

HAROLDO SILVA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, MORFOLÓGICA E AGRONÔMICA DE
GERMOPLASMA DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.) NO ESTADO DO
AMAZONAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

HAROLDO SILVA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, MORFOLÓGICA E AGRONÔMICA DE
GERMOPLASMA DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.) NO ESTADO DO
AMAZONAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de julho de 2013.

Maria Teresa Gomes Lopes
(Coorientadora)

Jacqueline Siqueira Glasenapp

Alúzio Borém de Oliveira
(Orientador)

À DEUS,

Aos meus pais Manoel José Lobato Rodrigues e Selma Silva Pantoja Lobato, irmãos Humberto Silva Rodrigues e Manoel Teixeira Rodrigues Neto, família e amigos, os quais me incentivaram e me deram força para concluir mais este projeto de vida.

DEDICO.

“Não acreditem em nada só porque lhes foi dito. Não acreditem na tradição apenas porque foi passada de geração em geração. Não acreditem em nada só porque está escrito nos seus livros sagrados. Não acreditem em nada apenas por respeito à autoridade de seus mestres. Mas qualquer coisa que, depois do devido exame e análise, vocês achem que leva ao bem, ao benefício e ao bem-estar de todos os seres - nesta doutrina creiam e aferrem-se a ela e a tomem como guia.”

Buda

“Corte sua própria lenha. Assim ela aquecerá você duas vezes.”

Henry Ford

“Não basta saber, é preciso também aplicar; Não basta querer, é preciso também agir.”

Goethe

“Algo só é impossível até que alguém duvide e prove o contrário. A maioria de nós prefere olhar para fora e não para dentro de si mesmo.”

Albert Einstein

“Ciência sem religião é manca. Religião sem ciência é cega.”

Albert Einstein

“Nenhum espelho reflete melhor a imagem do homem do que suas palavras.”

Juan Luis Vives

“Somos o que pensamos. Tudo o que somos surge com nossos pensamentos. Como
nossos pensamentos, fazemos nosso mundo.”

Buda

“Seja você a mudança que espera ver no mundo.”

Gandhi

“Tentem aprender algo sobre tudo e tudo sobre algo.”

Thomas Henry Huxley

“Escolha um trabalho que ames e não terás que trabalhar um único dia de sua vida.”

Confúcio

“Escrevam algo que valha a pena ler ou façam algo que valha a pena escrever.”

Benjamin Franklin

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

A DEUS por sempre me dar forças e iluminar o meu caminho.

Aos meus pais Manoel José Lobato Rodrigues e Selma Silva Pantoja Lobato pelo amor e apoio infinitos.

Aos meus irmãos Humberto e Manoel.

À Universidade Federal de Viçosa – UFV, professores, funcionários e amigos.

À EMBRAPA Amazônia Ocidental, todos os funcionários e amigos.

Ao Prof. Aluizio Borém pela orientação, apoio, amizade e ensinamentos.

Aos meus co-orientadores Dra. Maria Tereza Gomes Lopes e Francisco Célio Chaves, pelos ensinamentos e orientações durante o curso e pelo apoio na realização deste experimento. Obrigado!

Ao professor Cosme Damião Cruz por todo apoio e amizade dado ao longo do trabalho e do curso.

Aos melhoristas da Embrapa, em especial ao Doutor Francisco Célio Maia Chaves, pelo apoio, sugestões e amizade.

Aos colegas de laboratório, estagiários, funcionários da Embrapa e amigos (Adriana, André, Carlos ...) pelo apoio técnico e amizade.

Aos colegas e amigos do laboratório de bioinformática Rafael, Caio, Vinícius, Gislâyne, João, Angélica, Jacqueline, Dani, Digner, Filipe, Luiza, Marciane, Livia e Gabi.

Aos grandes amigos do Programa Soja – UFV, em especial Amilton, Francisco, André, Joana, Yuri e Lucas pelos momentos de descontração e muito trabalho na casa de vegetação na UFV.

Aos queridos amigos de república, Otávio, Amilton e Dona Elena.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para o sucesso deste trabalho.

OBRIGADO.

BIOGRAFIA

HAROLDO SILVA RODRIGUES, filho de Manoel José Lobato Rodrigues e Selma Silva Pantoja Lobato, nascido em 28 de maio de 1986, em Parintins, no estado do Amazonas.

Cursou o ensino fundamental e médio na rede pública na cidade de Parintins/AM, em 2004 iniciou a graduação em Engenharia Agrônômica/Bacharelado, na Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

Em 2006 iniciou como bolsista de iniciação científica pelo CNPq trabalhando com “INFLUÊNCIA DA DISPOSIÇÃO DOS TUBETES E DA APLICAÇÃO DE FERTILIZANTES DE LIBERAÇÃO LENTA, DURANTE O PRÉ-VIVEIRO, NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* JACQ.)”, sob orientação do Dr. Paulo Cesar Teixeira, na EMBRAPA Amazonia Ocidental, onde permaneceu por um ano.

Em 2008 participou do programa de extensão universitária da University of Minnesota em Minnesota/EUA, onde trabalhou na área de fruticultura, atuando ativamente no sistema de produção de cerejas em Traverse City – MI, pelo período de oito meses.

Em 2010 foi bolsista de iniciação científica pelo CNPq, no Instituto de Pesquisa da Amazônia/INPA, onde realizou o trabalho “AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS ESTIRPES DE RIZÓBIOS DA COLEÇÃO DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO DO INPA-CPCA”, sob orientação do Dr. Luiz Augusto Gomes de Souza.

Em agosto de 2010 iniciou o projeto de conclusão de curso na EMBRAPA Amazônia Ocidental, sob orientação da Dr. Maria Tereza Gomes Lopes, trabalhando com “CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PROGÊNIES DE PUPUNHEIRA PARA PRODUÇÃO DE PALMITO NO ESTADO DO AMAZONAS”, monografia aprovada em 22 de fevereiro de 2011.

Em julho de 2011 foi selecionado pelo programa de Pós-Graduação, Mestrado *Stricto Sensu*, em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa. Sob orientação do professor Aluizio Borém, realizou seus experimentos na Embrapa Amazônia Oriental – CPAA, trabalhando com caracterização de banco de germoplasma de sacha inchi. A dissertação foi aprovada em 18 de julho de 2013.

SUMÁRIO

| | Página |
|-------------------------------------|---------------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | x |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 6 |
| 3. OBJETIVO GERAL | 9 |
| CAPÍTULO 1 | 10 |
| Resumo | 11 |
| Introdução | 11 |
| Material e Métodos | 13 |
| Resultados e Discussão | 16 |
| Agradecimentos | 19 |
| Referências Bibliográficas | 19 |
| TABELA 1 | 22 |
| TABELA 2 | 23 |
| FIGURA 1 | 24 |
| CAPÍTULO 2 | 25 |
| Abstract | 26 |
| Resumo | 27 |
| Introdução | 28 |
| Material e Métodos | 29 |
| Resultados | 33 |
| Discussão | 33 |
| Agradecimentos | 36 |
| Bibliografia Citada | 37 |
| Legenda de Figuras e Tabelas | 40 |
| 4. CONCLUSÕES GERAIS | 45 |

RESUMO

RODRIGUES, Haroldo Silva, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, MORFOLÓGICA E AGRONÔMICA DE GERMOPLASMA DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.) NO ESTADO DO AMAZONAS.** Orientador: Alúzio Borém de Oliveira. Co-Orientadores: Maria Tereza Gomes Lopes e Francisco Célio Maia Chaves.

Apesar de amplamente conhecida e rica em biodiversidade, a região amazônica ainda possui uma gama de espécies subexploradas e negligenciadas pela comunidade científica, espécies essas que apresentam grande potencial de utilização para o homem. Apenas uma pequena fração dessa biodiversidade é conhecida, estima-se que a riqueza da flora amazônica compreende aproximadamente 30.000 espécies, cerca de 10% das plantas de todo o planeta. A sachá inchi é uma espécie nativa da amazônica com grande potencial de uso para a indústria farmacêutica e estética, pois possui alto teor de ácidos graxos mono e poliinsaturados no óleo extraído de sua semente. Apesar de estudos sobre características desse óleo serem encontrados na literatura, existe uma grande carência de trabalhos que mensurem a diversidade genética entre genótipos de sachá inchi. A Embrapa Amazônia Ocidental, situada no município de Manaus, possui um Banco de Germoplasma de sachá inchi composto por 37 acessos. O presente trabalho teve como objetivo estudar a diversidade genética entre e dentro dos acessos componentes dessa coleção por meio de marcadores moleculares e características fenotípicas relacionadas à produção de frutos e sementes. Foram utilizados marcadores AFLP e os resultados obtidos, submetidos à análise de dissimilaridade por meio do cálculo do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard e subsequente construção dendograma pelo método UPGMA. Os dados fenotípicos coletados foram submetidos à análise de variância e subsequente análise de agrupamento de médias pelo método Skott-Knott, distância generalizada de Mahalanobis e dendograma construído pelo método UPGMA. Foi realizada ainda a análise de correlações canônicas e estudo da diversidade entre e dentro dos acessos utilizando o método da AMOVA. Os resultados obtidos mostram a existência de variabilidade genética entre os acessos estudados, o estudo à nível molecular mostrou estruturação geográfica entre os acessos estudados, os dados fenotípicos mostram que existe grande amplitude entre as médias de maioria das variáveis consideradas neste trabalho, por outro lado não foi possível detectar

correlações estatisticamente significativas entre variáveis relacionadas ao fruto e variáveis relacionadas à semente. Para fins de melhoramento genético deve-se adotar a exploração da diversidade dentro dos acessos e optar por cruzamentos entre acessos divergentes.

ABSTRACT

RODRIGUES, Haroldo Silva, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **GENETIC, MORPHOLOGICAL AND AGRONOMIC CHARACTERIZATION OF SACHA INCHI GERMOPLOSM (*Plukenetia volubilis* L.) IN THE STATE OF AMAZONAS.** Adviser: Aluizio Borém de Oliveira. Co- Advisers: Maria Tereza Gomes Lopes and Francisco Célio Maia Chaves.

Although widely known and rich in biodiversity, the Amazon still has a range of species that are underexplored and neglected by science, these species may have great potential for man. Only a fraction of the Amazon biodiversity is known. It is estimated that the plant wealth comprises about 30,000 species, about 10% of plants from all over the planet. The sacha inchi is a native plant from the Amazon, with great potential for the pharmaceutical and cosmetic industry. This plant has high amounts of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in the oil that is extracted from its seeds. Studies on the oil characteristics are found in scientific journals. On the other hand, there is a lack of studies that measure the genetic diversity among genotypes of sacha inchi. Embrapa Western Amazon, located in Manaus, has a sacha inchi Germplasm Bank which is composed of 37 accessions. This work was aimed to measure the genetic diversity within and between accessions in this collection through molecular markers and phenotypic traits related to fruits and seeds. AFLP markers were used and the results obtained the genetic dissimilarity was calculating by the arithmetic complement of Jaccard coefficient and subsequent construction cluster by using the UPGMA method. The phenotypic data collected was subjected to variance analysis, classified with average grouping by the Skott-Knott method, Mahalanobis distance method and clustered by the UPGMA method. Also performed canonical correlation analysis and the study of diversity within and between accessions using the method of AMOVA. The results showed the following; the existence of genetic variability among genotypes, the molecular analysis revealed geographic structure among accessions, the phenotypic data affirmed that there is great variation between means of most of the variables considered in this work, it was not possible to detect statistically significant correlations between variables related to fruit and variables related to seed tough. For

breeding purposes, the exploration of diversity within the accessions and crosses between divergent accessions should be adopted.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Amazônia é um dos mais importantes centros de biodiversidade, várias e importantes culturas para a agricultura do mundo, como mandioca, abacaxi, cacau, borracha são originárias dessa região (Clement et al., 2009). No entanto, numerosas espécies de plantas amazônicas subexploradas com valor econômico promissor ainda permanecem pouco conhecidas e negligenciadas pela comunidade científica. Um exemplo dessas espécies é a *Plukenetia volubilis* L., popularmente conhecida como “sacha inchi”.

