



X CONNEPI

X Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação

ANÁLISE DO SISTEMA REPRODUTIVO DE *Bertholletia excelsa*

ESTEFANNY CASTRO DE SOUZA¹, VALÉRIA RIGAMONTE AZEVEDO², LUCIA HELENA DE OLIVEIRA WADT³, TATIANA DE CAMPOS⁴

¹Discente de Agronomia – UFAC. Bolsista PIBIC/CNPq. e-mail: estefannycastro@gmail.com

²Professora de Biologia – IFAC, Estudante de Doutorado pela Rede Bionorte

³Pesquisadora – Embrapa Rondônia

⁴Pesquisadora – Embrapa Acre

1 **RESUMO:** A espécie *Bertholletia excelsa*, conhecida popularmente por castanheira ou Brazil
2 nut é uma árvore símbolo da região amazônica devido a sua importância social, ecológica e
3 econômica, pois fornece a castanha-da-Amazônia, um dos principais produtos do extrativismo
4 florestal. Estudos de diversidade genética, fluxo gênico, sistema de cruzamento e estrutura
5 genética espacial são passos importantes para a preservação e manejo sustentável. Assim, o
6 estudo propôs obter a taxa de cruzamento na espécie. Foram selecionadas duas matrizes no
7 seringal Cachoeira, localizado no município de Xapuri no estado do Acre. Destas matrizes, 40
8 sementes foram coletadas e submetidas a germinação para produção de plântulas. Foram
9 coletadas folhas de nove e quinze plântulas para cada matriz. A partir das folhas e câmbio
10 vascular, realizou-se extração de DNA. O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose
11 (0,8%) utilizando o marcador DNA Mass Ladder. Os géis foram fotografados sob luz
12 ultravioleta. A reação de amplificação utilizou cinco locos: Bes 19, Bex 37, Bex 22, Bex 27,
13 Bes 18. Os produtos de amplificação foram verificados em eletroforese. A genotipagem foi
14 feita em géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata. As taxas de cruzamento
15 multilocus (tm) apresentaram alogamia completa com valor de 1,2. Os resultados deste
16 trabalho corroboram outros realizados, indicando um sistema de cruzamento
17 predominantemente alógamo, com indicativo de auto-incompatibilidade. A taxa de
18 cruzamento uniloco (ts) foi 1,0, indicando a taxa de reprodução cruzada entre indivíduos
19 aparentados. Assim, os marcadores utilizados foram polimórficos e eficientes para estimar o
20 parâmetro de taxa de cruzamento nas famílias estudadas.

21 **Palavras-chave:** Castanheira, taxa de cruzamento, alogamia, auto-incompatibilidade.

ANALYSIS OF REPRODUCTIVE SYSTEM *Bertholletia excelsa*

26 **ABSTRACT:** The *Bertholletia excelsa* species, acknowledged as Brazil nut tree, it is a
27 symbol of the Amazon region due your ecological, and social, and economic importance then



X CONNEPI

X Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação

28 it provides the Brazil nut, the major producer of forest extraction. Studies of genetic diversity,
29 the gene flow, crossing system and spatial genetic structure are important steps to
30 preservation and sustainable management. Thereby, this present study has aimed to get the
31 crossing rate in this species. Were selected two arrays not plantation in the Seringal
32 Cachoeira, located in Xapuri city in Acre state, Brazil. Forty seeds were collected from that
33 two arrays tree and submitted to germination, they sprouted originating small plants. From the
34 first array tree were collected leaves of the nine plants, and fifteen plants of the other array
35 tree. The DNA extraction were take by the leaf and tree stem. The DNA extracted was
36 quantified by agarose gel (0.8%) using the DNA Mass Ladder marker. The gels were
37 photographed by ultraviolet light. The amplification reaction utilized five loci: Bes 19, Bex
38 37, 22 Bex, Bex 27, Bes 18. The amplification products were observed by electrophoresis.
39 Genotyping was performed in polyacrylamide gels stained with silver nitrate. Where crossing
40 rates multilocus (tm) showed complete allogamy with value 1.2. The results in this work
41 corroborate with another works done, indicating a predominantly allogamy crossing system
42 indicative of self-incompatibility. A single locus crossing rate (TS) was 1.0, indicating a cross
43 rate among relative individuals. Thus, the markers used were polymorphic and efficient to
44 estimate the crossing rate parameters in this families studied.

