



COMUNICADO
TÉCNICO

210

Brasília, DF
Novembro, 2021

Embrapa

Otimização de protocolo de extração RNA de *Leucoptera coffeella* para análises moleculares

Eliza F. de Melo Bellard do Nascimento
Luiz Carlos Gonçalves dos Santos
Leonardo A. Vidal
Vívian dos Santos Lucena-Leandro
Camila Ivo C. Vilarinho Fernandes Junqueira
Juliana Dantas de Almeida
Thompson França Tomatieli
Andrea Queiroz Maranhão
Rodrigo Rocha Fragoso
Érika Valéria Albuquerque Saliba Albuquerque

Otimização de protocolo de extração RNA de *Leucoptera coffeella* para análises moleculares¹

¹ **Eliza F. de Melo Bellard do Nascimento**, bióloga, doutora em Botânica, bolsista FUNAPE na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. **Luiz Carlos Gonçalves dos Santos**, biólogo, bolsista FUNAPE na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. **Leonardo A. Vidal**, graduando em agronomia, bolsista Concafé na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. **Vívian dos Santos Lucena-Leandro**, bióloga, mestre em fitopatologia, bolsista FUNAPE na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. **Camila Ivo C. Vilarinho Fernandes Junqueira**, graduanda em agronomia, bolsista CNPq na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. **Juliana Dantas de Almeida**, bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. **Thompson França Tomatieli**, biólogo, doutorando em Biologia Molecular, técnico de laboratório na Universidade de Brasília (UnB). **Andrea Queiroz Maranhão**, bióloga, doutora em Biologia Molecular, professora associada ao Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (UnB). **Rodrigo Rocha Fragoso**, engenheiro agrônomo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador na Embrapa Cerrados. **Érika Valéria Albuquerque Saliba Albuquerque**, bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular e Genômica, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Introdução

Dentre as pragas que ameaçam a cultura das duas espécies comerciais brasileiras de café, *C. arabica* e *C. canephora*, destaca-se *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville; Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae), uma mariposa conhecida como bicho-mineiro do cafeeiro (BMC), responsável por causar grave dano às folhas (Guérin-Mèneville; Perrottet, 1842). Durante o ciclo de vida, as fêmeas depositam ovos sobre as folhas (Costa et al., 2012; Wolcott, 1947), de onde eclodem as larvas que se alimentam do mesófilo foliar, gerando necrose,

perda da capacidade fotossintética e desfolha drástica, podendo atingir até 100% das folhas (Costa et al., 2012) e causar prejuízos acima de 70% na produção do grão (Neves, 2006; Souza et al., 2006; Souza, et al., 1998).

As dificuldades no controle químico do BMC (Leite et al., 2020, 2021) geram forte demanda por soluções sustentáveis, duráveis, seguras e específicas contra o inseto alvo (Sawinska et al., 2020; Dantas et al., 2021). Abordagens biotecnológicas são utilizadas com sucesso em outros insetos (Dias et al., 2020) e podem ser aplicadas para o manejo controle específico

do BMC. Para selecionar genes alvo para aplicação na tecnologia de RNAi e outras estratégias biotecnológicas, como marcadores moleculares da resistência a inseticida, são necessárias as informações gênicas do BMC. Entretanto, ainda existem poucos dados disponíveis de transcrito.

Atualmente existem dois projetos registrados no NCBI que relacionam o sequenciamento dos transcritos de *L. coffeella*: LepTree II: Yponomeutoid transcriptomes (ID 313449), que visa a resolução das relações filogenéticas dentro da superfamília Yponomeutoidea a partir do transcrito de insetos da ordem Lepidoptera (Mitter et al., 2017), e o *The 1KITE project: evolution of insects* (ID 299175), que visa entender a evolução e distinção entre as espécies, abrangendo todas as ordens de insetos conhecidas (Kawahara et al., 2019). Uma derivação deste projeto consiste na publicação do transcrito de *L. coffeella* com 3,778,549 pb, entretanto apenas de organismos adultos e sem sexagem.

Portanto, o presente trabalho visa descrever um protocolo customizado que permita a extração de RNA total de *L. coffeella* em diferentes estádios de desenvolvimento (Motta ., 2021)

nas folhas de café, produzindo amostras de alta pureza e integridade para análises moleculares de alta sensibilidade. A partir desses dados, será possível gerar conhecimento acerca da expressão gênica e explorar genes-alvo para o desenvolvimento de alternativas mais eficientes e específicas para o controle e manejo do BMC.