A sacha inchi, também chamada “amendoim inca”, “amendoim selvagem”, “inca inchi” ou “amendoim da montanha”, é uma planta da família Euphorbiaceae, que cresce na floresta amazônica. Esta planta, amplamente cultivada no Peru, tem sido um componente da dieta de vários grupos tribais nativos da região (Hamaker et al., 1992). No Brasil é conhecida como Amendoim da Amazônia ou Amêndoa Lopo e o cultivo é limitado a uma pequena parcela no seu ambiente nativo, não dispondo de profundos estudos nem larga produção e industrialização do seu azeite. É uma planta semi-perene, trepadora lenhosa, produz frutos contendo cápsulas com 3 a 5 cm de diâmetro, geralmente com quatro lóbulos, podendo variar de três à sete, contendo uma semente oleaginosa dentro de cada lóbulo (Krivankova et al., 2007).

O peso das sementes varia de 0,8 a 1,4 g e contém aproximadamente 54% de óleo e 27% de proteínas. Sua composição é de 33 a 35% de casca e 65 a 67% de amêndoa e possuem elevado teor de óleo (35-60% do peso da amêndoa), contendo níveis elevados de ácido graxo α -linolênico (omega-3) e linoleico (omega-6), conseqüentemente, possuindo grande potencial para aplicações nas indústrias alimentar e farmacêutica (Krivankova et al., 2007).

O teor de ácido α -linolênico e ácido linoleico atingi aproximadamente de 45% e 35% do total de ácidos graxos poliinsaturados, respectivamente, enquanto que outros, tais como ácido graxo oleico (ômega-9), palmítico e esteárico, também estão presentes, em pequenas proporções (Hamaker et al., 1992). Assim, à semelhança de linhaça, o óleo de sacha inchi é uma fonte significativa de ômega-3 e ômega-6, sendo estes compostos importantes para a prevenção de doenças cardíacas, mostrando um efeito hipocolesterolêmico quando utilizado como suplemento.

Ácidos graxos poliinsaturados são comprovadamente benéficos uma vez que reduzem agregações das plaquetas e os triglicerídeos e, conseqüentemente, o risco de doenças cardíacas. Eles se classificam em ômega 6 e ômega 3 e se diferenciam na

posição da primeira dupla ligação. Atualmente, os ácidos graxos considerados essenciais são o α -linolênico e linoléico (Novello et al., 2010).

O ácido α -linolênico e linoléico são considerados essenciais, pois não são sintetizados pelo organismo humano, sendo necessária a sua ingestão. A partir destes compostos são sintetizados outros ácidos graxos poliinsaturados de fundamental importância pelo corpo humano, como o ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico. A ingestão desses ácidos graxos é importante para a prevenção de doenças cardiovasculares, neuromusculares e durante a gravidez, mostrando também efeito hipocolesterolêmico ao ser usado como suplemento alimentar.

As doenças cardiovasculares são doenças genéticas complexas influenciadas por vários fatores e têm sido considerados problemas de saúde pública desde o começo do século. Nesse quadro a nutrição através do consumo de uma alimentação saudável é um desafio para os consumidores, preocupando grande parte da população brasileira e do mundo, principalmente referente à ingestão de alimentos ricos em gorduras e colesterol. Atualmente, sabe-se que existem 23 ácidos graxos que são essenciais para o normal crescimento e desenvolvimento e podem desempenhar um papel importante na prevenção e tratamento de doença arterial coronariana, hipertensão, diabete, artrite, doenças inflamatórias, desordens autoimunes e câncer (Novello et al., 2010).

Estimasse que as doenças cardíacas causam aproximadamente 500.000 mortes/ano nos Estados Unidos. Recentes evidências de estudos de prevenção secundária (quando a doença já foi identificada) sugerem que a suplementação com 850 mg/dia de Omega-3, pode reduzir o risco de morte por doença coronária em 25% e morte cardíaca súbita em aproximadamente 45%. A American Heart Association (AHA) recomenda cerca de 1,0 g/dia de Omega-3 para reduzir o risco de morte por doença coronária ao nível de prevenção secundária. Além disso, para os indivíduos sem doença conhecida (prevenção primária), a AHA recomenda o consumo de pelo menos duas refeições de peixe por semana, esta quantidade poderia fornecer cerca de 500 mg de Omega-3 por dia (Harris et al., 2004).

A atual dieta ocidental é rica em Omega-6, isso ocorreu por causa da recomendação indiscriminada pela substituição das gorduras saturadas por Omega-6, sendo o consumo de ômega-3 muito mais baixo atualmente por causa da diminuição no consumo de peixe, mesmo tendo este maior efeito protetor sobre certas doenças como as doenças cardiovasculares (Novello et al. 2010).

Com o crescente aumento da erosão dos recursos genéticos vegetais, a preocupação principal por parte do melhorista é com a diminuição ou perda da

variabilidade genética de espécies cultivadas e seus parentes silvestres, bem como de variedades locais, gerando o estreitamento da base genética (Hallauer e Miranda, 1988). A vulnerabilidade resultante do estreitamento da base genética só pode ser evitada com introdução de variabilidade, a qual depende dos recursos genéticos disponíveis, ou seja, do germoplasma da espécie, sendo os bancos de germoplasma de grande importância na manutenção da variabilidade genética de uma espécie.

Para que a diversidade genética disponível de um banco de germoplasma seja utilizada, é preciso que os acessos sejam caracterizados e documentados de forma que o melhorista possa identificar aqueles potencialmente úteis para seu programa de melhoramento. Alguns bancos de germoplasma dispõem desta informação em catálogos, enquanto outros a apresentam em bancos de dados informatizados, que permitem a identificação de acessos com características específicas, como reação a doenças, teor de óleo e proteínas, atributos morfológicos e fisiológicos, grupos de maturação e ciclo (Borém, 2009).

A caracterização biométrica é importante para identificação da variação devido a fatores intrínsecos das espécies bem como sua interação com o ambiente, além das reações das populações, quando estabelecidas em outro ambiente, principalmente quando a espécie possui ampla distribuição geográfica e adaptação a diversos ecossistemas (Rodrigues et al., 2006).

Antes do desenvolvimento de isoenzimas nos anos 60 os melhoristas lançavam mão de técnicas de caracterização morfológica para conhecer os materiais genéticos existentes na coleção; a partir de dados de caracterização e avaliação, eles decidiam sobre quais acessos deveriam ser incluídos no programa de melhoramento. Atualmente, com o advento dos marcadores moleculares, os pesquisadores têm uma ferramenta que pode auxiliá-los na estimativa da diversidade genética existente no banco e na determinação das relações genéticas entre materiais para definirem a direção de cruzamentos ou a seleção de progenitores, além de poder acompanhar a introgressão de genes durante o processo de melhoramento em si (Pereira, 2009).

Marcadores moleculares têm sido usados com sucesso na análise genética de plantas e na caracterização da variabilidade contida em Bancos de Germoplasma (Ganga et al., 2004; Salla et al., 2002). A técnica de AFLP apresenta maior repetibilidade e confiabilidade que as técnicas RFLP e RAPD, nas quais se baseia, não depende de hibridização e digestão parcial, que são fatores que geram a não reprodutividade do RFLP. Além disso, a possibilidade de se empregarem condições mais estritas para o anelamento dos *primers* na reação de PCR resulta em maior

repetibilidade e robustez do AFLP, quando comparado com o RAPD (Caixeta et al., 2009).

Devido ao seu valor informativo, estes marcadores de DNA têm sido de grande utilidade para acessar diferenças genéticas entre indivíduos, populações e espécies. Essa característica tem permitido a sua aplicação em estudos filogenéticos e a discriminação de variedades. O poder de discriminação e a confiabilidade deste marcador poderão ser úteis no registro de variedades, auxiliando testes de distinção, homogeneidade e estabilidade (Ridout e Donini, 1999).

A maioria dos estudos de diversidade genética baseia-se em informações de locos amostrados aleatoriamente em populações não estruturadas hierarquicamente. Dessa maneira, diversas medidas de dissimilaridade (distância) tem sido proposta para verificar o grau de similaridade e a variação genética em amostras de populações, com aplicações variando em nível individual, intrapopulacional e interpopulacional (Cruz et al., 2011).

A diversidade genética entre e dentro de populações encontradas em suas condições naturais, em Bancos de Germoplasma ou desenvolvidas nos programas de melhoramento genético pode ser predita pela diferença entre os valores fenotípicos mensurados em suas unidades (indivíduos, famílias etc). Na caracterização da diversidade genética das espécies vegetais, animais e de microorganismos, os pesquisadores têm o interesse de agrupar genótipos similares de maneira que as maiores diferenças ocorram entre os grupos formados. Técnicas multivariadas, como análises discriminantes, componentes principais, análise de coordenadas e de agrupamentos, podem ser aplicadas nesse tipo de estudo. A adoção de uma, entre as técnicas citadas, varia de acordo com o padrão de resultado desejado e com a informação disponível, seja ela característica morfológica, fisiológica, ecológica, ou genético-molecular (Diniz Filho, 2000).

A quantificação da dissimilaridade genética é um dos mais importantes parâmetros estimados pelos melhoristas de plantas (Benin et al., 2003; Cruz et al., 2011). Neste sentido, os métodos multivariados, em que diversos caracteres podem ser dimensionados simultaneamente, têm oferecido contribuições efetivas na identificação de genótipos para serem utilizados em programas de melhoramento genético de várias culturas (Santos et al., 2000).

Coefficientes de (di)similaridade têm sido utilizados rotineiramente nas mais variadas áreas científicas com o intuito de quantificar o grau de semelhança ou associação entre duas entidades, a partir de n variáveis. Com informações de

dissimilaridade entre pares de entidades é possível averiguar a formação de grupos, por meio de métodos de agrupamento (Sneath e Sokal, 1973, Romesburg, 1984).

As estimativas de dissimilaridade atendem aos objetivos do melhorista por quantificarem e informarem sobre o grau de semelhança ou de diferença apresentado entre dois quaisquer genótipos. Algumas vezes, seus valores, por si só, são de grande utilidade, principalmente quando há interesse em orientar hibridações, concentrando esforços em cruzamentos em que há diversidade genética entre genitores, sendo indicativo de sua complementaridade gênica (Cruz et al., 2011).

Em muitas situações, o pesquisador está interessado em avaliar padrões de agrupamento, formular e testar hipóteses sobre a similaridade ou diversidade obtida. Contudo, em razão de o número de estimativas de dissimilaridade ser relativamente grande, torna-se impraticável o reconhecimento de grupos homogêneos pelo simples exame visual daquelas estimativas. Assim, para realizar essa tarefa, devem-se utilizar métodos de agrupamento ou de projeções de distância em gráficos bi ou tridimensionais em que cada coordenada é obtida a partir da medida de dissimilaridade escolhida (Cruz et al., 2011).

Nos métodos hierárquicos, os genótipos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido o dendograma ou o diagrama de árvore. Nesse caso, não há preocupação com o número ótimo de grupos, uma vez que o interesse maior está na “árvore” e nas ramificações que são obtidas. As delimitações podem ser estabelecidas por um exame visual do dendograma, em que se avaliam pontos de alta mudança de nível, tomando-os em geral como delimitadores do número de genótipos para determinado grupo (Cruz et al., 2011).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Benin, G.; carvalho, F. I. F.; Oliveira, A. C.; Marchioro, V. S.; Lorencetti, C.; Kurek, A. J.; Silva, J. A. G.; Cruz, P. J.; Hartwig, I.; Schmidt, D. A. M. Comparações entre medidas de dissimilaridade e estatísticas multivariadas como critérios no direcionamento de hibridações em aveia. **Ciência Rural**, v.33, p. 657-662, 2003.

