

**ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE CALOS E
ESTUDO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM
CASTANHA-DO-BRASIL
(*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**

ANA GABRIELA POLARO SERRA

1999

46484

13164 MFN.

ANA GABRIELA POLARO SERRA

**ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE CALOS E ESTUDO DA DIVERGÊNCIA
GENÉTICA EM CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K.).**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. RENATO PAIVA, Ph.D.

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

1999



Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Serra, Ana Gabriela Polaro

Análises bioquímicas de calos e estudo da divergência genética em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) / Ana Gabriela Polaro Serra. – Lavras : UFLA, 1999.

72 p. : il.

Orientador: Renato Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Castanha-do-brasil. 2. Calo. 3. Análise bioquímica. 4. População. 5. RAPD. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.53

**ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE CALOS E ESTUDO DA
DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM CASTANHA-DO-
BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 16 de março de 1999

Profa. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

UFLA

Profa. Ms. Giovana Augusta Torres

UFLA



Prof. Renato Paiva, PhD

UFLA

(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

Ao meu pai, Haroldo Nelson Andrade Serra

À minha mãe, Maria Fátima Polaro Serra

Ao meu irmão, Marcus Polaro Serra,

pelos esforços dedicados à minha formação

pessoal e profissional,

DEDICO

A meus avôs (*in memoriam*) e avós,

tios e tias,

primos e primas,

e a todos os meus

amigos e amigas,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar viva e ter me dado forças para desenvolver este trabalho.

À minha família, pela formação, exemplo de vida, carinho, respeito e amor.

À Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP), pelo incentivo e apoio.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Cursor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade concedida para realização do curso.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) do CNPMS-EMBRAPA, pelo acolhimento e apoio técnico-científico.

Ao Professor Renato Paiva, pela orientação e amizade e aos professores Luiz Edson Mota de Oliveira, Amauri Alves de Alvarenga, José Donizeti Alves e Angela Maria Soares pelos conhecimentos transmitidos.

À Prof. Irenice Vieira pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao Dr. Edilson Paiva, por permitir a realização das análises moleculares no Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) do CNPMS-EMBRAPA, pelas sugestões e orientações e pela atenção.

Aos funcionários do DBI Izonel, Dartagnan, Evaristo, Odorêncio, Joel, Lena e em especial ao laboratorista Mauro pelo auxílio e apoio para o desenvolvimento e bom andamento deste trabalho.

Aos amigos do NBA, Miguel, Ubiraci, Flávia, Cristiane, Eliane, Cristina, Geraldo e Rodrigo, pelo grande aprendizado profissional e pela adorável convivência.

Às amigas Dária Pimenta pela amizade e grande ajuda nas análises laboratoriais; Flávia Landa, pela atenção, confiança e amizade e a “quase irmã” Flávia Dionísio

Pereira, que acrescentou muitas coisas boas, pela convivência diária, paciência, atenção, respeito, carinho e amizade.

Ao amigo Guilherme Canella (Gui), pelos ensinamentos e pelos bons e inesquecíveis momentos que vivemos e amigas Fabiana, Fernanda, Aldenir e Kika, pela ajuda profissional e pelos bons momentos de descontração.

Aos amigos e amigas de Belém, Suelene, Patrícia, Keylah, Álvaro, Márcia, Bizi, Marluce e André por estarem sempre presentes, mesmo distantes.

Às demais pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Ana Gabriela Polaro Serra, filha de Haroldo Nelson Andrade Serra e Maria Fátima Polaro Serra, nasceu na cidade de Belém-PA no ano de 1973. Iniciou suas atividades escolares no Centro de Estudos Objetivos, em 1976. Aos 7 anos de idade mudou-se com a família para a cidade de Fortaleza-CE e aos 9 anos mudou-se para a cidade do Rio de Janeiro retornando posteriormente para Belém, onde estudou no Colégio Marista Nossa Senhora de Nazaré, até a finalização do segundo grau em 1990. Ingressou no curso de Engenharia Agrônômica em 1991, na Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP), tendo sido selecionada para receber uma Bolsa de Iniciação Científica, desenvolvendo seus trabalhos no Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (CPATU-EMBRAPA), nas áreas de plantas medicinais e fisiologia vegetal, durante 4 anos. Graduou-se no mês de junho do ano de 1996 e em setembro do mesmo ano, ingressou no curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde, obteve o Título de Mestre em Fisiologia Vegetal em março de 1999.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução Geral.....	01
2 Referencial Teórico.....	05
2.1 Descrição botânica.....	05
2.2 Cultura de tecidos.....	07
2.3 Análises bioquímicas.....	10
2.4 Marcadores moleculares.....	12
3 Referências Bibliográficas.....	15
CAPÍTULO 2: Análises bioquímicas de calos de castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H. B. K.).....	20
1 Resumo.....	20
2 Abstract.....	22
3 Introdução.....	23
4 Material e Métodos.....	25
5 Resultados e Discussão.....	31
6 Conclusões.....	40
7 Referências Bibliográficas.....	41
CAPÍTULO 3: Estudo da divergência genética em plantios racionais de castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H. B. K.).....	44
1 Resumo.....	44

2 Abstract.....	46
3 Introdução.....	47
4 Material e Métodos.....	49
5 Resultados e Discussão.....	57
6 Conclusões.....	65
7 Referências Bibliográficas.....	66
ANEXOS.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Clones, origem e indivíduos coletados no banco de germoplasma <i>in vivo</i> de castanha-do-brasil, localizado no Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental (CPATU).....	50
2 Primers utilizados na amplificação de DNA de castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.) nos indivíduos do estado do Pará e do Mato Grosso.....	53.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Aspecto visual da árvore (A), folhas e flores(B), frutos (C), sementes (D) e madeiras (E) de castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.). (Adaptado de Lorenzi, 1992).....	06
2 Aspecto visual da formação de calos formados a partir de explantes foliares de castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.) mantidos <i>in vitro</i> durante 0, 15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação em meio MS suplementado com 2,26µM de 2,4-D e 8,88µM de BAP. UFLA, Lavras/MG, 1998.....	31
3 Curva de crescimento de calos formados a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.), inoculados em meio MS suplementado com 2,26µM de 2,4-D e 8,88µM de BAP, durante 90 dias UFLA, Lavras/MG, 1998.....	32
4 Teores de açúcares solúveis totais do explante e de calos de castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.) formados a partir de segmentos foliares inoculados <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com 2,26µM de 2,4-D e 8,88µM de BAP, durante 0, 15, 30, 45 e 60 dias. UFLA, Lavras/MG, 1998.....	34
5 Teores de açúcares redutores do explante e de calos de castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.) formados a partir de segmentos foliares inoculados <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com 2,26µM de 2,4-D e 8,88µM de BAP, durante 0, 15, 30, 45 e 60 dias UFLA, Lavras/MG, 1998.....	35

- 6 Teores de proteínas totais do explante e de calos de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) formados a partir de segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado com 2,26 μ M de 2,4-D e 8,88 μ M de BAP, durante 0, 15, 30, 45 e 60 dias. UFLA, Lavras/MG, 1998.....37
- 7 Teores de aminoácidos do explante e de calos de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) formados a partir de segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado com 2,26 μ M de 2,4-D e 8,88 μ M de BAP, durante 0, 15, 30, 45 e 60 dias. UFLA, Lavras/MG, 1998.....37
- 8 Produto da amplificação de DNA de folhas de castanha-do-brasil de indivíduos provenientes de regiões do Estado do Pará (P1 a P17) e indivíduos provenientes do Estado do Mato Grosso (M1 a M17), obtido com o primer OPS11. CN = controle negativo. EMBRAPA-CNPMS, Sete Lagoas/MG, 1998.....58
- 9 Produto da amplificação de DNA de folhas de castanha-do-brasil de indivíduos provenientes de regiões do Estado do Pará (P1 a P17) e indivíduos provenientes do Estado do Mato Grosso (M1 a M17), obtido com o primer OPS19. CN = controle negativo. EMBRAPA-CNPMS, Sete Lagoas/MG, 1998.....59

- 10 Gráfico de agrupamento das distâncias genéticas entre indivíduos de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) provenientes dos Estados do Pará e do Mato Grosso. EMBRAPA-CNPMS, Sete Lagoas/MG, 1998.....62