Material e Métodos

As extrações foram realizadas a partir de 7 estádios de desenvolvimento do BMC: 4 instares larvais (L1, L2, L3 e L4) (Motta ., 2021), pupas, machos e fêmeas. Utilizamos o método *TRIzol*®, seguido por limpeza do RNA com o kit *ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System* (Promega, Cat.No.: PRZ6111).

Lise celular: com auxílio do cadinho e do pistilo, macerar separadamente os diferentes estádios de desenvolvimento (aproximadamente 20 µL de pó por tubo). Dissolver o material em um tubo de microcentrifuga estéril de 1,5 mL contendo 1 mL de *TRIzol* Reagente (Invitrogen, Cat.No.: 15596026). Inverter o tubo cuidadosamente 10 vezes e incubar por 5 minutos à

temperatura ambiente.

Extração orgânica: centrifugar o tubo a $10.000 \times g$ (Microcentrífuga Eppendorf® 5415R) por 10 minutos a 4°C para precipitação das impurezas e outros materiais não dissolvidos. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL contendo 200 μL de clorofórmio. Agitar o tubo vigorosamente por inversão manual por 15 segundos. Incubar por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugar a $10.000 \times g$ por 15 minutos a 4°C .

Precipitação do RNA: transferir cuidadosamente a fase aquosa (superior) para um novo tubo contendo 500 μL de isopropanol 100%. Inverter o tubo cuidadosamente 10 vezes, incubar por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugar a $10.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C .

Limpeza do RNA: após a obtenção do precipitado, descartar o sobrenadante e adicionar 1 mL de etanol 75%. Inverter o tubo cuidadosamente 5 vezes e centrifugar a $10.000 \times g$ por 5 minutos a 4°C . Descartar o etanol e secar o precipitado em temperatura ambiente.

Purificação do RNA utilizando o kit ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System: Ressuspender

o precipitado em 250 μL de solução LBA/TG (fornecido no kit). Adicionar 85 μL isopropanol. Transferir o volume do tubo para a Mini Coluna ReliaPrep™ (fornecida no kit) e centrifugar a $10.000 \times g$ por 1 minuto em temperatura ambiente. Adicionar 500 μL de RNA Wash Solution e centrifugar a $10.000 \times g$ por 30 segundos em temperatura ambiente. Preparar o mix de DNase (24 μL de Yellow Core Buffer + 3 μL MnCl_2 + 3 μL DNase, todos fornecidos pelo kit). Aplicar 30 μL do mix de DNase à coluna e centrifugar a $10.000 \times g$ por 15 minutos em temperatura ambiente. Aplicar 200 μL da solução Column Wash e centrifugar a $10.000 \times g$ por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, aplicar 500 μL de RNA Wash Solution e centrifugar a $10.000 \times g$ por 30 segundos em temperatura ambiente. Aplicar mais 300 μL de RNA Wash Solution e centrifugar a $10.000 \times g$ por 2 minutos em temperatura ambiente. Descartar os tubos de coleta e transferir a coluna para um novo tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL. Eluir o RNA da coluna com 15 μL de água livre de nucleasse e centrifugar a $10.000 \times g$ por 1 minuto em temperatura ambiente.

Controle de qualidade e armazenamento: após a extração, o

RNA deve ser avaliado quanto a sua quantidade e qualidade, analisados em *NanoDrop*, *Qubit* e *Bioanalyzer*. O RNA deve ser armazenado imediatamente em freezer -80 °C para evitar a degradação.

Resultados e Discussão

A extração de RNA total para o sequenciamento apresenta desafios metodológicos para manter a estabilidade das moléculas. O RNA está sujeito à degradação desde as etapas iniciais com a lise celular até a quantificação final (Houseley; Tollervey, 2009). Para evitar a degradação e a perda de informações transcritômicas, os protocolos de extração de RNA sugerem procedimentos importantes durante a manipulação, como o uso de equipamentos exclusivos para RNA e de áreas isoladas e descontaminadas de RNase (Florell et al., 2001).

