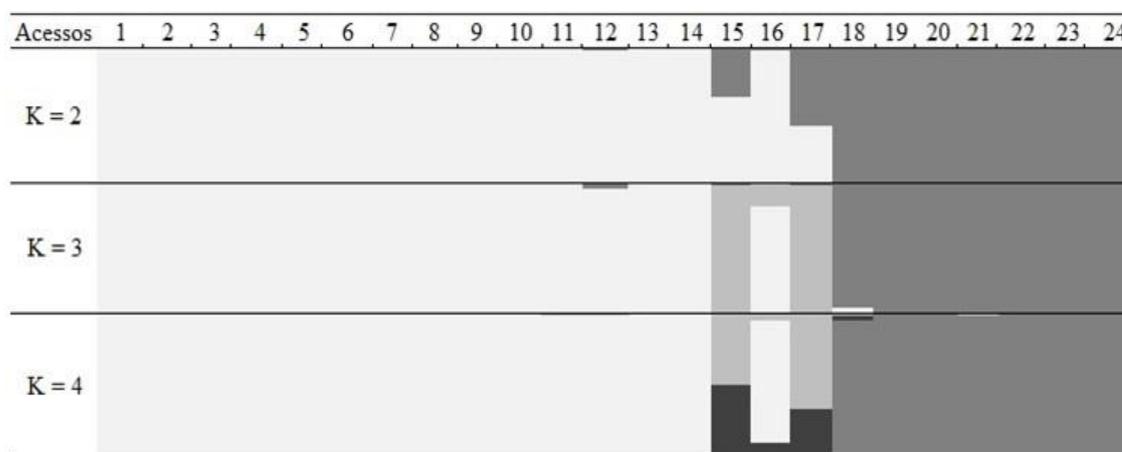


Figura 6. Estrutura populacional em 24 acessos de *Luffa cylindrica* empregando o software Structure para diferentes valores de agrupamento (K). Manaus, AM. 2016.

Os acessos 15, 16 e 17, parecem determinar a transição genica, correspondendo em parte com a variabilidade detectada. Considerando a distribuição geográfica de origem, estes materiais possam ter sido selecionados e dispersados por diversas ocasiões, haja visto que a espécie é de fácil cultivo e a fibra dos frutos amplamente utilizada para fins de limpeza em áreas urbanas e rurais. A eficiência na diferenciação genética a nível molecular, via aplicação de marcadores AFLP também tem sido atestada para outras espécies, inclusive de outros reinos (Fanizza et al., 2003; Oliveira et al., 2011; Chen et al., 2014).

Os acessos de bucha examinados foram geneticamente distintos, e essas diferenças podem ser utilizadas para estratégias no desenvolvimento de análises genéticas mais profundas, seleção de parentais e melhoramento da espécie na região amazônica. A indicação das relações genéticas ressaltadas, utilizando os marcadores AFLP, apresentaram-se fortemente coesivas pelas figurações obtidas.

Conclusões

1. A combinação dos *primers* EcoATC+MseCAT, EcoAGT+MseCAT, EcoAAC + MseCTC e EcoACA + MseCAT, foram eficientes na geração de locos polimórficos para análise de marcadores AFLP, entre os acessos de *L. cylindrica*.
2. As figurações desenvolvidas com base nos dados moleculares, determinaram a formação unânime de quatro grupos distintivos e o relacionamento genético entre os materiais.
3. Os acessos mais divergentes foram 16 e 17 oriundos de Presidente Figueiredo e Manacapuru e os mais similares foram 18 e 19 oriundos de Manaus e Iranduba.
4. A distribuição da diversidade genética alcançada pela técnica AFLP permite sustentar subsídios para uso e conservação da espécie.

Referências bibliográficas

- Bisognin, D. A. 2002. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciência Rural*, 32(5): 715-723.
- Bledzki, A. K.; Gassan, J. 1999. Composites reinforced with cellulose based fibbers. *Progress in Polimers Science*, 24: 221-274.
- Bonin, A.; Ehrich, D.; Manel, S. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular ecology*, 16(18): 3737-3758.
- Boynard, C. A.; Monteiro, S. N.; D’Almeida J. R. M. 2003. Aspects of alkali treatment of sponge gourd (*Luffa cylindrica*) fibers on the flexural properties of polyester matrix composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 87: 1927–1932.
- Chen, Z. D.; Huang, R. K.; Li, Q. Q.; Wen, J. L.; Yuanm G. Q. 2015. Development of pathogenicity and AFLP to characterize *Fusarium oxysporum* f.sp. momordicae isolates from bitter gourd in China. *Journal of Phytopathology*, 163 (3): 202–211.
- Creste, S.; Tulmann Neto, A.; Figueira, A. 2001. Detection of single sequence repeat olymorphisms in denaturing polyacrilamidesequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(4): 299-306.
- Cruz, C. D.; Carneiro, P.C.S. 2006. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, v.2, 585p.
- Cruz, V. M. V.; Tolentino, M. I. S.; Altoveros, N. C.; Villavicencio, M. L. H.; Siopongco, L. B.; dela Viña, A. C.; Laude, R.P. 1997. Correlations among acessions of southeast Asian *Luffa* genetic resources and variability estimated by morphological and biochemical methods. *Philipp Journal Crop Science*, 22(3): 131-140.
- Davis, J. M. 1994. *Luffa* sponge gourd production practices for temperate climates. *HortScience*, 29(4): 263-266.
- Earl, D. A.; Vonholdt, B. M. 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2): 359-361.

- Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8): 2611-2620.
- Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587.
- Fanizza, G.; Chaabane, R.; Lamaj, F.; Ricciardi, L.; Resta, P. 2003. AFLP analysis of genetic relationships among aromatic grapevines (*Vitis vinifera*). *Theoretical and Applied Genetics*, 107(6):1043-1047.
- Ferreira, M. A. J. F.; Lira, I. C. S. A.; Sena, E. M. N.; Aquino, D. A. L.; Passos, L. R. G.; Silva, M. L.; Araujo C. L. 2012. Seleção de bucha vegetal para produção de esponjas: In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS II. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/71544/1/Aldete-2012-3.pdf>
- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPACENARGEN,1998. 220pp.
- Ghali, L.; Aloui, M.; Zidi, M.; Bendaly, H.; M'sahli, S.; Sakli, F. 2011. Effect of chemical modification of *Luffa cylindrica* fibers on the mechanical and higrothermal behaviours of polyester *Luffa* composites. *Bioresources*, 6(4): 3836-3849.
- Hoque S.; Rabbani M. G. 2009. Assessment of genetic relationship among landraces of Bangladeshi ridge gourd (*Luffa acutangula* Roxb.) using RAPD markers. *Journal Scientific Research*, 1(3): 615-623.
- Lira, I.C.S.A.; Passos, L.R.G.; Ferreira, M.A.J.F.; Silva, M.L.; Sena, E.M.N.; Araujo, C.L.; Aquino, D.A.L. 2012. Seleção intra-populacional em bucha vegetal. *Horticultura Brasileira* 30: S4406-S4413.
- Lopes, R.; Lopes, M. G.; Oliveira, Figueira, A. V. O; Camargo, L. E. A.; Fungaro, M. H. P.; Carneiro, M. S.; Vieira, M. L. C. 2003. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP): aspectos técnicos e interpretação genética. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*, 29: 64-68.
- Mba, C.; Tohme, J. 2005. Use of AFLP markers in surveys of plant diversity. *Methods Enzymology*, 395: 177-201.
- Nass, L. L. 2007. **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Cenargen, 858pp.

Oboh, O.; Aluyor, E. O. 2009. *Luffa cylindrica* - an emerging cash crop. *African Journal of Agricultural Research*, 4 (8): 684-688.

Oksanen, J.; Blanchet, F. G.; Kindt, R.; Oksanen, M. J.; Suggests, M. **Vegan: Community Ecology Package**: R package 2.0-10, 2013.

Oliveira, E. J de.; Costa J. L.; Santos L F dos.; Carvalho, F. M.; Silva, A. S.; Dantas, J. L.L. 2011. Molecular characterization of papaya genotypes using AFLP markers. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(3): 849-858.

Prakash, K.; Pati, K.; Arya, L.; Pandey, A.; Verma, M. 2014. Population structure and diversity in cultivated and wild *Luffa* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56: 165-170.

Priori, D.; Barbieri, R.L.; Castro, C.M.; Oliveira, A.C.; Vilela, J.C.B.; Mistura, C.C. 2013. Diversidade genética de *Cucurbita pepo*, *C. argyrosperma* e *C. ficifolia* empregando marcadores microssatélites. *Horticultura Brasileira*, 31(3): 361-368.

Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.

Queiroz, M.A. 2004. Germplasm of Cucurbitaceae in Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4: 377-383.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>. 2014.

Satyanarayana, K. G.; Guilmaraes, J. L.; Wypych, F. 2007. Studies on lignocellulosic fibers of Brazil. Part I: Source, production, morphology, properties and applications. *Composites*, 38(7): 1694-1709.

Silva, M. W. K. P.; Ranil, R. H. G.; Fonseka R. M. 2012. *Luffa cylindrica* (L.) M. Roemer (Sponge Gourd-Niyan wetakolu): An Emerging High Potential Underutilized Cucurbit. *Tropical Agricultural Research*, 23(2): 186 – 191.

Sokal, R. R.; Rohlf, F. J. 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon*, 11(2): 33-40.

Siqueira, G.; Bras, J.; Dufresne, A. 2010. *Luffa cylindrica* as a linocellulosic source of fiber, microfibrillated cellulose, and cellulose nanocrystals. *Bioresources*, 5(2): 727-740.

Suzuki, R.; Shimodaira, H. 2006. Pvclost: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics*, 22(12): 1540-1542.

Tyagi, R.; Sharma, V.; Sureja, A. K.; Munshi, A. D.; Arya, L.; Verma, M. 2015. Deciphering population structure and diversity in *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem. using morphological and sequence-related amplified polymorphism markers. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 1: 1-4.

Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J. D.; Kuiper, M.; Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21): 4407-4414.

Vuylsteke, M.; Peleman, J.D.; van Eijk, M.J.T. 2007. AFLP technology for DNA fingerprinting. *Nature Protocols*, 2(6): 1387-1398.

Zhang, S.; Hu, J.; Xu, S. 2008. Developmental genetic analysis of fruit shape traits under different environmental conditions in sponge gourd (*Luffa cylindrical* (L) Roem. Violales, Cucurbitaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 31(3): 704-710.

Capítulo 2

Divergência genética entre acessos de *Luffa cylindrica* por descritores morfoagronômicos

Resumo – A bucha vegetal pertence à família das cucurbitáceas e vem revelando-se uma importante espécie produtora de fibras para o mercado agroindustrial, dermo-cosmético e automotivo. Os produtos e compósitos gerados tornam-se biodegráveis, possuem baixo custo de produção e são atrelados ao forte apelo ambiental de consumo. A caracterização morfoagronômica de acessos reunidos em Bancos de Germoplasma institui a divergência instalada e serve como base em pesquisas para o melhoramento e uso da espécie. Neste sentido, o presente estudo teve por objetivo caracterizar e verificar o relacionamento genético em 24 acessos de bucha, presentes no Banco Ativo de Germoplasma-UFAM, reunidos inicialmente como divergentes. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, representados por 24 acessos x 4 repetições e 3 plantas por parcela. Por meio de aferição em 22 descritores qualitativos e 8 quantitativos foi realizada a caracterização fenotípica, agrupamento dos acessos baseados na dissimilaridade genética, dispersão e contribuição relativa dos caracteres por meio da técnica de componentes principais além de correlação de caracteres. Verificou-se que os 24 acessos do BAG, possuem alta plasticidade fenotípica, possibilitando a formação de grupos de indivíduos mais similares considerando as estruturas foliares, dos frutos e das sementes. As variáveis quantitativas também admitiram formar grupos por meio das análises multivariadas de componentes principais e da importância relativa, o que contribuiu para dissimilaridade total encontrada e correlação entre os caracteres estudados principalmente para o comprimento do fruto, massa seca de fibra e circunferências do fruto.

Palavras-chave: Caracterização morfo-agronômica, Descritores, Germoplasma, Dissimilaridade genética.

Abstract - The loofah belongs to the family of cucurbits and is proving to be a major producer of fiber species for agro-industrial market, dermo-cosmetic and automotive. Products and composites generated become biodegradable, have low production costs and are linked to the strong environmental appeal consumption. The morphological and agronomic characterization of accessions collected in Gene Bank establishing at least divergence installed and serves as the basis of research for the improvement and use of the species. In this sense, this study aimed to characterize and verify the genetic relationship in 24 loofah access, present in the BAG-UFAM initially gathered as divergent. The experimental design was in blocks at the case represented by 24 hits x 4 replicates and three plants per plot. Through scouting on 22 qualitative descriptors and 8 quantitative variables was performed phenotypic characterization, grouping of accesses based on genetic dissimilarity, analysis of variance, dispersion and relative contribution of major components in addition to the estimates of genetic parameters. It was found that 24 accesses BAG - UFAM have high phenotypic plasticity, enabling the formation of groups of more dis-similar individuals. Quantitative variables also allowed formalizing groups by means of multivariate analyzes of major components and the relative importance, which contributed to the total dissimilarity and found correlation between the studied characters. The calculated genetic parameters allow selecting materials that have better rates of heritability, and low environmental co-option and can be employed in species breeding programs.

Keywords - Morpho-agronomic characterization, Descriptors, Germplasm, Genetic dissimilarity

Introdução

No Norte do Brasil a bucha vegetal (*Luffa cylindrica*), pode-se tornar uma importante cultura, visto que as fibras ligno-celulósicas produzidas pelos frutos acumulam características que agradam diversos setores do mercado agroindustrial. A região possui condições favoráveis ao cultivo da espécie (Davis, 1994; Siqueira, 2007; Marouelli et al., 2013) atrelado a facilidade de produção, beneficiamento e pela presença de indústrias de diversos setores que usam fibras (Oboh e Aluyor, 2009; Silva et al., 2012).

A planta possui hábito de crescimento indeterminado, ciclo anual, é monóica, os frutos constituem-se de bagas, geralmente cilíndricos e/ou trigonais, compridos e/ou ovalados, cujo tamanho pode variar entre 20 centímetros a 1,6 metro de comprimento, apresentando variações morfológicas e biométricas de acordo com origem dos acessos (Bisognin, 2002; Joshi et al., 2010;). Diversos trabalhos têm relatado variabilidade entre acessos de bucha tanto na Ásia como nas Américas (Cruz et al., 1997; Zhang et al., 2008; Ferreira et al., 2010; Prakash et al., 2013), no entanto, com pouco conhecimento gerado sobre o relacionamento e caracterização dos materiais distânciados geograficamente, o que poderia auxiliar na descoberta de possíveis amostras com potencial diferenciado para a agroindústria e fontes de genes de interesse para programas de melhoramento.

A divergência genética dentro de espécies e como ela se distribui, é uma informação importante em programas de reprodução para qualquer espécie. A análise de caracteres morfológicos, ajuizados como descritores são elementos indispensáveis ao cultivo e melhoramento, pois apresenta custo relativamente barato de aferição envolve diretamente a observação e mensuração de caracteres.

O manuseio simultâneo de múltiplas variáveis botânicas são ferramentas vantajosas na discriminação de acessos, variedades e/ou populações, porque permitem conferir características agrônômicas de interesse, relações e correlações genéticas de modo eficiente, proporcionando maior oportunidade de escolha de materiais além de sinalizar cruzamentos indesejáveis (Cruz, 1990; Cruz et al., 1997; Lira et al., 2012).

A presença ou ausência de formas, cores e/ou posições, envolvendo flores, folhas, frutos, sementes e ramos em espécies de cucurbitáceas, contribuem diretamente para verificar a diversidade genética, positiva ou negativa (Ramos et al., 2000; Taha et al., 2003; Queiroz, 2011).

O emprego de dados discretos e biométricos surgiram como ferramentas eficazes em análises de variações genéticas, uma vez que permitem verificar as dissimilaridades em curto espaço de tempo, identificando genitores geneticamente distantes que possibilitem maior efeito heterótico em suas progênes (Cruz e Carneiro 2006; Araújo et al., 2008)

Dentre os métodos mais empregados para análise de variações genéticas, destaca-se o uso de componentes principais, de variáveis canônicas, e análise de agrupamento estimadas pela distância euclidiana ou a de Mahalanobis (Cruz e Regazzi, 1994). Esses métodos já foram amplamente utilizados para estudo de diversidade em diversas espécies, a exemplo com acessos de coleções de Algodão (Singh e Gupta, 1968) de Arroz (Chaudhary et al., 1973) de Mandioca (Pereira et al., 1992) para Abóbora (Ramos et al., 2000) Maracujá (Araújo et al., 2008) e também em acessos de bucha na Ásia (Joshi et al., 2004) contribuindo para o manejo adequado e conservação do germoplasma nestes locais.

Paralelamente, o cálculo de parâmetros genéticos pode sinalizar as variâncias que circundam as variáveis de interesse e que relaciona-se com o ambiente de cultivo e sugestivamente devem ser considerados (Dudley e Moll, 1969). Além disso, a herdabilidade das características exercem forte influência na escolha da metodologia de seleção e melhoramento.

Desta forma, o presente estudo objetivou caracterizar a variabilidade genética em 24 acessos de bucha por meio de descritores morfoagronômicos, além de correlacionar variáveis quantitativas evidenciando acessos potencialmente adequados ao cultivo e ao melhoramento da cultura.

Material e Métodos

A partir do quarto mês pós transplante em meados de abril de 2014, quando as plantas cultivadas dos 24 acessos apresentados (Tabela 3 – metodologia geral) permitiram as primeiras colheitas, foram analisados os descritores, sendo vinte dois qualitativos e posteriormente oito quantitativos. Parte da caracterização dos acessos desenvolveu-se por meio de descritores botânicos extraídos e adaptados do “Descriptors for Sponge Gourd [*Luffa cylindrica* (L.) Roem.]” conforme sugestão de Joshi et al. (2004) para caracteres de fácil mensuração e variabilidade de expressão. Ao todo foram considerados 22 caracteres envolvendo as estruturas da rama, do fruto, da semente e da fibra dos acessos, sendo estes avaliados em todas as plantas das parcelas (Tabela 1).

Tabela 1. Lista dos descritores botânicos ponderados entre 24 acessos de *Luffa cylindrica*. Manaus, AM. 2016.