RESUMO

SERRA, Ana Gabriela Polaro. Análises bioquímicas de calos e estudo da divergência genética em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). Lavras: UFLA, 1999, 72p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia - Área de Concentração em Fisiologia Vegetal)¹

Com este trabalho objetivou-se verificar o comportamento *in vitro* de tecido foliar e estudar a divergência genética da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). O comportamento *in vitro* de tecido foliar foi avaliado através de curva de crescimento de calos e análises quantitativas dos teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, proteínas totais e aminoácidos. Explantes foliares com 0,7cm de diâmetro foram inoculados em meio MS suplementado com 2,26 μ M de 2,4-D + 8,88 μ M de BAP e mantidos em sala de crescimento na ausência de luz. Para a obtenção da curva de crescimento de matéria fresca, foram coletados calos com intervalos de 7 dias, durante 90 dias. As análises bioquímicas foram realizadas em calos coletados em intervalos de 15 dias, durante 60 dias. A curva de crescimento de calos apresentou cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. Os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores apresentaram uma redução durante o período avaliado. Os teores de proteínas totais e aminoácidos apresentaram uma elevação até o trigésimo dia, seguida de uma redução até o sexagésimo dia, período em que os mesmos devem ser repicados. O estudo da divergência genética da castanha-do-brasil utilizando o marcador molecular RAPD foi realizado com indivíduos coletados em um banco de germoplasma desta espécie no Estado do Pará e com indivíduos coletados em um reflorestamento no Estado do Mato Grosso. Os resultados obtidos indicaram a presença de divergência genética entre e dentro das populações estudadas. Três grupos de indivíduos foram formados no gráfico de agrupamento. Alguns indivíduos do Estado do Pará e outros do estado de Mato Grosso formaram um primeiro grupo apresentando uma maior similaridade. Nos segundo e terceiro grupos de indivíduos formados houve uma separação mais evidente em relação às origens geográficas dos mesmos.

¹ Orientador: Renato Paiva - UFLA

ABSTRACT

SERRA, Ana Gabriela Polaro. **Biochemical analysis of callus and study of genetic divergency in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.)** Lavras: UFLA, 1999, 72p. (Dissertation - Master of Agronomy / Plant Physiology)¹

The objective of this work was to verify the *in vitro* behavior of leaf tissue and study the genetic divergency of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) The *in vitro* behavior of leaf tissue was evaluated through a callus growth curve as well as quantitative analysis of total soluble sugars, reducing sugars, total proteins and aminoacids. Leaf explants with 0.7 cm diameter were inoculated in MS medium supplemented with 2.26 μM 2,4-D + 8.88 μM BAP and maintained in a growth room in the absence of light. In order to obtain the growth curve of callus fresh matter, callus samples were collected at 7 days interval during 90 days. Biochemical analysis were performed in callus samples collected at 15 days interval during 60 days. The callus growth curve presented five distinct phases: lag, exponential, linear, desaccelaration and stationary. The content of total soluble and reducing sugars showed a reduction during the evaluated period. The content of total protein and aminoacids showed an increase until the 30th day followed by a reduction until the 60th day, period in which the calli should be subcultured. The study of genetic divergency of Brazil nut through the molecular marker RAPD was performed using plant material collected from a germoplasm bank of the species in the state of Pará and plant material obtained from a reforestation in the state of Mato Grosso. The results indicated the presence of genetic divergency between and within the studied populations. Three groups of individuals were formed within the grouping graphic. Some individual from Pará as well as from Mato Grosso state formed a group presenting a high similarity. An evident separation based on geographic origin was observed in the second and third group.

¹ Adviser: Renato Paiva - UFLA

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é uma espécie arbórea pertencente à família Lecythidaceae, considerada de grande valor econômico devido à comercialização de seus frutos (castanhas) e da madeira. A castanheira é uma árvore de alto fuste que, apesar de seu lento crescimento, pode atingir de 30 a 50m de altura. Castanhais nativos podem ser encontrados nos Estados do Pará, Amazonas, Acre, Maranhão e Mato Grosso (Müller, 1981).

A exploração de castanhais silvestres no Brasil teve início em 1800 (Müller et al., 1980). Durante as décadas de 1970 e 1980 grandes áreas de castanhais nativos foram drasticamente reduzidas pelos desmatamentos na Amazônia. Apesar de o Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal na Portaria nº 48 de 10 de julho de 1995 do IBAMA proibir o corte e a comercialização da castanheira e da seringueira (*Hevea spp*) em florestas nativas, primitivas ou regeneradas, ressalvados os casos de projetos para realização de obras de relevante domínio público, essa prática infelizmente continua acontecendo, ocasionando quedas na produção de frutos e enormes perdas de material genético.

Na região amazônica, quase toda a extração de castanha-do-brasil é destinada à exportação. Segundo Carvalho, Ferreira e Homma (1994), após a decadência da borracha, a castanha-do-brasil passou a constituir o principal produto extrativo para exportação da região norte do Brasil, na categoria de produtos básicos.

Os frutos de castanha-do-brasil são denominados ouriços e possuem, em média, no seu interior dezorito sementes, cujas amêndoas são altamente nutritivas, tendo um valor protéico bastante expressivo, razão pela qual são conhecidas como “carne vegetal”. O teor de proteína de duas amêndoas equivale ao de um ovo. A composição química das amêndoas apresenta 17% de proteínas, 67% de gorduras, 7% de hidrocarbonados, 4% de sais e 5% de água (Müller, 1995).

Além de altos níveis, a fração protéica das amêndoas de castanha-do-brasil possui elevados teores do aminoácido essencial metionina (20%), especialmente na proteína de reserva 2S albumina, o que tem uma grande importância para as pesquisas de transferência de genes de interesse para culturas mais utilizadas na alimentação humana e que normalmente apresentam níveis bastante reduzidos deste aminoácido (Guerche et al., 1990). Ip e Lisk (1994) demonstraram que a amêndoa da castanha-do-brasil apresenta também em sua composição cerca de 13 a 30ppm de selênio na forma de selenito de sódio, substância altamente ativa na prevenção do câncer de mama.

O cultivo racional de castanheiras visando à comercialização de frutos e sementes ainda é pouco desenvolvido na região amazônica, sendo a lenta e desuniforme germinação de suas sementes, um dos maiores entraves à sua propagação (Pereira et al., 1980). A emergência do caulículo ou radícula das sementes pode demorar de 6 a 18 meses, em condições naturais, porém, com a retirada do tegumento, este período pode ser reduzido para um mês (Lorenzi, 1992).

O uso das técnicas de cultura de tecidos vegetais, apresenta-se como uma alternativa viável para reduzir as dificuldades encontradas na propagação natural da castanheira, pois, além de possibilitar a produção de grandes números de plantas em um pequeno espaço de tempo, viabiliza o resgate do germoplasma ameaçado, facilitando, assim, o seu intercâmbio e preservação (Camargo, 1997).

Especificamente em plantas lenhosas como a castanheira, a utilização de protocolos convencionais de micropropagação é dificultada por vários fatores, destacando-se a oxidação de compostos fenólicos liberados pelas células danificadas do explante e os longos períodos de crescimento destas espécies. Estudos utilizando tecidos formados em períodos reduzidos, como calos, diminuem consideravelmente o tempo de obtenção de informações a respeito do metabolismo celular em lenhosas.

Análises bioquímicas de tecidos vegetais cultivados *in vitro* podem fornecer informações sobre a melhor fase do desenvolvimento celular para a obtenção de substâncias ou moléculas de interesse, assim como mudanças fisiológicas que podem acontecer no âmbito celular. Dados como estes podem auxiliar nos processos de estabelecimento *in vitro* e, conseqüentemente, propiciar a otimização das condições de cultivo de espécies com dificuldade de propagação natural como a castanha-do-brasil (Paiva Neto, 1996).

Atualmente já existe uma preocupação entre pesquisadores, técnicos e políticos com relação à preservação e cultivo racional de castanheiras. Para tanto, a produção de grandes números de mudas através da cultura *in vitro* torna-se uma ferramenta indispensável. A implantação de populações base envolvendo diferentes procedências é de grande importância para a conservação de material genético que poderá ser perdido se deixado nas áreas de ocorrência natural. Estas populações poderão servir, tanto para conservação e fonte de material para micropropagação, como para programas de melhoramento, informando o grau de diversidade genética da espécie (Ohashi, Daniel e Costa, 1995).