Bordignon. S.R.; Ambrosano. G.M.B.; Odrigues, P.H.V. Propagação in vitro de Sacha inchi. **Ciência Rural**, v.42, p.1168-1172, 2012.

Borém, A.; Miranda, G.V. **Melhoramento de Plantas**. 5.ed., Viçosa: Editora UFV, 529p., 2009.

Caixeta, E. T.; Oliveira, A. C. B.; Brito, G.G.; Sakiyama, N.S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: Borém, A., Caixeta, E.T. (Ed). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Editora UFV, p.11-94, 2009.

Clement, C.R.; Borém, A.; Lopes, M.T.G. Da domesticação ao melhoramento de platas. **Domesticação e Melhoramento: espécies amazônicas**. Viçosa: Editora UFV, 486p., 2009.

Cruz, C. D.; Ferreira, F. M.; Pessoni, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 620p., 2011.

Diniz Filho, J. A. **Métodos filogenéticos comparativos**. Ribeirão preto: Holos, 120p., 2000.

Ganga, R. M. V.; Carlos Ruggiero, C.; Lemos, W. G. M.; Grili, G. V. G.; Gonçalves, M. M.; Chagas, E. A.; Wickert, E. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 494-498, 2004.

Hallauer, A.R.; Miranda, J.B. Germplasm. In: Hallauer, A.R.; Miranda, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2.ed., Ames: Iowa State University Press, 648p., 1988.

Hamaker, B. R.; Valles, C.; Gilman, R.; Hardmeier, R. M.; Clark, D.; Garcia, H. H.; Gonzales, A.E.; Kohlsted, I.; Castro, M.; Valdivia, R.; Rodriguez, T.; Lescano, M. Amino acid and fatty acid profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia Volubilis*). **Cereal Chemistry**. v.69, p.461-463, 1992.

Harris, W.S.; Schacky, C.V. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease?. **Preventive medicine**, v.39, p.212-220, 2004.

Krivankova, B.; Polesny, Z.; Lojka, B.; Lojkova, J.; Banout, J.; Preininger, D. Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*, Euphorbiaceae): A Promising Oilseed Crop from Peruvian Amazon. **Resumo: Tropentag. Utilisation of diversity in land use systems: Sustainable and organic approaches to meet human needs**. p.9-11, 2007.

Novello, D.; Franceschini, P.; Quintiliano, D. A. A importância dos ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 para a prevenção de doenças e na saúde humana. **Revista Salus**, v.2, p.77-87, 2010.

Pereira, G. P.; Pereira, T. N. S.; Costa, F. C. Marcadores Moleculares no Pré Melhoramento. In: Borém, A. e Caixeta, E.T. (Ed). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Editora UFV, p.103-128, 2009.

Ridout, C. J.; Donini, P. Technical focus: use of AFLP in cereal research. **Trend in Plant Science**, v.4, p.76-79, 1999.

Rodrigues, A. C. C.; Osuna, J. T. A.; Queiros, S. R. O. D. Biometria de frutos e sementes e grau de umidade de sementes de angico (*Anadenanthera colubrina* (vell.) Brenan var. Cebil (griseb.) Altschul) procedentes de duas áreas distintas. **Revista científica eletrônica de engenharia florestal**. v.08, 2006.

Romesburg, H. C. **Cluster analysis for researchers**. California: Lifetime Learning, p.334, 1984.

Salla, M.F.S.; Ruas, C.F.; Ruas, P. M.; Carpentieri-Pípolo, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p.15-22, 2002.

Santos, R.C.; Moreira, J. A. N.; Farias, R. H.; Duarte, J. M. Classificação de genótipos de amendoim baseada nos descritores agromorfológicos e isoenzimáticos. **Ciência Rural**, v.30, p.55-59, 2000.

Sneath, P. H., Sokal, R. R. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: **W. H. Freeman**, p.573, 1973.

3. OBJETIVO GERAL

Caracterização de aspectos moleculares, morfológicos e agronômicos de acessos de sachá inchi do banco de germoplasma da Embrapa Amazonia Ocidental.

CAPÍTULO 1

DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE SACHA INCHI UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES AFLP

Diversidade genética em acessos de sachá inchi utilizando marcadores moleculares AFLP

Resumo

Sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) é uma espécie nativa da região amazônica, que necessita de estudos de diversidade genética para possibilitar avanços em programas de melhoramento visando estabelecer cultivares para a agricultura. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade genética entre acessos de sachá inchi com o uso de marcadores moleculares AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*). Foram analisados 37 acessos de sachá inchi que pertencem ao Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental – CPAA. Para a obtenção dos marcadores foram utilizadas quatro combinações de *primers*. Foi estimada a porcentagem de locos polimórficos, realizada análise de dissimilaridade entre os acessos por meio do cálculo do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard e construção do dendograma. Os *primers* revelaram 191 locos polimórficos. Os resultados obtidos mostraram a existência de uma estruturação geográfica entre os acessos em função de sua origem, gerando informações consistentes e de alto valor para programas de melhoramento genético e de conservação da espécie.

Palavras-chave: *Plukenetia volubilis*, pré-melhoramento, Euphorbiaceae, Amazônia.

Introdução

A região amazônica possui grande variabilidade genética, a qual vem sendo explorada pelo homem muito antes da época do descobrimento das Américas. No entanto, uma grande porção das espécies que compõe este bioma permanece

parcialmente ou totalmente desconhecida pela sociedade científica, necessitando de estudos para sua melhor compreensão de suas populações e possíveis usos. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) é uma trepadeira lenhosa nativa da região amazônica pertencente à família Euphorbiaceae, cujo óleo retirado da semente possui qualidades muito interessantes, possuindo grande potencial para uso farmacêutico, nutricional e estético.

O óleo da sachá inchi é composto por um alto teor de ácido graxo insaturados, aproximadamente 93% do total (Hamaker et al. 1992), do qual cerca de 45,2% é composto de ácido α -linoleico (Omega 3) e 36,8% ácido linolênico (Omega-6) (Follegatti-Romero 2009), que são ácidos graxos essenciais e não são sintetizados pelo organismo humano, sendo necessária a sua ingestão. Esses ácidos graxos são precursores das prostaglandinas, tromboxanas e prostaciclina, que são um grupo de substâncias que participam na regulação da pressão sanguínea, frequência cardíaca, dilatação vascular, coagulação sanguínea, lipólise, integridade das membranas celulares, resposta imunológica, sistema nervoso central e inibem a agregação plaquetária (Novello et al. 2010).

A Embrapa Amazônia Ocidental, localizada em Manaus, Amazonas, possui um Banco de Germoplasma de sachá inchi compostos por 37 acessos coletados na Amazônia brasileira. Apesar de se conhecer os benefícios do consumo do óleo da sachá inchi, não existem estudos de caracterização ou de diversidade genética sobre os acessos componentes dessa coleção visando seu melhor conhecimento e disponibilização dos dados para uso em programas de melhoramento.

Com o desenvolvimento de ferramentas para as análises genéticas em nível molecular, tornou-se possível examinar em maiores detalhes a origem evolucionária dos genomas vegetais, assim como acessar o grau de variabilidade genética em grupos de plantas (Ganga et al. 2004). A técnica AFLP tem muitas vantagens para estudos

sistemáticos, ela é reproduzível, rápida e confiável, além de haver um número ilimitado de marcadores (Kardolus et al. 1998).

Este trabalho teve por objetivo estimar a diversidade genética entre acessos de *sacha inchi* componentes do Banco de Germoplasma da espécie na Embrapa Amazônia Ocidental – CPAA com o uso de marcadores AFLP.

Material e Métodos

Os 37 acessos de *sacha inchi* estudados são provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental– CPAA, localizada no município de Manaus, no Estado do Amazonas, nas coordenadas geográficas 3°8' S e 59°52'W. Entre os acessos, 25 foram coletados no interior do Estado do Amazonas, em 1992 e 12 coletados no sítio “Nova Jerusalém” em Careiro Castanho-AM, localizada nas coordenadas S 3°31'45,0” e W 59°49'07,9”. Folhas jovens dos acessos foram coletadas na Embrapa, colocadas em sacos plásticos com sílica e armazenadas a -20°C no Laboratório de Melhoramento Vegetal da UFAM (Universidade Federal do Amazonas).

A extração do DNA foi realizada utilizando o detergente catiônico CTAB 2% (Cationic *Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide*) (Doyle e Doyle 1987), com proteinase K, seguindo o protocolo otimizado por Ferreira e Grattapaglia (1998). A quantificação foi feita pelo método comparativo em gel de agarose 1%, utilizando marcadores com o peso molecular conhecido (50 e 100 ng). O gel de agarose foi corado com brometo de etídio (Ferreira e Grattapaglia 1998) e visualizado em transluminador UV.

Para as reações de digestão do DNA, foi utilizada a combinação de enzimas de restrição *EcoRI/MseI*. Utilizando 200 ng de DNA genômico, 5,0µL do tampão *One Phor All 10X* (OPA; Amersham), 0,5µL de solução BSA (Albumina de Soro Bovino)

(10µg/µL), 0,5µL da enzima *MseI* (10 unidades/µL, New England Biolabs) e 0,4µL da enzima *EcoRI* (12 unidades/µL, Gibco) em volume final de 50µL. As reações foram realizadas a 37 °C por três horas, em seguida as enzimas foram inativadas a 70 °C por 15 minutos.

Nas reações de pré-amplificação foram usados *primers* complementares às sequências dos sítios das enzimas de restrição com um nucleotídeo seletivo, onde foi usada a combinação de iniciadores *EcoRI-A/MseI-C*. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos acrescentando-se 40µL de água ultrapura para serem amplificados. Na amplificação seletiva foram utilizadas onze combinações de *primers* em uma amostra aleatória de 10 indivíduos da coleção: *EcoRI-AAC/ MseI-CAC*, *EcoRI-AAC/ MseI-CGC*, *EcoRI-AAC/ MseI-CTC*, *EcoRI-ACA/ MseI-CCA*, *EcoRI-ACA/ MseI-CGC*, *EcoRI-ACA/ MseI-CAT*, *EcoRI-AGC/ MseI-CAC*, *EcoRI-AGC/ MseI-CAT*, *EcoRI-ATC/ MseI-CCA*, *EcoRI-ATC/ MseI-CTC* e *EcoRI-AGT/ MseI-CGC*. Os *primers* com maior número de locos polimórficos foram amplificados em todos os indivíduos da coleção (*EcoRI-ACA/ MseI-CGC*, *EcoRI-AAC/ MseI-CAC*, *EcoRI-AAC/ MseI-CGC*, *EcoRI-ATC/ MseI-CCA*). Para as reações de amplificação seletiva via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), 2,5µL do produto da pré-amplificação diluído foram utilizados em termociclador (Techine TC-512). Antes da aplicação das amostras para eletroforese foi realizada uma pré-corrída conduzida sob potência constante de 50 W durante uma hora para aquecimento e limpeza do gel. Após a aplicação das amostras, a eletroforese foi realizada sob potência constante de 50 W por aproximadamente 4 horas de corrida.