Descritores	Escala avaliada			
	pequena, 10 x 10 ± 2 cm (1)	média, 15 x 15 ± 3 cm (2)	grande, acima 20 x 20 cm (3)	-
Tamanho de Folhas	pequena, 10 x 10 ± 2 cm (1)	média, 15 x 15 ± 3 cm (2)	grande, acima 20 x 20 cm (3)	-
Potencial de Ramificação	baixo, até 6 ramos (1)	media, 7 até 11 ramos (2)	alto, acima de 12 ramos (3)	-
Posição da Inflorescência	ereta (1)	intermediária (2)	pendular (3)	-
Margem da Folha	lisa (1)	dentada (2)	intermediária (3)	-
Formato da Folha	orbicular (1)	reniforme (2)	oval (3)	-
Expressão Sexual	monóica (1)	hermafrodita (2)	-	-
Cor da Flor	amarela (1)	amarelo claro (2)	laranja (3)	-
Raiz Adventícia	presente (1)	ausente (2)	-	-
Cor do Fruto Maduro	verde pintalgado (1)	verde uniforme (2)	-	-
Tamanho do Pedúnculo	pequeno, até 9 cm (1)	médio, 10-16 cm (2)	grande, acima 17 cm (3)	-
Tipo de Fruto	cilíndrico (1)	achatado (2)	Triangular (3)	-
Casca do Fruto	liso (1)	rugoso (2)	deprimido (3)	-
Formato Apical do Fruto	deprimido (1)	pontudo (2)	oval (3)	-
Formato Basal do Fruto	deprimido (1)	pontudo (2)	oval (3)	-
Forma do Fruto	alongado (1)	piriforme (2)	redondo (3)	elipsoide (4)
Número de Locos	três (1)	quatro (2)	cinco (3)	multilocular (4)
Cor da Semente	preta (1)	cinza (2)	creme (3)	branca (4)
Tamanho da Semente	grande, 12 mm x 0.8 mm ± 4 mm (1)	média, 11 mm x 0.8 mm ± 4 mm (2)	pequena, 10 mm x 0.7 mm ± 4 mm (3)	-
Formato da Semente	piriforme (1)	elipsoide (2)	oval (3)	-

Superfície da Semente	rugosa (1)	intermediária (2)	lisa (3)	-
Cor Natural da Fibra	cristalina (1)	creme (2)	amarela (3)	-
Maciez da Fibra	muito dura (1)	dura (2)	macia (3)	muito macia (4)

Para os descritores quantitativos relacionados à produção, foram tomados os dados obtidos em cada colheita considerando 6 meses de produção, adotando algumas sugestões de Ferreira et al. (2010). As variáveis de produção avaliadas foram: número médio de frutos (n), contabilizados no momento de cada colheita; massa seca da fibra do fruto (g); comprimento do fruto (cm), circunferência apical do fruto (mm), circunferência medial do fruto (mm), circunferência basal do fruto (mm), espessuras mínima da fibra (mm) e máxima da fibra (mm) considerando ponto medial, foram aferidos 72 h posterior à lavagem e secagem da fibra a sombra (Figura 1).

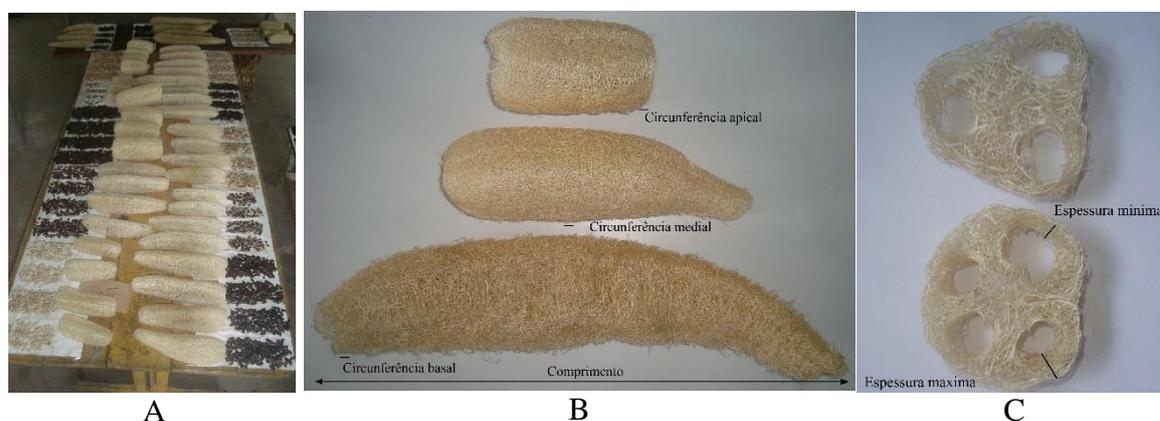


Figura 1. Exemplo de características qualitativas observadas nas sementes (A) e aspectos biométricos medidos nos frutos de 24 acessos de *Luffa cylindrica*, posterior a lavagem e secagem da fibra (B e C). Manaus, AM. 2016. Fotos: A.D. Blind, 2014

Com base no levantamento de dados resultante da análise dos descritores qualitativos e quantitativos, as variáveis foram padronizadas para eliminação das unidades de escalas, para então proceder com as análises estatísticas multivariadas.

Para análise dos caracteres morfológicos qualitativos, foi obtido matriz de dissimilaridade, a partir do coeficiente proposto por Cole-Rodgers (Cole-rodgers et al., 1997), que considera classificação de características em escalas, podendo assim, serem analisadas como características quantitativas discretas (Cruz e Carneiro, 2006). Para os caracteres quantitativos, a matriz de dissimilaridade foi obtida com base na distância genética de Mahalanobis. De posse das matrizes de dissimilaridades, ambos os agrupamentos foram realizados pelo métodos de otimização de Tocher e procedimento hierárquico UPGMA.

Adicionalmente realizou-se o cálculo do coeficiente de correlação cofenético (Sokal e Rohlf, 1962) para a estimativa do ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendograma gerado. As técnicas de análises multivariadas de componentes principais e importância relativa dos caracteres, baseando-se no método proposto por Singh (1981), também foram aplicadas aos dados quantitativos.

As estimativas de correlação e demais análises foram realizadas empregando-se o aplicativo computacional em genética e estatística, Programa Genes versão 2014.6.1 (Cruz, 2013).

Resultados e Discussão

É importante destacar a importância da caracterização de acessos pelos descritores morfológicos, uma vez que este conhecimento permite a adoção quase que imediata de acessos com características de interesse por parte dos produtores e programas de melhoramento da espécie ou mesmo para discriminação, identificação e caracterização de materiais potenciais para serem designados como variedades (Joshi et al., 2010; Prakash et al., 2013). Na tabela 2 são apresentados os descritores morfológicos observados entre os acessos de bucha.

Tabela 2. Caracterização de 24 acessos de *Luffa cylindrica*, considerando análise de 22 descritores morfológicos. Manaus, AM. 2016.

Acesso	Descritores										
	TF	PR	PI	MF	FF	ES	CF	RA	CFM	TP	TFr
1	pequena	baixo	intermediária	dentada	orbicular	monoica	amarela	ausente	verde pintalgado	pequeno	cilíndrico
2	média	média	pendular	dentada	orbicular	monoica	laranja	ausente	verde uniforme	médio	achatado
3	média	baixo	ereta	dentada	orbicular	hermafrodita	amarela	ausente	verde uniforme	pequeno	cilíndrico
4	grande	média	intermediária	lisa	oval	monoica	amarelo claro	ausente	verde pintalgado	grande	cilíndrico
5	média	média	ereta	lisa	orbicular	monoica	amarelo claro	ausente	verde pintalgado	pequeno	cilíndrico
6	média	alta	ereta	lisa	orbicular	monoica	amarelo claro	ausente	verde pintalgado	médio	cilíndrico
7	grande	média	pendular	dentada	reniforme	monoica	amarelo claro	ausente	verde pintalgado	pequeno	cilíndrico
8	grande	média	intermediária	lisa	orbicular	monoica	amarelo claro	ausente	verde uniforme	médio	cilíndrico
9	grande	alta	intermediária	lisa	oval	monoica	amarela	presente	verde uniforme	médio	cilíndrico
10	pequena	baixo	ereta	dentada	oval	monoica	amarela	ausente	verde pintalgado	grande	cilíndrico
11	grande	média	intermediária	lisa	reniforme	monoica	amarela	ausente	verde uniforme	médio	cilíndrico
12	grande	média	pendular	lisa	orbicular	monoica	amarela	ausente	verde uniforme	médio	cilíndrico
13	pequena	alta	ereta	lisa	reniforme	monoica	amarela	presente	verde uniforme	médio	triangular
14	média	média	intermediária	dentada	orbicular	monoica	amarela	ausente	verde pintalgado	pequeno	triangular
15	média	baixo	pendular	lisa	orbicular	hermafrodita	amarela	ausente	verde uniforme	pequeno	cilíndrico
16	média	média	ereta	dentada	reniforme	monoica	amarelo claro	ausente	verde uniforme	grande	cilíndrico
17	média	média	intermediária	dentada	reniforme	monoica	amarelo claro	ausente	verde pintalgado	pequeno	cilíndrico
18	média	alta	intermediária	dentada	reniforme	monoica	amarelo claro	ausente	verde pintalgado	pequeno	cilíndrico
19	média	alta	intermediária	lisa	reniforme	monoica	amarelo claro	ausente	verde uniforme	grande	cilíndrico
20	grande	alta	intermediária	dentada	orbicular	monoica	amarelo claro	presente	verde uniforme	médio	cilíndrico
21	média	alta	pendular	dentada	reniforme	monoica	amarelo claro	presente	verde pintalgado	médio	cilíndrico
22	média	média	ereta	dentada	oval	monoica	amarelo claro	presente	verde uniforme	médio	cilíndrico
23	pequena	alta	intermediária	dentada	reniforme	monoica	amarela	presente	verde pintalgado	médio	cilíndrico
24	grande	alta	pendular	lisa	orbicular	monoica	amarela	ausente	verde pintalgado	médio	triangular
cont..	CFr	FAF	FBF	FFr	NL	CS	TS	FS	SS	CNF	MFi
1	rugoso	pontudo	oval	elipsoide	três	preta	grande	piriforme	lisa	crystalina	dura
2	deprimido	pontudo	oval	alongado	três	preta	pequena	piriforme	intermediária	crystalina	macia
3	deprimido	pontudo	pontudo	elipsoide	três	preta	média	elipsoide	intermediária	creme	muito dura
4	liso	pontudo	pontudo	redondo	três	preta	grande	elipsoide	intermediária	crystalina	dura
5	liso	pontudo	oval	elipsoide	três	preta	grande	elipsoide	lisa	crystalina	dura
6	liso	oval	oval	piriforme	três	preta	média	elipsoide	lisa	crystalina	dura
7	liso	pontudo	oval	alongado	três	preta	pequena	elipsoide	intermediária	crystalina	dura
8	liso	pontudo	oval	alongado	três	preta	média	piriforme	intermediária	crystalina	dura
9	deprimido	pontudo	pontudo	piriforme	três	branca	grande	elipsoide	lisa	crystalina	muito macia
10	deprimido	deprimido	deprimido	redondo	três	creme	pequena	elipsoide	lisa	crystalina	macia
11	deprimido	pontudo	deprimido	piriforme	quatro	cinza	média	elipsoide	lisa	crystalina	muito dura
12	deprimido	pontudo	piriforme	três	cinza	média	elipsoide	lisa	crystalina	dura	
13	deprimido	deprimido	deprimido	elipsoide	três	branca	grande	elipsoide	lisa	crystalina	macia
14	deprimido	oval	oval	elipsoide	três	preta	média	elipsoide	intermediária	creme	macia
15	liso	deprimido	oval	alongado	três	preta	pequena	oval	intermediária	creme	muito dura
16	deprimido	deprimido	deprimido	redondo	quatro	preta	média	piriforme	intermediária	amarela	macia
17	deprimido	pontudo	deprimido	elipsoide	três	preta	pequena	elipsoide	intermediária	crystalina	macia
18	deprimido	deprimido	pontudo	piriforme	três	preta	média	elipsoide	rugosa	amarela	macia
19	liso	pontudo	pontudo	elipsoide	três	branca	grande	elipsoide	intermediária	crystalina	muito macia
20	liso	pontudo	pontudo	piriforme	três	preta	média	piriforme	lisa	crystalina	macia
21	liso	oval	pontudo	piriforme	três	cinza	média	elipsoide	intermediária	crystalina	macia
22	liso	pontudo	pontudo	elipsoide	três	preta	pequena	elipsoide	intermediária	crystalina	macia
23	liso	deprimido	pontudo	elipsoide	três	branca	grande	elipsoide	lisa	crystalina	macia
24	liso	deprimido	pontudo	alongado	três	preta	grande	elipsoide	lisa	crystalina	dura

TF = Tamanho da Folha; PR = Potencial de Ramificação; PI = Posição da Inflorescência; MF = Margem da Folha; FF = Formato da Folha; ES = Expressão Sexual; CF = Cor da Flor; RA = Raiz Adventícia; CFM = Cor do Fruto Maduro; TP = Tamanho do Pedunculo; TFr = Tipo de Fruto; CFr = Casca do Fruto; FAF = Formato Apical do Fruto; FBF = Formato Basal do Fruto; FFr = Forma do Fruto; NL = Numero de Locos; CS = Cor da Semente; TS = Tamanho da Semente; FS = Formato da Semente; SS = Superfície da Semente; CNF = Cor Natural da Fibra; MFi = Maciez da Fibra.

Os dados morfológicos mostram que, em geral, os materiais analisados possuem diferenças fenotípicas marcantes, dentre elas cita-se a expressão sexual (ES), forma do fruto

(FFr) e cor da semente (CS), características estas consideradas de baixa interação ambiental (Joshi et al., 2004). Considerando a FFr, os acessos 2, 7, 8, 15 e 24 mostraram-se com frutos alongados relativamente grandes quando conferidos pelo comprimento. A cor das sementes de bucha são geralmente pretas como verificado para maioria dos acessos estudados (Tabela 2), contudo, os materiais 9, 13, 19 e 23 produzem sementes brancas enquanto que os acessos 11, 12 e 21 produzem sementes de coloração cinza e o acesso 10, único a produzir sementes de cor creme.

Duas variáveis botânicas adicionalmente consideradas após o desenvolvimento das plantas foram relatadas (Figura 2). Os acessos 3 e 15, apresentaram plantas com flores masculinas e femininas na mesma haste, o que é raro, pois para bucha não é relatado androginia (Joshi et al., 2010). Ademais, foi verificado a presença de raízes adventícias também em algumas plantas entre os acessos, mostrando que há divergência por esta característica.

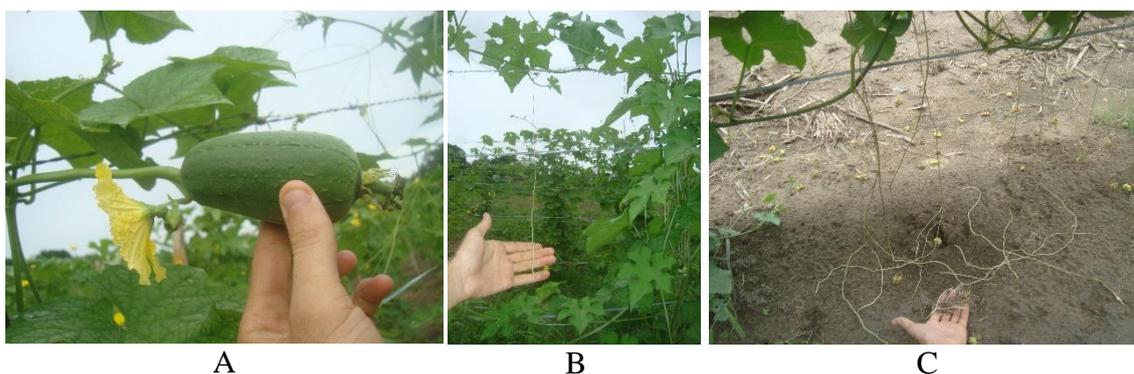


Figura 2. Registro da presença de flores masculinas e femininas na mesma haste (A) e raízes adventícias (B e C) em *L. cylindrica*. Manaus, AM. 2016. Fotos: A.D. Blind, 2014.

A manifestação de raiz adventícia inserida na axila foliar sentido solo, foi mais frequente em acessos oriundos da região norte, os acessos 20, 21, 22 e 23, contudo os acessos 9 e 13 também desenvolveram esta estrutura que por sinal é funcional e pode ter relação bem mais específica do que uma simples segregação varietal e sim uma estrutura de adaptabilidade. Na região Norte, além do solo ser pobre nutricionalmente, em diversos municípios os setores agrícolas permanecem com o solo bastante húmido e até encharcado, o que pode ter levado a surgir tal adaptação, tanto para extração nutricional como também para aeração radicular, todavia necessitando de estudos aprofundados que comprovem esta hipótese. É comum o lançamento de raízes axilares em cucurbitáceas quando há certa proximidade com solo e

sombreamento da rama (Filgueira, 2008), calhando por estímulo hormonal, porém, não relatos específicos explicando presença e funcionalidade de raízes adventícias em bucha curiosamente com até 1,5 metro da axila foliar até o solo.

Na caracterização de plantas de bucha, Carmo (2007) também relatou heterofilia principalmente em folhas da mesma planta em acessos do Espírito Santo. Embora este autor não tenha estipulado uma determinação para avaliar este parâmetro, é aceitável que tal diferença realmente ocorra, pois folhas mais jovens apresentam-se irregularidades no limbo à medida que se desenvolve. Neste estudo, as configurações foliares evidenciadas foram determinadas considerando repetições e moda de frequência em folhas maduras expandidas (folha com inserção de pedúnculo e fruto desenvolvido) constatando assim, variação entre os acessos (Tabela 2) pelas escalas determinadas (Tabela 1) evitando ter influência do desenvolvimento da folha.

Joshi et al. (2004) também constataram elevada diferença entre características qualitativas envolvendo estruturas de rama, do fruto, da semente e da fibra entre acessos de *L. cilíndrica*, oriundas de diversas localidades da Ásia. Estes autores relataram ainda que as principais características de interesse para agricultores desse local foram a forma e formato dos frutos, além da cor e maciez da fibra.

No Brasil, poucos trabalhos tem relatado as diferenças morfológicas envolvendo as estruturas da planta de bucha. Os trabalhos desenvolvidos por Carmo (2007), Lira et al., (2011) e Ferreira et al. (2009; 2010; 2012), basearam-se na discriminação e seleção de acessos locais principalmente dos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Estes autores avaliaram características produtivas e qualitativas entre acessos visando diversos usos, porém não relataram o grau de parentesco genético e sua inter-relação.

Observa-se que tanto no Brasil como na Ásia, as características relacionadas ao fruto e fibra coincidem com a preferência e hábito cultural dos agricultores do país, haja visto que em determinados locais a escolha de plantio e uso é determinada apenas pela forma do fruto, cor e maciez da fibra. Em contrapartida, para uso industrial, independente do País, existe forte interesse nas análises físicas e mecânicas nas fibras e como a estrutura fibrilar se comporta ao longo do tempo (Bledzki e Gassam, 1999; Ghali et al., 2011).