Os marcadores moleculares são considerados atualmente uma das principais ferramentas utilizadas para obtenção de informações sobre a diversidade genética entre populações. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1995), o termo marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo decorrente de

um gene expresso, como no caso de proteínas e caracteres morfológicos, ou no caso de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas e não expressas do genoma), cuja seqüência e função podem ser conhecidas, e que possui comportamento de acordo com as leis básicas da herança.

A técnica conhecida como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma modificação da técnica conhecida como PCR (Polymerase Chain Reaction), sendo que a primeira utiliza apenas um primer de seqüência desconhecida para que se inicie a amplificação do DNA. Entre as várias aplicações dos marcadores RAPD destacam-se a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e localização de genes de interesse econômico (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Estudos genéticos utilizando espécies alógamas como a castanha-do-brasil e marcadores moleculares vêm sendo realizados com grande intensidade, pois, além de informar o grau de similaridade entre os indivíduos dentro de uma população e entre populações distintas, os elevados níveis de heterozigose destas espécies refletem grandes quantidades de polimorfismo de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Entretanto, com a castanheira, poucos trabalhos foram realizados com o objetivo de informar o grau de similaridade ou divergência genética entre populações naturais e entre populações cultivadas de maneira racional como plantios comerciais, bancos de germoplasma e reflorestamentos.

Desta forma, visando gerar informações para pesquisas futuras relacionadas com propagação *in vitro* e diversidade genética em *Bertholletia excelsa*, este trabalho objetivou (1) analisar bioquimicamente os calos obtidos a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil e (2) estudar a divergência genética em plantios racionais de castanha-do-brasil, por meio do marcador molecular RAPD.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) é uma espécie arbórea de grande porte (Figura 1), podendo atingir 50m de altura e 4m de diâmetro na base do caule. Possui caule cilíndrico, liso e desprovido de ramos até a fronde. A casca é escura e utilizada como matéria-prima para estopa de qualidade superior empregada na calafetação de embarcações, vestuários indígenas e esteiras (Müller, 1981).

As folhas são esparsas, alternas, pecioladas, oblongas ou ovado-oblongas, curto-acuminadas, onduladas, verde escuras na parte superior e pálidas na inferior. As flores possuem seis pétalas branco-amareladas, são tubulosas, grandes e dispostas em panículas terminais eretas (SUDAM, 1976).

Os frutos são pixídios lenhosos, quase esféricos, com bastante variação de tamanho, podendo conter de 12 a 25 sementes, que são angulosas, agudas, mais ou menos triangulares, transversalmente rugosas, estreitamente comprimidas, envoltas em polpa amarela e dispostas em três séries. Contém em seu interior a amêndoa, que possui a maior utilidade e valor econômico, servindo para fins alimentícios, devido ao seu alto valor protéico (Müller, 1981).



FIGURA 1 Aspecto visual da árvore de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) (A), folhas e flores(B), frutos (C), sementes (D) e madeiras (E) (Adaptado de Lorenzi, 1992).UFLA, Lavras/MG, 1998.

2.2 CULTURA DE TECIDOS

A técnica de cultivar tecidos vegetais *in vitro* consiste em isolar uma pequena parte de tecido, chamada explante, e colocar à sua disposição condições físicas e químicas artificiais que permitam seu crescimento e desenvolvimento.

De acordo com Kurtz e Chu (1990), as principais vantagens da cultura de tecido são a rápida multiplicação, uniformidade e possibilidade de produção de grandes números de plantas, seleção de elites, produção de produtos de engenharia genética e armazenagem de produtos em bancos de germoplasma *in vitro*.

Em plantas cultivadas *in vivo*, o processo fotossintético é responsável por 90 a 95% do peso de matéria seca de plantas; o restante, 5 a 10%, resultam do acréscimo de minerais retirados do solo. No caso de cultura *in vitro*, nutrientes minerais, água, oxigênio, componentes energéticos e vitaminas, estão disponíveis no meio de cultura. Os principais meios de cultura conhecidos são: MS (Murashige e Skoog, 1962), B5 (Gamborg, Miller e Ojima, 1968), White (White, 1943) e WPM (Lloyd e McCown, 1980), os quais diferem principalmente na concentração final dos sais utilizados.

A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* é uma das principais aplicações da cultura de tecidos, especialmente para aquelas plantas que possuem dificuldade de propagação sexuada. Esta técnica, quando usada comercialmente, permite a obtenção de grandes números de plantas, em curto espaço de tempo, todas geneticamente semelhantes à planta doadora do explante.

O cultivo *in vitro* de espécies lenhosas como a castanha-do-brasil enfrenta algumas dificuldades naturais. Segundo Jones (1991), a utilização da técnica de cultura de tecidos em espécies lenhosas obteve pouco sucesso inicialmente, restringindo-se aos estudos com sementes e explantes de mudas,

sendo que atualmente, estas técnicas têm sido utilizadas com êxito em explantes oriundos de plantas adultas. Estudos com lenhosas *in vitro* em zonas temperadas têm mostrado que a capacidade para organogênese de explantes segue uma tendência segundo a qual as estações do ano para a obtenção dos explantes influenciam em respostas diferentes durante a cultura *in vitro* (Ladet, 1998).

A propagação de plantas lenhosas a partir de tecidos como calos tem sido observada em várias espécies que apresentam dificuldades de propagação.

Calos são tecidos não diferenciados, constituídos por massa de células diferenciadas e desorganizadas que se desenvolvem como resposta a injúrias físicas ou desbalanço hormonal (Yeoman e Macleod, 1977) e podem apresentar composição bioquímica e exigências distintas em relação ao explante de origem (Phan, Do e Hegedus, 1987).

Segundo Hicks (1980), durante a organogênese indireta, nos cultivos *in vitro*, se faz necessária, primeiramente, a indução de calos no explante primário. Em contraste, na organogênese direta, a formação de órgãos ocorre sem a passagem do explante inicial pela fase de calos, como ocorre em plantas de fumo (Than Van, 1980).

No primeiro relato encontrado sobre cultura de tecidos em castanha-do-brasil, Toledo et al. (1993) obtiveram pouco crescimento em segmentos de caule cultivados em meio MS líquido suplementado com 0,5mg/L de ANA e 2,5mg/L de BAP e obtiveram calos em meio sólido utilizando de 2,4-D, porém apresentando pouca descrição sobre o tipo de explante e metodologia adotados. No segundo relato encontrado, Camargo (1997) foi capaz de induzir a formação de calos 15 dias após a inoculação de explantes provenientes de segmentos foliares jovens de castanha-do-brasil, em meio MS suplementado com 2,26 μ M de 2,4-D e 8,88 μ M de BAP. O mesmo autor afirma que estudos sobre o comportamento *in vitro* efetuados a partir de explantes juvenis podem

proporcionar o estabelecimento de um protocolo seguro de propagação da espécie, bem como facilitar trabalhos futuros, visando resgate de germoplasma com uso de explantes oriundos de plantas adultas.

Muitos autores têm obtido resultados satisfatórios na propagação de lenhosas via organogênese indireta, por exemplo. Múltiplas brotações de *Tecomella undulata*, uma árvore nativa dos desertos da Índia, foram obtidas a partir de calos crescidos em meio MS suplementado com AIA (0,1mg/L) e BAP (2,5mg/L). Brotações regeneradas foram pré-tratadas com uma mistura de auxinas (AIA, ANA e AIB: 5mg/L de cada) durante 24 horas antes de serem transferidas para o meio MS, onde foram enraizadas (Dilip et al., 1996).

A formação de calos de *Aristolochia indica* foi induzida em meio MS suplementado com 1,0-10mg de BAP (Remashree, Hariharan e Unnikrishnan, 1997). A iniciação foliar destes foi observada 40 dias após a inoculação, também no meio MS, suplementado com 2mg/L BAP e 0,5-2mg/L ANA.

A cultura de calos de Caqui (*Diospyros kaki* c.v.) foi iniciada em meio MS suplementado com 10 μ M de zeatina e 1 μ M de AIA. Após algumas subculturas, os calos foram subdivididos e inoculados em meio MS contendo frutose, glicose e sacarose com 0-5% de concentração, suplementado com 10 μ M de zeatina e 0,1 μ M de AIA, para induzir brotações adventícias. A melhor regeneração (88%) foi encontrada no meio MS contendo 3% de sacarose (Tao, Yonemori e Sugiura, 1992).