Com o protocolo aqui estabelecido, foi possível obter com sucesso o RNA total de *L. coffella* referente aos diferentes estádios de desenvolvimento. Além das etapas comuns dos protocolos convencionais, adicionamos a etapa de purificação das amostras

extraídas utilizando um kit de extração comercial, como um diferencial da metodologia. Quando comparado a outros métodos de extração de RNA, esse protocolo mostrou maior grau de pureza e concentração das amostras.

As amostras extraídas e avaliadas nos espectrofotômetros *Qubit* e *NanoDrop* apresentaram os valores de concentração e relações específicas (A260/A280 e A260/A230) recomendadas para obtenção de um sequenciamento de transcrito de alto rendimento (Tabela 1). A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (Figura 1) e em *Bioanalyzer* (Figura 2), atualmente os dois métodos utilizados para avaliar a integridade e degradação do RNA após a extração. O *Bioanalyzer* calcula o número de integridade do RNA (*RNA integrity number* - RIN), a partir dos picos de distribuição de fragmentos de RNA, que varia de 1 a 10, onde valores acima de 7 são considerados de alta qualidade e apropriados para sequenciamento (Mueller et al., 2004). Outra forma de avaliar a integridade do RNA é a partir do tamanho das subunidades do RNA ribossômico (RNAr): entre 4400 e 5000 pares de bases (bp) para a subunidade 28S e 2.000 bp

para a subunidade 18S (Melen et al., 1999).

Ao analisar o perfil das amostras em gel de agarose não desnaturante e no eletroferograma gerado pelo *Bioanalyzer*, observamos respectivamente a presença de apenas uma banda de RNAr com aproximadamente 850 pb (Figura 1) e uma banda com aproximadamente 2000 pb (Figura 2A). Essa diferença na altura das bandas de RNA pode ser explicada pelas interações intramoleculares, onde as moléculas de RNA podem dobrar-se e alterar a estrutura secundária das moléculas, afetando a migração no gel de agarose não desnaturante (Sambrook; Russell, 2001). O gel desnaturante soluciona este problema com o rompimento das pontes de hidrogênio em condições desnaturantes, permitindo que o RNA migre como uma

molécula de fita simples, o que garante estimativas de tamanho mais precisas (Sambrook; Russell, 2001).

Inicialmente esses resultados foram interpretados como um perfil de degradação, pois tradicionalmente o RNA de alta qualidade apresenta as subunidades 28S e 18S (Sambrook; Russell, 2001). Entretanto, uma particularidade é descrita para invertebrados, onde a subunidade 28S é altamente propensa à desnaturação, resultando em dois fragmentos menores que se sobrepõe com a subunidade 18S em uma única banda (DeLeo et al., 2018; Ogino et al., 1990; Winnebeck et al., 2010), como aqui observado. Além disso, os picos de distribuição dos fragmentos de RNAr mostraram elevado RIN, como indicativo da alta qualidade das amostras (Figura 2B).

Tabela 1: Razões de absorvância e concentrações de RNA total dos 7 estádios de desenvolvimento de *L. coffella* quantificados no *Nanodrop* e *Qubit*, respectivamente.

Amostra	A260/A280	A260/A230	Concentração (ng/μL) <i>Qubit</i>
L1	2,18	2,26	876
L2	2,17	2,21	756
L3	2,17	2,27	816
L4	2,19	2,27	1159
P	2,15	2,32	542

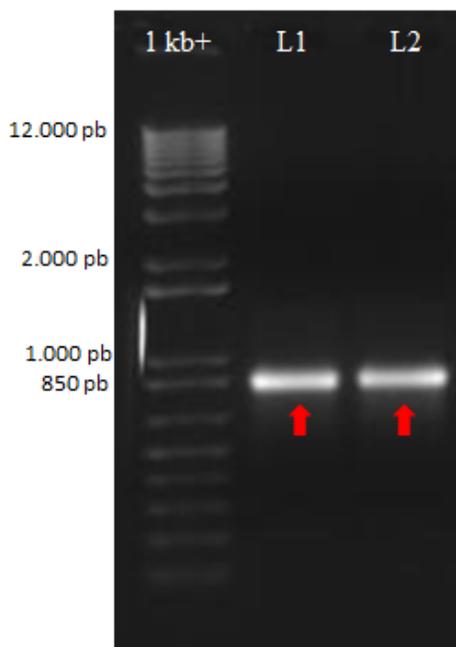


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1,2 % não desnaturante, corado com brometo de etídio após 2 horas de corrida a 50 volts (V). O marcador utilizado foi o 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) (poço 1). Bandas de RNAr referentes aos instares larvais L1 e L2 com aproximadamente 850 pb (setas vermelhas).

