

ESTUDO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Ana Gabriela Polaro Serra¹; Renato Paiva¹; Edilson Paiva²; Rairys Cravo Nogueira¹; Fernanda Pereira Soares¹;
Patrícia Duarte de Oliveira Paiva²

¹Universidade Federal de Lavras, C. P.: 37, CEP: 37200-000, Lavras-MG. e-mail: renpaiva@ufla.br; pdoliveira@ufla.br

²EMBRAPA CNPMS Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG

RESUMO: A devastação de castanhais nativos na Amazônia, devido à implantação de programas de colonização e/ou de atividades comerciais, está provocando a diminuição da variabilidade genética de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), imprescindível na manutenção da diversidade genética da cultura e como base de trabalho para programas de melhoramento, essenciais para a expansão das áreas de cultivo. O presente trabalho teve por objetivo estudar a divergência genética da castanha-do-brasil, utilizando marcadores moleculares RAPD. Trinta e quatro indivíduos foram avaliados, sendo dezessete provenientes do Banco de Germoplasma do Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (EMBRAPA/Amazônia Oriental), localizado na cidade de Belém-PA e outros 17 indivíduos, de um reflorestamento na cidade de Cláudia-MT. O DNA destes indivíduos foi extraído, purificado e quantificado. Nas análises foram utilizados 51 iniciadores de reação (primers), que geraram 144 bandas polimórficas. As distâncias genéticas foram obtidas pelo complemento do coeficiente de similaridade de Sorensen-Dice. Os resultados indicaram a presença de divergência genética entre e dentro das populações estudadas. Três grupos de indivíduos foram formados no gráfico de agrupamento: o primeiro grupo constituiu-se de indivíduos dos dois estados, o segundo apresentou apenas indivíduos do Estado do Mato Grosso e o terceiro, apenas indivíduos do Estado do Pará. Os marcadores RAPD mostraram-se eficientes na separação dos indivíduos de acordo com os centros de origem.

Palavras-chave: marcadores moleculares, diversidade genética, castanha-do-brasil

STUDY OF GENETIC DIVERGENCY IN BRAZIL NUT (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) USING RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) MARKER

ABSTRACT: Depletion of native nut species in the Amazon, due to implementation of colonization programs and/or new economic activities is causing a reduction in the genetic variability of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), which is a vital characteristic for maintaining genetic diversity of the crop, for breeding programs as well as for the expansion of cultivated areas. The objective of the present work was to study the genetic divergence of Brazil nut cultivated trees, using RAPD molecular marker. Thirty four plants were studied with 17 being from the germplasm bank of the East Amazonian Agroforest Research Center (Embrapa/East Amazonia) located in Belém, State of Pará, Brazil, and 17 from a reforestation area in the city of Cláudia, State of Mato Grosso. Leaf DNA from these plants was extracted, purified and quantified. Fifty one primers were used, from which, 144 polymorph bands were obtained. Genetic distances were obtained by the similarity coefficient of Sorensen-Dice. The results indicated the presence of genetic divergence between and within the studied populations. Three groups of individuals were formed within the grouping graphic: the first group presented individuals from both States, while the second group presented individuals only from the State of Mato Grosso, and the third group presented individuals only from the State of Pará. The use of RAPD was efficient in separating individuals based on their geographic origins.

Key words: molecular markers; genetic diversity; Brazil nut

INTRODUÇÃO

A erosão genética que vem ocorrendo em populações nativas de espécies tropicais arbóreas é um fato preocupante. O desaparecimento e o desconhecimento de genes que poderiam ser utilizados em programas de

melhoramento genético têm diminuído a disponibilidade de materiais para pesquisa biológica (Ferreira e Gratapaglia, 1995).

Hamrick (1983) aborda a necessidade do conhecimento da variabilidade genética tanto dentro como entre as populações para dar suporte à conservação

dos recursos genéticos florestais.

Os marcadores moleculares são considerados atualmente uma das principais ferramentas utilizadas para obtenção de informações sobre a diversidade genética de populações. O marcador molecular RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), derivado da técnica PCR, gera fragmentos específicos de DNA, os quais são amplificados por meio de primers únicos de seqüência nucleotídica arbitrária (Williams et al., 1990).

