

Simpósio SILVICULTURA NA AMAZÔNIA ORIENTAL: CONTRIBUIÇÕES DO PROJETO EMBRAPA/DFID

**R
E
S
U
M
O
S

E
X
P
A
N
D
I
D
O
S**



Resumos expandidos...

1999

PC - 2005.00330

fevereiro de 1999
- Pará



30939-1

00330

SIMPÓSIO

SILVICULTURA NA AMAZÔNIA ORIENTAL:

Contribuições do Projeto Embrapa/DFID

Belém, PA, 23 a 25 de fevereiro de 1999

Resumos Expandidos



**Belém – Pará – Brasil
1999**

DIVERSIDADE DE RAPD EM CASTANHA DO BRASIL (*Bertholletia excelsa* HUMB. AND BONPL., LECYTHIDACEAE)¹

Milton Kanashiro², Stephen A. Harris³, & Anthony Simons⁴

A variação genética em populações naturais é um recurso para a sobrevivência e a futura evolução da espécie, assim como pode ser utilizado para melhorar a sua produtividade (Frankel et al., 1995). Portanto, entender a diversidade genética e as mudanças na diversidade são essenciais para o efetivo manejo de uma espécie (Millar and Westfall, 1992; Savolainen and Kaerkkäinen, 1992).

A castanha-do-brasil, castanha-do-pará, ou simplesmente castanheira (*Bertholletia excelsa*), é uma árvore grande porte, chegando a atingir até 50 metros de altura, distribuída na floresta de terra firme das Guianas, Amazonia Colombiana, Venezuela, Peru, Bolívia e Brasil (Mori e Prance, 1990). Ao longo desta distribuição, as densidades podem ser baixas, de 1 a 6 árvores por hectare, ou tão altas, de 5 a 20 árvores por hectare (Sanchez, 1973). As flores de castanheira são visitadas e supostamente polinizadas por uma variedade de abelhas de grande porte, como *Bombus*, *Centris* e *Xylocopa* (Nelson et al. 1985). A evidência disponível é de que a castanheira é fecundação cruzada intensa, contudo, podendo ocorrer um significativo baixo nível de autofecundação (O'Malley et al. 1988). As sementes estão alojadas num grande fruto indeiscente e aparentemente dispersadas por agoutis (*Dasyprocta* spp.), um roedor comum do neotrópico (Huber, 1910). A espécie é conhecida principalmente pela sua produção de castanhas, mas recentemente tem sido indicada como uma espécie promissora para a produção de madeira em plantios a pleno aberto (Kanashiro, 1992).

Os estudos de variabilidade genética das espécies têm sido baseados em padrões de variação de genética quantitativa, e com o advento dos marcadores moleculares e bioquímicos. Essas técnicas têm contribuído muito

¹ [Resumo do artigo "RAPD Diversity in Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl., Lecythidaceae), publicado em *Sivae Genetica*, v. 46, n. 4, p. 219-223, 1997], Trabalho desenvolvido com o apoio financeiro do Convênio Embrapa Amazônia Oriental/DFID.

² Eng. Ftal., Ph.D., Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66.017-970, Belém, Pa.

³ Depto. Plant Sciences, University of Oxford. South Parks Road. Oxford.OX1 3RB, Reino Unido.

⁴ International Centre for Research in Agroforestry- ICRAF, P.O.Box 30677, Nairobi, Kenia

para o acesso à diversidade genética das populações naturais. No caso de espécies tropicais madeireiras, especialmente onde o sistema de acasalamento não é bem entendido, testar a potencialidade das espécies e a caracterização dos sistemas reprodutivos, e estudos de procedências são de muita importância, e o uso de marcadores genéticos podem ser usados como parte do programa de pesquisa (Haines, 1994). Entre essas técnicas está o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD). Esta técnica envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma utilizando "primers" de sequência arbitrária (Ferreira e Grattapaglia, 1996). O objetivo deste estudo é entender a distribuição da diversidade genética entre cinco procedências de castanha-do-brasil, amostradas na Amazônia.

Folhas bem desenvolvidas foram coletadas de um ensaio de procedências estabelecido em 1982, no Campo Experimental de Belterra (30 km ao sul de Santarém, Pará), e composto de cinco procedências de *Bertholletia excelsa* (Tabela 1). O material foi coletado e colocado em sacos de plástico e secos com sílica gel (Chase and Hills, 1991) e mantidos em temperatura ambiente até ser levado ao laboratório, e estocado a -20°C .

A coleta de sementes, no período do estabelecimento do ensaio, variou de procedência para procedência devido a dificuldades de se chegar a muitas populações em seus habitats naturais. A procedência de Santarém e Rio Branco foram coletadas de árvores individuais, enquanto que as procedências de Alenquer e Altamira foram amostradas de exemplares maiores no mercado local. A procedência de Marabá foi amostrada de um local onde recebia as castanhas de outros pontos próximos.