45

46 KEYWORDS: Brazil nut, crossing rate, allogamy, self-incompatibility.

47

48

49 INTRODUÇÃO

50 Dentre as espécies encontradas na região amazônica, destaca-se a castanheira-do-brasil
51 (*Bertholletia excelsa*). É considerada uma das mais importantes espécies de exploração
52 extrativista, possuindo sementes com alto valor nutricional e comercial. Seus frutos são
53 utilizados em artesanato e sua madeira pode ser empregada na construção civil e naval, em
54 forros, paredes e assoalhos. A espécie passou a constituir o principal produto extrativista para
55 exportação na Região Norte do Brasil após a decadência da exploração e comércio da
56 borracha extraída de seringueiras (LORENZI, 2002; VIEIRA et al., 2009). O extrativismo da
57 castanha é considerado uma atividade estratégica na conservação da Amazônia por conciliar o
58 uso econômico das florestas e a manutenção da biodiversidade. Para a geração de renda, via
59 produto florestal não madeireiro (PFNM) de florestas nativas, é necessário conciliar
60 produtividade versus sustentabilidade ecológica da espécie. A renda gerada pelo extrativismo
61 beneficia muitos municípios e comunidades, como assentamentos de reforma agrária,
62 indígenas e famílias que exploram as reservas extrativistas. O valor da produção nacional da
63 extração da castanha-do-brasil ficou em torno de R\$18,6 milhões no ano de 2000 e, em 2008,
64 esse valor superou o montante de R\$45,7 milhões. A região Norte foi responsável pela maior
65 parte desta arrecadação, com R\$42,9 milhões, sendo o estado do Acre o maior produtor
66 (37,4% da produção nacional). O sucesso de qualquer programa de pré-melhoramento ou de
67 conservação depende do conhecimento da quantidade de variação presente na espécie de



X CONNEPI

X Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação

68 interesse. Estudos genéticos com castanheira ainda são pouco descritos, mas alguns trabalhos
69 mostraram o grande potencial genético da espécie que ainda necessita ser explorado
70 (KANASHIRO et al., 1997; SERRA et al., 2006; REIS et al., 2009).

71 A exploração de exemplares nativos desta espécie é protegida por lei (Decreto 1282 de 19 de
72 outubro de 1994), mas não impede seu plantio com a finalidade de reflorestamento, tanto em
73 monocultivos quanto em sistemas consorciados. Dessa forma, para que a castanheira seja
74 explorada de forma sustentável é importante localizar os maciços da espécie para viabilizar a
75 conservação dos mesmos, além de conhecer a distribuição da variabilidade genética para sua
76 conservação e utilização nos futuros programas de melhoramento genético (SERRA et al.,
77 2006). Poucos trabalhos na área de melhoramento genético da *B. excelsa* estão sendo
78 realizados, sendo que os plantios comerciais da castanheira são formados por clones que
79 vieram de seleção de matrizes para alta produtividade dos castanhais e vêm sendo clonados
80 em campos de prova (MÜLLER et al., 1995). Diante do exposto, são necessárias ações que
81 visem à conservação e caracterização da diversidade genética da espécie, uma vez que existe
82 um grande potencial de exploração da cultura, seja de forma extrativista, em monocultivo ou
83 em sistemas integrados agrossilvipastorais. Assim, o presente estudo propõe estimar a taxa de
84 cruzamento na espécie no estado do Acre. Os resultados obtidos serão importantes para
85 embasar futuras estratégias de preservação da espécie e garantir sua exploração econômica e
86 sustentável. Estimar a diversidade genética, o fluxo gênico, o sistema de cruzamento e a
87 estrutura genética espacial de espécies ameaçadas e exploradas são passos importantes para a
88 conservação e manejo sustentável. O uso de marcadores moleculares, como os
89 microssatélites, representa uma ferramenta importante para as análises genéticas que visam
90 obter critérios e indicadores práticos da sustentabilidade genética do manejo florestal e têm
91 sido utilizados com muita freqüência em estudos com o objetivo de fornecer subsídios aos
92 programas de conservação.

93

94

95 MATERIAL E MÉTODOS

96 Foram selecionadas duas matrizes no seringal Cachoeira, localizado no município de
97 Xapuri no estado do Acre. Destas matrizes, 40 sementes foram coletadas e submetidas a
98 germinação para produção de plântulas (Figura 1). Para análise da taxa de cruzamento foram
99 avaliadas as progêniés de cada matriz, em que amostras foliares foram coletadas de 15 plantas
100 por matriz, desidratadas em liofilizador e armazenadas em freezer (-20°C) para posterior
101 extração de DNA.

102 As amostras de tecido cambial foram obtidas e imediatamente após a coleta, as amostras
103 foram imersas em microtubos contendo 1,0 ml de tampão de transporte (30% de tampão de
104 extração CTAB a 2%: 70% Etanol) e levadas para o Laboratório de Morfogênese e Biologia
105 Molecular (LABMOL) da Embrapa Acre onde serão armazenadas a -20°C para posterior
106 extração de DNA.

107 O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose (1%) utilizando o marcador DNA Mass
108 Ladder. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, e o DNA diluído para 2,5 ng/µL
109 (Figura 2). Para a reação de amplificação (Polymerase Chain Reaction – PCR) foram



X CONNEPI

X Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação

utilizados cinco locos microssatélites desenvolvidos por Reis et al (2009): Bes 19, Bex 37, Bex 22, Bex 27, Bes 18.