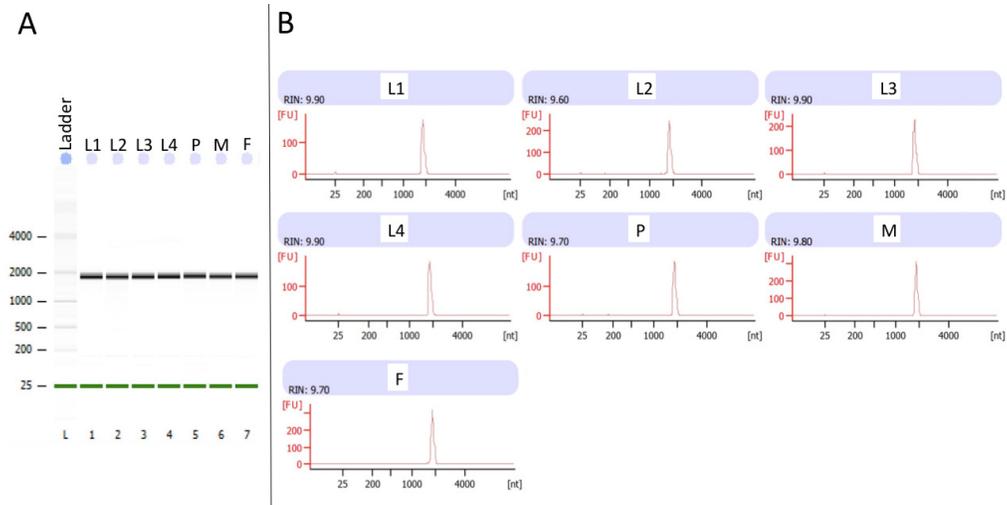


Figura 2: (A) eletroferograma gerado pelo *Bioanalyzer* mostrando a sobreposição das subunidades 28S e 18S em uma única banda com 1900 pb. *Ladder* corresponde ao tamanho do RNA padrão do picochip. (B) picos de distribuição dos fragmentos de RNA com todos os valores RIN acima de 9.5.

Embora existam perfis de RNAr relevantes para vários organismos modelo (Schroeder et al., 2006), ainda existem poucos estudos recentes que avaliem as métricas e os padrões de qualidade para organismos não modelo (Mccarthy et al., 2015). Grande parte das análises de perfis de RNA de insetos documentam a “desnaturação oculta” da subunidade 28S como um perfil aparentemente degradado (DeLeo et al., 2018; Fujiwara; Ishikawa, 1986; Ishikawa; Newburgh, 1972; Winnebeck et al., 2010). Entretanto, com aumento do sequenciamento de diferentes organismos para investigações de RNA nos últimos anos, mais perfis de RNAr de invertebrados foram gerados e sugerem que a desnaturação da subunidade 28S é de fato muito comum (DeLeo et al., 2018; Mccarthy et al., 2015; Winnebeck et al., 2010).

O protocolo otimizado de extração de RNA do BMC será essencial para gerar dados mais robustos acerca do seu transcrito, principalmente pelo detalhamento dos diferentes estádios de desenvolvimento. Os dados gerados a partir desse material viabilizarão o direcionamento de estratégias específicas de controle do inseto, como o silenciamento

de genes via RNAi e marcadores moleculares da resistência a inseticida.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao pesquisador Adriano Veiga da Embrapa Cerrados, por fornecer acesso às plantações de café e por ajudar na coleta de insetos. Trabalho apoiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café - Bolsa CBP & D / Café nº 10.18.20.004.00.00. As bolsas de Eliza F. de Melo Bellard do Nascimento, Luiz Carlos Gonçalves dos Santos, Leonardo A. Vidal e Vívian dos Santos Lucena-Leandro foram financiadas pelo Consórcio Pesquisa Café (Concafé) via Fundação de Apoio à Pesquisa - FUNAPE. A bolsa de Camila Ivo C. Vilarinho Fernandes Junqueira foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Referências