Kelkar, Deboo e Krishnamurthy (1996) regeneraram brotações a partir de calos obtidos de explantes originados de segmentos foliares de pimenta (*Piper colubrinum*), utilizando o meio MS contendo 2,0mg/L de BAP e 0,5mg/L de ANA, bem como 1,0mg/L e 0,5mg/L de 2,4-D. As brotações foram enraizadas também em meio MS com ou sem AIA ou AIB e transferidas para solo, atingindo 100% de sobrevivência.

2.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As determinações quantitativa e qualitativa de macro e micromoléculas que constituem tecidos vegetais podem auxiliar na determinação das diferentes fases da vida de um vegetal, de acordo com o aumento ou diminuição dos níveis de compostos essenciais como proteínas, enzimas, aminoácidos e carboidratos.

O requerimento de nutrientes e compostos orgânicos em tecidos vegetais mantidos *in vitro* tem sido estudado, visto que tais tecidos podem perder, diminuir ou aumentar, em certos casos, a síntese de substâncias exigidas para o seu desenvolvimento normal.

Por ser uma técnica que possibilita resultados bastante práticos, a cultura de tecidos ainda necessita de informações básicas para seu perfeito entendimento. Estudos bioquímicos que possam caracterizar as possíveis mudanças que ocorram no explante, culminando com indução de calogênese, ainda estão em fase inicial de exploração (Paiva Neto, 1996). Calos formados a partir de tecidos de frutos de citrus têm sido utilizados para estudar vários aspectos da fisiologia desses frutos, pois o crescimento de calos observado através de seu peso fresco foi dependente da idade com que os frutos foram colhidos, bem como da adição de suco de laranja ao meio de cultura (Amo-Marco e Picazo, 1994).

Uma das análises bioquímicas mais comuns em Fisiologia Vegetal é a determinação do nível de proteínas de um tecido (Passos, 1996). As proteínas são polímeros de aminoácidos que possuem funções muito importantes no metabolismo celular, agindo como enzimas e materiais estruturais, entre outras.

Estudos sobre determinação de teores, qualidade e localização protéica em tecidos cultivados *in vitro* são freqüentemente encontrados na literatura, pois revelam informações importantes sobre o metabolismo celular.

Rajyalakshmi et al. (1991) demonstraram a existência de polipeptídeos especificamente associados com calos embriogênicos e não-embriogênicos de folhas de trigo. Coleman e Ernst (1991), estudando explantes de ramos internodais de *Populus deltoides*, conseguiram identificar diferentes proteínas envolvidas com o processo de calogênese e regeneração de parte aérea.

Calos originados de cotilédones de plântulas de citrus foram induzidos no meio MS suplementado com 1,0mg/L de 2,4-D, 0,5mg/L de BAP e 0,5mg/L de ANA. Calos não embriogênicos foram observados nas três primeiras fases de crescimento e os embriogênicos iniciaram a sua formação na quarta fase de crescimento, permanecendo assim por prolongadas sub culturas. Os teores de proteínas totais reduziram-se drasticamente até a terceira fase de crescimento, porém, após este período, aumentaram progressivamente (Chaudhry, Rashid e Quraishi, 1993).

Teores de proteínas totais e aminoácidos de calos originados de segmentos foliares de tabaco mostraram-se altos naqueles que apresentaram regeneração de brotações e baixos naqueles que não diferenciaram-se (Yadav, Maherchandani e Yadav, 1995).

Outra classe de biomoléculas que se destacam em tecidos vegetais são os carboidratos ou açúcares, os quais atuam como forma de armazenamento de energia, como importantes constituintes de suporte de tecidos ou também como provedores de esqueletos de carbono para compostos orgânicos sintetizados pelas células. Gamborg et al. (1976) classificam os carboidratos como uma das cinco classes de substâncias essenciais requeridas para o crescimento e desenvolvimento *in vitro*.

Em plântulas obtidas *in vitro*, normalmente os açúcares solúveis e os compostos fenólicos diminuem, enquanto os ácidos orgânicos e proteínas solúveis tendem a aumentar (Phan, Do e Hegedus, 1987).

Yoo et al. (1998) sugerem que células orientadas para a divisão celular, como calos e células em suspensão, sintetizam diferentes polissacarídeos de parede celular daquelas encontradas em plantas intactas.

Análises de sacarose, glicose e frutose do meio de cultura e de calos formados a partir de explantes foliares de *Actinidia deliciosa* indicaram que, após 15 dias de cultivo, houve um incremento no meio de cultura nos teores de glicose e frutose causado pela hidrólise de sacarose. Os calos apresentaram um pequeno aumento nos teores de sacarose até os 30 dias de cultivo, porém altas quantidades de glicose e frutose foram encontradas durante o mesmo período (Mezzeti, Conte e Rosati, 1991).

2.4 MARCADORES MOLECULARES

A erosão genética que vem ocorrendo em populações nativas de árvores de espécies tropicais é um fato preocupante para os cientistas em todo o mundo. O desaparecimento e o desconhecimento de genes que poderiam ser utilizados em programas de melhoramento genético estão deixando a comunidade científica sem material para pesquisa biológica. Trabalhos de identificação de mapas genéticos em espécies alógamas estão sendo realizados com muita intensidade. (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

O uso de marcadores moleculares surgiu como uma ferramenta poderosa para a análise genômica e para auxílio a programas de melhoramento genético. As izoenzimas foram os primeiros marcadores moleculares utilizados, possuindo as vantagens de fornecer respostas rápidas e baixos custos.

Posteriormente surgiram os marcadores de DNA, que detectam diretamente nas moléculas diferenças na informação genética entre indivíduos (Helentjaris, 1992). O primeiro marcador de DNA desenvolvido através de estudos de biologia molecular foi o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição, cuja técnica baseia-se nas diferenças de tamanho dos fragmentos obtidos pela digestão de DNA genômico por enzimas de restrição (Tanksley et al., 1989).

Após a descoberta dos marcadores RFLP, novos marcadores foram desenvolvidos, baseados na reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), na qual ocorre a síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA através da enzima termo-tolerante Taq-polimerase. Os métodos derivados desta tecnologia têm se mostrado muito úteis para estudos em várias áreas da genética (Schierwater, 1995).

O marcador molecular RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), derivado da técnica PCR, gera fragmentos específicos de DNA, os quais são amplificados através de primers únicos de seqüência nucleotídica arbitrária (Williams, Kubelik e Livak, 1990). A reação de amplificação ocorre em ciclos que envolvem três etapas: (1) desnaturação, (2) anelamento e (3) extensão. Na primeira etapa, as fitas do DNA molde são separadas por um aumento da temperatura que em seguida é diminuída para que pequenas moléculas de DNA de fita simples (*primers*), que são complementares às seqüências que flanqueiam a região alvo, hibridizem com as fitas do DNA molde. A DNA polimerase inicia então a síntese de um segmento que é uma cópia da região alvo. Estas etapas são repetidas por várias vezes, de forma que o número de cópias dupliquem ao final de cada ciclo, ocorrendo um aumento em progressão geométrica do número de cópias da região alvo.

Estudos visando informar a diversidade genética de populações naturais ou cultivadas de espécies que possuem algum interesse econômico ou científico, utilizando a técnica RAPD, estão sendo desenvolvidos.

Kanashiro, Harris e Simons (1997), determinando a diversidade genética em cinco populações geograficamente distantes de castanha-do-brasil da Amazônia, através de RAPD, observaram dois grupos distintos. O primeiro incluiu plantas provenientes das cidades de Alenquer, Marabá e Altamira, pertencentes ao Estado do Pará e o segundo incluiu plantas das cidades de Santarém (Pará) e Rio Branco (Acre). Os autores concluíram que a variação genética entre as populações de castanha-do-brasil distribuídas na Amazônia brasileira, é pequena.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMARGO, I. P. de. Estudos sobre a propagação da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb.& Bonpl.). Lavras:UFLA, 124p; 1997 (Tese de Doutorado - Fitotecnia).
- 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).
- COLEMAN, G.D. & ERNST, S.G. Protein differences among *Populus deltoides* internodal stem explants determined for shoot regeneration or callus growth. *Plant Science, Berkeley*, v.75, n.1, p.83-92, 1991.
- DILIP, N.; RACHANA, S.; RAMAWAT, K.G.; NANDWANI, D. & SHARMA, R. High frequency regeneration in callus cultures of a tree - *Tecomella undulata*. *Gartenbauwissenschaft*, v.61, n.3, p. 147-150, 1996.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. p. 220. (EMBRAPA-CENARGEN Documento 20)
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A. & OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, v.50, p.151-158, 1968.
- GAMBORG, O.L.; MURASHIGUE, T.; THORPE, T.A. & VASIIL, I.K. Plant tissue culture media. *In vitro*, v.12, p.473-478, 1976.
- GUERCHE, P.; ALMEIDA, E. R. P. de; SCHWARZTEIN, M. A.; GANDER, E.; KREBBERS, E. & PELLETIER, G. Expression of the 2S albumin from *Bertholletia excelsa* in *Brassica napus*. *Molecular & General Genetics*, New York, v.221, n.3, p.306-314. 1990.
- HELENTJARIS, T.G. RFPL analysis of manipulating agronomic traits in plants. In: STALKER, H.T. and MURPHY, J.P. (ed). *Plant Breeding in 1990s*. p.357-372, 1992.