Para a revelação do gel usou-se o método de coloração com nitrato de prata segundo o protocolo proposto por Creste et al. (2001). Os locos polimórficos foram analisados para presença/ausência do fragmento amplificado. Na denominação dos marcadores AFLP foi adotado um código onde o primeiro caractere corresponde as enzimas usadas na digestão (*EcoRI* = E e *MseI* = M), o terceiro e o quarto caracteres

foram números que identificaram as combinações de acordo com a variação nas extensões dos iniciadores. Após os quatro caracteres que identificam as enzimas e a combinação de iniciadores foi adicionado o tamanho do fragmento amplificado do loco em número de bases. A partir dos fragmentos obtidos foi construída uma matriz binária, onde um e zero indicaram presença e ausência de fragmentos, respectivamente.

A análise dos dados foi realizada no Laboratório de Bioinformática da Universidade Federal de Viçosa, utilizando o software GENES (Cruz 2013). Os dados da matriz binária obtidos a partir dos marcadores moleculares foram na construção de uma matriz de dissimilaridade por meio do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard obtido pela expressão:

$$D_j = 1 - \left(\frac{a}{a + b + c} \right)$$

Sendo a , b e c , presença de banda em ambos os acessos, presença de banda no primeiro e ausência no segundo, ausência no primeiro e presença no segundo, respectivamente.

Para obtenção do dendograma, a matriz de dissimilaridade foi utilizada no método de agrupamento hierárquico da ligação média entre grupos (UPGMA). Como regra geral, a construção do dendograma é estabelecida pelo genótipo de maior similaridade. Como regra geral para construção do dendograma, inicialmente o primeiro grupo é formado pelos genótipos mais similares, logo em seguida calcula-se a distância entre este grupo e os demais genótipos, sendo novamente agrupados os indivíduos dos grupos de maior similaridade. 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 métodos:

$$d_{(ij)k} = \frac{n_i}{n_i + n_j} d_{ik} + \frac{n_j}{n_i + n_j} d_{jk}$$

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 et al. 2011).

Resultados e Discussão

Entre os onze pares de *primers* testados quatro foram polimórficos, sendo observado um total de 191 marcas polimórficas. A Tabela 1 revela alta diversidade genética entre grande parte dos acessos avaliados, o acesso A2U20 obteve dissimilaridade em torno de 0,9 com onze acessos do Banco de Germoplasma, os menores valores de dissimilaridade observados estão entre o acessos A2M03 e A2M04, A1M3 e A1M4 e A1M12 e A1M15 sendo 0,338, 0,368 e 0,373, respectivamente. A distribuição dos valores de dissimilaridade em intervalos de classe podem ser observados na Tabela 2, sendo a média 0,739 e a variância 0,01, o valor da simetria calculado foi de -0,649, mostrando que a distribuição tem cauda inclinada para direita (valores acima da média) e o achatamento (curtose) estimado de 3,47 indica que a distribuição em questão é mais alta (afunilada) e concentrada que a distribuição normal (lilliefors $\alpha=5\%$), observou-se que 37,24% dos valores encontram-se no intervalo de classe que varia de 0,7 a 0,79 e 69,22% de todas as observações possuem valores acima de 0,7, mostrando predominância de alta diversidade genética entre os acessos.

A análise de agrupamento com base nas distâncias genéticas (Figura 1) mostrou relação entre grau de similaridade e a procedência dos acessos, no corte ao nível de fusão 0,75*, estimado pelo índice de Mojema. Nota-se que o grupo A é composto por vinte e dois acessos, onde apenas um é procedente dos acessos coletados no sítio “Nova Jerusalém”, o grupo B por três acessos coletados no sítio “Nova Jerusalém”, o grupo C por cinco acessos coletados no sítio “Nova Jerusalém” e um do interior do estado, o grupo D formado por dois acessos da Embrapa e o grupo E por um acesso coletado no sítio “Nova Jerusalém” e outro da Embrapa, os acessos A1U28 e A2U20 foram inseridos nos grupos F e G, respectivamente.

O dendograma (Figura 1) mostra também a existência de estruturação geográfica dentro do Banco de Germoplasma, sendo os acessos do interior do estado mais similares entre si quando comparados à similaridade estimada entre os acessos coletados no sítio “Nova Jerusalém”, uma vez que a maior parte dos acessos do interior ficaram concentrado no grupo A e os provenientes do sítio “Nova Jerusalém” formaram grupos separados, podendo ser inferido que os acessos do interior possuem uma base genética mais estreita que os demais. Por outro lado, a presença do acesso A2U19 dentro do grupo formado por acessos do interior e a presença acessos do interior entre os grupos formados por acessos coletados no sítio “Nova Jerusalém” mostra que existe algum grau similaridade genética, independente de sua procedência. Ao avaliar acessos de mandioca utilizando marcadores RADP, Costa et al. (2003) constataram a eficiência desse marcador no estudo da diversidade genética, embora não tenham conseguido observar nenhuma estruturação geográfica. Colombo et al. (2000) examinaram o polimorfismo gerado por marcadores RAPD em 126 genótipos de mandioca e concluíram haver uma fraca estruturação genética na mandioca, o que pode ocasionar sobreposição de genótipos de diferentes localidades.

Para a geração de uma população segregante a partir de genitores divergentes, é recomendado o cruzamento entre os acessos A2U20 e A1M14, A2U20 e A2M06, A2U20 e A1M11, A2U20 e A2U15, A2M08 e A1U29, A2U20 e A2M10, A2U01 e A1U28, A2U20 e A2M05, A2U20 e A1U29 e A2U10 e A1U28, sendo essas as combinações que mostraram a maior distância entre pares estimada pelo complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, respectivamente. O acesso A2U20 obteve os maiores valores de dissimilaridade e não foi agrupado no dendograma estimado (Figura 1) em nenhum nível de fusão, sendo esse um potencial genitor para programas de melhoramento utilizando acessos desse Banco de Germoplasma.

Identificação de genitores com alta divergência genética tem sido objetivo de muitos trabalhos de melhoramento (Ganga et al. 2004; Costa et al. 2006; Nick et al. 2010), para que na hibridação, ocorram segregações nas progênes que aumentem a probabilidade de ocorrência de genótipos superiores. Assim, a caracterização de germoplasma é essencial para programas de melhoramento, assegurando a disponibilidade de informações sobre os acessos do banco e facilitando o trabalho de seleção de possíveis doadores de genes, podendo também ser usada para eliminação de duplicatas e prevenir a perdas de recursos genéticos, sendo fundamental para o sucesso de um programa de melhoramento e produção agrícola da cultura.

O presente estudo permitiu a obtenção de informações úteis para programas de melhoramento além de gerar informações sobre o Banco de Germoplasma de *sacha inchi* da Embrapa Amazônia Ocidental - CPAA, uma vez que não há relatos na literatura sobre trabalhos que tenham quantificado a variabilidade genética de acessos dessa espécie utilizando marcadores AFLP, os quais permitem obter grande quantidade de marcas e alto desempenho na geração de dados. Krivankova et al. (2012) utilizaram *primers* ISSR escolhidos aleatoriamente para estudar variabilidade genética em populações naturais de *sacha inchi* provenientes de comunidades vizinhas da cidade de Pucallpa no Peru, obtendo 16 bandas polimórficas para um dos *primers* utilizados, concluindo que a elevada taxa de bandas polimórficas encontradas indicaram que os marcadores ISSR foram polimórficos e informativos, portanto, aconselhável para estimar parâmetros genéticos dessa espécie em estudos futuros.

Os marcadores AFLP se mostraram consistentes para a avaliação da variabilidade genética, detectando e quantificando a divergência genética entre os 37 acessos que compõe o Banco de Germoplasma de *sacha inchi* da Embrapa Amazônia Ocidental - CPAA, sendo possível a obtenção de um dendograma onde se observa a estruturação geográfica dos acessos em função de sua origem. Os resultados obtidos

servem de subsídio para futuros programas de melhoramento da espécie, auxiliando na seleção de possíveis progenitores. Apesar de válida, essa abordagem deve ser associada ao desempenho dos acessos em condições de cultivo, direcionando programas de melhoramento na seleção de acessos que se adaptam melhor às intempéries ambientais.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro, à Embrapa Amazônia Ocidental pelo apoio dos pesquisadores e técnicos na realização desse trabalho. Também agradecem à Universidade Federal do Amazonas, pela realização das rotinas de laboratório, principalmente ao Laboratório de Melhoramento Vegetal e ao Laboratório de Bioinformática da Universidade Federal de Viçosa pela ajuda no processamento de dados.

Referências Bibliográficas.

Colombo C, Second G e Charrier A (2000) Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology 23**: 189-199.

Costa MD, Pereira WE, Bruno RLA, Freire EC, Nóbrega MDM, Milani M, e Oliveira AD (2006) Divergência genética entre acessos e cultivares de mamoneira por meio de estatística multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 41**: 1617-1622.

Costa MR, Cardoso ER e Ohaze MMM (2003) Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia 27**: 158-164.

Creste S, Tulmann N A e 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 CD (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum** **35**: 271-276.

Cruz CD, Ferreira FM e Pessoni LA (2011) *Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética*. Editora Suprema, Visconde do Rio Branco, 620p.

Doyle JJ e Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. **Phytochem Bull** **19**:11-15.

Ferreira ME e Grattapaglia D (1998) **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3rd ed., Embrapa/Cenargen, Brasília, 222p.

Follegatti-Romero LA, Piantino CR, Grimaldi R e Cabral FA (2009) Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. **The Journal of Supercritical Fluids** **49**: 323-329.

Ganga RMD, Ruggiero C, Lemos EDM, Grili GVG, Gonçalves MM, Chagas EA e Wickert E (2004) Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura** **26**: 494-498.

Hamaker BR, Valles C, Gilman R, Hardmeier RM, Clark D, Garcia HH, Gonzales AE, Kohlstad I, Castro M, Valdivia R, Rodriguez T e Lescano M (1992) Amino acid and fatty acid profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia Volubilis*). **Cereal Chemistry** **69**: 461-463.

Kardolus JP, Eck HJV e Berg RGVD (1998) The potential of AFLP in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy. **Plant Systems Evolutive** **2**: 87-103.

Krivankova B, Cepkova PH, Ocelak M, Juton G, Bechyne M e Lojka B (2012) Preliminary Study of Diversity of *Plukenetia volubilis* Based on the Morphological and Genetic Characteristics. **Agricultura tropica et subtropica** **45**: 140-146.

Nick C, Carvalho SP, Jesus AMS, Custódio TN, Marim BG, e Assis LHB (2010) Divergência genética entre acessos de mandioca. **Bragantia** **69**: 289-298.

Novello D, Franceschini P e Quintiliano DA (2010) A importância dos ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 para a prevenção de doenças e na saúde humana. **Revista Salus** **2**: 77-87.

TABELA 1 - Dissimilaridade genética observada entre 37 acessos de *Plukenetia volubilis* a partir de marcadores AFLP, sendo que a diagonal superior apresenta os valores de dissimilaridades calculados pelo complemento aritmético do coeficiente de Jaccard e a diagonal inferior mostra a análise gráfica obtida a partir da matriz de dissimilaridade, onde cada cor representa uma classe correspondente à porcentagem de dissimilaridade entre os acessos, sendo cada classe representada na legenda.