- COSTA, J. N. M., TEIXEIRA, C. A. D., JÚNIOR, J. R. V., ROCHA, R. B., & FERNANDES, C. DE F. **Informações para facilitar a identificação das diferentes fases do bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) em campo**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2012. 4 p.
- DANTAS, J., MOTTA, I.O., VIDAL, L.A., NASCIMENTO, E.F.M.B., BILIO, J., PUPE, J.M., VEIGA, A., CARVALHO, C., LOPES, R.B., ROCHA, T.L., SILVA, L.P., PUJOL-LUZ, J.R., ALBUQUERQUE, É.V.S. A Comprehensive Review of the Coffee Leaf Miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae)—A Major Pest for the Coffee Crop in Brazil and Others Neotropical Countries. *Insects*, v. 12, n. 12, p. 1130, dez. 2021
- DELEO, D. M.; PÉREZ-MORENO, J. L.; VÁZQUEZ-MIRANDA, H.; BRACKENGRISOM, H. D. RNA profile diversity across arthropoda: guidelines, methodological artifacts, and expected outcomes. **Biology Methods and Protocols**, v. 3, n. 1, 2018.
- DIAS, N. P.; CAGLIARI, D.; DOS SANTOS, E. A.; SMAGGHE, G.; JURAT-FUENTES, J. L.; MISHRA, S.; NAVA, D. E.; ZOTTI, M. J. Insecticidal Gene Silencing by RNAi in the Neotropical Region. **Neotropical Entomology**, v. 49, p. 1-11, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13744-019-00722-4>
- FLORELL, S. R.; COFFIN, C. M.; HOLDEN, J. A.; ZIMMERMANN, J. W.; GERWELS, J. W.; SUMMERS, B. K.; JONES, D.A.; LEACHMAN, S. A. Preservation of RNA for Functional Genomic Studies: a multidisciplinary tumor bank protocol. **Modern Pathology**, v. 14, n. 2, p. 116–128, 2001. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880267>
- FUJIWARA, H.; ISHIKAWA, H. Molecular mechanism of introduction of the hidden break into the 28S rRNA of insects: implication based on structural studies. **Nucleic acids research**, v. 14, n. 16, p. 6393–6401, 1986.
- GUÉRIN-MÉNEVILLE, F.-É.; PERROTTET, S. **Mémoire sur un insecte et un champignon qui ravagent les cafiers aux Antilles**. Paris: Bouchard-Huzard, 1842. 40 p.
- HOUSELEY, J.; TOLLERVEY, D. The Many Pathways of RNA Degradation. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 763-776, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.019>.
- ISHIKAWA, H. T.; NEWBURGH, R. W. Studies of the thermal conversion of 28 S RNA of *Galleria mellonella* (L.) to an 18 S product. **Journal of Molecular Biology**, v. 64, n.1, p. 135-144, 1972.
- KAWAHARA, A.Y.; PLOTKIN, D.; ESPELAND, M.; MEUSEMANN, K.; TOUSSAINT, E. F. A.; DONATH, A.; GIMNICH, F.; FRANDSEN, P. B.; ZWICK, A.; REIS, M. DOS; BARBER, J. R.; PETERS, R. S.; LIU, S.; ZHOU, X.; MAYER, C.; PODSIADLOWSKI, L.; STORER, C.; YACK, J. E.; MISOF, B.; BREINHOLT, J. W. Phylogenomics reveals the evolutionary timing and pattern of butterflies and moths. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116,

n. 45, p. 22657–22663, 2019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907847116>.

LEITE, S. A., GUEDES, R. N. C., SANTOS, M. P. DOS, COSTA, D. R. DA, MOREIRA, A. A., MATSUMOTO, S. N., LEMOS, O. L., & CASTELLANI, M. A. Profile of Coffee Crops and Management of the Neotropical Coffee Leaf Miner, *Leucoptera coffeella*. **Sustainability**, v. 12, n. 19, p. 8011, 2020. <https://doi.org/10.3390/su12198011>.

LEITE, S. A.; SANTOS, M. P. DOS; COSTA, D. R. DA; MOREIRA, A. A.; GUEDES, R. N. C.; CASTELLANI, M. A. Time-concentration interplay in insecticide resistance among populations of the Neotropical coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella*. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 23, p. 232–241, 2021. <https://doi.org/10.1111/afe.12425>.

