



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

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

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

ANALYSIS OF REPRODUCTIVE SYSTEM *Bertholletia excelsa*

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

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

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

INTRODUÇÃO

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

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

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

MATERIAL E MÉTODOS

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

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

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

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 (\hat{t}_m), taxa de cruzamento uniloco (\hat{t}_s), taxa de autofecundação ($s = 1 - \hat{t}_m$), taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$), correlação de paternidade multiloco ($\hat{r}_{p(m)}$) e correlação de autofecundação (\hat{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.

CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS

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



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