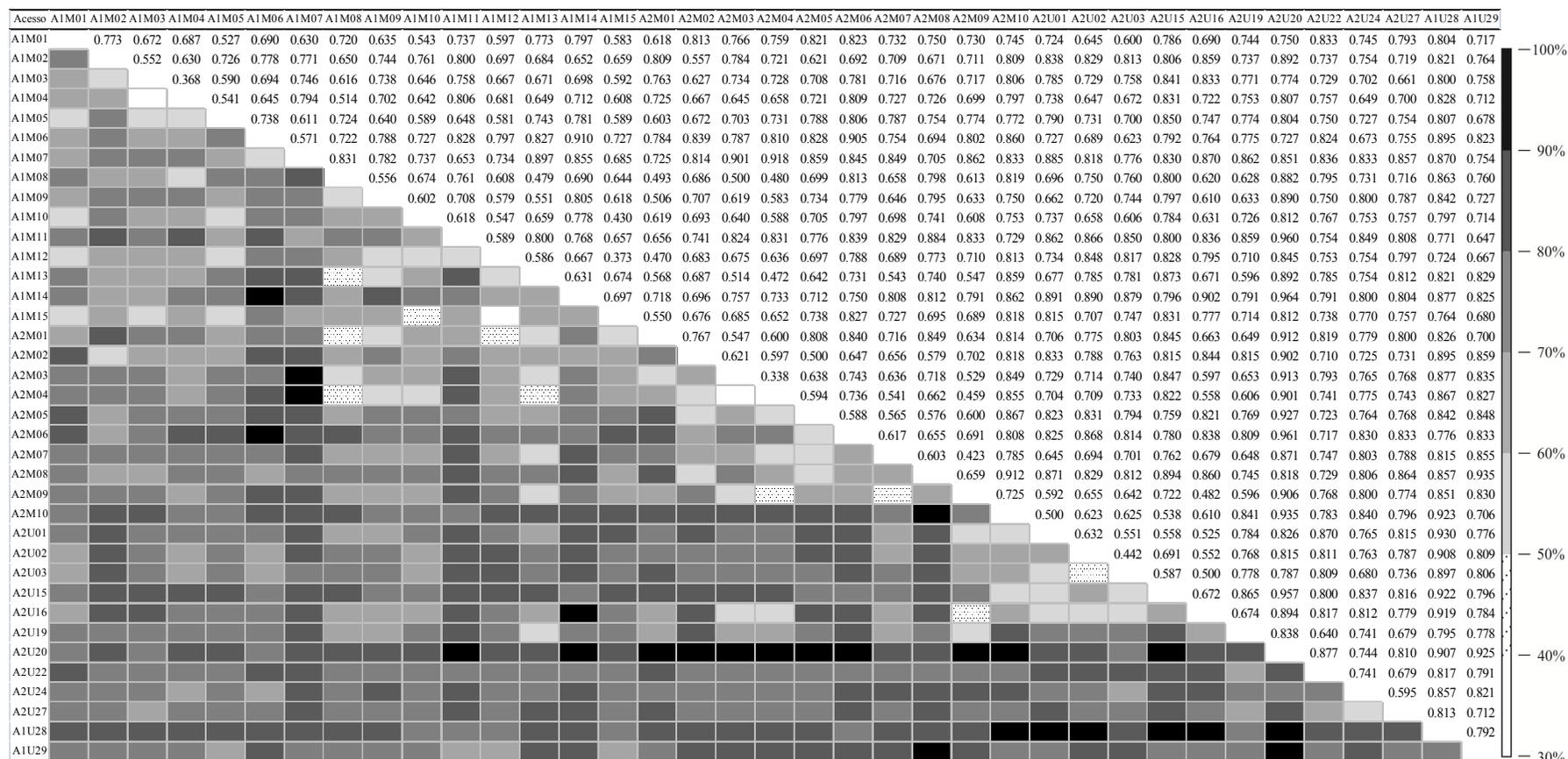


TABELA 2 – Distribuição das estimativas de dissimilaridade nos intervalos de classe.

| Intervalo de estimativa | Número de distâncias no intervalo | % |
|--------------------------------|--|----------|
| 0 | 0 | 0 |
| 0,1 – 0,19 | 0 | 0 |
| 0,2 – 0,29 | 0 | 0 |
| 0,3 – 0,39 | 3 | 0,45 |
| 0,4 – 0,49 | 10 | 1,51 |
| 0,5 – 0,59 | 53 | 7,95 |
| 0,6 – 0,69 | 139 | 20,87 |
| 0,7 – 0,79 | 248 | 37,24 |
| 0,8 – 0,89 | 188 | 28,23 |
| 0,9 – 0,99 | 25 | 3,75 |
| 1 | 0 | 0 |
| Média | 0,739 | - |
| Variância | 0,01 | - |
| Simetria | -0,649 | - |
| Achatamento (Curtose) | 3,47 | - |

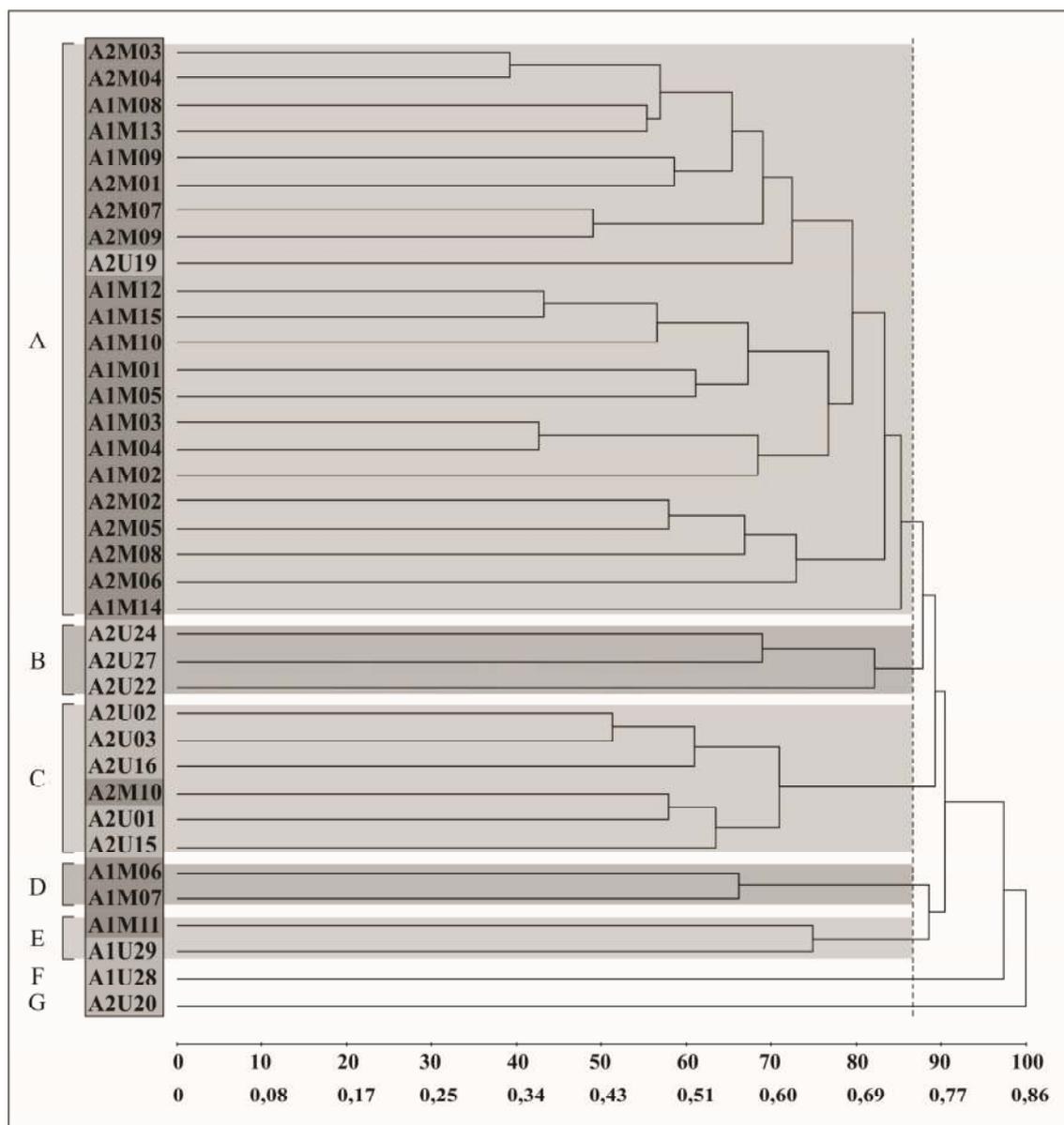


FIGURA 1 - Dendrograma de 37 acessos de *Plukenetia volubilis*, baseado na técnica método hierárquico da ligação média entre grupos (UPGMA), onde os acessos procedentes do interior do estado estão hachurados em cinza escuro e os provenientes do sítio “Nova Jerusalém” em cinza claro, a linha vertical tracejada representa o corte estimado pelo método de Mojema (0,75*) e A, B, C, D, E, F e G são os grupos formados à esse nível de fusão.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE SACHA INCHI DETERMINADA ATRAVÉS DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

Genetic diversity analysis among accessions of sacha inchi through phenotypic characteristics

Abstract

Although the Amazon region is the center of diversity of different species with some economic value, a large number of species from this region remain under-explored and neglected by science. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) is native to the Amazon region, whose seed has high amount of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids that are interesting for the pharmaceutical industry and aesthetics, however this species still requires genetic diversity studies to enable advances in breeding programs in order to optimize its operation. Fruits and seeds from 25 accessions of sacha inchi were collected from the Germplasm Bank of Western Amazon in Manaus-AM. Fruits and seeds were measured for genetic diversity and morphological characterization analysis. The data was subjected to variance analysis, and subsequent means grouping analysis by Skott-Knott method, Mahalanobis distance method, and UPGMA cluster method. Canonical correlation analysis was also applied to the data along with study of diversity between and within the accession AMOVA method was used. Differences were observed among the averages for the variables analyzed, significant canonical correlations for the groups tested could not be found. AMOVA showed that close to 60% of the observed variation is within the accession. The results show that there is variability among accessions and the variation within the accessions should be explored to obtain better results in breeding programs of this species.

Key-words: *Plukenetia volubilis*, Biometrics, Euphorbiaceae, Amazon.

Análise da diversidade genética entre acessos de sachá inchi determinada através de características fenotípicas

Resumo

Apesar de a região Amazônica ser centro de diversidade de diversas espécies de alta importância econômica um grande número de espécies provenientes dessa região continuam subexploradas e negligenciadas pela comunidade científica. A sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) é uma espécie nativa da região amazônica cuja semente possui alto teor de ácidos graxos mono e poliinsaturados sendo uma espécie interessante para a indústria farmacêutica e estética, no entanto ainda necessita de estudos de diversidade genética para possibilitar avanços em programas de melhoramento genético a fim de otimizar sua exploração. Foi realizada coleta e biometria de frutos e sementes de 25 acessos do Banco de Germoplasma de sachá inchi da Embrapa Amazônia Ocidental em Manaus-AM. O objetivo do presente trabalho foi o estudo de diversidade genética e caracterização dos acessos a partir de dados fenotípicos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e subsequente análise de agrupamento de médias pelo método Skott-Knott, distância generalizada de Mahalanobis e dendograma construído pelo método UPGMA. Foi realizada análise de correlações canônicas e para estudo da diversidade existente entre e dentro dos acessos foi utilizado o método da AMOVA. Constatou-se diferença significativa entre as médias para as variáveis analisadas, não foi encontrada nenhuma correlação canônica significativa para os grupos de variáveis analisados, a AMOVA mostrou que aproximadamente 60% da variação observada está dentro dos acessos. Os resultados obtidos mostram que há variabilidade entre os acessos estudados e que se deve explorar a variação dentro dos acessos para obtenção de melhores resultados em programas de melhoramento da espécie.

Plavras-chave: *Plukenetia volubilis*, Biometria, Euphorbiaceae, Amazônia.

Introdução

A Amazônia é um dos mais importantes centros de biodiversidade, várias e importantes culturas para a agricultura do mundo, como mandioca, abacaxi, cacau e borracha são originárias dessa região (Clement et al., 2009). No entanto, numerosas espécies de plantas amazônicas subexploradas e com valor econômico promissor ainda permanecem pouco conhecidas e negligenciadas pela comunidade científica. Um exemplo dessas espécies é a *Plukenetia volubilis* L., popularmente conhecida como “sacha inchi”, uma cultura com potencial para uso farmacêutico e estético (Krivankova et al., 2007).