As amplificações foram feitas em um termociclador MJ 96+ da Biocycler de acordo com as condições descritas por Don et al. (1991). Os produtos de amplificação com volume final de 13 μl foram migrados em eletroforese em gel de poliacrilamida (5%) (Figura 3) a 80 W. Após a corrida utilizou-se o procedimento de coloração com nitrato de prata, seguindo-se protocolo de Creste et al. 2001.

O sistema de reprodução foi avaliado a partir do modelo misto e do modelo correlacionado usando o programa MLTR 3.4 (RITLAND, 2002), onde foram estimados os seguintes parâmetros: taxa de cruzamento multiloco (t_m), taxa de cruzamento uniloco (t_s), taxa de autofecundação ($s = 1 - t_m$), taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ($\hat{t}_m - t_s$), correlação de paternidade multiloco ($r_{p(m)}$) e correlação de autofecundação (r_s).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de cruzamento multiloco (t_m) identificou alogamia completa, com valor de 1,2. Estimativas da taxa de cruzamento maiores que 1,0 são interpretadas como 100% de cruzamento e não deve ser considerado seu valor nominal. A taxa de cruzamento uniloco (t_s) foi 1,0, indicando a taxa de reprodução cruzada entre indivíduos não aparentados e um sistema de cruzamento predominantemente alógamo.

Poucos são os trabalhos que estimaram a taxa de cruzamento em *Bertholletia excelsa* sendo encontrados apenas três estudos (O'MALLEY et al., 1988; PARDO, 2001; SILVA, 2014). Os resultados do presente trabalho corroboram com SILVA (2014) que encontrou valores superiores de t_m (0,97, 1,11 e 1,2) estimados para uma população nativa de castanheiras, um remanescente em pastagem e um plantio de castanheiras, respectivamente. Desta forma, as altas taxas de cruzamentos observadas neste estudo podem estar associadas à mecanismos de auto-incompatibilidade conforme já citado por O'Malley et al. (1988), Pardo (2001) e Silva (2014) em seus trabalhos.

Os locos foram polimórficos. Para espécies arbóreas espera-se a predominância de alogamia. Assim, os marcadores utilizados foram polimórficos e eficientes para estimar o parâmetro de taxa de cruzamento nas famílias estudadas.

139

CONCLUSÕES

141

142 Os marcadores utilizados apresentaram-se polimórficos e eficientes para estimar o parâmetro de taxa
143 de cruzamento nas famílias de *B. excelsa* estudadas. As taxas de cruzamento encontradas foram altas
144 sugerindo a auto-incompatibilidade.

145

REFERÊNCIAS

147

148 CRESTES, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat
149 polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular
150 Biology Reporter**, Heidelberg, v.19, p 299-306, 2001.



X CONNEPI

X Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação

- 151
152 DON R.H., COX, P.T., WAINWRIGHT, B.J., BAKER, K.; MATTICK, J.S. Touchdown PCR to
153 circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, n. 19, 4008, 1991.
154
155 KANASHIRO M, HARRIS MS, SIMONS. A RAPD Diversity in Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*
156 HUMB. and BONPL., Lecythidaceae) *Silvae Genetica* v.46, n.4, 1997.
157
158 LORENZI A. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil. 4.
159 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v.1. 2002.
160
161 MÜLLER CH, FIGUEIRÊDO FJC, KATO AK, CARVALHO JEU, STEIN RLB, SILVA AB. A
162 cultura da castanha-do-brasil. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, centro de Pesquisa
163 Agroflorestal da Amazônia Oriental, Coleção Plantar, 23, 65p. 1995.
164
165 O'MALLEY, D.M., BUCKLEY, D.P., PRANCE, G.T.; BAWA, K. S. Genetics of Brazil Nut
166 (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, v. 76, p.
167 929-932. 1988.
168
169 PARDO, M. **Estrutura Genética de Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) em Floresta**
170 **e em Pastagens no Leste do Estado do Acre.** Dissertação de Mestrado. Piracicaba, SP. 2001
171
172 REIS AMM, BRAGA AC, LEMES MR, GRIBEL R, COLLEVATTI RG. Development and
173 characterization of microsatellite markers for the Brazil nut tree *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.
174 (Lecythidaceae). *Molecular Ecology Resources*, v.9, n.3, p.920-923, 2009.
175
176 RITLAND, K. Estimation of gene frequency and heterozygosity from pooled samples. *Mol Ecol*
177 Notes n. 78 p.370–372, 2002.
178
179 SERRA AGP, PAIVA R, PAIVA E, NOGUEIRA RC, SOARES FP, PAIVA PDO. Estudo da
180 divergência genética em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) utilizando marcadores
181 moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). *Magistra*, Cruz das Almas-BA, v.18, n.1,
182 p.42-47 jan/mar, 2006.
183
184 VIEIRA AH, BENTES-GAMA MM, ROCHA RB, LOCATELLI M, OLIVEIRA AC. Fenologia
185 reprodutiva de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. Bompl.), em Porto Velho, RO.
186 Embrapa Rondônia Porto Velho, RO, – Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Rondônia,
187 13 p. 2009.