Pela figura 3, evidencia-se algumas diferenças que foram avaliadas nas análises morfológicas quanto a cor, aspecto da casca, forma e formato dos frutos maduros

fisiologicamente. Além disso foi possível distinguir os acessos cujos frutos produzidos foram classificados em alongados, piriformes, elipsóides e/ou redondos, características essas que refletem diretamente sobre o comprimento dos frutos.

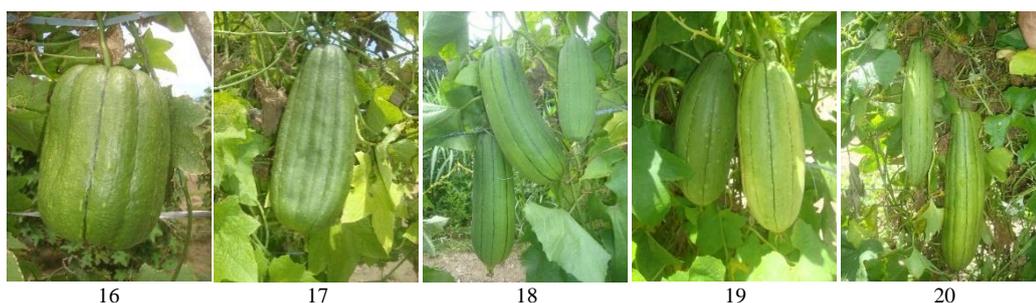
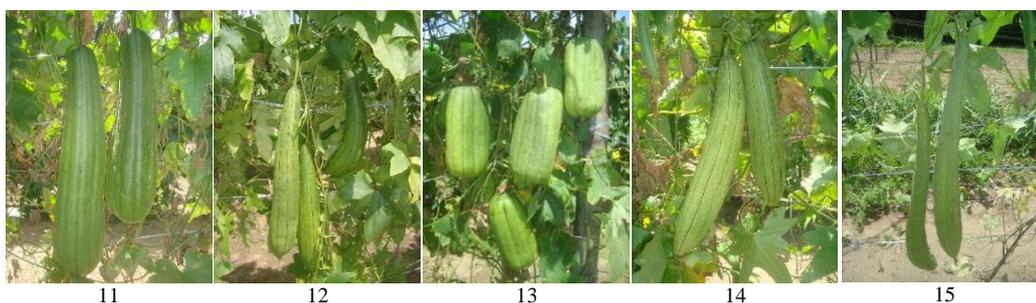
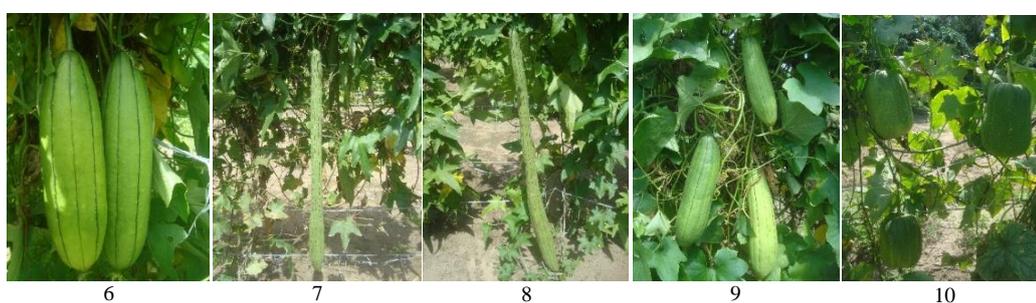
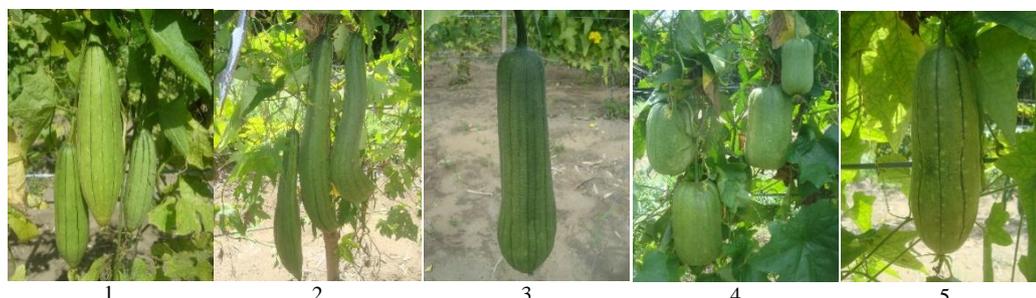


Figura 3. Aspectos morfológicos de frutos maduros, produzidos entre 24 acessos de *Luffa cilíndrica*. Manaus, AM. 2016. Fotos: A.D. Blind, 2014.

Também foi foto documentado a variabilidade de características pós-colheita, quanto á cor, tamanho, formato e superfície de sementes, além da cristalinidade natural e maciez da fibra entre os acessos de bucha estudados (Figura 4).

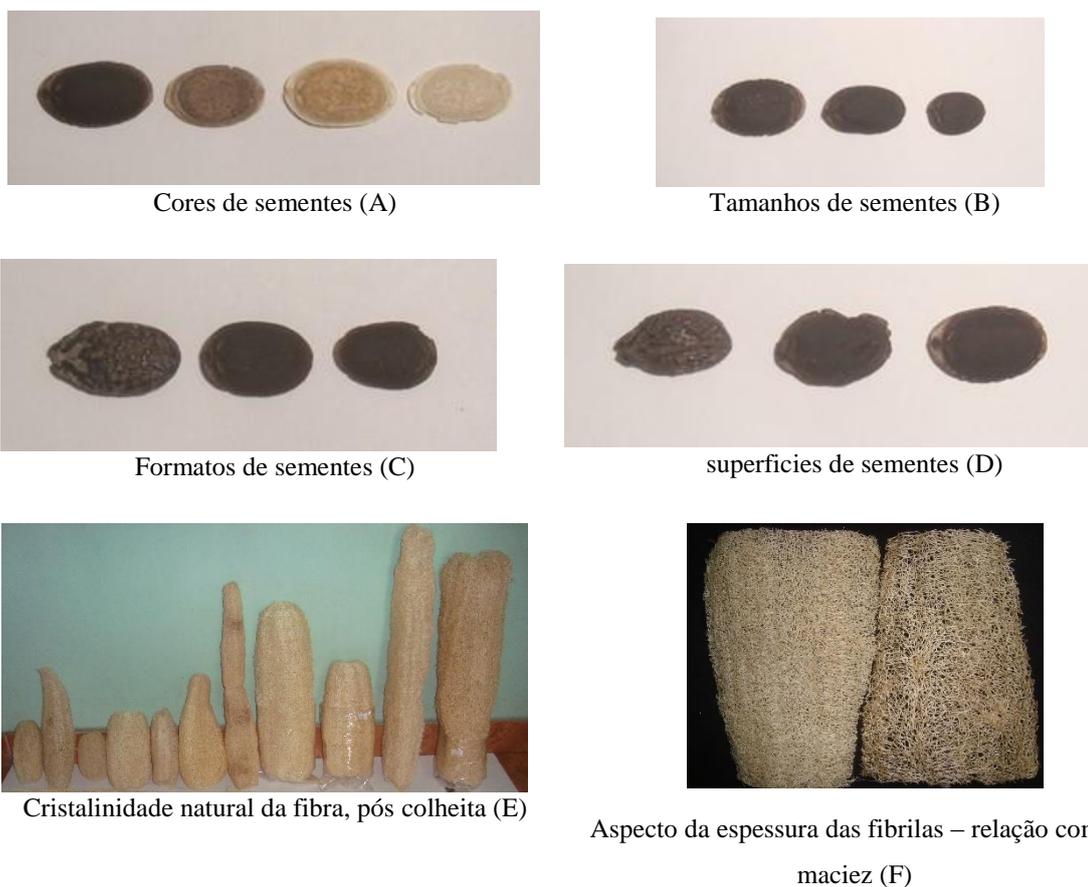


Figura 4. Apresentação morfológica de sementes (A, B, C, D) e da fibra (E e F) observada entre acessos de *L. cilíndrica*. Manaus, AM. 2016. Fotos: A.D. Blind, 2014.

Neste estudo, a determinação da maciez da fibra não foi estudado com metodologia a sua densidade. Apesar de não ter sido avaliado por método específico a espessura das fibrilas que compõem a manta fibrosa, sensitivamente, é possível discernir que os acessos classificados por terem fibra macia e muito macia, possuem fibrilas relativamente finas quando comparado aos acessos que produziram fibra dura e muito dura. Esta característica visivelmente não tem relação com a densidade da manta fibrosa, visto que alguns acessos produziram parede fibrosa relativamente fina e fibrilas muito grossas, com baixa deformidade manual, classificadas assim como duras ou muito duras.

Conforme relatos de Carmo (2007), Ferreira et al. (2010) e Blind et al. (2013), buchas de fibras macias são preferencialmente comercializadas em estilhas para uso dermo-cosmético, para limpeza de pele, enquanto que fibras duras sugestivamente para uso doméstico, para limpeza de louças e para emprego em compósitos industriais como palmilhas, estofamentos e filtros de óleo.

A diferença fenotípica entre plantas alógamas, está muitas vezes relacionada com sua genealogia. Apesar da bucha possuir baixa depressão por endogamia (Queiroz, 2004) é relatado em diversos estudos a influência do modo de conservação do germoplasma entre agricultores, instituições e sua interdependência de expressão com o ambiente (Joshi et al., 2010).

Considerando análise dos descritores morfológicos qualitativos foi possível agrupar geneticamente os acessos estudados. A tabela 3 apresenta a análise de agrupamento das informações, pelo método de otimização de Tocher, baseadas na distância proposta por Cole-Rodgers et al., (1997).

Tabela 3. Agrupamento dos acessos de *Luffa cylindrica* pelo método de otimização de Tocher, baseado na distância genética proposta por Cole-Rodgers, considerando caracteres morfológicos qualitativos. Manaus, AM. 2016.

Grupos	Acessos
1	6 24 20 22 19 21
2	4 12 7 8 5 17
3	11 16 3
4	13 23
5	9
6	10
7	18
8	14
9	1
10	15
11	2

A representação dos grupos formados pelo método de otimização de Tocher, permitiu a formação de 11 grupos distintos. Os acessos 1, 2, 9, 10, 14, 15 e 18 ficaram sozinhos em único grupo, evidenciando assim, que os mesmos possuem caracteres morfológicos distintos dos demais e que os mesmos possuem uma certa similaridade genética dentro do grupo.

Comparando-se a formação de grupos, com trabalho realizado por Joshi et al. (2010) estudando acessos de bucha da Ásia e o trabalho realizado por Ramos et al. (2000) entre acessos

de abóbora do Nordeste do Brasil, o estabelecimento de grupos pela simples inspeção visual deve associar combinações fenotípicas e biométricas, visando ampliar a base genética e de possibilidades hereditárias.

Para Cruz e Carneiro (2006), grupos formados por apenas um acesso apontam na direção de que tal indivíduo seja mais divergente em relação aos demais. Caso os dados sejam direcionados especificamente para único grupo há forte probabilidade de condução e seleção de indivíduos monozigóticos, mas isto dependerá do objetivo a ser pautado.

Pela representação gráfica dos dados a figura 5, evidencia o arranjo genético pelo método UPGMA.

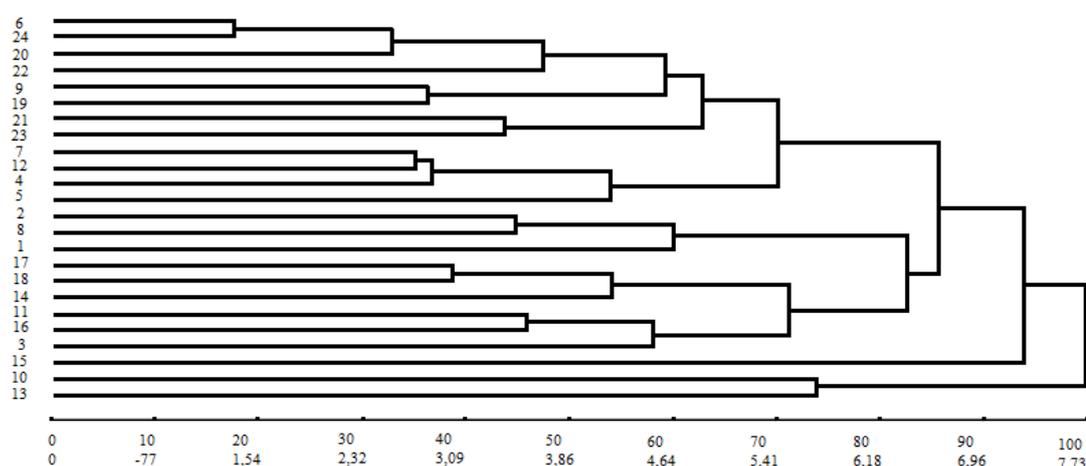


Figura 5. Dendrograma originado pelo método UPGMA, a partir das dissimilaridades de 24 acessos de *Luffa cylindrica*, baseado em caracteres morfológicos qualitativos. Coeficiente de correlação cofenética: $r = 0,6185$. Manaus, AM. 2016.

A representação filogenética proporcionada pelo método UPGMA foi semelhante a formalização dos grupos pelo método otimização de Tocher (Tabela 3).

Considerando análise dos descritores morfológicos quantitativos também foi possível agrupar geneticamente os acessos estudados. A tabela 4 apresenta a análise de agrupamento das informações biométricas, pelo método de otimização de Tocher, baseadas na distância de Mahalanobis.

Tabela 4. Agrupamento dos acessos de *Luffa cylindrica* pelo método de otimização de Tocher, baseado na distância genética de Mahalanobis, considerando caracteres morfológicos quantitativos. Manaus, AM. 2016.

Grupos	Acessos
1	9 20 22 21 17 6 18 19 3 5 23 13 1 14 12
2	4 16 10
3	7 8
4	2 24
5	15
6	11

Considerando os dados biométricos avaliados entre os acessos, o método de agrupamento por otimização de Tocher, permitiu aglomerar os acessos em 6 grupos, inferior quando comparado ao utilizar as variáveis botânicas discretas. O grupo 1 coligou a maioria dos acessos, enquanto que os grupos 5 e 6 formalizaram-se apenas com único acesso, podendo estes serem considerados muitos divergentes com relação aos demais. Os grupos 2, 3 e 4 apresentam materiais similares dentro do grupo, observando-se que ao considerar paralelamente as características qualitativas; tipo de fruto e a forma do fruto é admissível que contribuam e sejam determinantes para discriminação genética verificada.

A distribuição dos indivíduos por análise UPGMA, também teve similaridade de aglomeração dos acessos, semelhantes ao comparar pelo método de agrupamento de Tocher (Figura 6).

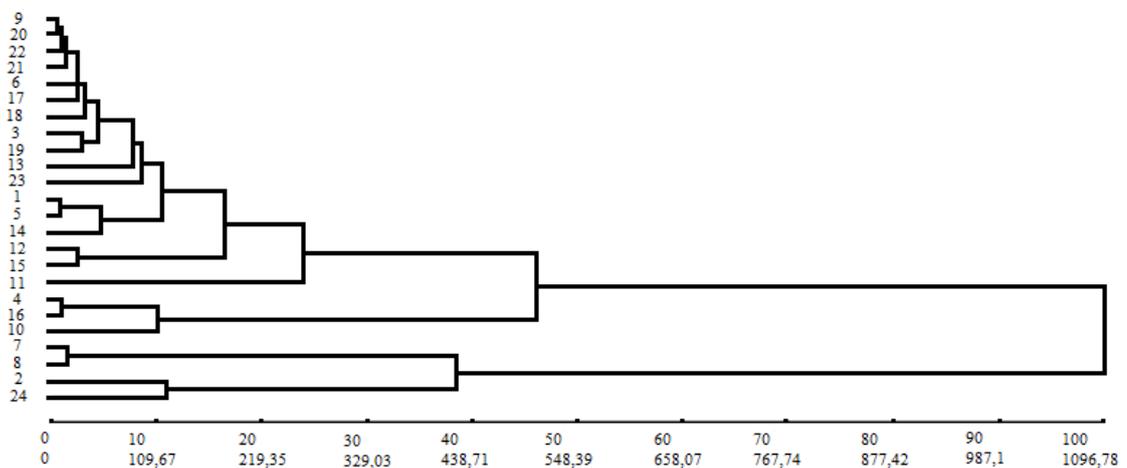


Figura 6. Dendrograma originado pelo método UPGMA, a partir das dissimilaridades de 24 acessos de *L. cylindrica*, baseado em caracteres morfológicos quantitativos e na distância genética de Mahalanobis. Coeficiente de correlação cofenética: $r = 0,7718$. Manaus, AM. 2016.

A contribuição relativa das variáveis de produção permitem conferir melhor entendimento sobre a variabilidade genética encontrada pela estatística (S.j). Verificou-se que

o caractere comprimento dos frutos exerceu maior influência na divergência entre os acessos (62,32%), seguida pela circunferência apical dos frutos (19,70%), circunferência basal dos frutos (6,36%) e espessura máxima da fibra (5,59%) (Tabela 5).

Tabela 5. Contribuição relativa e oito caracteres morfológicos quantitativos para divergência entre 24 acessos de *Luffa cylindrica*, pela estatística (S.j) proposta por Singh (1981). Manaus, AM. 2016.

Caractere	S.j	Contribuição relativa (%)
Comprimento dos Frutos	82402,59	62,32
Circunferência Apical dos Frutos	26053,59	19,70
Circunferência Basal dos Frutos	8413,392	6,36
Espessura Máxima da Fibra	7389,476	5,59
Espessura Mínima da Fibra	4672,476	3,53
Massa Seca dos Frutos	2143,945	1,62
Número Médio de Frutos	888,0589	0,67
Circunferência Mediana dos Frutos	261,3497	0,20

O caractere que obteve a menor contribuição foi a circunferência mediana dos frutos (0,20%). Atentando a produtividade e demandas do mercado no setor de cosméticos e de limpeza, plantas que desenvolvem frutos com menor dispersão de circunferências apical, medial e basal, fibras cristalinas, maciez razoável e espessura admissível entre 5-10 mm, os acessos 2, 4, 7, 10, 13, 17, 19 e 23 apresentam um maior conjunto de características desejáveis para constituírem-se em duplicatas, rapidamente.

Na análise dos componentes principais, os dois primeiros componentes explicaram 81,12% da variância total, adequando-se, neste caso, a uma representação gráfica bidimensional (Figura 7). Comparando os resultados da dispersão gráfica a partir dos dados quantitativos de produção com os agrupamentos provenientes dos dados qualitativos, verifica-se correlação entre os materiais, ou seja, os acessos apresentam diferença de similaridade de acordo com o tipo de informação analisada. Este fato pode ser explicado em função dos caracteres de produção serem muitos influenciados pelo ambiente.