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), espécie arbórea pertencente à família Lecythidaceae, apresenta um grande valor econômico, já que seus frutos (castanhas) e sua madeira são intensamente comercializados. Na região amazônica, quase toda a extração de castanha-do-brasil é destinada à exportação. Segundo Carvalho et al. (1994), após a decadência da borracha, ela passou a constituir o principal produto extrativo para exportação da Região Norte do Brasil e tem sido irracionalmente explorada.

Estudos genéticos utilizando espécies alóginas, como a castanha-do-brasil, e marcadores moleculares vêm sendo realizados com grande intensidade. Os elevados níveis de heterozigose dessas espécies são refletidos em grandes quantidades de polimorfismo de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Dessa forma, é possível estabelecer o grau de divergência genética dos indivíduos entre e dentro de populações. No caso das castanheiras, poucos trabalhos foram realizados com o objetivo de informar o grau de divergência genética existente tanto em populações naturais, como em populações cultivadas em plantios comerciais, bancos de germoplasma e reflorestamentos.

O objetivo desse trabalho foi estudar a divergência genética existente em plantios racionais de castanha-do-brasil nos estados do Pará e Mato Grosso, por meio de marcadores RAPD. Espera-se, desta forma, gerar informações que poderão ser utilizadas em pesquisas futuras, relacionadas tanto à conservação da diversidade genética da cultura como ao melhoramento genético de *Bertholletia excelsa*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da Embrapa Milho e Sorgo, localizada na cidade de Sete Lagoas - MG.

Material Vegetal

Avaliaram-se 34 indivíduos (plantas adultas) de plantios racionais de castanha-do-brasil. Dezesete foram coletados no banco de germoplasma *in vivo* de castanha-do-brasil, no Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (EMBRAPA/Amazônia Oriental), Belém, Pará, o qual possui clones provenientes de diferentes regiões do Estado (Tabela 1). Esses indivíduos foram denominados de PA1 a PA17. Os dezesete indivíduos restantes foram coletados aleatoriamente em um reflorestamento no município de Cláudia, localizado ao norte do Mato Grosso. A esses foi dada a identificação de MT1 a MT17.

Extração, purificação e quantificação do DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Nienhuis et al. (1995), com algumas modificações. Foram utilizadas 2 g de folhas, trituradas com nitrogênio líquido em almofariz e, em seguida, transferidas para tubos de centrifuga, onde foram adicionados 20 µL de β-mercaptoetanol e 10 mL de tampão de extração. O tampão de extração constituiu-se de 2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH 8,0), 20 mM de EDTA (pH 8,0), 1,4 M de NaCl e 1% de PVP (polivinilpirrolidone). As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C durante 60 minutos e posteriormente centrifugadas.

A purificação do DNA foi feita seguindo a metodologia descrita por Ausubel (1998). Às amostras purificadas, foram adicionados 10 µL de solução de RNase (10 mg mL⁻¹).

O DNA foi quantificado por meio de espectrofotometria UV e de eletroforese em gel de agarose. A quantificação no espectrofotômetro foi realizada utilizando-se 5 µL da amostra e 995 µL de água destilada, a uma

Tabela 1 - Clones, origens e indivíduos coletados no Banco de Germoplasma *in vivo* de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), localizado no Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental.

CLONE	ORIGEM	INDIVÍDUO(S)
Santa Fé II (SFII)	Alenquer	PA1, PA4 e PA8
Santa Fé I (SFI)	Alenquer	PA14, PA15 e PA16
614	Piraruacá	PA2, PA6, PA11 e PA17
606	Alenquer	PA3, PA10 e PA12
M. Pedro II	Rio Mamiá	PA5, PA9 e PA13
609	Oriximiná	PA7

absorbância de 260 nm. A quantificação eletroforética foi feita em gel de agarose 0,8%, onde o padrão de banda obtido forneceu a qualidade e quantidade do DNA extraído. Após a corrida a 100 V, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (10%) durante 30 minutos, e as bandas foram visualizadas por meio de exposição do gel à luz ultravioleta.