MCCARTHY, S. D.; DUGON, M. M.; POWER, A. M. 'Degraded' RNA profiles in Arthropoda and beyond. **PeerJ**, 2015. p.e1436.

MELEN, G. J.; PESCE, C. G.; ROSSI, M. S.; KORNBLIHTT, A. R. Novel processing in a mammalian nuclear 28S pre-rRNA: tissue-specific elimination of an 'intron' bearing a hidden break site. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 11., p. 3107–3118, 1999.

MITTER, C.; DAVIS, D. R.; CUMMINGS, M. P. Phylogeny and Evolution of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 62, p. 265–283, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035125>.

MOTTA, I.O., DANTAS, J., VIDAL, L., BÍLIO, J., PUJOL-LUZ, J.R., ALBUQUERQUE, É.V.S., The coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae):

identification of the larval instars and description of male and female genitalia. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 65, 27 ago. 2021.

MUELLER, O.; LIGHTFOOT, S.; SCHROEDER, A. RNA integrity number (RIN)—standardization of RNA quality control. **Agilent application note, publication**, v. 1, p. 1-8, 2004.

NEVES, M. F. Análise dos benefícios econômicos e sociais da utilização do Carbofurano no controle de Nematoides, Bicho Mineiro (*Leucoptera coffeella*) e cigarra do cafeeiro (*Quesada gigas* e *Fidicina*). Universidade de São Paulo, 2006. v. 29.

OGINO, K.; EDA-FUJIWARA, H.; FUJIWARA, H.; ISHIKAWA, H. What causes the aphid 28S rRNA to lack the hidden break? **Journal of molecular evolution**, v. 30, p. 509–51, 1990.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring: Cold Spring Harbor, 2001. 3 v.

SAWINSKA, Z.; ŚWITEK, S.; GŁOWICKA-WOŁOSZYN, R.; KOWALCZEWSKI, P. Ł. Agricultural practice in Poland before and after mandatory IPM implementation by the European Union. **Sustainability**, v. 12, n. 3, p. 1107, 2020. <https://doi.org/10.3390/su12031107>.

SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC**

molecular biology, v. 7, n. 3, p.1–14, 2006

SOUZA, J. C. DE; REIS, P. R.; RIGITANO, R. L. DE O.; CIOCIOLA JÚNIOR, A. I. Eficiência de thiamethoxam no controle do bicho-mineiro do cafeeiro. II - Influência na época de aplicação via irrigação por gotejamento. **Coffee Science**, v.1, n. 2, p.150-155, 2006.

SOUZA, J. C. de; REIS, P. R.; RIGITANO, R. L. de O. **Bicho-mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado**. 2.ed. rev. aum. Belo Horizonte: EPAMIG, 1998. 48 p. (EPAMIG. Boletim Técnico, 54).

WINNEBECK, E. C.; MILLAR, C. D.; WARMAN, G. R. Why does insect RNA look degraded? **Journal of Insect Science**, v. 10. n. 159, 2010.

WOLCOTT, G. N. A quintessence of sensitivity: the coffee leaf-miner. **The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 31., n. 3, p. 215–219, 1947. <https://doi.org/10.46429/jaupr.v31i3.12848>.

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF Fone: +55 (61) 3448-470
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br www.embrapa.br/fale-conosco/sac Comitê Local de Publicações da Unidade Responsável

Presidente
Wagner Alexandre Lucena
Secretária-Executiva
Daniela Aguiar de Souza
Membros
Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes;
Andrielle Camara Amaral Lopes; Bruno Machado Teles Walter; Daniela Aguiar de Souza; Debora Pires Paula; Edson Junqueira Leite; Márcio Martinello Sanches; Marcos Aparecido Gimenes; Solange Carvalho Barrios
Roveri Jose
Supervisão editorial
Daniela Aguiar de Souza
Revisão de texto
Jakcelia Costa da Silva
Normalização bibliográfica
Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes
Tratamento das ilustrações
Marcus Vinicius Pereira e Souza
Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro
Editoração eletrônica
Marcus Vinicius Pereira e Souza
Foto da capa
Leonardo A. Vidal
1ª edição
1ª impressão (2021): tiragem

Embrapa

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



**PÁTRIA AMADA
BRASIL**
GOVERNO FEDERAL