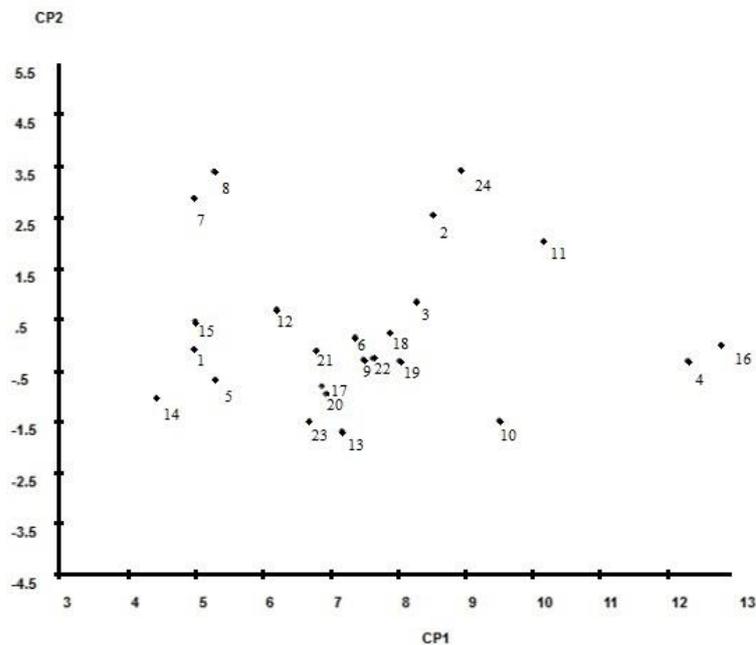


Figura 7. Dispersão gráfica dos escores em relação aos eixos representativos dos dois primeiros componentes principais (CP1, CP2), de oito caracteres quantitativos, em 24 acessos de *Luffa cylindrica*. Variância acumulada nos dois primeiros componentes de 81,12%. Manaus, AM. 2016.

Os acessos ficaram concentrados ou mais próximos uns dos outros conforme verificado pela análise discreta quando envolve principalmente a forma e formato dos frutos. Os acessos 7, 8 produzem frutos alongados, semelhante ao observado nos frutos dos acessos 2 e 24, enquanto que os acessos 4, 10 e 16 figuram com frutos curtos e arredondados, decorrência idêntica ao estudar os fatores que influenciaram o agrupamento determinado na tabela 4. Isso é esperado e comum em coleções e bancos de germoplasma, sinalizando perfeitamente que existe elevado grau de diversidade e interação com ambiente. O comprimento de frutos avaliado entre os acessos de bucha possui extensa variância genotípica situada entre materiais e que mais representa a variação de tamanho, sendo possível confirmar também pela caracterização botânica. Do mesmo modo Joshi et al. (2010), verificaram que as variáveis de formato e comprimento do fruto, que sinalizam o tipo de fruto produzido, possuem alta influência na discriminação e classificação fenotípica de acessos de bucha na Ásia.

Pela matriz de correlação entre as variáveis quantitativas, apresentadas na tabela 7, é possível verificar que existe forte correlação $r \geq 0,5$ entre os descritores massa seca dos frutos com o comprimento dos frutos. Esta correlação é comum em espécies agronômicas, visto que quanto maior o fruto, maior será a massa. Ainda nesta diretriz, as circunferências apical, medial

e basal dos frutos também tiveram alta correlação entre as espessuras máxima e mínima das fibras (Tabela 7).

Tabela 7. Matriz de correlação entre caracteres quantitativos avaliados durante seis meses de produtividade dentre acessos de *L. cilíndrica*. Manaus, AM. 2016.

Caracteres	MSF	CF	CAF	CMF	CBF	EMF	EMFi
NMF	- 0,4312*	- 0,4652	0,0918	- 0,0026	- 0,1287	- 0,2240	- 0,2223
MSF	0	0,6862	- 0,0571	0,2222	0,3680	0,4085	0,5199
CF		0	- 0,5392	- 0,4195	- 0,1961	- 0,1563	- 0,0626
CAF			0	0,9131	0,8730	0,7867	0,7413
CMF				0	0,9488	0,8681	0,8364
CBF					0	0,9088	0,8892
EMF						0	0,9796

*Valores de r.

NMF – Número Médio de Frutos; MSF – Massa Seca dos Frutos; CF – Comprimento dos Frutos; CAF – Circunferência Apical dos Frutos; CMF – Circunferência Medial dos Frutos; CBF – Circunferência Basal dos Frutos; EMF – Espessura Máxima da Fibra; EMFi – Espessura Mínima da Fibra.

Quanto menor for a correlação entre variáveis, menor será seu aproveitamento para capacidade combinatória de caracteres. As correlações que apresentaram valores $r \leq 0$, indicam dificuldade para aprimoramento combinatório de tais características, visto que há predominância de atuação para o componente ambiental.

Do ponto de vista ao melhoramento e filogenia, torna-se muito relevante o conhecimento destas correlações, uma vez que norteiam possibilidades de seleção e progresso de ganho na região do estudo (Heiser e Schiling, 1988).

Os resultados apresentados pela caracterização botânica, análise de agrupamento pelos descritores e a participação dos componentes principais contribuíram na explicação da similaridade entre os indivíduos avaliados. Além disso, as estimativas de correlação entre caracteres de produtividade avaliados permitiram uma compreensão melhor da diversidade e seu relacionamento com o ambiente.

Conclusões

1. A dissimilaridade genética evidenciada por meio de características multicategóricas e quantitativas foram eficazes para demonstrar a diversidade entre os acessos de bucha, mostrando que os materiais possuem ampla variabilidade genética.
2. Na análise das relações filogenéticas entre os acessos estudados, os métodos de agrupamento de otimização de Tocher e perfil UPGMA demonstraram ser concordantes entre si.
3. Os caracteres que mais contribuíram para a divergência entre os acessos foram o comprimento dos frutos (62,32%) e a circunferência apical dos frutos (19,70%).
4. Os acessos 2, 4, 7, 10, 13, 17, 19 e 23 apresentam um maior conjunto de características botânicas desejáveis com maior capacidade combinatória de variáveis de interesse agrônomo.
5. O contraste fenotípico dos acessos pode ser utilizado de forma similar com as correlações de caracteres para futuras hibridizações na tentativa de obtenção de materiais superiores.

Referências Bibliográficas

- Araújo, F. P.; Silva, N.; Queiroz, M. A. 2008. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast com base em descritores morfo-agronômicos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30(3): 723-730.
- Bisognin, D. A. 2002. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciência Rural*, 32(5): 715-723.
- Bledzki, A. K. e Gassan, J. 1999. Composites reinforced with cellulose based fibbers. *Progress in Polimers Science*, 24: 221-274.
- Blind, A. D.; Blind, M. R.; Blind, E. J. 2013. Produtos e compósitos naturais de esponja vegetal (*Luffa cylindrica*) com aplicação dermo-cosmética, industrial e doméstica. 1ª Competição de Planos de Negócios Inovadores do Amazonas - FUCAPI/FAPEAM/SECTI, 1. ed. Manaus-AM, 24 p (Plano vencedor - 1º lugar).
- Carmo, C. A. S. 2007. **Caracterização morfológica de acessos de bucha vegetal no estado do Espírito Santo**. Dossiê Técnico-INCAPER-ES 6p.
- Chaudhary, D.; Srivastava, D. P.; Ghosh, A. K.; Seetharaman, R. 1973. Genetic variability and correlation for yield component in rice. *Indian Journal of Agricultural Science*, 43: 181-184.
- Cole-Rodgers, P.; Smith, D. W.; Bosland, P. W. 1997. A novel statistical approach to analyze genetic resource evaluations using *Capsicum* as na example. *Crop Science*, 37: 1000-1002.
- Cruz, C. D. 2013. Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*, 35(3): 271-276.
- Cruz, C. D.; Carneiro, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, v.2, 2006. 585p.
- Cruz, C. D. 1990. **Aplicações de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. 188p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.
- Cruz, C. D.; Regazzi, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV. Imprensa Universitária, 1994. 390p.

Cruz, C. D. e Regazzi, A. J. **Análise dialélica. In.: Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético.** Ed. UFV. Viçosa. 2^a ed. 1997. p. 131–285.

Cruz, V. M. V.; Tolentino, M. I. S.; Altoveros, N. C.; Villavicencio, M. L. H.; Siopongco, L. B.; dela Viña, A. C.; Laude, R. P. 1997. Correlations among accessions of southeast Asian *Luffa* genetic resources and variability estimated by morphological and biochemical methods. *Philipp Journal Crop Science*, 22(3): 131-140.

Davis, J. M. 1994. *Luffa* sponge gourd production practices for temperate climates. *HortScience*, 29(4): 263-266.

Dudley, J. W.; Moll, R. H. 1969. Interpretation and use of estimates of heritability and genetic variances in plant breeding. *Crop Science*, 9(3): 257-262.

Ferreira, I. C. P. V.; Araujo, A. V.; Cavalcanti, T. F. M.; Costa, C. A.; Ferreira, M. A. J. F. 2010. Caracterização morfológica de frutos de 17 acessos de bucha vegetal cultivados no Norte de Minas Gerais. *Horticultura Brasileira*, 28(2) 2192-2198.

Ferreira, I. C. P. V.; Mota, V. A.; Araújo, A. V. de; Costa, C. A.; Ferreira, M. A. J da F. 2009. Avaliação participativa de acessos de bucha vegetal. In: Congresso Latino Americano de Agroecologia, 2009, Curitiba. Revista Brasileira de Agroecologia. Brasília-DF: *Sociedade Brasileira de Agroecologia*, 4: 3155-3158.

Ferreira, M. A. J. F.; Lira, I. C. S. A.; Sena, E. M. N.; Aquino, D. A. L.; Passos, L. R. G.; Silva, M. L.; Araujo C. L. 2012. Seleção de bucha vegetal para produção de esponjas: In: Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos II. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/71544/1/Aldete-2012-3.pdf>

Filgueira, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** Viçosa: MG, 2008. 421 p.

Ghali, L. H.; Aloui, M.; Zidi, M.; Daly, H. B.; Msahli, S.; Sakli, F. 2011. Effect of chemical modification of *Luffa cylindrica* fibers on the mechanical and hygrothermal behaviours of polyester/luffa composites. *BioResources*, 6(4): 3836-3849.

Heiser, C. B & Schiling E. E. 1988. Phylogeny and distribution of *Luffa* (Cucurbitaceae). *Biotropica*, 20(3): 185-191.

Joshi, B. K.; Upadhyay, M. P.; Baniya, B. K.; Dongol, D. M.; Tiwari, R. K.; Shrestha, P. 2010. Evaluation of sponge gourd landraces in line with the reliability of names given by farmers. *Nepal Journal of Science and Technology*, 11: 9-16.

Joshi, B. K.; Tiwari, R. K.; Ghale, M.; Sthapit, B. R.; Upadhyay, M. P. **Descriptors for sponge gourd (*Luffa cylindrica* L. Roem)**. Kathmandu: Nepal, NARC, LIBIRD and IPGRI, 2004. 43 p.

Lira, I. C. S. A.; Passos, L. R. G.; Ferreira, M. A. J. F.; Silva, M. L.; Sena, E. M. N.; Araujo, C. L.; Aquino, D. A. L. 2012. Seleção intra-populacional em bucha vegetal. *Horticultura Brasileira*, 30: S4406-S4413.

Marouelli, W. A.; Silva, H. R.; Lopes, J. R. 2013. **Irrigação na cultura da bucha vegetal**. Circular Técnica, Brasília. 116: 12 p.

Oboh, O.; Aluyor, E. O. 2009. *Luffa cylindrica* - an emerging cash crop. *African Journal of Agricultural Research*, 4(8): 684-688.

Pereira, A.V.; Vencovsky, R.; Cruz, C. D. 1992. Selection of botanical and agronomical descriptors for the characterization of cassava (*Manihot esculenta* Cratz) germplasm. *Revista Brasileira de Genética*, 15(1): 115-124.

Prakash, K.; Pandey, A.; Radhamani, J.; Bisht, I. S. 2013. Morphological variability in cultivated and wild species of *Luffa* (Cucurbitaceae) from Índia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60(8): 2319-2329.

Queiróz, M. A. 2011. Germoplasma de Cucurbitáceas no Brasil. In: Congresso brasileiro de olericultura, 51. *Horticultura Brasileira*, 29: S5946-S5954.

Queiroz, M. A. 2004. Germplasm of Cucurbitaceae in Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4:377-383.

Ramos, S. R. R.; Queiroz M. A.; Casali V. W. D. Cruz, C. D. 2000. Divergência genética em germoplasma de abóbora procedente de diferentes áreas do Nordeste. *Horticultura Brasileira*, 18: 195-199.

Silva, M. W. K. P; Ranil, R. H. G; Fonseka R. M. 2012. *Luffa cylindrica* (L.) M. Roemer (Sponge Gourd-Niyan wetakolu): An Emerging High Potential Underutilized Cucurbit. *Tropical Agricultural Research*, 23(2): 186-191.

- Singh, D. 1981. The relative importance of characters affecting genetic divergence. *The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding*, 41: 237-245.
- Singh, R. B.; Gupta, M. P. 1968. Multivariate analysis of divergence in upland cotton. *Indian Journal of Genetic & Plant Breeding*, 28(2):151-157.
- Siqueira R. G. 2007. **Crescimento e acúmulo de nutrientes em bucha (*Luffa cylindrica*)** Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). UFV. Viçosa – MG, 48p.
- Sokal, R. R.; Rohlf, F. J. 1962. The comparison of dendograms by objective methods. *Taxonomy*, (11) 33-40.
- Taha, M.; Omara, K.; EL Jack, A. 2003. Correlation among growth and quality characters in *Cucumis melo* L. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 26(1) 9-11.
- Zhang, S.; Hu, J.; Xu, S. 2008. Developmental genetic analysis of fruit shape traits under different environmental conditions in sponge gourd (*Luffa cylindrical* (L) Roem. Violales, Cucurbitaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 31(3): 704-710.

Capítulo 3

Desempenho produtivo de bucha (*Luffa cilíndrica*) na Amazônia Central

Resumo – O conhecimento do rendimento produtivo de uma espécie agrônômica em uma determinada região, aliada a forma de manejo, constitui-se como base para seleção de indivíduos mais produtivos para uma cadeia de exploração economicamente viável. A bucha possui alta variabilidade morfo-agronômica, e portanto passível de haver flutuações nos níveis de produtividade e comportamento produtivo de forma dinâmica. Deste modo, o presente estudo teve por objetivo avaliar o desempenho produtivo entre acessos de bucha de sete Estados brasileiros em solo tipo, Argissolo Amarelo de textura arenosa, com fertilização indicada para cucurbitáceas. O delineamento experimental foi em blocos casualizados sendo 24 tratamentos (acessos), quatro repetições e três plantas por parcela. O sistema de cultivo adotado foi em espaldeira e o espaçamento entre plantas e entre linhas foi de 2,0 x 1,5 m, respectivamente, com condução de ramos. Durante seis meses de produção, entre meados de abril e setembro de 2014, foi analisado o número de frutos produzidos, a massa de fibras seca, o comprimento dos frutos, circunferências apical, medial e basal dos frutos secos além das espessuras máxima e mínima da manta fibrosa seca. No geral a colheita iniciou-se após 120 dias da sementeira e houve acentuada variação produtiva entre os materiais analisados. A sazonalidade produtiva de frutos durante os seis meses, comportou de 7 até 15 colheitas dentre os acessos. O acúmulo produtivo entre os acessos variou de 12 até 87 frutos por planta. A flutuação no comportamento produtivo para o número de frutos, comprimento e massa de fibras, pode ser entendida após a quarta ordem na equação de regressão polinomial. A massa seca de fibras apresentou relação com o comprimento dos frutos, havendo acessos superiores a 80 cm e outros com apenas 12 cm em média, com diferentes níveis de espessura de fibra ($0,6 \pm 0,5$ mm), o que contribuiu para as diferenças no comportamento produtivo e diversidade apurada entre os materiais.

Palavras-chave: Cultivo de bucha, Rendimento, Sazonalidade, Acessos

Abstract - Knowledge of the productive yield of agronomic species in a given region, together with the form of management, constitutes a foundation for selection for individuals for an economically viable farm chain. The loofah has morphological and agronomic variability, and therefore likely to be changes in the levels of productivity and productive behavior dynamically. Thus, the present study was to evaluate the productive performance between bushing hits from seven Brazilian states in Ultisol yellow sandy texture, with fertilization suitable for cucurbits. The experimental design was randomized blocks with 24 treatments (accessions loofah), 4 replications and three plants per plot. The adopted cropping system was trellis, and spacing between plants and between rows was 2.0 x 1.5 m, respectively. For six months of production was rated the number of fruit, dry mass of fibers, the length of the fruit, circles apical, medial and basal fruits and maximum and minimum thicknesses of the fiber. Overall harvest began after 120 days of sowing and there was a marked variation between the production materials analyzed. The production of seasonal fruits during the six months, behaved 7 to 15 harvests from the access. The productive accumulation between accessions ranged from 12 to 87 fruits per plant. The dry mass of fibers has no relationship with the length of the fruit, since there was access to the fruits of more than 100 cm and another with 12 cm thick fiber with different levels of 0.6 ± 0.5 mm, which contributes to variability and yield determined accessions loofah.

Keywords – Loofah cultivation, yield, seasonality, accessions loofah

Introdução

O emprego de fibras naturais em produtos e compósitos tem sido alvo entre instituições, empresas e centros de pesquisa no mundo todo, ao passo que o apelo e prospecção acerca da produção e consumo de materiais biodegradáveis vem aumentando. O arranjo estrutural das fibras de bucha, permite diversas aplicabilidades, aonde deseja-se réplicas de materiais que predominam escalas micrométricas com baixo custo e fonte renovável (Ghali et al., 2009; Oboh e Alyuor, 2009; Laidani et al., 2012).

Na década de 60 e 70 o Brasil exportou fibra de bucha para países da Europa e América, sendo empregadas em filtros de óleos em motores a vapor e estofamentos automotivos (Melo e Moreira, 2007), contudo, com avanços tecnológicos, os derivados de petróleo foram substituindo gradativamente estas fibras. Em consequência da exposição dos fatores de depreciação dos recursos naturais e conscientização da população atualmente é possível observar incentivo e tendência significativa para produção e consumo de produtos biodegradáveis com matéria prima não poluente, a exemplo do uso de fibras vegetais (Tanobe et al., 2005; Siqueira et al., 2010).