Obtenção dos marcadores RAPD

Foram utilizados 51 primers da marca Operon, que são os seguintes: OPA1, OPA4, OPA5, OPA9, OPA10, OPA17, OPA18, OPB1, OPB4, OPB8, OPB10, OPB12, OPB18, OPC2, OPC3, OPC6, OPC8, OPC11, OPS7, OPS8, OPS9, OPS11, OPS16, OPS17, OPS19, OPC12, OPC13, OPC15, OPJ19, OPL8, OPO3, OPO6, OPO7, OPO9, OPO10, OPO13, OPO12, OPO15, OPO20, OPR4, OPR9, OPR10, OPR12, OPR15, OPW1, OPW2, OPW3, OPW5, OPW7, OPW8, OPW9, OPW10, OPW13, OPW18, OPW19.

Para cada reação de RAPD foram utilizados: 9,5 µL de água ultrapura estéril, 2,5 µL de tampão de PCR 10X, 1 µL de mix dNTPs 10 mM, 1 µL de primer 4 µM, 1 µL de DNA-Taq Polimerase e 10 µL de solução de DNA (5 ng µL⁻¹), com um volume final de reação igual a 25 µL. As reações para a amplificação do DNA foram realizadas em um termociclador Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 9.600).

O programa do termociclador utilizado foi o seguinte: A) 95°C (1') - desnaturação inicial do DNA; B) 35 ciclos de amplificação: 94°C (10'') - desnaturação + 36°C (1') - anelamento dos primers + 72°C (2') - extensão pela Taq polimerase; C) 72°C (7') - etapa final da reação e D) 4°C - manutenção das amostras para posterior aplicação no gel.

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TAE, por 1 hora a 100 V. Adicionou-se 5 µL de Dye Xylene Cyanole-Orange para DNA. Após a corrida, o gel foi transferido para uma bandeja contendo água e solução de brometo de etídio na concentração de 10%, e submetido à agitação por 30 minutos a temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas.

Análise dos resultados

Para análise da variabilidade genética entre os indivíduos, cada banda polimórfica foi considerada como um caráter único, sendo a sua presença em um indivíduo designada por 1 (um) e sua ausência em outro indivíduo, por 0 (zero). Com os dados obtidos da análise dos géis foi construída uma matriz.

A partir da matriz de 0 e 1, obteve-se uma matriz de distância, utilizando-se o coeficiente de similaridade de Sorensen-Dice (Duarte, 1998), por meio da expressão:

$$sg_{xy} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

sendo: a indicação de que houve concordância entre o par de genótipos analisados, e b e c indicação de que não houve concordância entre os genótipos analisados.

As similaridades foram transformadas em medidas de dissimilaridade pela seguinte equação:

$$dg_{xy} = 1 - sg_{xy}$$

sendo: dg_{xy} indicação da divergência genética entre os indivíduos x e y; e sg_{xy} indicação da similaridade entre os indivíduos x e y.

A representação gráfica dos resultados foi feita por meio do gráfico de agrupamento, construído pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Average), através do programa STATISTICA, Versão 4.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 51 primers utilizados nas amplificações do DNA genômico dos indivíduos provenientes dos estados do Pará e Mato Grosso geraram pelo menos uma banda polimórfica. No total, foram obtidas 144 bandas polimórficas. Alguns trabalhos de reamostragem têm verificado que, com marcadores RAPD, a partir da presença de 100 bandas polimórficas, praticamente ocorre uma estabilização do coeficiente de variação das distâncias genéticas entre os genótipos (Nienhuis et al., 1995). O número médio de locos polimórficos por primer foi de 2,8. Um exemplo de padrão de bandas polimórficas está representado na Figura 1.