A planta foi usada por pré-incas e Incas há 3.000 anos, sendo evidente a interpretação da planta em vasos nas tumbas incas. É uma espécie semi-perene, trepadora lenhosa, produz frutos contendo cápsulas com 3 a 5 cm de diâmetro, geralmente tetralóbulada, podendo ocorrer cinco a sete lóbulos, com uma semente oleaginosa dentro de cada lóbulo. O peso das sementes varia de 0,8 a 1,4 g e contém cerca de 54% de óleo e 27% de proteínas (Krivankova et al., 2007). O óleo contém altos níveis de ácidos graxos insaturados (Follegatti-Romero et al., 2009; Hamaker et al., 1992) chegando atingir até 93% do total. Hamaker et al. (1992) encontraram: 45,2% de ácido α -linolênico, 36,8% de ácido linoléico que são ácidos graxos poliinsaturados, 9,6% de oléico e 7,7% de saturados.

Até a década de 1940, os centros de origem eram considerados fontes ilimitadas de variabilidade genética (Borém, 2009). As expansões de fronteiras agrícolas e urbanas ocupam o habitat natural de numerosas espécies de plantas e animais, e a substituição de cultivares domésticas e raças locais (landraces) resultam em erosão na diversidade

genética de espécies de plantas nativas ou a sua extinção (Villalobos et al., 1991). A manutenção da variabilidade genética de uma espécie em Bancos de Germoplasma é uma alternativa para evitar a perda desses recursos genéticos. Para que a diversidade genética disponível no banco de germoplasma seja utilizada, é preciso que os acessos sejam caracterizados e documentados de forma que o melhorista possa identificar acessos úteis para seu programa de melhoramento (Borém, 2009).

Embora a composição e as propriedades da sachá inchi sejam relativamente bem conhecidas e o seu cultivo já tenha se expandido para a região do Alto Solimões (AM) e Manaus (AM), até o momento não foram identificadas informações na literatura sobre seu cultivo e diversidade genética. Esse trabalho teve como objetivo a mensuração da diversidade genética entre genótipos de sachá inchi que compõe o Banco de Germoplasma de sachá inchi da Embrapa Amazônia Ocidental.

Material e Métodos

O Banco de Germoplasma de sachá inchi da Embrapa Amazonia Ocidental, localizado em Manaus-AM nas coordenadas 3°8'S e 59°52'W, é constituído atualmente por 37 acessos dos quais 25 foram coletados no interior do estado no ano de 1992 e os 12 restantes foram coletados no sítio “Nova Jerusalém” em Careiro Castanho-AM, localizada nas coordenadas S 3°31'45,0'', W 59°49'07,9''.

Entre todos os acessos componentes do banco, os 25 coletados no interior do estado encontram-se em estágio reprodutivo e foram utilizados neste trabalho, o restante foi recentemente introduzido e ainda encontra-se em estágio vegetativo. O Banco de Germoplasma está dividido em duas áreas, apresentadas no código utilizado para identificação de cada acesso como A1 e A2, representado área 1 e área 2, sendo que não existe qualquer divisão em função da origem dos acessos nessas duas áreas. A Embrapa

Amazônia Ocidental vem realizando a coleta e biometria de frutos e sementes da espécie de frutos dos acessos que estão em fase reprodutiva a mais de um ano.

Foram coletados cinco frutos por acesso utilizado e realizadas análises morfológicas em frutos secos. Foram contados o número de lóbulos por fruto, e aferidos o peso do fruto, altura do fruto e número de sementes por fruto. As variáveis peso do fruto e altura do fruto foram obtidas por gravimétrica em balança eletrônica e de paquímetro digital, respectivamente. Foram obtidas as medidas de distância entre os lóbulos dos frutos, denominadas comprimento 1 e comprimento 2. O comprimento 1 representou a medida de distância para os pares de lóbulos mais distantes entre si e o comprimento 2 para os pares de lóbulos que apresentaram menor distância, para os frutos que apresentaram número ímpar de lóbulos o comprimento 1 foi obtido da forma anteriormente mencionada, o comprimento 2 foi obtido pela média aritmética das distâncias entre os lóbulos restantes. As sementes foram retiradas de cada fruto e foram mensurados peso, diâmetro e comprimento de cada semente (Coutinho et al., 2010). Foi calculada a relação massa de semente/massa de fruto e número de sementes por lóbulo para determinar o rendimento de semente.

O processamento dos dados foi realizado no Laboratório de Bioinformática da Universidade Federal de Viçosa, utilizando o software GENES (Cruz, 2013). Para a estimação da distância genética entre os acessos, foi realizada análise de variância em delineamento inteiramente casualizado, sendo considerando acessos como a fonte de variação e cada fruto uma repetição, Lyra et al. (2012) utilizaram a mesma estratégia para obtenção da variância residual. A partir dos dados obtidos da análise de variância (médias de todos os acessos e matriz de covariância residual) as médias foram agrupadas pelo método de Skott-Knott a 5% de probabilidade e obtida a matriz de

dissimilaridade através do cálculo da distância generalizada de Mahalanobis, representada pela expressão:

$$D_{ii'}^2 = \delta' \Psi^{-1} \delta$$

onde $D_{ii'}^2$ é a distância entre um acesso i e um acesso i' , $\delta' = [d_1 \ d_2 \ \dots \ d_n]$, sendo $d_j = Y_{ij} - Y_{i'j}$ e Y_{ij} a média do i -ésimo genótipo em relação à j -ésima característica.

A matriz de dissimilaridade obtida foi usada na construção do dendograma por meio do método hierárquico da ligação média entre grupos (UPGMA). Como regra geral, a construção do dendograma é estabelecida pelos genótipos de maior similaridade. Uma expressão geral para obtenção das médias não ponderadas entre grupos pode ser apresentada da seguinte maneira:

$$d_{(ij)k} = \frac{n_i}{n_i + n_j} d_{ik} + \frac{n_j}{n_i + n_j} d_{jk}$$

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 et al. 2011).

Posteriormente foi realizado o estudo da correlação entre as variáveis relacionadas ao fruto e as variáveis relacionadas à semente através da estimação das correlações canônicas. As variáveis foram divididas em dois grupos, o grupo I foi composto pelas variáveis peso de sementes, diâmetro da semente e comprimento da semente, o grupo II foi composto pelas variáveis número de lóbulos por fruto, peso do fruto, altura do fruto e comprimento 1 do fruto. As variáveis comprimento 2 do fruto e rendimento foram retiradas da análise por apresentarem problema estatístico de multicolinearidade com as variáveis peso de semente e diâmetro de sementes.

Para análise da variação existente dentro de cada acesso foi estimado a matriz de distância euclidiana pela expressão:

$$D_{ii'} = \sqrt{\sum_j (Y_{ij} - Y_{i'j})^2}$$

onde Y_{ij} é a observação no i -ésimo acesso para a j -ésima característica, padronizada pela expressão $(Z = X_i/S_x)$, sendo obtida a matriz de dissimilaridade entre indivíduos (fruto). A partir dessa nova matriz de dissimilaridade foi obtida a diversidade entre e dentro dos acessos pelo método da AMOVA (análise de variância molecular) descrito por Excoffier et al. (1992), o qual produz estimativas de componentes de variância análogas às estatísticas F de Wright. A matriz de dissimilaridade é particionada, agrupando as informações entre os pares de acessos dentro de cada fruto. O esquema da AMOVA é mostrado na Tabela 1. Sendo as somas de quadrado obtidas pelas expressões:

$$SQ_{Total} = \frac{1}{2N}T, \quad SQ_{Dentro} = \sum_{i=1}^F \frac{D_i}{2N_i} \quad e \quad SQ_{Entre} = SQ_{Total} - SQ_{Dentro}$$

onde N é o número total de observações e n representa o número frutos amostrados por acesso.

Uma vez estimados os quadrados médios, as esperanças dos quadrados médios foram obtidas considerando o modelo de dois fatores:

$$Y_{ij} = u + E_i + D_{ij}$$

sendo Y_{ij} a medida de dissimilaridade entre pares de frutos (j) no acesso (i), u a constante do modelo, E_i efeito da subpopulação i e D_{ij} o efeito da dissimilaridade entre os pares de indivíduos j no acesso i . Os estimadores dos componentes de variância que expressam as diferenciações dentro e entre dos acessos foram obtidos por meio de:

$$\sigma_d^2 = QMD \quad e \quad \sigma_e^2 = \frac{QME - QMD}{n}$$

onde σ_d^2 é o componente de variância dentro de acessos e σ_e^2 o componente de variância entre acessos.

Resultados

O agrupamento das médias obtido utilizando o método de Skott-Knott pode ser observado na Tabela 2. Para as variáveis número de lóbulos por fruto, comprimento de semente e rendimento de semente pode ser observado a formação de dois grupos, as variáveis altura do fruto, comprimento 1 do fruto, peso da semente e peso total de sementes formaram três grupos e entre as médias das variáveis peso do fruto, comprimento 2 do fruto e variável diâmetro da semente pode-se observar a formação de quatro grupos à 5% de probabilidade.

O agrupamento utilizando a matriz de dissimilaridade obtida pela distância de Mahalanobis mostrou a formação de quatro grupos entre os acessos avaliados, evidenciando baixa diversidade genética entre os acessos (Figura 1), o corte foi realizado ao nível de 58,61%*, estimado pelo método de Mojema.

A análise de correlações canônicas mostrou associações lineares entre os super caracteres estimados. As correlações entre pares de super caracteres e suas respectivas significâncias testadas pelo teste de qui-quadrado podem ser observados na Tabela 3.

Os resultados da AMOVA mostram a decomposição da variância total em variância entre e dentro dos acessos. O resultado da AMOVA pode ser observado na Tabela 1, mostrando também a porcentagem da variância presente entre e dentro de acessos.

Discussão

O teste de agrupamento de médias realizado (Tabela 2) mostra a formação de grupos para todas as variáveis analisadas, mesmo na variável número de lóbulos por fruto, que possui uma baixa amplitude entre médias, foi possível identificar diferenças significativas, resultando na formação de dois grupos distintos, sendo que apenas quatro

acessos foram agrupados no grupo *a*. Na variável peso de frutos, entre os quatro grupos formados, o grupo *a* foi composto por sete acessos, enquanto o grupo *d*, composto pelas menores médias, possui apenas três acessos. A formação de grupos nas variáveis comprimento 1 do fruto e comprimento 2 do fruto mostra que existe maior variação significativa entre o comprimento 2, no qual foram formados quatro grupos. As medições dessas duas variáveis não foram baseadas em metodologia científica pela carência de trabalhos que direcionem estudos de biometria na *sacha inchi*, assumindo que o tamanho do fruto esteja relacionado com o tamanho das sementes, a mensuração das dimensões do fruto mostram-se necessárias, a metodologia utilizada no presente trabalho mostrou-se válida e eficiente para agrupar as médias dos genótipos avaliados. A variável altura do fruto apresentou uma boa amplitude entre as médias dos acessos, resultando na formação de quatro grupos, uma particularidade desses resultados dessa variável foi que o grupo *a* foi composto por apenas um acesso enquanto o grupo *c* por quinze acessos. As variáveis peso da semente e peso total de sementes possuíram médias variando de 1,218 a 0,695 e 4,872 a 2,800 respectivamente, pode se observar que o maior valor é aproximadamente duas vezes o menor. Sabendo que o principal produto da *sacha inchi* é o óleo, é economicamente interessante a produção de sementes com maior massa, visando incremento na produtividade na lavoura. As variáveis diâmetro da semente e comprimento da semente também mostraram grande variação entre as médias obtidas, a variável rendimento, teve como maior média 0,627, proveniente do acesso A1M11, então para esse acesso espera-se obter em média 0,627 gramas de semente para cada grama de fruto produzida. Diferenças significativas utilizando esse método de agrupamento de médias são comumente observadas em trabalhos avaliando genótipos de espécies da família *euphorbiaceae* (Lyra et al. 2012; Silva et al. 2010; Melo et al. 2008).