Apesar de serem escassas informações da retomada da manufatura com fibras naturais em diversos setores (Satyanayana et al., 2007), e da bucha especificamente (Oboh e Alyuor, 2009), talvez por razões estratégicas da posse dos atributos funcionais da celulose, hemicelulose e lignina presentes, vem ocorrendo atualmente maior demanda de matéria prima, conseqüentemente aumento de áreas de cultivo e por informações fitotécnicas sobre a cultura. As pesquisas desenvolvidas com a espécie focaram até o momento principalmente as propriedades físicas, mecânicas e químicas das fibras (Siqueira et al., 2010; Tanobe et al., 2014). Na Ásia, estruturas vegetativas da bucha são estudadas e utilizadas na fitomedicina para o tratamento de enfermidades endógenas e exógenas (Partap et al., 2012).

Atualmente no Brasil, utiliza-se estilhas e fibra da bucha na confecção de artesanatos, em atividades de limpeza doméstica, em produtos dermo-cosméticos e em compósitos industriais, como palmilhas de calçados, filtros, absorventes de fluidos além de estofamentos automotivos e industriais (Ferreira et al., 2010; Blind et al., 2013).

A bucha possui origem apontada em regiões tropicais da Ásia (Heiser e Schiling 1988) e está dispersa em diversos territórios, incluindo de norte a sul do Brasil (Bisognin 2002) podendo produzir por até 16 meses dependendo das condições edafoclimáticas (Davis, 1994; Silva et al.,

2012; Marouelli et al., 2013). Os frutos fibrosos apresentam-se em forma de bagas com diferentes conformações e tamanhos (Joshi et al., 2004). Variações do meio ambiente, principalmente aquelas prevalentes do local de origem podem conduzir a modificações nos indivíduos quanto aos níveis de rendimento de forma muito dinâmica.

O rendimento produtivo da bucha inicia-se geralmente 120 dias após sementeira porém depende do potencial varietal de ramificação e pegamento de frutos, da variação sazonal das condições térmicas e hídricas, do manejo nutricional do solo, além dos tratamentos culturais no sistema de cultivo adotado (Davis 1994; Carvalho, 2007; Joshi et al., 2010). São escassos os trabalhos que abordam a produtividade da bucha, sobre tudo as particularidades referentes ao tamanho, peso, circunferências e espessura da manta fibrosa. A espécie requer temperatura em torno de $26 \pm 12 \text{ C}^\circ$, o que torna as regiões tropicais potenciais ao cultivo (Davis, 1994; Silva et al., 2012). Precipitações pluviométricas devem estar acima de 1.200 mm/ano bem distribuídos ao longo do ano (Carvalho, 2007; Marouelli et al., 2013).

O plantio de bucha no Brasil ainda é incipiente. Geralmente o plantio inicia-se de acessos/variedades que acumulam características desejáveis entre a boa produtividade, uniformidade, estabilidade e qualidade das fibras (Melo e Moreira, 2007; Ferreira et al., 2010). A região sudeste possui destaque na produção, sendo Minas Gerais o Estado com maior produtividade entre os municípios de Bomfim, Cipotânea e Porteirinha (Carmo 2007; Ferreira et al., 2010). No estado do Amazonas, recentemente agricultores da região metropolitana iniciaram cultivo de bucha aproveitando os solos férteis de várzea ou em solo de terra firme. Diversas empresas do Polo Industrial utilizam a fibra na produção de dermo-cosméticos e outras demonstraram muito interesse para agregação em produtos industriais incluindo as celas de motocicletas em substituição parcial do poliuretano (Blind et al., 2013).

O conhecimento da variabilidade e comportamento produtivo em bucha pode permitir triagens específicas para uso e produção em larga escala para uma determinada região e figura como prioridade para subsidiar informações ao cenário agroindustrial. Neste sentido o presente estudo teve objetivo de avaliar o desempenho e sazonalidade produtiva entre acessos de bucha provenientes de diferentes regiões do Brasil na condição edafoclimática da Amazônia Central.

Material e Métodos

Após o transplante e condução das plantas conforme delineamento experimental, e condições edafoclimáticas apresentados na metodologia geral, foi acompanhado diariamente o desenvolvimento da maturidade dos frutos entre os acessos. A colheita foi realizada de forma manual para cada acesso avaliado, por um período de seis meses, entre abril e setembro de 2014.

Em cada colheita de cada acesso foi apanhado o(s) fruto(s) com a casca de coloração amarelo pálido até o marrom claro (fases em que as fibras apresentam-se fisiologicamente maduras, saudáveis e com cristalinidade natural) conforme apontam Zhang et al. (2007) e testes preliminares (Figura 1A). Posteriormente os frutos foram amassados, colocados em recipiente e imersos com água por 48 horas para facilitar a retirada das sementes e da casca (Dairo et al., 2007) (Figura 1B). Após a retirada da casca, os frutos fibrosos foram sacudidos e enxaguados em água afim de retirar demais impurezas e sementes (Figura 1C). Em sequência as buchas foram penduradas em local protegido e arejado cerca de 72 h para secar as fibras de forma natural e adequada (Carvalho 2007).

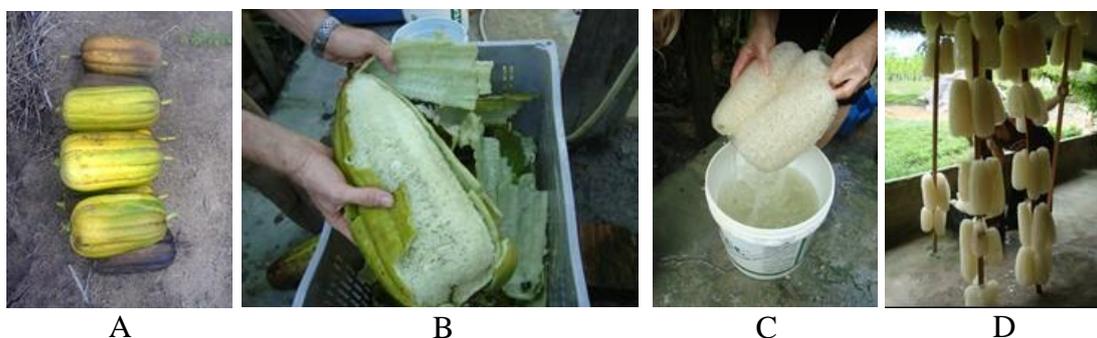


Figura 1. Ponto de colheita dos frutos de bucha (A), retirada da casca e de sementes (B), aspecto da fibra após o enxague (C) e modo de secagem dos frutos fibrosos (D). Manaus, AM. 2016. Fotos: A.D. Blind 2014.

Todas etapas de pós colheita foram cuidadosamente semelhantes, principalmente para lavagem das fibras, local e tempo de secagem, evitando-se que remessas tivessem mais ou menos impurezas e umidade entre as fibras. Desta forma os frutos que foram avaliados estavam sem casca, sem sementes e secos a sombra.

A mensuração das variáveis de produção foram realizadas adotando algumas sugestões de Joshi et al. 2004 e Ferreira et al. (2010), em que o Número Médio de Frutos (n) foi

contabilizado no momento de cada colheita entre os meses de produtividade; Massa de Fibra (g) foi obtida em etapa posterior ao período da pós colheita utilizando balança digital ± 0.001 g; Comprimento do Fruto (cm) foi aferido com auxílio de fita milimetrada; Circunferência Apical do Fruto (mm) Circunferência Medial do Fruto (mm) e Circunferência Basal do Fruto (mm) foram apuradas em posições independentes com auxílio de fita milimetrada; Espessura Mínima da Fibra (mm) e Espessura Máxima da Fibra (mm) foram coletadas diretamente na manta fibrosa na posição medial do fruto com auxílio de paquímetro digital.

Os dados obtidos das variáveis de produtividade entre os acessos foram submetidos á análise de variância ANOVA para detectar variação mínima pelo teste F. Quando significativo (F calculado $>$ F tabelado), as médias foram contrastadas pelo teste Duncan (1955), ao nível de 5% de probabilidade com o auxílio computacional e do software ASSISTAT Versão 7.7 beta (Silva, 2015).

Paralelamente realizou-se análise de regressão, apenas para o comprimento de frutos, massa de fibra seca e número médio de frutos produzidos entre os acessos, afim de se evidenciar a sazonalidade entre as colheitas e a natureza desse efeito sobre o desempenho observado, considerando os seis meses de avaliação.

Resultados e Discussão

Todas características avaliadas apresentaram variabilidade significativa ao nível de 1% pelo teste F (Tabela 1). Deste modo, ocorre diferenças biométricas entre os acessos de bucha e há possibilidade de identificação de genótipos superiores para serem usados diretamente pelos produtores, indústrias e em programas de melhoramento da espécie.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as características produtivas, avaliadas entre os acessos de bucha. Manaus, AM. 2016.

FV	GL	Quadrados Médios							
		NF	MSF	CF	CAF	CMF	CBF	EMiF	EMaF
Blocos	3	130,3959	5,717	10,5938	0,4264	0,4981	0,1094	0,039	0,3282
Acessos	23	185,5137 **	145,0834 **	1936,7618 **	112,2687 **	80,8725 **	80,6776 **	5,1004 **	12,7195 **
Resíduo	69	52,0876	2,3182	4,3111	0,6141	0,6304	0,6258	0,0804	0,1384
Média	-	15,29	10,34	33,05	15,21	19,83	19,21	3,29	4,78
CV ¹ %	-	47,2	14,72	6,28	5,15	4,00	4,12	8,62	7,79

NF – Número de frutos; MSF – Massa seca de fibra; CF – Comprimento de fruto; CAF – Circunferência apical do fruto; CMF – Circunferência medial do fruto; CBF - Circunferência basal do fruto; EMiF – Espessura mínima da fibra; EMaF – Espessura máxima da fibra.

**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

¹Coefficiente de variação experimental.

Todas as características avaliadas apresentaram variabilidade significativa ao nível de 1% pelo teste F (Tabela 1). O coeficiente de variação mostrou-se em uma faixa normal para todas variáveis com exceção para o número de frutos. Apesar de não ter sido considerado análise sobre o efeito de blocos o alto coeficiente de variação para o número de frutos pode ser influenciado por fatores genéticos ou por mudanças no ambiente de cultivo, o que pode acarretar grandes variações fenotípicas até mesmo dentro de um mesmo indivíduo.

Ao analisar a produção com a procedência dos acessos, é possível verificar que os perfis de rendimento de buchas foram contrastantes (Tabela 2). O número médio de frutos produzidos por planta durante o período de seis meses, teve acentuada variação entre os acessos. O acesso 23, proveniente de Manaus, acumulou no período de seis meses o maior número médio de frutos, sendo 87 por planta entre 13 colheitas. Ainda considerando as melhores produtividades os acessos 5, 6, 10, 13, 14, 17 e 20, acumularam entre 51 e 80 frutos por planta e não diferiram estaticamente entre si.

Tabela 2. Rendimento acumulado de frutos e colheitas entre os acessos de bucha estudadas no período compreendido em 6 meses de produção. Manaus, AM. 2016.

Acessos	Total de Frutos ¹	Total de Colheitas ²	Num. de Frutos/Planta ³
1	86	11	21,5 ef
2	168	12	42 cd
3	76	12	19 ef
4	160	13	40 cd
5	225	12	56,25 ab
6	207	12	51,75 ab
7	99	11	24,75 ef
8	94	11	23,5 ef
9	186	11	46,5 bc
10	252	15	63 ab
11	182	12	45,5 bc
12	161	13	40,25 cd
13	299	14	74,75 ab
14	264	13	66 ab
15	200	12	50 bc
16	135	13	33,75 de
17	323	13	80,75 ab
18	123	9	30,75 de
19	142	9	35,5 de
20	305	13	76,25 ab
21	123	8	30,75 de
22	188	11	47 bc
23	348	13	87 a
24	48	7	12 f

¹ Acumulado médio de cada planta/repetição em período de seis meses de produção.

² Considerando a média de colheitas efetivas entre cada parcela.

³ Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade

De forma geral os materiais que acumularam maior número de frutos por planta, não necessariamente foram os que proporcionaram maior número de colheitas. Isto é interessante do ponto de vista operacional, ainda mais quando existe uniformidade de maturação, ou seja, quanto maior o número de frutos colhidos por colheita, melhor será o proveito operário. Ao associar os melhores rendimentos acumulados de frutos com algumas variáveis biométricas, a exemplo da massa de fibra (MF) e do comprimento de frutos (CF) (Tabela 3), verificou-se que estes mesmos acessos 10, 13 e 23, produzem frutos curtos, e menor massa de fibra por fruto. Deste modo, para estes acessos, é possível observar certo equilíbrio entre produção e tamanho

de fruto produzido. Materiais que produzem frutos maiores, acima de 60 cm, foram os que menos produziram em número médio por planta.

Tabela 3. Média dos caracteres de produtividade para seis meses de produção entre acessos de bucha vegetal. Manaus, AM. 2016

Acessos	MF (g)	CF (cm)	CAF (cm)	CMF (cm)	CBF (cm)	EMiF (mm)	EMaF (mm)
1	3,77 j	18,68 jl	10,50 j	14,87 h	12,7 n	2,09 h	2,70 m
2	21,74 b	58,92 c	10,86 i	20,71 de	20,71 de	4,35 bc	6,71 c
3	11,97 de	24,21 hi	16,86 ef	20,26 de	18,79 fg	4,08 bc	5,77 d
4	11,49 de	16,62 lm	28,74 a	29,78 a	28,17 b	5,50 a	8,36 a
5	4,85 ij	31,38 ij	10,66 ij	15,42 h	14,15 lm	2,24 gh	3,26 jl
6	9,82 ef	29,82 f	13,26 h	19,56 f	18,40 gh	3,50 d	5,12 e
7	13,31 d	88,63 a	9,09 l	11,88 i	14,89 l	2,38 gh	3,65 ij
8	17,85 c	84,49 a	8,49 l	12,83 i	15,15 l	2,40 gh	4,00 hi
9	6,67 hi	24,85 h	15,61 ef	20,12 de	18,39 gh	3,44 de	4,90 ef
10	4,87 ij	10,91 n	22,67 b	23,50 c	24,27 c	4,32 bc	5,80 d
11	25,1 a	41,79 d	17,46 d	24,95 b	23,89 c	4,46 b	7,71 b
12	11,37 de	36,03 e	10,97 ij	18,02 g	16,73 ij	2,63 fg	3,58 ij
13	5,31 hi	15,06 m	18,71 c	21,22 d	20,23 e	2,40 gh	3,36 j
14	4,72 ij	25,04 h	11,15 ij	15,69 h	13,55 mn	1,17 i	1,62 n
15	9,24 fg	41,29 d	9,01 l	15,36 h	14,36 lm	2,04 h	2,79 lm
16	12,09 de	17,31 lm	28,16 a	30,15 a	30,27 a	5,88 a	8,80 a
17	9,94 ef	28,59 fg	15,14 fg	20,49 de	18,59 gh	2,67 fg	3,67 ij
18	9,12 fg	23,1 hi	15,81 ef	20,14 de	21,46 d	3,33 de	4,82 ef
19	5,37 hi	19,42 jl	16, 63 de	20,90 de	19,52 ef	3,92 c	5,05 ef
20	6,72 hi	25,96 gh	14,84 g	19,64 ef	17,81 hi	3,02 ef	4,33 gh
21	6,49 hi	24,39 hi	15,81 ef	19,73 ef	17,96 h	2,56 g	3,64 ij
22	7,63 gh	26,4 gh	16,18 ef	20,79 de	19,96 ef	3,29 de	4,50 fg
23	5,83 hi	15,25 m	14,66 g	17,03 g	16,61 j	3,16 de	4,71 ef
24	22,83 b	69,85 b	13, 42 h	22,91 c	24,47 c	4,06 bc	5,73 d

Medias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

MSF – Massa seca de fibra; CF – Comprimento de fruto; CAF – Circunferência apical do fruto; CMF – Circunferência média do fruto; CBF – Circunferência basal do fruto; EMiF – Espessura mínima da fibra; EMaF – Espessura máxima da fibra.

Pela tabela 3, verifica-se que os acesso 11 proporcionou o maior valor para MF, produzindo em média 25,1 g de fibra por fruto. Curiosamente este acesso não produz frutos relativamente compridos, porém verifica-se que o que contribuiu diretamente para a massa observada foi a espessura da manta fibrosa (EMF) com 6,08 mm, isto é, uma manta relativamente densa. Pode-se verificar que a MF é determinada principalmente pela EMF e com o comprimento da bucha.

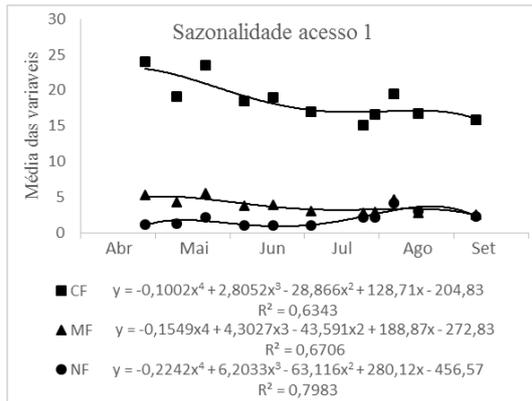
Os frutos mais longos considerando a média das colheitas, foram os acessos 7 e 8, acima de 80 cm de comprimento. Estes materiais junto com o acesso 15 proporcionaram a menor circunferência apical dos frutos, isto é, frutos com ápice mais coniforme, o que torna sua

moldura fibrosa natural compreensível ao referir-se a frutos alongados, tanto no Brasil quanto na Ásia (Carmo, 2007; Joshi et al., 2004). Diferentemente ocorre para os acessos 4, 10 e 16 que apesar de apresentarem frutos curtos entre 10 e 20 cm de média, exibem similaridades de valores para as circunferências apical, medial e basal, o que proporciona mais uniformidade da estilha, sendo bastante atrativo para o mercado doméstico e cosmético. Os acessos 10 e 13 produziram as menores buchas, entre 10 e 15 cm em média.

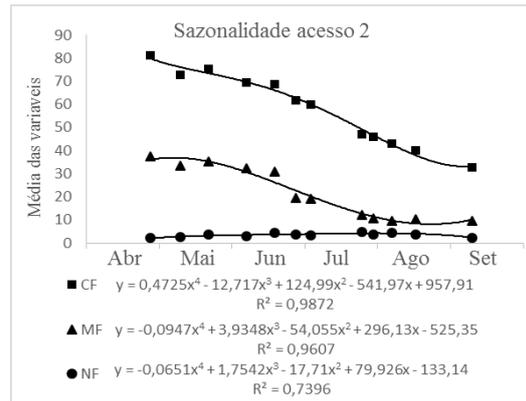
A EMF refere-se ao arranjo natural entre fibras e que pode ter mais ou menos densidade e variar dentro da própria estilha. O acesso 14, foi o material que proporcionou as menores espessuras tanto para mínima quanto para máxima com 1,17 e 1,62 mm, respectivamente. Esta característica tem influência sobre a MF, além da qualidade e espessura das fibrilas da bucha. Os materiais 4 e 16 apresentaram os maiores valores EMaF, com 8,36 e 8,80 mm respectivamente, sendo portanto, acessos de manta bastante espessa, até mesmo ao comparar com a EMiF.