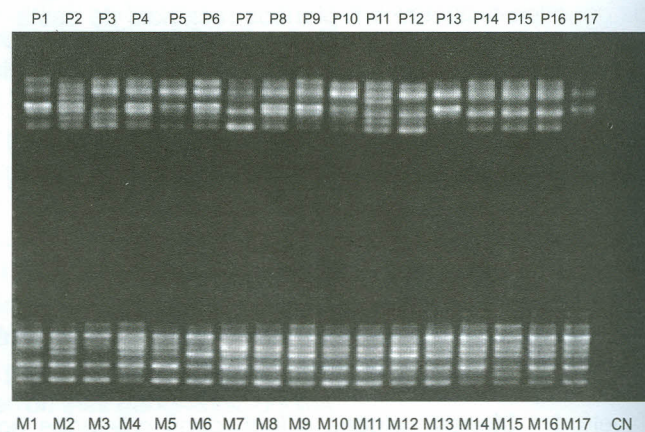


Figura1 - Produto da amplificação de DNA de folhas de castanha-do-brasil de indivíduos provenientes de regiões do estado do Pará (PA1 a PA17) e Mato Grosso (MT1 a MT17), obtido com o primer OPS11. CN = controle negativo.

A partir das 144 bandas polimórficas obtidas, construiu-se a matriz de distâncias genéticas. A distância genética média foi de 39%, com uma amplitude de

4% a 72%. A menor distância genética foi observada entre os indivíduos PA14 e PA16, pertencentes ao clone Santa Fé I, provenientes da cidade de Alenquer - PA, e a maior distância genética foi verificada entre os indivíduos PA5 e MT11.

O gráfico de agrupamento apresentado pelo método UPGMA (Figura 2), separa os indivíduos analisados em três grupos, com uma distância genética limite de 72%, o que sugere presença de variabilidade genética entre os grupos de indivíduos, de acordo com suas origens, e também, dentro dos grupos de indivíduos.

O primeiro grupo foi formado pelos indivíduos PA10, PA17, PA5, PA3, PA12, PA2, PA7, PA13 e PA15, provenientes do Estado do Pará e pelos indivíduos MT13, MT6, MT3 e MT15, provenientes do Estado do Mato Grosso. Apesar dos indivíduos de ambos os estados estarem geograficamente distantes, os resultados indicam a existência de uma maior similaridade entre eles quando comparados com o segundo e terceiro grupos formados no gráfico. A partir deste resultado pode-se inferir que as sementes de alguns indivíduos provenientes do reflorestamento (MT) podem ter sido coletadas em regiões do Estado do Pará, confirmando a idéia proposta por Ducke (1946) que afirma que a distribuição de árvores de castanha-do-brasil é atribuída diretamente à intervenção do homem, já que as cotias (*Dasyprocta leporina*), principais agentes dispersores de sementes desta espécie, possuem um alcance restrito (Peres e Baider, 1997). Mori et al. (1990), estudando a ecologia de castanheiras, afirmaram que populações desta espécie podem ter sido plantadas por civilizações pré-colombianas. Existe ainda, a possibilidade de que

duas populações de castanheira possam ser derivadas de uma população ancestral comum (Prance e Mori, 1979). Buckley et al. (1988) observaram uma diferenciação genética muito pequena em populações naturais de castanha-do-brasil analisadas através de isoenzimas.

Observa-se também dentro do primeiro grupo, a formação de subgrupos geneticamente mais próximos, como os indivíduos PA10, PA17 e PA5, pertencentes aos clones 606, 614 e M. Pedro II, respectivamente, e os indivíduos MT13, MT6 e MT3 e PA12 e PA2, pertencentes aos clones 606 e M. Pedro II, respectivamente. A presença de indivíduos isolados, como PA3 (clone 606), PA7 (clone 609) e MT15 também foi constatada.

O segundo grupo observado foi formado apenas por indivíduos do Estado do Mato Grosso: MT11, MT7, MT17, MT16, MT10, MT14, MT9, MT12, MT8, MT4, MT5, MT2 e MT1. Neste grupo observa-se também a formação de subgrupos geneticamente mais semelhantes, como os indivíduos MT11 e MT7; MT17, MT16 e MT10; MT14, MT9, MT12, MT8 e MT4; e MT5 e MT2. O indivíduo MT1 apresentou-se isolado. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por O'Malley et al. (1988), estudando sistemas de manutenção de populações naturais de castanha-do-brasil através de isoenzimas. Os autores observaram que, dentro de uma mesma população desta espécie, existe um elevado nível de variação genética devido a uma alta taxa de cruzamento entre os indivíduos.