A identificação de alguma estruturação geográfica no dendograma apresentado na Figura 1 foi dificultada pelo fato de não se ter informações sobre a origem de cada um desses acessos do banco de germoplasma. A única informação que pode ser atribuída à alguma divisão dos acessos é se ele está localizado na área 1 ou na área 2 do banco de germoplasma, sendo que mesmo utilizando essa informação, não se pode observar estruturação alguma no dendograma. Para o corte feito ao nível de fusão 0,5861 foram obtidos quatro grupos, sendo que o grupo A possui 20 acessos, dos quais 14 estão localizados na área 1 no Banco de Germoplasma e seis estão localizados na área 2, analisando os subgrupos formados dentro do grupo A, observa-se que os acessos da área 1 e da área 2 não apresentam padrão algum em suas posições no dendograma. O grupo B foi composto por 3 acessos pertencentes a área 2, dentro deste grupo pode ser observado dois subgrupos, o primeiro subgrupo à 0,09% da distância total agrupando os acessos A2M01 e A2M05 e ao nível de 0,14% da distância total agrupando esse subgrupo ao acesso A2M04. Os grupos C e D foram constituídos pelos acessos A1M05 e A2M05 respectivamente.

Para os pares canônicos apresentados na Tabela 3, não foi observada correlações significativas para os três pares estimados, além de se observar baixa amplitude nas associações obtidas. A correlação do primeiro par canônico possui um valor de 0,6412, o que pode ser traduzido em um r^2 de 0,4111, todavia, pelo fato da não obtenção de correlações significativas pelo teste de qui-quadrado deve-se tentar associações entre diferentes conjuntos de variáveis apresentados no presente trabalho. Ao testar a correlação canônica de um híbrido de mamoneira entre grupos de variáveis de semente e plântula; plântula e planta adulta; plântula e produção e entre planta adulta e produção de grãos, Brum et al. (2011) identificou que os grupos considerados não são independentes e que há uma relação linear entre eles. Para o híbrido Lyra, as correlações

canônicas significativas ocorrem somente entre os grupos de variáveis de plântulas e plantas adultas e entre plantas adultas e de produção.

Ao se testar a diversidade entre e dentro de acessos utilizando o método da AMOVA, foram geradas informações importantes para a adoção de estratégias para melhoramento da espécie. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos, observa-se que o componente de variância estimado para a variação dentro, com valor de 6,1568, é superior ao de variância entre acessos, representando 60,7887% da variação total, o componente de variância estimado para a variação entre acessos assumiu o valor de 3,9714 e detem apenas 39,2113% da variação total.

Os resultados do teste de Skott-Knott mostraram que existe variação significativa entre as variáveis analisadas neste estudo e possibilidade de ganho na seleção. Os resultados obtidos pela AMOVA, indicam que a seleção seria mais eficiente se feita dentro dos acessos, selecionando indivíduos provenientes da mesma progênie, visando explorar ao máximo a variação obtida na segregação esperada. O estudo de correlações canônicas não apresentou resultados significativos, as variáveis utilizadas na biometria de frutos que foram introduzidas nesse teste, não são um parâmetro confiável para a seleção indireta de sementes, considerando também os caracteres mensurados na semente. Na escolha de acessos para possíveis cruzamentos, pode-se dar preferência à cruzamentos divergentes, o dendograma fornece informações que podem ser úteis na seleção de matrizes, devendo-se selecionar aquelas que estão em grupos diferentes.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro, aos pesquisadores e técnicos à Embrapa Amazônia Ocidental. À

Universidade Federal do Amazonas, principalmente ao Laboratório de Melhoramento Vegetal e ao Laboratório de Bioinformática da Universidade Federal de Viçosa pela ajuda no processamento dos dados obtidos.

Bibliografia Citada

Borém, A.; Miranda, G. V. 2009. *Melhoramento de Plantas*. 5ta ed. Editora UFV, Viçosa, 2009, 523p.

Brum, B.; Lopes, S. J.; Storck, L.; Lúcio, A. D. C.; Oliveira, P. H. D.; Milani, M. 2011. Canonical correlation between variables seed, seedling, plant and grain yield in castor bean. *Ciência Rural*, 41: 404-411.

Clement, C.R.; Borém, A.; Lopes, M.T.G. 2009. Da domesticação ao melhoramento de plantas. *Domesticação e Melhoramento: espécies amazônicas*. Editora UFV, Viçosa, 2009, 486p.

Coutinho, D. J. G.; Mendes, L. C. A.; Silva, S.I. 2010. Biometria de sementes e teor de óleo de nove espécies de euphorbiaceae ocorrentes em Pernambuco. *X jornada de ensino, pesquisa e extensão*. JEPEX, UFRPE, Recife.

Cruz, C.D (2008) *Programa Genes: Diversidade Genética*. Editora UFV, Viçosa, 2008, 278p.

Cruz, C. D.; Ferreira, F. M.; Pessoni, L. 2011. A. *Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética*. Suprema, Visconde do Rio Branco, 2011, 620p.

Cruz, C.D. 2013. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*. 35: 271-276.

Excoffier L.; Smouse P.E.; Quattro J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.

Follegatti-Romero, L.A.; Piantino, C.R.; Grimaldi, R.; Cabral, F.A. 2009. Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 49: 323-329.

Hamaker, B.; Valles, C.; Gilman, R. 1992. Amino Acid and Fatty Acid Profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis*). *Cereal Chemistry*, 6: 461-465.

Krivankova, B.; Polesny, Z.; Lojka, B.; Lojkova, J.; Banout, J.; Preininger, D. 2007. Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*, Euphorbiaceae): A Promising Oilseed Crop from

Peruvian Amazon. *Resumo: Tropentag. Utilisation of diversity in land use systems: Sustainable and organic approaches to meet human needs*. p.9-11.

Lyra, D. H.; Almeida, L. A. H.; Brasileiro, B. P.; Sant'ana, M. R.; Amaral, C. L. F. 2012. Genetic parameters of fruits, seeds and seedlings of *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill.(Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 14: 579-585.

Mello, F. D. A.; Carginin, A.; Albrecht, J. C.; Alano, E. 2008. Crescimento e desenvolvimento inicial de procedências de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). *IX Simpósio Nacional Cerrado*. Brasília.

Silva, E. B.; Tanure, L. P. P., Souza, P. T.; Graziotti, P. H.; Silva, A. C. 2010. Crescimento de pinhão-manso em neossolo quartzarênico usando a técnica do nutriente falante. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas*,14: 73-81.

Villalobos, V. M.; Ferreira, P. & Mora, A (1991) The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm. *Biotech Advances*, 9: 197-215.

Legendas de Figuras e Tabelas

TABELA 1. Análise de variância molecular com dois níveis hierárquicos.

| FV | GL | SQ | QM | E(QM) |
|-------------------|-----|-----|-----|----------------------------|
| Entre acessos | p-1 | SQE | QME | $\sigma_d^2 + n\sigma_e^2$ |
| Dentro de acessos | N-p | SQD | QMT | σ_e^2 |
| Total | N-q | SQT | | σ_T^2 |

Sendo fonte de variação (FV), graus de liberdade (GL), a soma de quadrados estimada (SQ), os quadrados médios estimados (QM) e as esperanças de quadrados médios (E(QM)), n representa o número frutos amostrados por acesso.

TABELA 2. Teste de agrupamento de médias Skott-Knott ($\alpha=5\%$) para 10 variáveis avaliadas em 25 acessos de *Plukenétia volubilis* L. componentes do banco de germoplasma de sacha inchi da Embrapa Amazônia Ocidental.

| Número de Lóbulos por fruto | | Peso do Fruto | | Comprimento 1 do Fruto | | Comprimento 2 do Fruto | | Altura do Fruto | |
|-----------------------------|-------|---------------|----------|------------------------|----------|------------------------|----------|-----------------|----------|
| Acesso | Média | Acesso | Média | Acesso | Média | Acesso | Média | Acesso | Média |
| A2M06 | 4,6 a | A1M13 | 10,906 a | A1M13 | 49,664 a | A2M09 | 50,404 a | A1M05 | 25,096 a |
| A1M04 | 4,6 a | A1M07 | 10,452 a | A1M14 | 49,622 a | A1M13 | 49,720 a | A1M10 | 22,972 b |
| A2M04 | 4,5 a | A2M09 | 10,156 a | A1M12 | 48,972 a | A1M12 | 49,678 a | A1M14 | 22,848 b |
| A2M08 | 4,4 a | A1M10 | 10,156 a | A2M09 | 48,956 a | A1M14 | 49,462 a | A1M12 | 22,434 b |
| A2M03 | 4,2 b | A1M08 | 9,970 a | A1M10 | 48,802 a | A1M08 | 47,970 a | A2M08 | 22,020 b |
| A2M01 | 4,2 b | A1M05 | 9,928 a | A1M11 | 48,238 a | A1M11 | 47,920 a | A1M03 | 21,746 b |
| A1M08 | 4,2 b | A1M12 | 9,888 a | A1M08 | 48,034 a | A1M10 | 47,908 a | A1M01 | 21,540 b |
| A1M05 | 4,2 b | A2M08 | 9,422 b | A1M07 | 47,590 a | A1M02 | 47,302 b | A1M08 | 21,220 b |
| A2M10 | 4,0 b | A1M01 | 9,256 b | A1M02 | 47,306 a | A1M07 | 47,298 b | A2M09 | 20,996 b |
| A2M09 | 4,0 b | A1M14 | 9,006 b | A2M07 | 46,910 a | A2M07 | 46,806 b | A2M07 | 20,738 b |
| A2M07 | 4,0 b | A1M03 | 8,940 b | A2M08 | 46,784 a | A2M08 | 46,690 b | A1M11 | 20,432 c |
| A2M05 | 4,0 b | A2M04 | 8,715 b | A1M09 | 46,440 a | A2M03 | 45,676 b | A1M13 | 20,172 c |
| A2M02 | 4,0 b | A1M04 | 8,698 b | A2M03 | 45,512 a | A1M09 | 45,598 b | A1M06 | 20,002 c |
| A1M15 | 4,0 b | A1M02 | 8,660 b | A1M04 | 44,536 a | A1M03 | 45,014 b | A1M07 | 19,892 c |
| A1M14 | 4,0 b | A1M09 | 8,602 b | A1M03 | 43,618 b | A1M04 | 44,782 b | A2M03 | 19,664 c |
| A1M13 | 4,0 b | A2M03 | 8,548 b | A1M06 | 43,396 b | A1M06 | 43,254 c | A1M04 | 19,280 c |
| A1M12 | 4,0 b | A2M07 | 8,156 c | A2M04 | 43,060 b | A2M06 | 43,066 c | A2M06 | 19,210 c |
| A1M11 | 4,0 b | A2M01 | 7,910 c | A2M02 | 42,752 b | A2M02 | 42,954 c | A1M02 | 19,054 c |
| A1M10 | 4,0 b | A2M05 | 7,866 c | A2M06 | 41,386 b | A2M04 | 42,357 c | A2M10 | 18,880 c |
| A1M09 | 4,0 b | A2M06 | 7,322 c | A1M15 | 41,340 b | A1M15 | 42,176 c | A1M09 | 18,728 c |
| A1M07 | 4,0 b | A1M11 | 7,142 c | A2M10 | 40,382 c | A1M01 | 40,938 c | A2M04 | 18,355 c |
| A1M06 | 4,0 b | A2M10 | 6,970 c | A1M01 | 39,940 c | A2M10 | 40,878 c | A1M15 | 18,354 c |
| A1M03 | 4,0 b | A1M06 | 6,302 d | A2M05 | 39,226 c | A1M05 | 39,762 d | A2M02 | 18,048 c |
| A1M02 | 4,0 b | A2M02 | 6,300 d | A1M05 | 39,204 c | A2M05 | 39,588 d | A2M05 | 17,692 c |
| A1M01 | 4,0 b | A1M15 | 5,976 d | A2M01 | 38,072 c | A2M01 | 37,306 d | A2M01 | 16,748 c |