A diversidade de valores máximos e mínimos revelados para todas características produtivas possuem semelhanças quando comparado ao resultados obtidos por Ferreira et al. (2009; 2010; 2012) e Joshi et al. 2010 ao estudarem acessos de bucha da Região de Minas Gerais – Brasil, e Kaski e Bara distritos do Nepal, respectivamente. Apesar da suposição de diversidade entre estes materiais, não deve ser descartado a hipótese que a nível molecular, exista grau de parentesco principalmente com acessos do Brasil, mesmo que geograficamente exista distância. Existe similaridade dos dados biométricos analisados, principalmente com o comprimento e massa seca de fibras de acessos estudados provenientes do município de Bonfin e Porteirinha ambos de Minas Gerais (Ferreira et al., 2012).

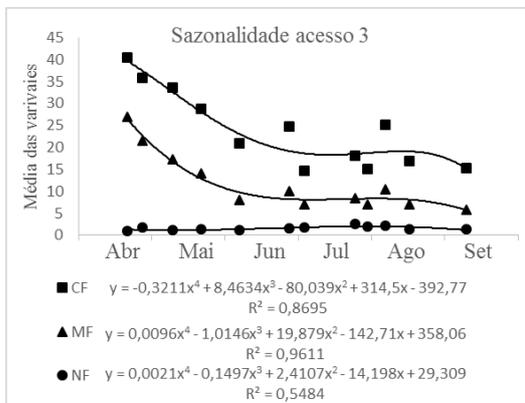
Examinando o comportamento das variáveis número de frutos, massa de fibra e o comprimento do fruto, verificou-se acentuada variação de resultados. Praticamente todos os acessos inicialmente produziram poucos frutos, relativamente vistosos, contribuindo para os maiores valores de MF e CF (Figura 2). Isto é esperado em espécies que proporcionam mais de uma colheita, a exemplo da maioria das cucurbitáceas, haja visto que existe o vigor vegetativo e reprodutivo normalmente em ramos primárias e posteriormente há tendência de declínio produtivo, ao passo que a planta investe em novas estruturas vegetativas e posteriormente em novos frutos, todavia em menor quantidade (Filgueira 2008; Joshi et al., 2010; Santi et al., 2013).



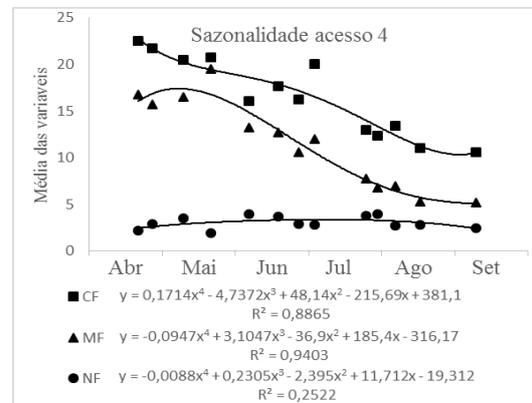
A



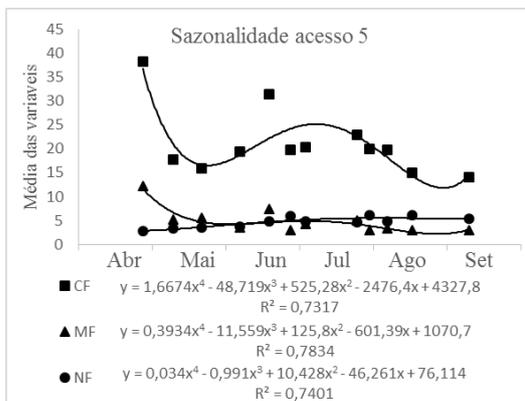
B



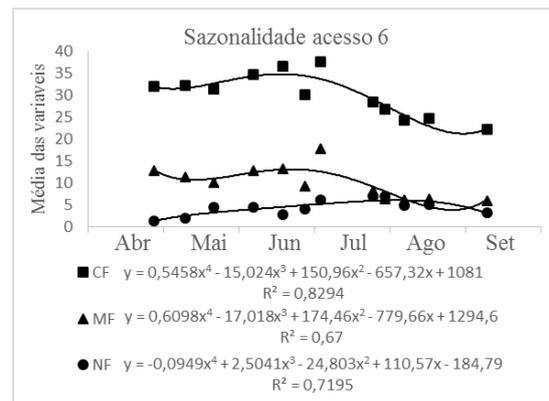
C



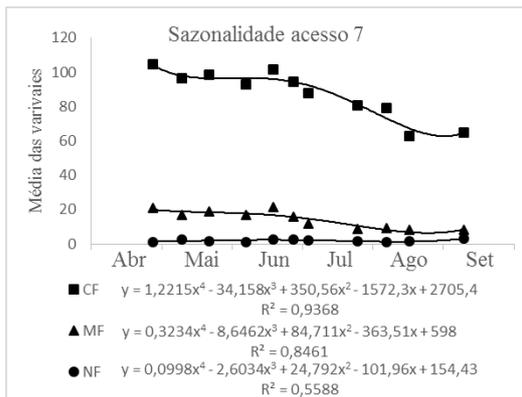
D



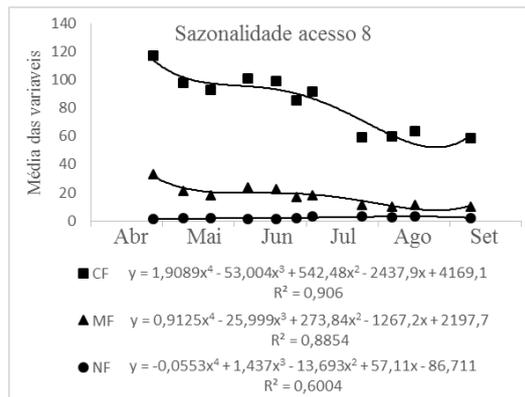
E



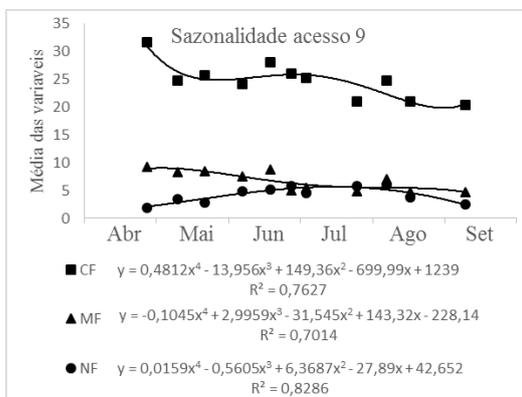
F



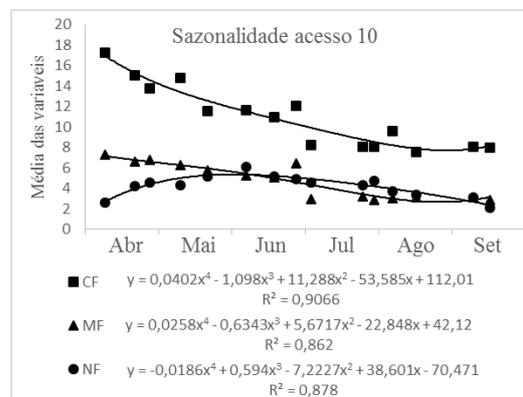
G



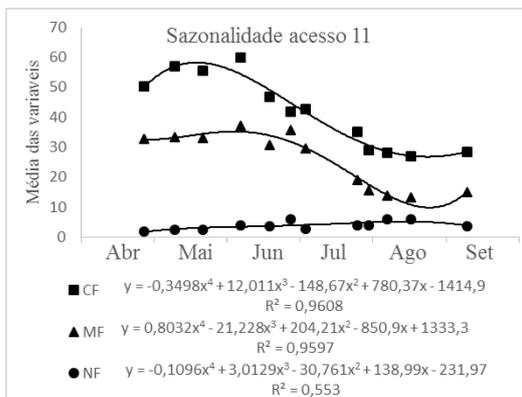
H



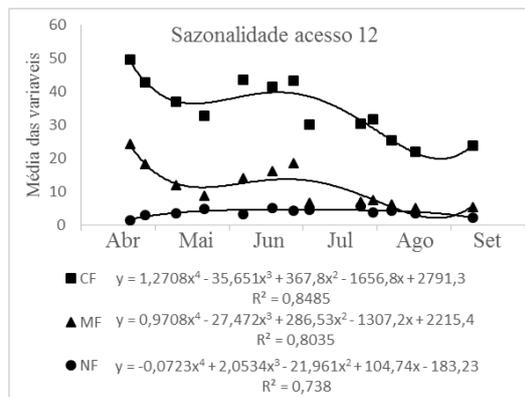
I



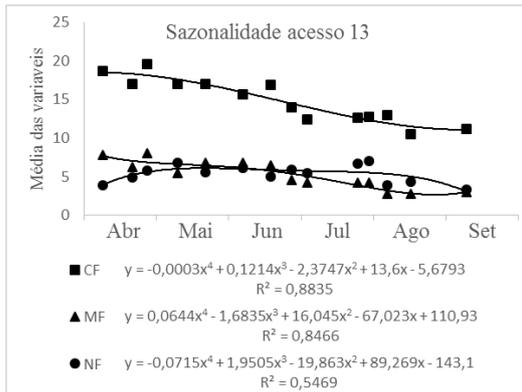
J



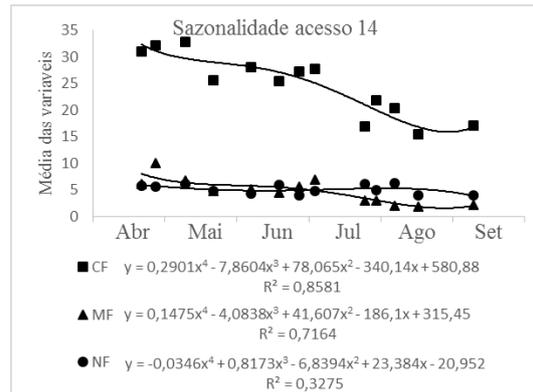
K



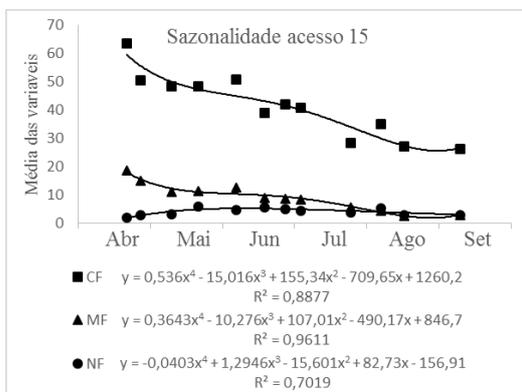
L



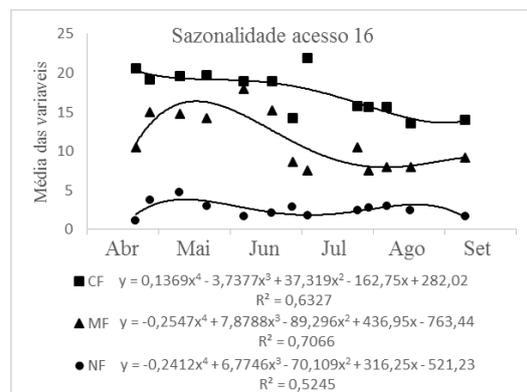
M



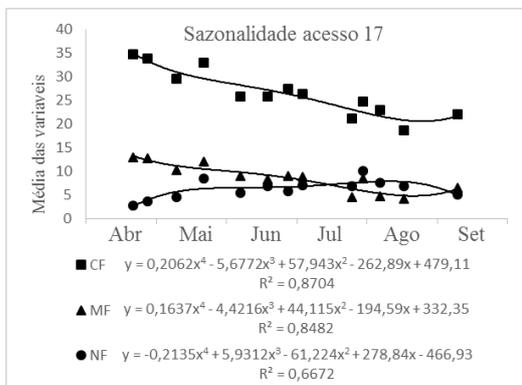
N



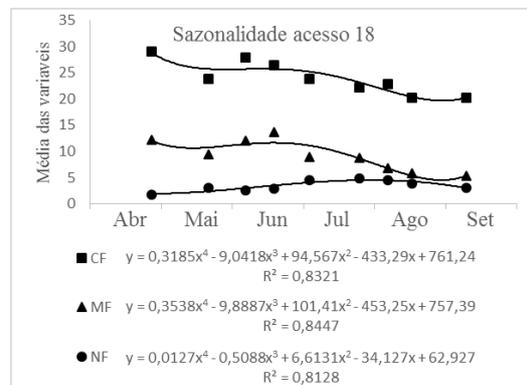
O



P



Q



R

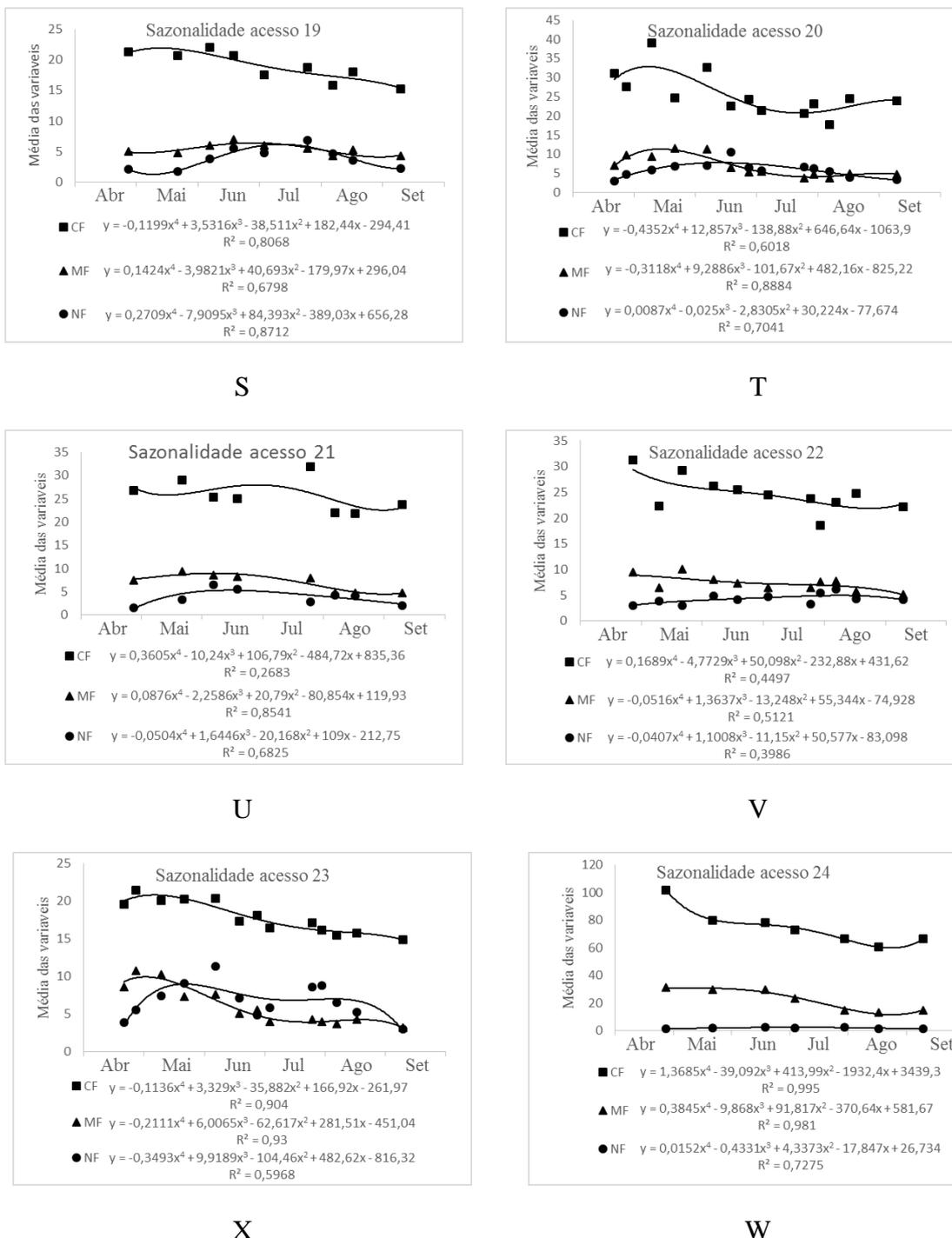


Figura 2. Comportamento das variáveis; Comprimento do Fruto (CF), Massa de Fibra (MF) e Número de Frutos (NF), produzidos entre os 24 acessos avaliados em período de seis meses. Manaus, AM. 2016.

Diante da análise de regressão para cada acesso, é possível verificar quatro situações para cada uma das variáveis. A partir da quarta ordem na equação polinomial, em que o coeficiente de determinação calculado (R^2) apresenta-se mais próximo de 1, o que implica na

coerência do efeito observado, pode-se analisar que todos acessos, com exceção do 6, 11, 13, 14, 16, 19, 20, 21 e 23 apresentaram valores principalmente para o CF proporcionalmente decrescente a partir da primeira colheita em meados de Abril com oscilações até a última colheita em meados de Setembro. As oscilações que culminam com as maiores médias tem relação com as condições em que as plantas desenvolveram e a própria capacidade de resposta do vegetal perante o aporte hídrico e nutricional. As exceções proporcionaram maiores valores para CF, entre a segunda e sétima colheita respectivamente. Isto é interessante do ponto de vista produtivo, porém importante associar ao dinamismo das demais variáveis, NF e MF, até porque o equilíbrio anteriormente citado para EMF também tem interação ao longo do tempo com quantidade de frutos produzidos x tamanho x massa desses frutos.

Quanto mais linear for o efeito da análise sobre as variáveis, mais estável podemos dizer que o acesso é para tal característica, mas deve ser considerando que as condições ambientais presentes no meio podem interagir de forma dinâmica. Em meados de abril foi disponibilizado uma adubação de cobertura conforme citado na metodologia e isto favoreceu a rápida capacidade de emissão de novas ramas, o que proporcionou em meados de junho, julho maiores valores para comprimento e massa de fibra, inclusive superiores as primeiras colheitas em determinados acessos. Podemos observar este fato, incluindo aumento para o número de frutos colhidos para os acessos 6, 18 e 21 (figura 2F, R e U) respectivamente. Observando a oscilação de número de frutos colhidos entre os materiais, os acessos 4, 14, 22 (figura 2 D, N e V) foram os que mais oscilaram, com cerca de seis efeitos, podendo figurar como materiais de safras flutuantes em que após uma colheita e outra existe variação marcante.