No terceiro grupo, observou-se a presença dos indivíduos PA11, PA15, PA16, PA14, PA9, PA8, PA4 e PA1, todos provenientes do estado do Pará. A tendên-

Dendrograma para árvores de castanha-do-Pará provenientes dos Estados do Pará e Mato Grosso

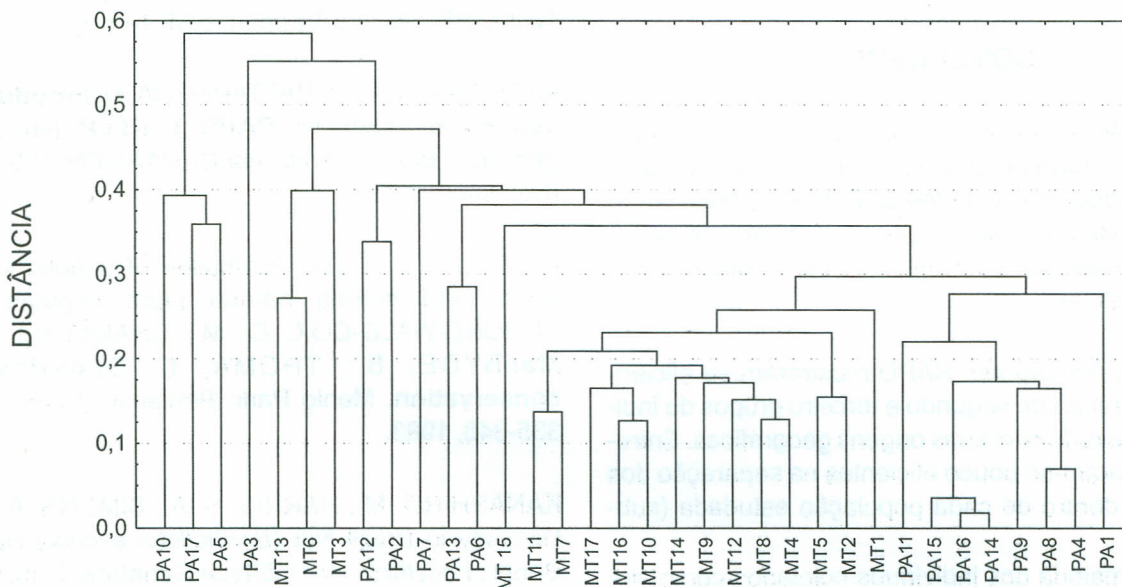


Figura 2 - Gráfico de agrupamento das distâncias genéticas entre indivíduos de castanha-do-brasil, provenientes dos estados do Pará (PA1 a PA17) e do Mato Grosso (MT1 a MT17).

cia de formação de subgrupos, também foi verificada. Os indivíduos PA11 (pertencente ao clone 614) e PA1 (pertencente ao clone Santa Fé II), apresentaram-se de forma isolada. Os indivíduos PA15, PA16 e PA14 (pertencentes ao clone Santa Fé I) foram os que apresentaram menor distância genética entre si. O indivíduo PA9 (clone M. Pedro I) e os indivíduos PA8 e PA4 (clone Santa Fé II) apresentaram-se como um subgrupo. Observou-se neste grupo de indivíduos, agrupamentos de acordo com as regiões onde foram coletados no estado do Pará.

Os resultados obtidos estão relacionados com as origens geográficas dos indivíduos, provenientes dos estados do Pará e Mato Grosso, porém, a formação do grupo 1, no gráfico de agrupamento (Figura 2) mostra a presença de similaridade genética entre alguns indivíduos provenientes dos dois estados. Resultados semelhantes foram observados por Kanashiro et al. (1997), estudando a variação genética em 100 indivíduos de castanha-do-brasil provenientes de cinco regiões da Amazônia brasileira (Alenquer-PA, Altamira-PA, Marabá-PA, Santarém-PA e Rio Branco-AC) com a utilização de 47 primers. O grau de similaridade entre essas populações foi calculado por meio do índice de Jaccard's. O gráfico de agrupamento demonstrou um primeiro grupo com uma maior similaridade genética, formado pelas populações de Alenquer, Altamira e Marabá, e um segundo grupo formado pelas populações de Santarém e Rio Branco. Provavelmente, esses resultados devem estar relacionados com a distribuição geográfica destas populações. Entretanto, a população de Santarém, que é geograficamente mais próxima das populações do primeiro grupo, mostrou-se geneticamente mais similar à população de Rio Branco, a qual é geograficamente mais isolada.