| Peso da Semente | | Diâmetro da Semente | | Comprimento da Semente | | Peso Total de Sementes | | Rendimento | |
|-----------------|---------|---------------------|----------|------------------------|---------|------------------------|---------|------------|---------|
| Acesso | Média | Acesso | Média | Acesso | Média | Acesso | Média | Acesso | Média |
| A1M10 | 1,218 a | A1M11 | 20,133 a | A1M05 | 8,916 a | A1M10 | 4,874 a | A1M11 | 0,627 a |
| A1M05 | 1,185 a | A1M07 | 19,923 a | A1M02 | 8,771 a | A1M05 | 4,740 a | A2M10 | 0,550 a |
| A1M02 | 1,162 a | A1M13 | 18,556 b | A1M07 | 8,770 a | A1M02 | 4,648 a | A1M02 | 0,545 a |
| A2M04 | 1,156 a | A1M14 | 17,706 b | A2M04 | 8,688 a | A2M04 | 4,627 a | A2M04 | 0,538 a |
| A1M11 | 1,109 a | A1M08 | 17,290 b | A1M10 | 8,516 a | A1M11 | 4,438 a | A2M01 | 0,520 a |
| A1M07 | 1,105 a | A2M09 | 16,901 c | A2M05 | 8,499 a | A1M07 | 4,420 a | A2M05 | 0,512 a |
| A1M14 | 1,079 a | A1M10 | 16,872 c | A2M10 | 8,497 a | A1M14 | 4,318 a | A1M15 | 0,505 a |
| A2M01 | 1,026 b | A1M02 | 16,519 c | A2M01 | 8,477 a | A2M01 | 4,098 b | A2M02 | 0,498 a |
| A1M13 | 1,021 b | A1M05 | 16,414 c | A2M08 | 8,394 a | A1M13 | 4,086 b | A1M05 | 0,495 a |
| A2M09 | 1,020 b | A1M03 | 16,190 c | A1M14 | 8,389 a | A2M09 | 4,082 b | A1M06 | 0,488 a |
| A1M12 | 1,010 b | A1M09 | 16,166 c | A1M03 | 8,385 a | A1M12 | 4,040 b | A1M14 | 0,483 a |
| A2M05 | 0,997 b | A2M08 | 16,149 c | A1M13 | 8,226 b | A2M05 | 3,988 b | A1M10 | 0,482 a |
| A2M08 | 0,988 b | A1M12 | 16,052 c | A1M09 | 8,168 b | A2M08 | 3,948 b | A2M07 | 0,456 b |
| A1M08 | 0,947 b | A2M04 | 16,043 c | A2M09 | 8,156 b | A1M08 | 3,788 b | A1M09 | 0,441 b |
| A1M09 | 0,942 b | A2M01 | 15,758 c | A1M08 | 8,156 b | A1M09 | 3,770 b | A2M08 | 0,426 b |
| A2M10 | 0,940 b | A1M04 | 15,595 c | A1M11 | 8,082 b | A2M10 | 3,760 b | A1M07 | 0,422 b |
| A2M07 | 0,930 b | A2M10 | 15,416 c | A2M07 | 8,063 b | A2M07 | 3,722 b | A2M03 | 0,421 b |
| A2M03 | 0,887 c | A2M07 | 15,147 d | A2M03 | 7,957 b | A2M03 | 3,548 c | A1M12 | 0,410 b |
| A1M03 | 0,814 c | A2M06 | 15,087 d | A1M12 | 7,928 b | A1M03 | 3,256 c | A2M06 | 0,396 b |
| A1M04 | 0,813 c | A2M03 | 14,724 d | A1M15 | 7,903 b | A1M04 | 3,232 c | A2M09 | 0,395 b |
| A2M02 | 0,788 c | A2M02 | 14,472 d | A2M06 | 7,812 b | A2M02 | 3,152 c | A1M08 | 0,379 b |
| A1M01 | 0,788 c | A2M05 | 14,201 d | A2M02 | 7,771 b | A1M01 | 3,152 c | A1M13 | 0,377 b |
| A1M15 | 0,753 c | A1M01 | 14,034 d | A1M01 | 7,741 b | A1M15 | 3,014 c | A1M04 | 0,373 b |
| A1M06 | 0,743 c | A1M06 | 13,920 d | A1M04 | 7,678 b | A1M06 | 2,974 c | A1M03 | 0,369 b |
| A2M06 | 0,695 c | A1M15 | 13,906 d | A1M06 | 7,486 b | A2M06 | 2,800 c | A1M01 | 0,337 b |

Médias seguidas por mesmas letras minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

TABELA 3. Correlações canônicas entre dois grupos de caracteres de frutos e sementes de sachá inchi, onde o primeiro grupo é composto pelas variáveis peso da semente, diâmetro da semente e comprimento da semente e o segundo grupo pelas variáveis número de lóbulos por fruto, peso do fruto, altura do fruto e comprimento 1 do fruto.

| Variável | Pares Canônicos | | |
|-----------------------------|-----------------|----------|----------|
| | 1° | 2° | 3° |
| Peso da Semente | 1,60224 | -0,3533 | -0,3545 |
| Diâmetro da Semente | 0,23909 | 0,01851 | 0,9732 |
| Comprimento da Semente | -1,1019 | 1,25985 | 0,15341 |
| Número de Lóbulos por Fruto | -0,1678 | -0,3287 | -0,7544 |
| Peso do Fruto | 0,21802 | 1,22917 | 0,14382 |
| Altura do Fruto | 0,07998 | -0,2276 | -0,8249 |
| Comprimento 1 do Fruto | 0,78515 | -0,8469 | 0,06811 |
| r | 0,641206 | 0,528236 | 0,180216 |
| significância | NS | NS | NS |

TABELA 4. AMOVA de acessos de *Plukenetia volubilis* L., estimado a partir da matriz de dissimilaridade entre os acessos e considerando dois níveis hierárquicos (entre e dentro de acessos).

| FV | GL | SQ | QM | ECV | % |
|--------|-----|-----------|--------|---------|---------|
| Entre | 24 | 624 | 26 | 3,9714 | 39,2113 |
| Dentro | 100 | 616 | 6,1568 | 6,1568 | 60,7887 |
| Total | 124 | 1240,0029 | 10 | 10,1281 | 100 |

FV= fonte de variação, GL= graus de liberdade, SQ= soma de quadrados, QM= Quadrado médio, ECV= estimativa de componentes de variância, %= porcentagem da variação.

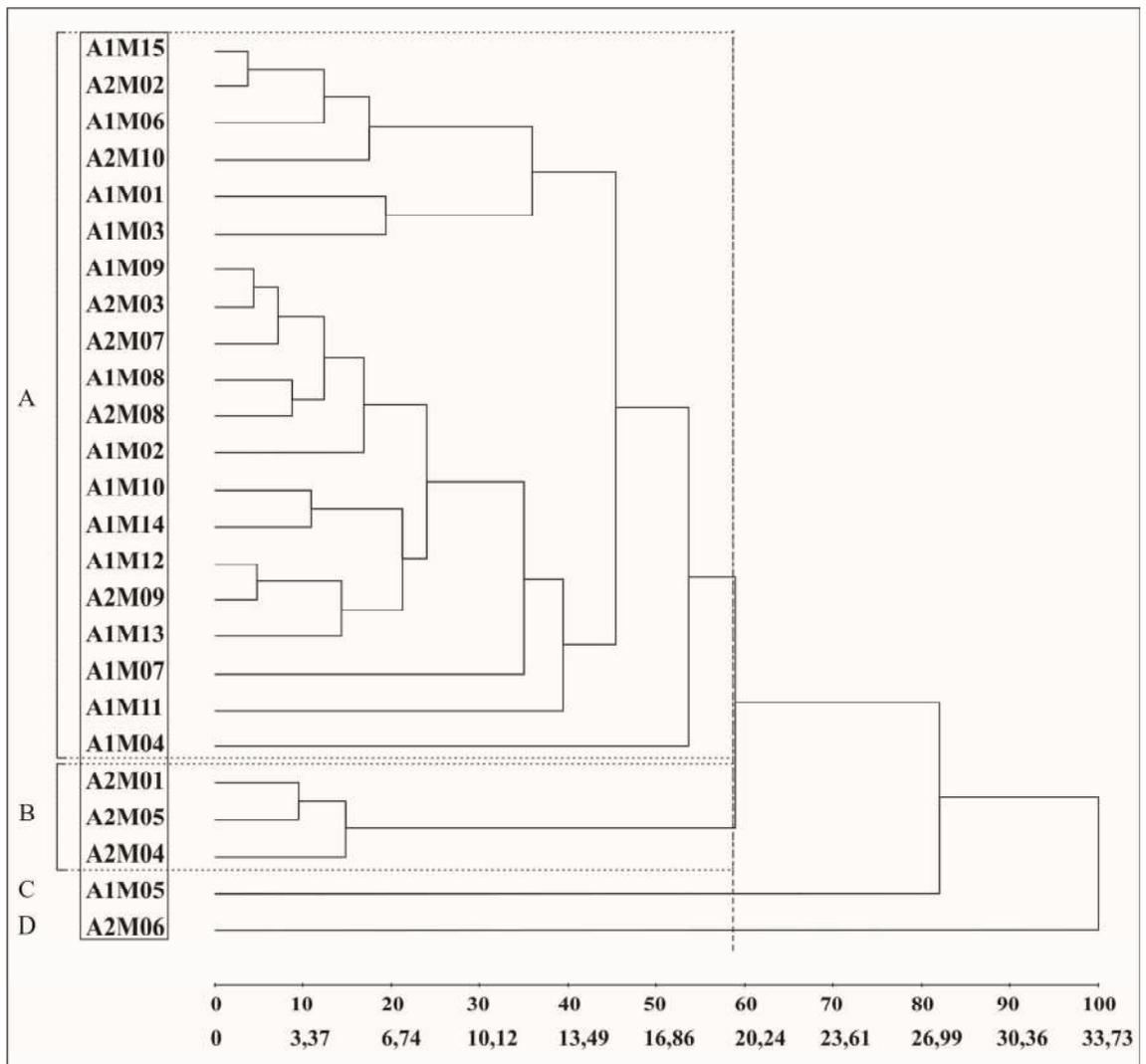


FIGURA 1. Dendrograma de 25 acessos de *Plukenetia volubilis* L. obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, a linha vertical tracejada representa o corte estimado pelo método de Mojema (0,5861*) e A, B, C e D são os grupos formados à esse nível de fusão.

4. CONCLUSÕES GERAIS

O banco de germoplasma de sachá inchi da Embrapa Amazônia Ocidental possui variabilidade genética que pode ser explorada em programas de melhoramento genético da espécie. Os 37 acessos que compõem o banco mostraram diversidade entre si bem como também uma estruturação geográfica em função do local de origem dos acessos. Os 25 acessos que foram submetidos ao estudo através de características fenotípicas mostraram que a variabilidade dentro dos acessos é maior que a variabilidade existente entre eles. Com base no presente trabalho é possível tomar decisões para escolha de genitores em um futuro programa de melhoramento da sachá inchi, que é uma espécie nativa da região Amazônica.