Ao analisar o acesso 23, (figura 2) que acumulou o maior número de frutos por planta, tabela 2, pode-se observar que este material proporcionou em meados de junho rendimento superior a 10 frutos por planta em uma única colheita, o que pode associar a este fato o favorecimento hídrico e nutricional presentes, além da própria habilidade genética deste material. Os acessos 17 e 20 tiveram comportamento semelhante porém o primeiro manifestou produção mais tardia e o segundo mais precoce.

Do ponto de vista produtivo da bucha, é importante salientar que estes resultados podem ser considerados em local onde o mercado exija estabilidade no fornecimento de matéria prima e principalmente para o tamanho de frutos. Além disso é importante considerar o conhecimento sobre a qualidade dessas fibras, se elas se mantem ou também flutuam ao longo do rendimento.

Podemos notar que ao passo que as plantas foram tornando-se mais envelhecidas, a produção em geral diminuiu, não prioritariamente por conta da idade da planta, e sim pela disponibilidade hídrica e provavelmente associado ao aporte nutricional que estavam ficando escassos e aos quais ajuizaram diretamente a emissão de novas estruturas vegetativas e reprodutivas. Esta capacidade de comportamento fenológico tem sido relatado para as culturas do pepino, jerimum e principalmente para cultura do chuchu, adicionalmente aliado, o fator fitossanitário como depreciadores das estruturas de produção das plantas (Filgueira 2008; Santiel al., 2013). Apesar deste estudo ter considerado o desempenho da bucha apenas um período de seis meses, fica evidente que á medida que seja disponibilizado agua e novas fertilizações, aliado a tratos culturais convencionais a planta continua viva e investindo em produção.

Embora estudos pioneiros sobre caracterização e produção de bucha tenham sido realizados por Melo e Moreira (2007), Carmo (2007) e Ferreira et al. (2009; 2010), trata-se do primeiro relato do comportamento produtivo durante um determinado período entre acessos de bucha para o Brasil.

Considerando a composição das variáveis quantitativas, seu proveito mediante verificação do comportamento produtivo, pode permitir utilizar e selecionar materiais mais estáveis, e com melhores resultados para características de interesse tanto para agricultores quanto para o mercado consumidor de fibras de bucha.

Conclusões

- 1) Os materiais de bucha que mais acumularam frutos durante o período de seis meses foram o acesso 23, oriundo de Manaus-AM, seguido dos acessos 6, 11, 13, 14, 16, 19 e 20.
- 2) Existe equilíbrio entre número de frutos produzidos e o comprimento destes, sendo que quanto mais compridos forem, menor é a produção em número.
- 3) Os materiais que produziram as menores buchas foram os acessos 10 e 13, porém, com bom acúmulo de frutos.
- 4) O melhor rendimento de fibra foi encontrada em frutos relativamente compridos, nos acessos 11, 2 e 24, originários de Monte Alegre do Sul-SP, Tomé Açu-PA e Vilhena-RO, respectivamente.
- 5) As três variáveis de produção analisadas em função do período de seis meses sofreram flutuações significativas no desempenho, permitindo selecionar materiais genéticos mais estáveis, com melhores características para atender o mercado consumidor de fibras de bucha.

Referências Bibliográficas

- Bisognin, D.A. 2002. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciência Rural*, 32 (5): 715-723.
- Blind, A. D.; Blind, M. R.; Blind, E. J. 2013. Produtos e compósitos naturais de esponja vegetal (*Luffa cylindrica*) com aplicação dermo-cosmética, industrial e doméstica. 1ª Competição de Planos de Negócios Inovadores do Amazonas - FUCAPI/FAPEAM/SECTI, 1. ed. Manaus-AM, 24 p (Plano vencedor - 1º lugar).
- Carmo, C. A. S. 2007. **Caracterização morfológica de acessos de bucha vegetal no estado do Espírito Santo**. Dossiê Técnico-INCAPER-ES 6p.
- Carvalho, J. D. V. 2007. Cultivo de bucha vegetal. Dossie Tecnico. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília – CDT/UnB. 18p. Brasília: SBRT/UnB, 19 p.
- Dairo, F. A.; Aye S. P. A. & Oluwasola T. A. 2007. Some functional properties of loofah gourd (*Luffa cylindrica* L., M. J. Roem) seed. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 5(1) : 97-101.
- Davis, J. M. 1994. *Luffa* sponge gourd production practices for temperate climates. *HortScience*, 29(4): 263-266.
- Ferreira, I. C. P. V.; Araujo, A. V.; Cavalcanti, T. F. M.; Costa, C. A.; Ferreira, M. A. J. F. 2010. Caracterização morfológica de frutos de 17 acessos de bucha vegetal cultivados no Norte de Minas Gerais. *Horticultura Brasileira*, 28(2) 2192-2198.
- Ferreira, I. C. P. V.; Mota, V. A.; Araújo, A. V. de; Costa, C. A.; Ferreira, M. A. J da F. 2009. Avaliação participativa de acessos de bucha vegetal. In: Congresso Latino Americano de Agroecologia, 2009, Curitiba. Revista Brasileira de Agroecologia. Brasília-DF: *Sociedade Brasileira de Agroecologia*, 4: 3155-3158.
- Ferreira, M. A. J. F.; Lira, I. C. S. A.; Sena, E. M. N.; Aquino, D. A. L.; Passos, L. R. G.; Silva, M. L.; Araujo C. L. 2012. Seleção de bucha vegetal para produção de esponjas: In: Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos II. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/71544/1/Aldete-2012-3.pdf>

Filgueira, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** Viçosa: MG, 2008. 421 p.

Ghali, L.; Msahli, S.; Zidi, M.; Sakli, F. 2009. Effect of pre-treatment of *Luffa* fibers on the structural properties. *Materials Letters*. 63: 61-63.

Heiser, C. B e Schiling E. E. 1988. Phylogeny and distribution of *Luffa* (Cucurbitaceae). *Biotropica*, 20(3): 185-191.

Joshi, B. K.; Upadhyay, M. P.; Baniya, B. K.; Dongol, D. M.; Tiwari, R. K.; Shrestha, P. 2010. Evaluation of sponge gourd landraces in line with the reliability of names given by farmers. *Nepal Journal of Science and Technology*, 11: 9-16.

Joshi, B. K.; Tiwari, R. K.; Ghale, M.; Sthapit, B. R.; Upadhyay, M. P. **Descriptors for sponge gourd (*Luffa cylindrica* L. Roem).** Kathmandu: Nepal, NARC, LIBIRD and IPGRI, 2004. 43 p.

Laidani, Y.; Hanini S.; Mortha, G.; Heninia, G. 2012. Study of a Fibrous Annual Plant, *Luffa Cylindrica* for Paper Application Part I: Characterization of the Vegetal. *Iram Journal Chemical Engineer*, 31:4 p.119-129.

Marouelli, W. A.; Silva, H. R.; Lopes, J. R. 2013. **Irrigação na cultura da bucha vegetal.** Circular Técnica, Brasília. 116: 12 p.

Melo A. M. T. e Moreira S. R. 2007. Recursos genéticos e caracterização de cucurbitáceas subutilizadas e/ou negligenciadas no IAC. Disponível em: http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev_1/curc19.pdf. acesso em 10/03/2013.

Oboh, O.; Aluyor, E. O. 2009. *Luffa cylindrica* - an emerging cash crop. *African Journal of Agricultural Research*, 4(8): 684-688.

Partap, S.; Kumar, A.; Sharma, N. K.; Jha, K. K. 2012, *Luffa Cylindrica*: An important medicinal plant . Journal National. Producing. *Plant Resources*, 2 (1):127-134.

Santi, A.; Scaramuzza, W. L. M. P.; Soares, D. M. J.; Scaramuzza, J. F.; Dallacort, R.; Krause, W.; Tieppo, R. C. 2013. Desempenho e orientação do crescimento do pepino japonês em ambiente rotgado. *Horticultura Brasileira*, 31: 649-653

- Satyanarayana, K. G.; Guilmaraes, J. L.; Wypych, F. 2007. Studies on lignocellulosic fibers of Brazil. Part I: Source, production, morphology, properties and applications. *Composites*, 38(7): 1694-1709.
- Silva, M. W. K. P.; Ranil, R. H. G.; Fonseka R. M. 2012. *Luffa cylindrica* (L.) M. Roemer (Sponge Gourd-Niyan wetakolu): An Emerging High Potential Underutilized Cucurbit *Tropical Agricultural Research*, 23(2): 186-191.
- Siqueira, G.; Bras, J.; Dufresne, A. 2010. *Luffa cylindrica* as a linocellulosic source of fiber, microfibrillated cellulose, and cellulose nanocrystals. *Bioresources*, 5(2): 727-740.
- Tanobe, V. O.; Flores-sahagun, T. H.; Amico, S. C.; Muniz, G. I.; Satyanarayana, K. G. 2014. Sponge Gourd (*Luffa Cylindrica*) Reinforced Polyester Composites: Preparation and Properties. *Defence Science Journal*, 64(3): 273-280.
- Tanobe, V. O. A.; Sydenstricke T. H. D.; Munaro, M.; Amico, S. C. 2005. A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge-gourds (*Luffa cylindrica*). *Polymer Testing*, 24: 474-482.
- Zhang S.; Hu J.; Zhang C.; Guan Y.; Zhang Y. 2007. Genetic analysis of fruit shape traits at different maturation stages in sponge gourd. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 8(5): 338-344.

Conclusões gerais

Os resultados dos trabalhos 1, 2 e 3 demonstraram que houve influência do método de avaliação para diferenciar os padrões de variabilidade genética, confirmando que existe heterogeneidade entre os 24 acessos do BAG analisado, e que são representativos para uso entre agricultores e em programas de melhoramento da espécie.

No capítulo 1, o uso de marcadores AFLP, pode evidenciar que a proporção da variabilidade genética presente entre os diferentes acessos de bucha contribuiu para o ajustamento de quatro grupos distintos, determinados pelos métodos de agrupamento, sinalizando ainda que existe maior variabilidade dentro dos grupos.

A caracterização dos acessos de bucha no capítulo 2, utilizando 30 descritores morfo-agronômicos foram confiáveis para o entendimento morfológico e arranjo das configurações de acessos mais ou menos próximos. Os resultados revelaram ainda que existe alta herdabilidade para maioria das variáveis biométricas, existindo correlação positiva entre a massa de fibras o comprimento dos frutos e a espessura da manta fibrosa.

A variabilidade produtiva analisada entre os acessos de bucha no capítulo 3, permite selecionar e reproduzir materiais com especificidade quanto aos níveis de rendimento acumulado e características desejáveis conforme a demanda do mercado. Considerando análise sobre o comportamento das variáveis número de frutos, massa de fibras e o comprimento do fruto, entre as colheitas durante o período de seis meses, pode-se inferir que, existe flutuações acentuadas no desempenho produtivo da maioria dos acessos nas condições edafoclimáticas presentes neste estudo.

Analisando a procedência dos materiais e a interação dos dados moleculares, multicategóricos e os resultados de produtividade, ficou evidente que a distância geográfica não permite generalizações sobre diversidade, visto que alguns acessos mais distanciados apresentaram atributos similares quanto aos perfis morfo-agronômicos.

Para o mercado cosmético, doméstico e industrial, que utiliza principalmente a estilha natural de bucha é oportuno selecionar e reproduzir os materiais que produzem elevado número de frutos, com produção relativamente estável, fibras macias e cristalinas sendo buchas de circunferências e espessura da manta fibrosa mais homogêneas. Com base nos capítulos, os acessos 4, 10, 13, 16, 17, 19 e 23 provenientes de Monte Alegre do Sul-SP, Umuarama-PR, Campinas-SP, Presidente Figueredo-AM, Manacapuru-AM, Iranduba-AM e Manaus-AM, situados no BAG-UFAM, figuram como promissores tanto para agricultores quanto para agroindústria da região.

Referências Bibliográficas

- Altınışık, A.; Gür, E.; Seki, Y. 2010. A natural sorbent, *Luffa cylindrica* for the removal of a model basic dye. *Journal of Hazardous Materials*, 179: 658–664.
- Allard, R.W. 1971. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 381p.
- Aumonde, T. Z.; Lopes, N.F.; Peil, R. M. N.; Moraes, D. M.; Pedó, T.; Prestes, S. L. C.; Nora L. 2011. Enxertia, produção e qualidade de frutos do híbrido de mini melancia smile. *Revista Brasileira Agrociência*, 17(4):42-50.
- Bal K. E.; Bal, Y.; Lallam, A. 2004. Gross morphology and absorption capacity of cell-fibers from the fibrous vascular system of Loofah (*Luffa cylindrica*). *Textile Reserch Journal*, 74: 241-247.
- Barra, R. P. & Lima, T. B. F. 1990. Escova ecológica (dispositivo de bucha vegetal). Uma alternativa para remoção da placa bacteriana. *Revista Científica Ciências Biomédicas*, 6(1): 24-7.
- Bledzki, A. K. & Gassan, J. 1999. Composites reinforced with cellulose based fibbers. *Progress in Polimers Science*, 24: 221-274.
- Bisognin, D.A. 2002. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciência Rural*, 32(5):715-723.
- Bottin, C.; Jitumori, C.; Leong, I. R. S.; Silva, N. B.; Kozłowski, V. 1998. *Luffa cilndrica* como metodo mecânico alternativono controle da placa bacteriana supragengival e gengivite. *Ciencias Biologicas e da Saude*, (4)1: 85-97.
- Borem, A. & Miranda, G.V. 2005. **Melhoramento de plantas** (eds). Universiidade Federal de Viçosa, 4ª ed, p. 85-111.
- Borem, A.; Lopes, M. T. G.; Clement, C. R.; Noda, H. 2012. **Domestication and Breeding: Amazonian species**. 1. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema Editora, v. 1. 479p.
- Boynard, C. A. e D’Almeida, J. R. M. 1999. Water absorption by sponge gourd (*Luffa cylindrica*) - polyester composite materials. *Journal Materials Science Letter*, 18:1789-1791.
- Boynard, C. A. Monteiro, S. N. D’Almeida J. R. M. 2003. Aspects of alkali treatment of sponge gourd (*Luffa cylindrica*) fibers on the flexural properties of polyester matrix composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 87: 1927–1932.
- Carmo, C. A. S. 2007. **Caracterização morfológica de acessos de bucha vegetal no estado do Espírito Santo**. Dossiê Tecnico-INCAPER-ES 6p.

- Carvalho, J. D. V. 2007. **Cultivo de bucha vegetal**. Dossie Técnico. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília – CDT/UnB. 18p. Brasília: SBRT/UnB, 19 p.
- Creste, S.; Tulmann, N. A.; Figueira, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 299-306.
- Cruz, C. D. 1990. **Aplicações de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. 188p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.
- Cruz, C. D. 2006. **Programa Genes: Estatística experimental e matrizes**. Editora UFV. Viçosa-MG. 285p.
- Cruz, C. D. w Regazzi, A. J. **Análise dialélica**. In.: **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. Ed. UFV. Viçosa. 2a ed. 1997. p. 131–285.
- Cruz, C. D. e Regazzi, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV. Imprensa Universitária, 1994. 390p.
- Cruz, C. D. e Carneiro, P. C. S. 2006. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, v.2, 585pp.
- Cruz, V. M. V.; Tolentino, M. I. S.; Altoveros, N. C.; Villavicencio, M. L. H.; Siopongco, L. B.; dela Viña, A. C.; Laude, R. P. 1997. Correlations among accessions of southeast Asian *Luffa* genetic resources and variability estimated by morphological and biochemical methods. *Philipp Journal Crop Science*, 22(3): 131-140.
- Curi, P. R. 1983. Análise de agrupamento: métodos seqüenciais, aglomerativos e hierárquicos. *Ciência e Cultura*, 35(10): 1416-1429.
- D’Almeida, A. L. F. S.; Calado V.; Barreto D. W.; D’Almeida J. R. M. 2005. Acetilação da Fibra de Bucha (*Luffa cylindrica*). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15(1): 59-62.
- Davis, J. M. 1994. *Luffa* sponge gourd production practices for temperate climates. *HortScience*, 29(4). 263-266.
- Dairo, F. A.; Aye S. P. A. e Oluwasola T. A. 2007. Some functional properties of loofah gourd (*Luffa cylindrica* L., M. J. Roem) seed. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 5(1): 97-101.
- Devi, A. G. S.; Kottain, M. D.; Kumar, S. S.; Rekha, I.; Nandhini. R. 2009 . Studies on the antibacterial and antifungal activities of the ethanolic extracts of *Luffa cylindrica* (linn) fruit. *International Journal Drug Developmente & Researc*, 1(1):105-109.

- Du, Q.; Xu, Y.; Li, L.; Zhao, Y.; Jerz G.; Winterhalter P. 2006. Antioxidant Constituents in the Fruits of *Luffa cylindrica* (L.) Roem. *Journal of Agricultura and Food Chemistry*, 54(12): 4186–4190.
- EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. SPI, Brasília- DF. 1999. 412p.
- Ferreira I. C. P. V.; Araujo A.V.; Cavalcanti T. F. M.; Costa C. A.; Ferreira M. A. J. F. 2010. Caracterização morfológica de frutos de 17 acessos de bucha vegetal cultivados no Norte de Minas Gerais. *Horticultura Brasileira*, 28: S2192-S2198.
- Ferreira, I. C. P. V.; Mota, V. A.; Araújo, A. V. de; Costa, C. A.; Ferreira, M. A. J da F. 2009. Avaliação participativa de acessos de bucha vegetal. In: Congresso Latino Americano de Agroecologia, 2009, Curitiba. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 4: 3155-3158.
- Ferreira, M. A. J. F.; Lira, I. C. S. A.; Sena, E. M. N.; Aquino, D. A. L.; Passos, L. R. G.; Silva, M. L.; Araujo C. L. 2012. Seleção de bucha vegetal para produção de esponjas: In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS II. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/71544/1/Aldete-2012-3.pdf>
- Ferreira, M. E. e Grattapaglia, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 220p.
- Filgueira, F. A. R. 2008. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, MG: (Ed.) UFV. 421 p.
- Ghali, L.; Aloui, M.; Zidi, M.; Bendaly, H.; M'sahli, S.; Sakli, F. 2011. Effect of chemical modification of *Luffa cylindrica* fibers on the mechanical and higrathermal behaviours of polyester *Luffa* composites. *Bioresources*, 6(4): 3836-3849.
- Ghali, L.; Msahli, S.; Zidi, M.; Sakli, F. 2009. Effect of pre-treatment of *Luffa* fibers on the structural properties. *Materials Letters*, 63: 61-63.
- Guimarães, J. L. 2010. **Preparação e caracterização de compósitos de amido plastificado com glicerol e reforçados com fibras naturais Vegetais**. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia. Curitiba-PR. 193 f.
- Grangeiro, L. C. e Cecílio Filho, A. B. 2005. Acúmulo e exportação de macronutrientes em melancia sem sementes. *Horticultura Brasileira*, 23(3): 763-767.
- Hanini, S. M. G. & Bouaziz, M. N. 2003. **Etude d'une plante annuelle fibreuse, la *Luffa cylindrica*, en vue d'application papetière Partie I: Caractérisation du vegetal**. Congres de la Société Française de Genie des Procédés, Saint Nazaire. France.