- HICKS, G. S. Patterns of organ development in plants tissue culture and the problem of organ determination. *Botanical Review*, v.46, p.1-23, 1980.
- IP, C.; LISK, D. J. Bioactivity of selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance. *Nutrition and Cancer*, Philadelphia, v.21, n.3, p.203-212. 1994.
- JONES, O.P. The role of biotechnology in the multiplication and improvement of wood plants *Acta Horticulturae*. Wageningen, v.289, p. 35-44, 1991.
- KANASHIRO, M.; HARRIS, S.A. & SIMONS, A. RAPD Diversity in Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* Humb. And Bonpl., Lecythidaceae). *Silvae Genetica*, v.46, n.4, p.185-252, 1997.
- KELKAR, M.S.; DEBOO, G.B. & KRISHNAMURTHY, K.V. *In vitro* plant regeneration from leaf callus in *Piper colubrinum* Link. *Plant Cell Reports*, v.16, n.3-4, p.215-218, 1996.
- KUMAR, K. P. Micropropagation of *Clitoria ternatea* L. (Papilionaceae) through callus regeneration and shoot tip multiplication. *Journal of Spices and Aromatic Crops*. v.2, p.41-46, 1993.
- KURTZ, S.L. & CHU, I.Y.E. Commercialization of plant micropropagates. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BAJAJ, P.S. (Editors), *Handbook of Plant Cell Culture*, MacGraw-Hill, Vol.5, 1990.
- LARDET, L.; AGUILAR, M.E.; MICHAUX-FERRIERE, N.; BERTHOULY, M. Effect of strictly plant-related factors on the response of *Hevea brasiliensis* and *Theobroma cacao* nodal explants cultured *in vitro*. *In Vitro Cellular Developmental Biology*, v.34, n.1, p.34-40, 1998.
- LLOYD, G. & McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of *Moutain laurel*, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagators Society Proceedings*. v.30, p.421-427, 1980.
- LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa, SP: Ed. Plantarum, 1992.

- MEZZETTI, B.; CONTE, L.S. & ROSATI, P. *Actinidia deliciosa in vitro* II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Berlin, v.26, p.153-160, 1991.
- MILLER, C. & SKOOG, F. Chemical control of bud formation in tobacco stem segments. *American Journal of Botany*, v.40, p.768-77, 1953.
- MORITZ, A. Estudos biológicos da floração e frutificação da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). Belém: EMBRAPA-CPATU, 1984. 82p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos 19).
- MÜLLER, C.H. Castanha-do-Brasil, estudos agronômicos. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1981. 25p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos 1)
- MÜLLER, C.H.; FIGUEREDO, F.J.C. & CARVALHO, J.E.U. de Características comparativas entre frutos e sementes de castanheira do-brasil. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1995. (EMBRAPA-CPATU. Documentos 82)
- MÜLLER, C.H.; RODRIGUES, I.A.; MÜLLER, A.A. & MÜLLER, N.R.M. Castanha-do Brasil. Resultados de pesquisa. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1980. 25p. (Miscelânea 2)
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- OHASHI, S. T.; DANIEL, O. & COSTA, L.G.da S. A castanha-do-brasil - *Bertholletia excelsa*, H.B.K. Belém:FCAP. Serviço de Documentação e Informação, 1995. 17 p.
- PAIVA NETO, V. B. de. Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud). Lavras:UFLA, 33p., 1996 (Dissertação de Mestrado - Fisiologia Vegetal).
- PASSOS, L. P. Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 223 p. 1996.

- PEREIRA, L.A. F.; MÜLLER, C.H.; MÜLLER, A.A.; FIGUEREDO, F.J.C. & FRAZÃO, D.A.C. Escarificação mecânica e embebição na germinação de sementes de castanha-do-brasil. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1980. 13p. (Boletim de Pesquisa 10)
- PHAN, C.T.; DO, C.B. & HEGEDUS, P. Metabolic aspects of "in vitro" culture of plants; problems and applications, comparison of soluble contents, marker enzymes between explant and cell suspension culture. *Experimental Biological*, v.46, n.3, p.58, 1987.
- PIERIK, R.L.M. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid: Ediciones Mundi Prensa, 1990. 326p.
- RAJYALAKSHMI, K.; GROVER, A.; MAHESHWARI, N.; MAHESHWARI, S.C. & TYAGI, A.K. High frequency regeneration of plants from the leaf-bases via somatic embriogenesis and comparation of polypeptide profiles from morphogenic and non-morphogenic calli in wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum*, v.82, n.4, p.617-623, 1991.
- REMASSHREE, A. B.; HARIHARAN, M. & UNNIKRISHNAN, K. *In vitro* organogenesis in *Aristolochia indica* (L.). *Phytomorphology*, v.47, n.2, p.161-165, 1997.
- SCHIERWATER, B. Arbitrarily amplified DNA in systematics and phylogenetics. *Electrophoresis*, v.16, p.1643-1647, 1995.
- SUDAM. Estudos e pesquisas sobre a castanha-do-pará. Belém: SUDAM. 1976, 100p.
- TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H. & BONIERBALE, M.W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology*, v.7, p.257-264, 1989.
- TAO, R.; YONEMORI, K. & SUGIURA, A. High frequency plant regeneration from callus cultures derived from primordial leaves of adult japanese persimmon and protoplast isolation from those callus lines. *Acta Horticulturae*. Wageningen, v.300, p. 251-254, 1992.

THANH VAN, K. Control of morfogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. **International Review Cytology Supplement**. v.11A, p.175-194, 1980.

TOLEDO, M.L.B. de; LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P. da; SANTIAGO, E.J.A. de. Micropropagação in vitro do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart) e da castanheira (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA, 44, São Luiz, 1993. **Anais...São Luis: SBB?**, 1993. V.1, p.225.

WHITE, P. R. **A handbook of plant tissue culture**. Jaques Cattell Press, Lancaster, 1943.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R. & LIVAK, K.J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primes are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p. 6531-6535, 1990.

YEOMAN, M.M. & MACLEOD, A.J. Tissue callus cultures techniques. In: STREET, H.E. (ed). **Plant Tissue and Cell Culture**. Berkeley: University of California. p.31-59. 1977.

YOO, U.; KOHMURA, H. NAKAGAWA, N. & SAKURAI, N. Quantitative and qualitative changes of cell wall polyssacharides during somatic embriogenesis and plantlet development of *Asparagus* (*Asparagus officinalis* L.). **Plant Cell Physiology**, v.39, n.6, p.607-614, 1998.

CAPÍTULO 2

ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE CALOS DE CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K.).