O DNA intacto foi extraído do material seco de plantas individuais seguindo o protocolo, modificado de Doyle e Doyle, (1987). Os procedimentos de extração estão descritos no texto original. Inicialmente na seleção do material, foram testados 40 primers sintéticos (OPB-01 a OPB-20; OPE-01 a OPE-20), adquiridos da Operon Technologies Inc. Desses 40, foram escolhidos oito primers, para a análise completa baseado na facilidade de amplificação (procedimentos no texto original) e resolução dos produtos. Todos os conjuntos de amplificação continham um controle. Fragmentos amplificados foram posteriormente separados em gel de agarose a 2%, e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta (UV), e fotografados com uma câmara Polaróide 667, e posteriormente "lidos". Aproximadamente metade das amplificações foram repetidas duas vezes para checar a estabilidade da amplificação dos produtos.

TABELA 1. Locais e diversidade fenotípica de RAPD (H_{pop}) de cinco procedências de *B. excelsa*

Pop. N°.	Procedências	Lat. (S)	Long. (W)	H_{pop}
1	Alenquer, Pa	01 55'	54 46'	7,88
2	Altamira, Pa	03 32'	52 14'	6,53
3	Marabá, PA	05 22'	49 06'	7,29
4	Rio Branco, AC	10 00'	67 47'	5,97
5	Santarém, Pa	02 32'	54 45'	8.69

$H_{pop} = 7,272$; $H_{sp} = 10,58$; $(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp} = 0,313$; $H_{pop} / H_{sp} = 0,687$

Os dados de RAPD foram registrados como presença (1), e ausência (0) de amplificação de produtos, não sendo considerada a intensidade dos mesmos. A similaridade entre os acessos (procedências) foi calculada usando o coeficiente de similaridade assimétrica de Jaccard, $J_{xy} = C_{xy} / (n_x + n_y - C_{xy})$, onde C_{xy} é o número de positivos “matches” entre dois indivíduos, n_x é o número de produtos encontrados na acesso X, e n_y é o número encontrado no acesso Y (Jaccard, 1908); Lynch, 1990). Valores na matrix de similaridade foram agrupados usando a análise de média de grupos de pares não-balanceados (UPGMA; (Sneath and Sokal, 1973)) e analisados usando análise de coordenada principal. Análises de Similaridade, coordenada principal e de agrupamentos foram conduzidas usando o “pacote” de R. A medida de SHANNON’s ($H = -\sum p_i \log_2 p_i$, onde p_i é a frequência do i th produto RAPD) foi usada para obter uma estimativa da diversidade fenotípica do RAPD em cada população, e a partição da diversidade entre populações (King and Schaal, 1989; Lewontin 1972)

Foram analisados quanto à variação em 47 produtos, cem indivíduos de *B. excelsa*, de cinco procedências. Assumindo que cada produto de RAPD representa um único *loco*, todos os *loci* são polimórficos, à exceção de 6 (12.8% OPB-15-A; OPB-15-C; OPB 15-E; OPB-17-B; OPB-20-C; OPE-03-A). A frequência dos produtos variaram entre 0 (ausência) e 1 (monomórfico) com 49% da frequência maior que 0.801, e somente 25.6% da frequência é menor que 0.601. O número médio de produtos por procedência variou entre 35 (Marabá) e 41 (Santarém: média de todas as procedências = 38.6. Sete produtos estão restritos a indivíduos das populações: Altamira (OPB-11-H;

OPE-03-A); Marabá (OPB-20-C); Santarém (OPB-11-E; OPB-18-K; OPB-18-G).

Estimativas da média fenotípicas de Shannon's variaram entre 5.966 (Rio Branco) e 8.686 (Santarém) para cada população e 10.580 por espécie (Tabela 1). Adicionalmente, a medida de diversidade fenotípica de SHANNON's, foi utilizada para a partição da diversidade dos componentes dentro e entre procedências (Tabela 1). Uma análise da proporção de diversidade presente dentro de procedências (H_{pop} / H_{sp}) e entre procedências [$(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$] indicou que em média 68,7% da variação ocorreu dentro de procedências (Tabela 1) e somente 31,3% foram observados entre as procedências.

Os índices de similaridade de Jaccard's revelaram que dentro das procedências esses índices variaram entre 0.734 (Santarém) e 0.854 (Altamira), enquanto que, entre procedências, as estimativas de similaridades estão representadas na Fig. 1. As procedências de Alenquer, Altamira, Marabá se agrupam formando um grupo discreto, que correlaciona com a distribuição geográfica das populações. Contudo a procedência de Santarém, que é geograficamente próxima destas. Os índices são bastante distintos, apresentando uma similaridade maior com a procedência de Rio Branco, que é geograficamente distante.

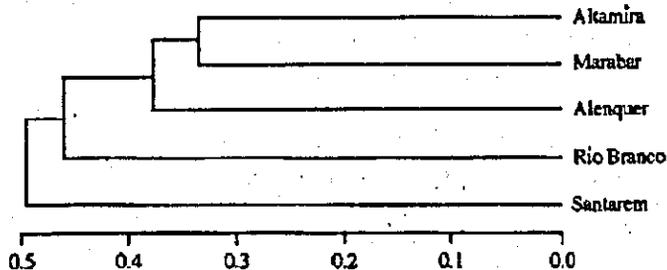


Fig. 1. Agrupamentos UPGMA de cinco procedências de *Bertholletia excelsa* baseados nas medidas de similaridade de Jaccard.