- Heiser, C. B & Schiling E. E. 1988. Phylogeny and distribution of *Luffa* (Cucurbitaceae). *Biotropica*, 20(3): 185-191.
- Ito, L. A.; Charlo H. C. O.; Castoldi, R.; Braz L. T.; Camargo, M. 2009. Seleção de porta-enxertos resistentes ao cancro da haste e seus efeitos na produtividade de melão 'Bônus nº 2'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(1): 262-267.
- Ismail, M. D.; Hussain, M. M.; Dastagir, M. G.; Billah, M.; Quader, A. 2010. Phytochemical and antimicrobial investigation of *Luffa cylindrica*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(4): 327-332.
- INMET – **Instituto Nacional de Meteorologia**. 2013. Relatório Técnico: índice de precipitação e temperatura – Manaus-AM. Disponível em <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/prognosticoClimaticoTrimestral> acesso 18/12/2013.
- Joshi, B. K.; Tiwari, R. K.; Ghale, M.; Sthapit, B. R.; Upadhyay, M. P. 2004. **Descriptors for sponge gourd (*Luffa cylindrica* L. Roem)**. NARC, LIBIRD and IPGRI, Kathmandu.
- Joshi, B. K.; Upadhyay, M. P.; Baniya, B. K.; Dongol D. M. S.; Tiwari, R. K.; and Shrestha, P. 2010. Evaluation of sponge gourd landraces in line with the reliability of names given by farmers. *Nepal Journal of Science and Technology*, 11: 9-16.
- Krup, L. R. & Jewell, W. J. 1992. Biodegradability of modified plastics film in controlled biological environments. *Environmental Science & Technology*, 6: 193-198.
- Laidani, Y.; Hanini S.; Mortha, G.; Heninia, G. 2012. Study of a Fibrous Annual Plant, *Luffa Cylindrica* for Paper Application Part I: Characterization of the Vegetal. *Iram Journal Chemical Engineer*, 31(4): 119-129.
- Leite, A. F.; Bonini, G.; Imparato, J. C.; Raggio, D.; Menezes, V.; Cabral, R. 2012. Avaliação da eficácia da escova ecológica e do juá no controle de biofilme dentário em crianças. *Pesquisa Brasileira Odontopedica Clinica Integrada*, 12(3): 337-343.
- Leite, G. L. D.; Moreira, E. D. S.; Mota, V. A.; Pereira, I. C.; Ferreira, V.; Costa, C. A. 2011. Artrópodes fitófagos e predadores associados em 20 acessos *Luffa* sp. em sistema orgânico. *Revista Ciência Agronômica*, 42(4): 986-992.
- Lira, I. C. S. A.; Passos, L. R. G.; Ferreira, M. A. J. F.; Silva, M. L.; Sena, E. M. N.; Araujo, C. L.; Aquino, D. A. L. 2012. Seleção intra-populacional em bucha vegetal. *Horticultura Brasileira* 30: S4406-S4413.

- Lopes, M. S.; Lopes, M. T. G.; Figueira, A.; Camargo, L. E.A.; Fungaro, M. H. P.; Carneiro, M. S.; Vieira, M. L. C. 2002. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 5(29): 56-60.
- Malavolta, E. 1992. ABC da análise de solos e folhas São Paulo: Agronômica Ceres, 124p.
- Marouelli, W. A.; Silva, H. R.; Lopes, J. R. 2013. Iriiiação na cultura da bucha vegetal. *Circular Tecnica*, Brasilia. 116: 12 p.
- Mazali, I. O. e Alves O. L. 2005. Morphosynthesis: high fidelity inorganic replica of the fibrous network of loofa sponge (*Luffa cylindrica*). *Anais Academia Brasileira de Ciência*, 77(1): 25-31.
- Melo A. M. T. e Moreira S. R. 2007. Recursos genéticos e caracterização de cucurbitáceas subutilizadas e/ou negligenciadas no IAC. Disponível em: http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev_1/curc19.pdf. acesso em 10/03/2013.
- Nass, L. L. 2007. **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Cenargen, 858p.
- Oboh O. e Aluyor. E. O. 2009. *Luffa cylindrica* - an emerging cash crop. *African Journal of Agricultural Research*, 4(8): 684-688,
- Oliveira, E. C & Teodoro, E. B. 2005. **Avaliação do desempenho acústico da *luffa cylindrica* (bucha vegetal), por meio deanálises experimentais em tubo de impedância**. diponivel em: <http://www.posgrad.mecanica.ufu.br/posmec/15/pdf/POSMEC058.pdf> acesso dia 09/03/2013.
- Partap, S.; Kumar, A.; Sharma, N. K.; Jha, K. K. 2012, *Luffa cylindrica*: An important medicinal plant . *Journal National Producing Plant Resources*, 2(1):127-134.
- Prakash, K.; Pati, K.; Arya, L.; Pandey, A.; Verma, M. 2014. Population structure and diversity in cultivated and wild *Luffa* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56: 165-170.
- Priori, D.; Barbieri, R. L.; Castro, C. M.; Oliveira, A. C.; Vilela, J. C. B.; Mistura, C. C. 2013. Diversidade genética de *Cucurbita pepo*, *C. argyrosperma* e *C. ficifolia* empregando marcadores microssatélites. *Horticultura Brasileira*, 31: 361-368.
- Queiróz, M. A. 2011. Germoplasma de Cucurbitáceas no Brasil. In: Congresso brasileiro de olericultura, 51. Horticultura Brasileira 29. Viçosa: ABH.S5946-S5954.
- Queiroz, M. A. 2004. Germplasm of Cucurbitaceae in Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4:377-383.
- Ramos, S. R. R.; Queiroz M. A.; Casali V. W. D. Cruz, C. D. 2000. Divergência genética em germoplasma de abóbora procedente de diferentes áreas do Nordeste. *Horticultura Brasileira*, 18: 195-199.

- Rizzo, A. A. N.; Chaves, F. C. M.; Laura, V. A.; Goto, R. 2004. Avaliação de métodos de enxertia e porta-enxertos para melão rendilhado. *Horticultura Brasileira*, 22(4): 808-810.
- Satyanarayana, K. G.; Guilmaraes, J. L.; Wypych, F. 2007. Studies on lignocellulosic fibers of Brazil. Part I: Source, production, morphology, properties and applications. *Composites*, 38(7): 1694-1709.
- Silva, M. W. K. P.; Ranil, R. H. G.; Fonseka R. M. 2012. *Luffa cylindrica* (L.) M. Roemer (Sponge Gourd-Niyan wetakolu): An Emerging High Potential Underutilized Cucurbit. *Tropical Agricultural Research*, 23(2): 186 – 191.
- Siqueira R. G. 2007. **Crescimento e acúmulo de nutrientes em bucha (*Luffa cylindrica*)** Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). UFV. Viçosa – MG, 48p.
- Siqueira, G.; Bras, J.; Dufresne, A. 2010. *Luffa cylindrica* as a lignocellulosic source of fiber, microfibrillated cellulose, and cellulose nanocrystals. *Bioresources*, 5(2): 727-740.
- Tanobe, V. O. A.; Sydenstricker, T. H. D.; Munaro, M.; Amico, S. C. 2005. A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge-gourds (*Luffa cylindrica*). *Polymer Testing*, 24: 474–482.
- Tanobe, V. O.; Flores-Sahagun, T. H.; Amico, S. C.; Muniz, G. I.; Satyanarayana, K. G. 2014. Sponge Gourd (*Luffa Cylindrica*) Reinforced Polyester Composites: Preparation and Properties. *Defence Science Journal*, 64(3): 273-280.
- Tarley, C. R. T. & Arruda, M. A. Z. 2003. Adsorventes naturais: potencialidades e aplicações da esponja natural (*Luffa cylindrica*) na remoção de chumbo em efluentes de laboratório. *Revista Analytica*, 4(1): 25-31.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21):4407-4414.
- Vichiato, M. R. M. 2008. Bucha vegetal e fertilização organo-mineral no cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. *Revista da FZVA*, 15(01): 34-42.
- Ye, C.; Hu, N.; Wang, Z. 2013. Experimental investigation of *Luffa cylindrica* as a natural sorbent material for the removal of a cationic surfactant. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44 (1): 74-80.
- Zhang, S.; Hu, J. e Xu, S. 2008. Developmental genetic analysis of fruit shape traits under different environmental conditions in sponge gourd (*Luffa cylindrical* (L) Roem. Violales, Cucurbitaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 31(3): 704-710.

Zhang S.; Hu, J.; Zhang, C.; Guan, Y.; Zhang, Y. 2007. Genetic analysis of fruit shape traits at different maturation stages in sponge gourd. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 8(5): 338-344.

Apêndices

Tabela A. Medida de dissimilaridade genética entre 24 acessos de bucha, sendo expressa pela distancia de Jaccard.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	0	0,142	0,161	0,113	0,140	0,210	0,191	0,086	0,204	0,145	0,142	0,165	0,209	0,123	0,366	0,246	0,525	0,385	0,384	0,360	0,359	0,353	0,359	0,355
2		0	0,189	0,164	0,087	0,122	0,103	0,163	0,161	0,137	0,124	0,201	0,190	0,139	0,376	0,138	0,524	0,379	0,370	0,369	0,368	0,362	0,375	0,356
3			0	0,112	0,186	0,153	0,217	0,171	0,145	0,119	0,219	0,211	0,176	0,159	0,356	0,239	0,508	0,377	0,377	0,397	0,396	0,397	0,396	0,393
4				0	0,139	0,198	0,244	0,169	0,179	0,144	0,141	0,164	0,230	0,169	0,389	0,234	0,522	0,376	0,367	0,359	0,357	0,359	0,342	0,353
5					0	0,120	0,148	0,172	0,205	0,182	0,123	0,199	0,232	0,183	0,397	0,182	0,526	0,382	0,367	0,366	0,350	0,358	0,364	0,360
6						0	0,100	0,220	0,136	0,173	0,179	0,276	0,179	0,209	0,400	0,208	0,520	0,400	0,392	0,404	0,410	0,404	0,417	0,406
7							0	0,143	0,178	0,213	0,182	0,259	0,206	0,201	0,357	0,200	0,490	0,393	0,385	0,397	0,382	0,390	0,411	0,385
8								0	0,179	0,129	0,205	0,185	0,196	0,132	0,350	0,235	0,515	0,380	0,379	0,377	0,361	0,362	0,376	0,349
9									0	0,072	0,237	0,230	0,093	0,179	0,354	0,213	0,538	0,408	0,399	0,411	0,417	0,411	0,410	0,399
10										0	0,216	0,185	0,120	0,129	0,364	0,190	0,553	0,400	0,399	0,411	0,417	0,411	0,403	0,399
11											0	0,168	0,251	0,183	0,392	0,224	0,498	0,356	0,341	0,326	0,332	0,326	0,324	0,327
12												0	0,155	0,115	0,341	0,238	0,510	0,363	0,363	0,347	0,345	0,339	0,338	0,341
13													0	0,110	0,320	0,218	0,548	0,411	0,410	0,414	0,427	0,414	0,420	0,417
14														0	0,331	0,201	0,523	0,364	0,364	0,362	0,369	0,355	0,361	0,357
15															0	0,401	0,341	0,309	0,310	0,318	0,317	0,326	0,339	0,304
16																0	0,563	0,408	0,393	0,404	0,411	0,397	0,396	0,393
17																	0	0,291	0,300	0,339	0,338	0,332	0,338	0,310
18																		0	0,045	0,102	0,142	0,111	0,107	0,117
19																			0	0,096	0,127	0,096	0,101	0,093
20																				0	0,068	0,045	0,059	0,068
21																					0	0,059	0,090	0,091
22																						0	0,050	0,051
23																							0	0,065
24																								0

Tabela B. Medida de dissimilaridade genética entre 24 acessos de bucha, sendo expressa pelo coeficiente proposto por Cole-Rodgers (Cole-Rodgers et al., 1997).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	0	4,806	4,861	8,611	4,861	6,444	7,500	4,500	8,889	7,667	7,056	6,556	9,611	5,111	7,056	5,722	5,556	8,556	7,861	5,806	7,417	5,500	6,361	9,750
2		0	7,889	6,472	8,167	6,861	3,972	3,472	8,861	7,806	6,194	6,972	12,194	6,694	8,194	4,361	5,250	7,250	7,944	5,000	6,111	6,806	10,444	6,222
3			0	8,472	6,222	7,806	8,361	7,861	9,694	7,250	4,694	7,917	10,194	4,694	4,694	4,306	5,139	6,139	9,444	7,389	9,000	5,861	8,944	10,111
4				0	3,972	5,111	2,944	4,444	6,556	5,056	4,722	2,722	8,222	6,722	6,222	6,111	4,222	6,722	4,972	5,472	4,083	4,111	7,472	4,694
5					0	3,806	5,361	4,361	7,083	7,583	7,417	3,194	6,306	4,472	5,917	7,583	4,417	6,417	4,556	5,667	5,056	4,861	4,556	6,111
6						0	5,611	3,611	4,944	9,667	6,111	4,111	7,556	7,056	6,611	7,722	6,611	7,111	3,306	2,361	3,972	3,444	6,306	1,361
7							0	4,000	9,056	7,000	6,722	2,722	11,611	5,611	5,722	7,056	4,222	6,222	7,361	3,972	3,083	6,000	7,861	4,750
8								0	7,056	10,000	4,722	3,722	11,111	7,611	5,222	6,056	6,222	8,222	5,861	3,972	6,083	6,000	9,361	3,750
9									0	7,333	6,000	5,889	4,556	8,556	10,000	7,222	6,111	6,611	2,806	4,861	5,306	5,389	5,306	6,306
10										0	6,500	7,333	5,722	7,056	10,000	4,444	3,556	7,056	7,972	8,306	6,972	5,667	5,972	10,250
11											0	4,722	8,889	6,889	5,500	3,556	4,944	6,444	7,639	6,194	7,806	6,556	10,139	6,472
12												0	8,000	5,167	5,222	8,333	4,222	7,722	5,250	4,472	3,361	6,556	6,250	5,472
13													0	7,000	12,389	8,111	6,444	6,944	4,750	8,194	7,139	7,111	3,750	9,861
14														0	7,889	6,611	3,444	4,944	8,750	6,694	5,306	6,611	6,750	9,861
15															0	9,056	7,444	8,444	8,639	7,694	8,306	7,556	9,639	7,472
16																0	4,111	4,611	6,861	5,361	7,472	4,722	8,361	7,806
17																	0	3,000	7,194	4,750	3,361	4,556	5,194	7,972
18																		0	7,194	5,250	3,861	5,056	5,194	7,972
19																			0	3,944	3,889	3,361	4,000	4,611
20																				0	2,611	2,806	4,944	2,722
21																					0	3,417	3,389	5,333
22																						0	4,361	4,750
23																							0	9,111
24																								0

Tabela C. Medida de dissimilaridade genética entre 24 acessos de bucha, sendo expressa pela distância de Mahalanobis, média padronizada.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	0	547,439	118,513	815,905	8,285	96,871	1402,812	1420,612	97,103	440,851	418,340	129,917	190,339	54,076	180,457	867,219	123,659	135,031	135,628	86,608	82,863	129,400	90,862	994,032
2		0	434,978	1166,536	470,783	260,933	515,908	466,593	403,778	1010,599	178,784	171,298	701,629	444,798	182,786	1146,879	319,434	423,695	538,176	375,817	406,393	367,493	694,738	119,743
3			0	380,995	95,538	44,455	1526,366	1530,952	26,745	201,518	173,855	169,618	119,888	196,986	300,651	405,125	90,871	42,239	30,757	48,865	63,101	50,547	57,266	863,694
4				0	758,288	560,341	2667,280	2718,028	410,439	104,267	550,538	886,911	323,589	901,803	1166,665	11,537	544,591	395,880	314,338	479,354	491,633	410,218	455,762	1566,263
5					0	59,679	1326,565	1343,546	67,728	401,204	350,548	98,636	165,360	47,708	152,186	797,609	88,769	97,454	108,641	54,707	61,810	92,870	75,187	895,838
6						0	1150,677	1154,522	22,736	328,803	146,650	54,823	152,672	110,293	136,526	573,523	37,448	42,413	63,907	19,640	38,834	27,977	115,521	601,467
7							0	15,648	1352,163	2356,898	1208,579	835,090	1773,879	1116,157	628,437	2679,593	1163,314	1450,848	1613,986	1263,928	1276,363	1282,661	1818,010	375,736
8								0	1380,139	2424,592	1147,325	820,560	1813,984	1131,550	623,480	2726,524	1170,700	1466,082	1652,146	1289,504	1299,207	1307,636	1852,445	326,277
9									0	200,543	209,159	122,625	78,672	126,772	224,906	437,035	42,042	28,641	15,516	6,660	19,889	11,168	66,010	773,276
10										0	505,433	594,651	113,167	529,213	812,910	117,765	316,254	178,399	117,965	244,505	254,096	206,629	178,264	1446,612
11											0	193,949	355,314	391,044	328,110	539,407	177,510	184,972	267,166	214,261	228,839	183,724	387,362	428,332
12												0	271,553	69,591	27,414	905,216	59,201	138,783	210,443	90,661	89,472	103,973	274,203	414,394
13													0	182,155	412,900	358,917	87,506	64,087	62,810	77,357	58,923	62,714	107,072	1047,389
14														0	89,974	954,671	69,694	154,932	197,989	86,278	67,022	119,530	197,626	754,974
15															0	1194,624	140,342	263,561	344,816	176,658	176,424	206,842	396,943	396,692
16																0	572,316	398,043	335,369	508,958	526,320	427,820	492,913	1524,572
17																	0	50,947	86,804	20,581	16,070	19,944	156,921	589,793
18																		0	33,523	35,363	34,901	18,113	85,998	760,793
19																			0	35,280	49,545	30,686	51,659	941,254
20																				0	11,749	9,717	82,181	720,024
21																					0	12,350	104,731	721,729
22																						0	108,275	671,834
23																							0	1215,735
24																								0