1 RESUMO

SERRA, Ana Gabriela Polaro. Análises bioquímicas de calos de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). Lavras: UFLA, 1999, 72p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia - Área de Concentração em Fisiologia Vegetal)¹

O objetivo deste trabalho foi analisar bioquimicamente tecido foliar de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) mantidos *in vitro*. Explantes foliares com 0,7 cm de diâmetro foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com 2,26 μM de 2,4-D e 8,88 μM de BAP e mantidos na ausência de luz. Para a obtenção da curva de crescimento amostras contendo calos foram coletadas em intervalos de sete dias, durante 90 dias. Para a realização das análises bioquímicas, utilizou-se intervalo de 15 dias entre as coletas de calos, num período de 60 dias de inoculação. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo que cada repetição era composta por 4 tubos. A curva de crescimento de calos apresentou-se na forma sigmoideal, apresentando cinco fases distintas de crescimento: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. O maior percentual de crescimento (74%) foi observado na fase exponencial e o menor na fase de desaceleração (6%). Estes estudos também indicam que a repicagem de calos deve ser efetuada no início da fase de desaceleração (60 dias após a inoculação). Os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores seguiram a mesma tendência, apresentando uma redução durante o período de observação. Esta redução se mostrou mais acentuada até o 30º dia após a inoculação, período em que os calos encontravam na fase lag. Os teores de proteínas totais e aminoácidos também mostraram a mesma tendência, aumentando até o 30º dia após a inoculação e diminuindo após este período. O teor de aminoácidos apresentou uma elevação mais acentuada até o 15º dia após a inoculação, seguido de uma elevação menos acentuada até o 30º dia. O teor de proteínas totais apresentou um crescimento menos acentuado até o

15° dia após a inoculação, seguido de uma elevação mais acentuada até o 30° dia de inoculação. Estes estudos também indicam que as altas quantidades de aminoácidos sintetizados ou absorvidos presentes no período inicial de inoculação certamente foram utilizadas para posterior síntese de proteínas.

¹ Orientador: Renato Paiva - UFLA



2 ABSTRACT

SERRA, Ana Gabriela Polaro. **Biochemical analysis of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) callus** Lavras: UFLA, 1999, 72p. (Dissertation - Master of Agronomy / Plant Physiology)¹

The objective of this work was to biochemically analyse brazil nut leaf tissues maintained *in vitro*. Leaf explants with 0.7 cm diameter were inoculated in MS medium supplemented with 2.26 μM 2,4-D + 8.88 μM BAP and maintained in a growth room in the absence of light. In order to obtain the growth curve of callus fresh matter, callus samples were collected at 7 days interval during 90 days. Biochemical analysis were performed in callus samples collected at 15 days interval during 60 days of inoculation. The callus growth curve presented a sigmoidal shape with five distinct phases: lag, exponential, linear, desacceleration and stationary. The highest growth percentage (74%) was observed during the exponential phase and the lowest (6%) during the desacceleration phase. The results also indicate that callus subculture should be performed at the beginning of the desacceleration phase, 60 days after explant inoculation. The content of total soluble and reducing sugars showed a reduction during the evaluated period. This reduction was more evident until the 30th day of inoculation, period in which the calli was in the lag phase. The content of total protein and aminoacids showed an increase until the 30th day of inoculation followed by a reduction. The aminoacid content presented a high increase until the 15th day of inoculation followed by a lower increase until the 30th day. The total protein content showed a low increase until the 15th day of inoculation followed by a high increase until the 30th day of inoculation. The results also indicate that the high content of synthesized or absorbed aminoacids present during the initial period of inoculation were probably used for further protein synthesis.

¹ Adviser: Renato Paiva - UFLA

3 INTRODUÇÃO

Os diversos grupos de substâncias presentes nos tecidos vegetais como proteínas, aminoácidos, açúcares estruturais e não estruturais, açúcares solúveis, açúcares redutores, amido, lipídeos, ácidos orgânicos, ácidos nucleicos e pigmentos, podem ser classificados de acordo com seu peso molecular, como macro e micromoléculas.

Para detecção destes grupos de substâncias existem diversos métodos, os quais são baseados em reações químicas específicas do reagente com a estrutura de componentes desses grupos, reações estas que podem ser quantificadas através de métodos colorimétricos.

O estudo bioquímico de tecidos cultivados *in vitro* tem sido realizado com frequência nos últimos anos. Através desses estudos pode-se determinar qual a melhor fase de crescimento ou de desenvolvimento celular que propicie uma maior produção de compostos celulares específicos, principalmente a partir de calos.

A determinação dos níveis de carboidratos, por revelar a reserva prontamente disponível para o crescimento, tem aplicação em vários estudos fisiológicos (Passos, 1996). Os carboidratos, nos cultivos *in vitro*, são acrescentados ao meio de cultura para que possam servir como fonte de energia para o desenvolvimento do explante, pois estes tecidos apresentam uma taxa fotossintética bastante reduzida, tornando-os praticamente heterotróficos.

Calos foliares de moreira cultivados na presença de 2,4-D apresentaram teores superiores de açúcares redutores, proteínas e aminoácidos, e inferiores de açúcares solúveis totais, quando comparados com explantes cultivados na ausência deste regulador de crescimento (Paiva Neto, 1996).

Chenevard et al. (1995), estudando os efeitos da sacarose no desenvolvimento de plântulas de nogueiras híbridas, observaram que a presença de sacarose aumentou a percentagem de enraizamento, número de raízes adventícias e o peso seco por brotação enraizada. Os autores atribuíram esses efeitos principalmente às propriedades energéticas da sacarose em relação as suas funções osmóticas. Altas concentrações de sacarose no meio de cultura (superior a 20g.L⁻¹) resultaram no acúmulo de altas quantidades de carboidratos solúveis nas plântulas, principalmente em raízes e calos.

As proteínas são macromoléculas que podem apresentar função enzimática ou estrutural. Estudos fisiológicos e bioquímicos envolvendo a quantificação, localização e determinação de atividade enzimática *in vivo* e *in vitro* têm sido conduzidos. Por exemplo, calos obtidos a partir de segmentos foliares de fumo, inoculados em meio MS suplementado com 2mg/L de AIA + 2mg/L de cinetina, apresentaram ou não formação de parte aérea. Os níveis de proteínas solúveis e aminoácidos livres foram mais altos em calos que regeneraram parte aérea do que aqueles que não regeneraram (Yadav, Maherchandani e Yadav, 1995).

Este trabalho foi realizado tendo como objetivo analisar bioquimicamente calos induzidos a partir de tecido foliar de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), através da determinação dos teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, proteínas totais e aminoácidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG.

4.2 MATERIAL

As sementes de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) foram obtidas no comércio da cidade de Belém-PA, no mês de dezembro de 1997.

4.3 PRODUÇÃO DAS MUDAS

As sementes foram lavadas com detergente comercial e imersas em água corrente por um período de 48 horas. O tegumento foi removido com o auxílio de um alicate e as amêndoas foram tratadas com uma solução contendo 0,3% de benomyl, durante 90 minutos.

A semeadura foi feita em bandejas plásticas contendo, como substrato, areia lavada, as quais foram colocadas em germinador (Eletrolab-102 G) com temperatura de 28°C. Logo após a germinação, as plântulas foram transplantadas para sacos plásticos de polietileno contendo, como substrato, a mistura composta

de terra, areia e esterco na proporção de 3:1:1, respectivamente, e transferidas para casa de vegetação.

4.4 CULTIVO DE TECIDO FOLIAR *IN VITRO*

O cultivo de tecidos foliares de castanha-do-brasil *in vitro* visou primeiramente a produção de calos, para posterior obtenção da curva de crescimento e análise bioquímica destes tecidos. Foram utilizados como explantes, segmentos foliares de mudas com dez meses de idade produzidas anteriormente e mantidas em casa de vegetação. Folhas jovens foram coletadas, lavadas com detergente e mantidas em água corrente durante 24 horas, antes de sofrerem o processo de desinfestação.

A desinfestação das folhas seguiu a metodologia descrita por Camargo (1997), que constitui em imergir o material em solução de álcool etílico a 80% durante um minuto, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 30% (v/v) de produto comercial durante 20 minutos e de lavagem com água destilada e autoclavada por cinco vezes.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige e Skoog, 1962) solidificado com ágar na concentração de $6,5\text{g.L}^{-1}$. Ao meio foram adicionados $2,26\mu\text{M}$ de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), $8,88\mu\text{M}$ de benzilaminopurina (BAP), 2,5% de sacarose e 200mg.L^{-1} do antioxidante Polivinilpirrolidone (PVP-40).

Os explantes constituíram-se de segmentos circulares do limbo foliar contendo a nervura central, obtidos com o auxílio de um cortador de discos foliares com diâmetro de 0,7cm.

A inoculação dos explantes foi feita em tubos de ensaio de 2,5 x 15cm contendo 15ml de meio de cultura, em câmara de fluxo laminar. Os tubos foram então mantidos em câmara de crescimento, na ausência de luz a uma temperatura de 26 ± 2 °C.