Bertholletia um gênero monoespecífico, é aparentemente mais próximo relacionado com algumas espécies do gênero *Lecythis*, como exemplo *L. lurida*. Contudo diferenciação entre ambos é tão grande que a hibridação provavelmente não é possível (Mori and Prance, 1990). O entendimento do nível de variação genética e da distribuição desta variação em *B. excelsa* é, portanto, crucial. Duas observações principais podem ser

reportadas: (i) a maioria da variação está distribuída dentro de procedências e (ii) o agrupamento de procedências independe da localização geográfica.

A partição da variação do RAPD em *Bertholletia excelsa* onde 68,7% da variação está distribuída dentro de procedências, coincide com um estudo prévio utilizando isoenzimas como marcadores. A variação genética para duas populações distantes de aproximadamente 150 km foram encontrados valores de $D_{st}=0.0375$ (Buckley et al. 1988), embora estes resultados tenham sido criticados parcialmente por Mori e Prance (1990) devido o tamanho da amostragem e as possibilidades dessas populações terem sido originadas de intervenções Ameríndias. O presente estudo, embora aumente o número de populações amostradas e também a faixa geográfica de ocorrência tanto em latitude quanto em longitude (populações distanciando -se de 60 a 2.100 km), a maioria da variação observada está contida também nas procedências.

Com relação aos agrupamentos entre as procedências, enquanto parte deste agrupamento pode estar associado a questões de amostragem das populações no momento da instalação do ensaio, isto não pode explicar totalmente o padrão observado. Embora, as populações de Santarém e Alenquer estejam relativamente próximas geograficamente (c. 60 km), elas são distantes baseadas nos dados apresentados por RAPD. Por outro lado, Santarém e Rio Branco são opostos, baseando-se nos resultados de diversidade de RAPD, e representam, respectivamente, o maior e o menor índices de desenvolvimento silvicultural aos 12 anos (Kanashiro, 1992).

Embora não possa ser dito que no geral os níveis de variação na espécie são altos, comparados com outras espécies da floresta tropical úmida, foi demonstrado a importância de acessar a variação ao longo da faixa de ocorrência da espécie.

Referências Bibliográficas

- BUCKLEY, D. P.; O'MALLEY, D.; APSIT, V.; PRANCE, G. T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HUMB. & BOPL.: Lecythidaceae). 1. Genetic variation in natural populations. *Theoretical Applied Genetics*, v. 76, p. 923-928. 1988.
- CHASE, M. W.; HILLS, H.H.: Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon*, v. 40, p. 215-220, 1991.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p. 11-15, 1987.

- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1996. 220p.
- FRANKEL, O.H.; BROWN, A. H.; BURDON, J. J. The conservation of plant biodiversity. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- HAINES, R. Biotechnology in forest tree improvement. Rome: FAO, 1994.
- HUBER, J. Matas e madeiras amazônicas. Boletim do Museu Paraense de História Natural, v. 6, p.91-226, 1910.
- JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat., v.44, p.223-270, 1908.
- KANASHIRO, M. Genética e melhoramento de essências florestais nativas: aspectos conceituais e práticos. Revista do Instituto Florestal, v. 4, p.1168-1178, 1992
- KING, L.M.; SCHAAL, B. A Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evolution*, v. 43, p. 1117-1119, 1989.
- LEWONTIN, R. The apportionment of human diversity. Evolution Biology, v.6, p. 381-398, 1972.
- LYNCH, M. The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology Evolution*, v. 7, p. 478-484, 1990.
- MILLAR, C. I.; WESTFALL, R.D. Allozyme markers in forest genetic conservation. New Forests, v. 6, p. 347-371, 1992.
- MORI, S. A.; PRANCE, G.T. Taxonomy, ecology, and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) HUMB. & BONPL.: Lecythidaceae. *Advanced Economic Botany*, v. 8, p. 130-150, 1990.
- NELSON, B. W.; ABSY, M. L.; BARBOSA, E. M.; PRANCE, G. T. Observations of flower visitors to *Bertholletia excelsa* H.B. K. e *Couratari tenuicarpa* A. C. Sm. (Lecythidaceae). Acta Amazônica, n.15, p. 225-234, 1985. Suplemento.
- O'MALLEY, D.; BUCKLEY, D. P.; PRANCE, G. T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HUMB. & BOPL.: Lecythidaceae). 2. Mating System. *Theory Applied Genetics*, v. 76, p. 929-932, 1988.
- SANCHEZ, J. S. Explotación y comercialización de la castaña en Madre Dios. Lima: Ministério de Agricultura, Dirección General de Forestal y Caza. 1973.

SAVOLAINEN, O.; KAERKKEINEN, K. Effect of forest management on gene pools. New Forests, v. 6, p. 329-345, 1992.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R.R. Numerical taxonomy. San Francisco: Freeman, 1973.