CONCLUSÕES

1. Três grupos de indivíduos foram observados no gráfico de agrupamento. O primeiro grupo, composto por indivíduos dos estados do Pará e do Mato Grosso. O segundo e terceiro grupos constituídos de indivíduos mais evidentemente separados em relação às origens geográficas.

2. Os marcadores RAPD mostraram-se eficientes na separação do segundo e terceiro grupos de indivíduos, de acordo com suas origens geográficas. Entretanto mostraram-se pouco eficientes na separação dos indivíduos, dentro de cada população estudada (subgrupos).

3. A maioria dos indivíduos coletados como clones no Banco de Germoplasma da EMBRAPA/Amazônia Oriental apresentaram divergência genética.

4. A distância genética média entre os indivíduos foi de 39%, sendo a menor distância (4%), observada entre os indivíduos PA14 e PA16, provenientes da cidade de Alenquer no Estado do Pará e pertencentes ao Clone Santa Fé e, a maior distância (72%), observada entre os indivíduos PA5 e MT11.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSUBEL, F. M. 1998 **Current Protocols in Molecular Biology**. Molecular Biology Laboratory Manuals. New York, USA, John Wiley & Son. v. 1, supplement 26, p. 261-12.
- BUCKLEY, D. P.; O'MALLEY, D. M.; APSIT, V.; PRANCE, G. T.; BAWA, K. S. 1988. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. - *Lecythidaceae*). 1. Genetic variation in natural populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, n. 6, p. 923-928.
- CARVALHO, R. de A.; FERREIRA, C. A. P.; HOMMA, A. K. O. **Fontes de crescimento das exportações de castanha-do-brasil (1970-1988)**. Belém: Embrapa CPATU, 1994. 27p. (EMBRAPA CPATU. Documentos, 76).
- DUARTE, J. M. **Estudo da divergência genética em raças de feijão por meio de marcadores RAPD**. 1998. 78p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- DUCKE, A. **Plantas de cultura pré-colombiana na Amazônia Brasileira**. Belém. 1946. p. 2-24 (Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte).
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-CENARGEN. 1995. 220p. (Documentos, 20).
- HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. H.; MacBYDE, B.; THOMA, L. **Genetics and conservation**. Menlo Park: Benjamim Cummings, p. 335-348, 1983.
- KANASHIRO, M.; HARRIS, S. A.; SIMONS, A. RAPD Diversity in Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl., *Lecythidaceae*). **Silvae Genetica**, v. 46, n. 4. p. 185-252, 1997.
- MORI, S. A.; PRANCE, G. T.; BALICK, M. J. Taxonomy,

ecology and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. - *Lecythidaceae*).

Advanced Economical Botany, Institute of Economic Botany, New York, Botanical Garden, v. 8, p. 130-150, 1990.

NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J. B. dos. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 2, p. 300-306, 1995.

O'MALLEY, D. M.; BUCKLEY, D. P.; PRANCE, G. T.; BAWA, K. S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. - *Lecythidaceae*). 2. Mating system. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, n. 6, p. 929-

932, 1988.

PERES, C. A.; BAIDER, C. Seed dispersal, spatial distribution and population structure of Brazil nut trees (*Bertholletia excelsa*) in southeastern Amazonia. **Journal of Tropical Ecology**, v. 13, p. 395-616, 1997.

PRANCE, G. T.; MORI, S. A. *Lecythidaceae*. **Flora Neotropica**, v. 21, n. 1, p. 270, 1979.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 22, p. 6531-6535, 1990.