4.5 CURVA DE CRESCIMENTO

As avaliações da indução de calogênese para fins de obtenção da curva de crescimento foram feitas a partir do dia da inoculação dos explantes (tempo 0) até o 90° dia, com intervalos de coleta de 7 dias. Em cada coleta, os calos foram cuidadosamente limpos com papel absorvente, pesados em balança de precisão, imersos em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a temperatura de -80°C, para, posteriormente, se proceder as análises bioquímicas.

O percentual de crescimento dos calos foi determinado através da equação:

$$\% \text{ cresc} = \frac{\text{Pf} - \text{Pi}}{\text{Pf}} \times 100$$

Onde: Pi = peso inicial e Pf = peso final de calos (Lameira, 1997).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 12 repetições por pesagem, cujos valores dos pesos médios foram analisados por análise de variância e teste F, ao nível de 1% de probabilidade.

4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os teores de proteínas totais, aminoácidos, açúcares redutores e açúcares solúveis totais foram obtidos a partir de calos formados com: 0, 15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação.

A obtenção do extrato enzimático bruto no qual foram realizadas as análises bioquímicas, baseou-se na metodologia descrita por Lemos (1996) modificada por Lima (1998). As amostras contendo 500mg de material vegetal (calos) foram homogeneizadas em graal com 5mL de um meio de extração composto de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5 (4,82mL), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,5M (100 μ L), EDTA 0,1M (50 μ L), DTT 1,0 M (10 μ L), PMSF 0,4M (10 μ L) e PVPP (100mg). Seguiu-se uma filtragem em gaze e centrifugação a 18000 g (12000 rpm) durante 30 minutos, em centrífuga refrigerada à temperatura de 4°C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições por data de coleta, quatro tubos por repetição, cujos valores médios foram analisados por análise de variância e teste F, ao nível de 1% de probabilidade.

4.6.1 PROTEÍNAS

A quantificação protéica foi realizada pelo método de Bradford (1976), baseada no princípio da proteína ligada a um corante. Aliquotas de 50 μ L do extrato bruto foram adicionadas em 5,05mL do reagente Comassie, constituído de 0,01% de Comassie Blue G-250, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em agitador e levadas para leitura em espectrofotômetro a 595nm, sendo os valores expressos em μ g

proteína.g⁻¹ de matéria fresca, com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de soro-albumina bovina (BSA).

4.6.2 AMINOÁCIDOS

O método utilizado para a determinação dos teores de aminoácidos foi o da ninidrina, descrito primeiramente por Stein e Moore (1948). Aliquotas de 10µL do extrato foram adicionadas a 990µL de água destilada e 1,7mL do reagente A+B+C (A - tampão citrato de sódio 0,2M, pH 5,0; B - reagente de ninidrina 5% em metilcelosolve e C - KCN 2% em metilcelosolve), agitadas e levadas a um banho-maria a 100°C durante 20 minutos. Para leitura a 570nm em espectrofotômetro, foi adicionado 1,3mL de etanol 60% (v/v). A quantificação dos aminoácidos baseou-se na curva padrão obtida através de diferentes quantidades do aminoácido glicina.

4.6.3 AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

O teor de açúcares solúveis totais foi obtido segundo a metodologia descrita por Yemm e Willis (1954). Aliquotas de 10µL do extrato foram adicionadas em 990mL de água destilada e 2,0mL do reagente antrona (20 mg de antrona, 0,5mL de água destilada e 10mL de H₂SO₄ concentrado). Após agitação, os tubos foram aquecidos a 100°C por 5 minutos. As amostras foram levadas para leitura em espectrofotômetro a 620nm e a quantificação dos açúcares baseou-se na curva padrão obtida a partir de diferentes quantidades de glicose.

4.6.4 AÇUCARES REDUTORES

A determinação dos açúcares redutores foi feita através da metodologia descrita por Miller (1959), que utiliza o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A alíquota utilizada foi de 100 μ L do extrato, sendo adicionados 1,4mL de água destilada e 1000 μ L do reagente DNS. Esta mistura foi homogeneizada e levada ao banho-maria por 5 minutos a 100°C, sendo posteriormente resfriada à temperatura ambiente. As amostras foram levadas para leitura em espectrofotômetro a 540nm e a quantificação baseou-se na curva padrão obtida a partir de diferentes quantidades de glicose.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CURVA DE CRESCIMENTO MÉDIO EM MATÉRIA FRESCA

A Figura 2 mostra o aspecto visual dos calos induzidos *in vitro* a partir de explantes foliares inoculados em meio MS suplementado com $2,26\mu\text{M}$ de 2,4-D e $8,88\mu\text{M}$ de BAP.

O padrão de crescimento dos calos formados está apresentado na Figura 3. Observa-se a presença de crescimento sigmoidal, com tendência de ganho de matéria fresca em função do aumento do tempo de cultivo, indicando a presença de 5 fases de crescimento distintas.



FIGURA 2. Aspecto visual de calos formados a partir de explantes foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) mantidos *in vitro* durante 0, 15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação em meio MS suplementado com $2,26\mu\text{M}$ de 2,4-D e $8,88\mu\text{M}$ de BAP. UFLA, Lavras/ MG, 1998.

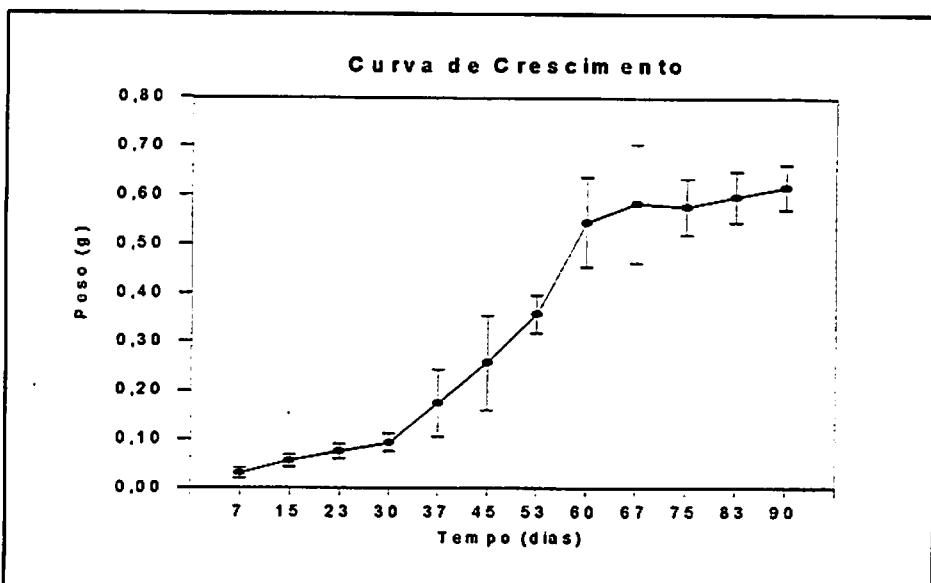


FIGURA 3. Curva de crescimento de calos formados a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) inoculados em meio MS suplementado com $2,26\mu\text{M}$ de 2,4-D e $8,88\mu\text{M}$ de BAP, durante 90 dias. UFLA, Lavras/ MG, 1998.

A fase lag, na qual células do explante preparam-se para divisão, ocorreu até o 30^o dia de inoculação, com 66% de crescimento. Mezzetti, Conte e Rosati (1991), avaliando o crescimento de calos obtidos a partir de segmentos foliares de *Actinidia deliciosa*, observaram um acúmulo de matéria fresca e seca até o 30^o dia após a inoculação.

A fase de crescimento exponencial, período em que ocorre a máxima divisão celular, ocorreu entre o 30^o e o 53^o dia após a inoculação, com o maior percentual de crescimento observado, 74%. A fase lag pode ser considerada como produtora de energia e a fase exponencial como fase biossintética (Shimizu et al., 1977)

O período de crescimento linear, em que os calos diminuem a divisão celular e aumentam a área celular, foi observado entre o 53^o e o 60^o dia de inoculação, com 35% de crescimento. Santos (1998), estudando a curva de

crescimento de japecanga (*Smilax japecanga*), indica que a fase linear desta espécie ocorreu entre o 18^o e 26^o dia após a inoculação.

O intervalo de desaceleração do crescimento se deu entre o 60^o e 67^o dia de inoculação, com apenas 6% de crescimento. Segundo Smith (1992), as culturas neste período devem ser transferidas para um novo meio de cultura devido à redução de nutrientes, secagem do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas. Desta forma, a repicagem de calos provenientes de folhas de castanha-do-brasil para um novo meio de cultura deve ser feita no início da fase de desaceleração, ou seja, aos 60 dias de cultivo. O crescimento dos calos chegou à fase estacionária entre o 67^o e o 90^o dia de inoculação, sendo observado neste período 4% de crescimento.

Lameira (1997), estudando à curva de crescimento *in vitro* de calos obtidos a partir de segmentos caulinares de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*), observou também cinco fases de crescimento, sendo as fases lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária observadas, respectivamente, nos intervalos: 0 - 6; 6 - 18; 18 - 21; 21 - 27 e a partir de 27 dias após a inoculação.

Comparando-se os resultados das outras curvas de crescimento de calos citadas anteriormente com os da curva de crescimento de calos de castanha-do-brasil podemos perceber que o crescimento destes tecidos na espécie em estudo é bastante lento o que pode estar relacionado a um ciclo celular também lento. O ciclo celular é composto por várias fases, sendo a interfase (fase onde ocorre a duplicação do DNA), a mais demorada. A seqüência das fases do ciclo celular é governada por um sistema-controle em que participam complexos de proteínas (Alberts et al., 1997).

5.2 AÇÚCARES REDUTORES E AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

Os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores observados desde a inoculação do explante e durante o crescimento *in vitro* de calos formados a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil, estão representados respectivamente nas Figuras 4 e 5.

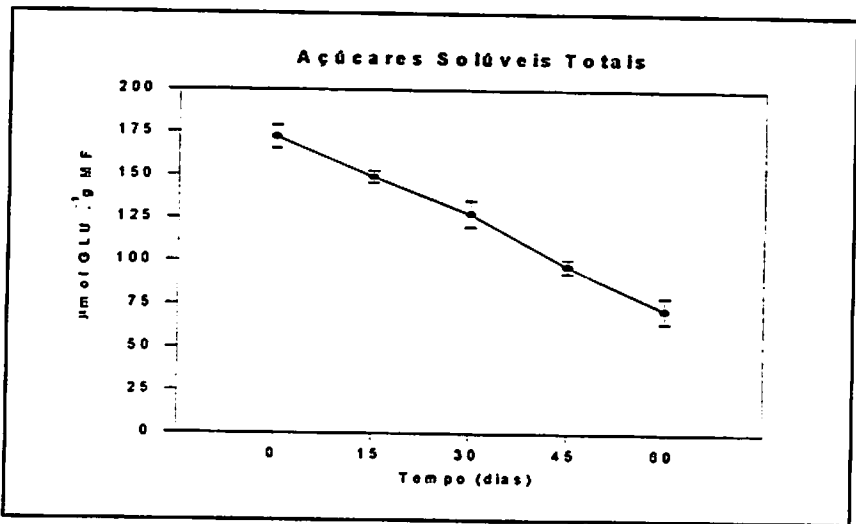


FIGURA 4. Teores de açúcares solúveis totais do explante e de calos de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) formados a partir de segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado com 2,26µM de 2,4-D e 8,88µM de BAP, durante 0, 15, 30, 45 e 60 dias. UFLA, Lavras/MG, 1998.

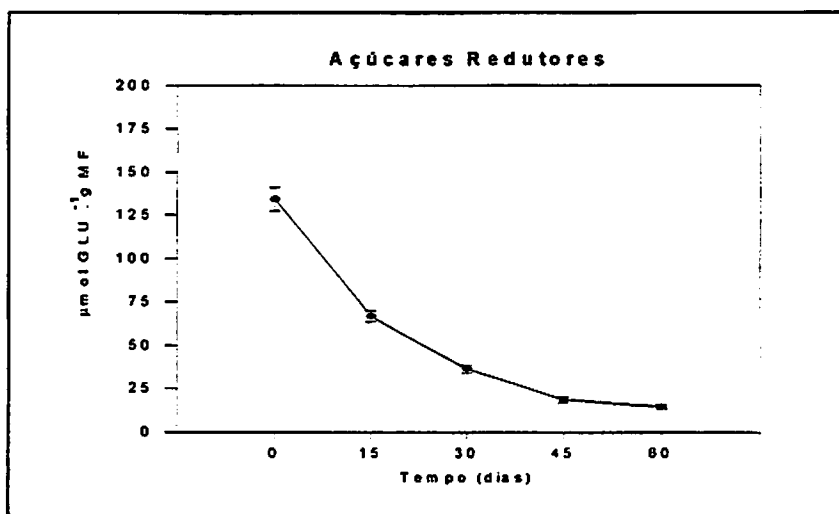


FIGURA 5. Teores de açúcares redutores do explante e de calos de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) formados a partir de segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado com 2,26µM de 2,4-D e 8,88µM de BAP, durante 0, 15, 30, 45 e 60 dias. UFLA, Lavras/MG, 1998.

Os açúcares solúveis totais são compostos basicamente por hexoses (açúcares redutores) e açúcares de cadeias maiores com função de armazenamento e transporte (não redutores) (Lima, 1998).

O teor máximo dos açúcares solúveis totais e açúcares redutores foi observado no dia da inoculação dos explantes e o teor mínimo no último dia da avaliação (60º dia). Este fato sugere que os explantes não absorveram a fonte de carboidrato (sacarose) presente no meio de cultura, a qual pode, assim, ser excluída de tal meio.

O teor de açúcares solúveis totais apresentou uma constante redução durante todo o período de avaliação, sugerindo que após a inoculação dos explantes *in vitro* houve degradação destes açúcares, possivelmente para serem utilizados, entre, outras formas, na composição de nucleotídeos formadores de novas fitas de DNA durante a fase de divisão celular e também uma diminuição da atividade anabólica nos mesmos, podendo este resultado ser explicado pela

redução da área para a realização de fotossíntese e pela total ausência de luz para sua realização.

No período compreendido entre 0 e 30 dias após a inoculação, a redução dos açúcares redutores mostrou-se mais acentuada, chegando a um nível de 20% do valor inicial. Este período coincide com a fase lag de crescimento de calos. Neste período verificou-se ainda uma preparação para o início da fase exponencial de crescimento, em que ocorreu um aumento na divisão celular, que resultou no maior percentual de crescimento.

Os resultados indicam que a redução acentuada dos açúcares redutores até o trigésimo dia após a inoculação dos explantes realizou-se possivelmente para produzir energia a ser utilizada na fase exponencial de crescimento.

No período compreendido entre o trigésimo e o sexagésimo dia, os teores de açúcares redutores continuaram apresentando redução, porém, de uma forma menos acentuada, talvez por um esgotamento natural destes, nos tecidos.

5.3 PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS

As Figuras 6 e 7 apresentam, respectivamente, os teores de proteínas totais e aminoácidos observados desde a inoculação do explante e durante o crescimento *in vitro* de calos formados a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil.

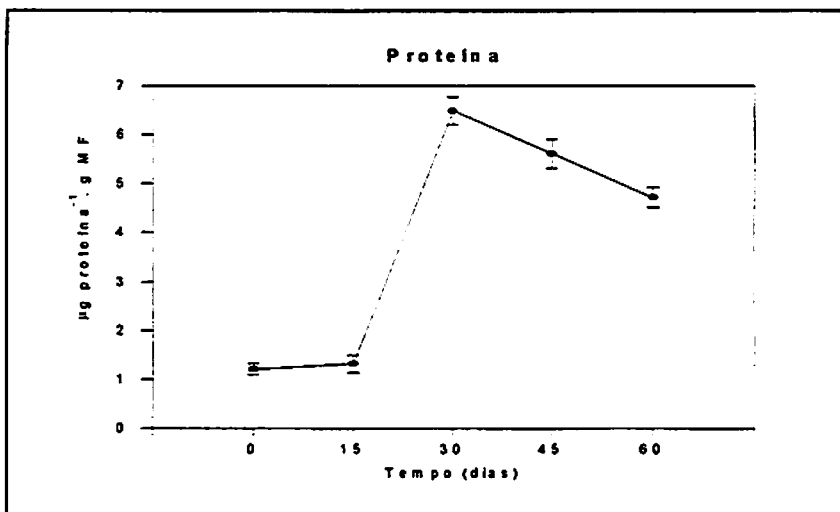


FIGURA 6. Teores de proteínas totais do explante e de calos de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) formados a partir de segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado com 2,26µM de 2,4-D e 8,88µM de BAP, durante 0, 15, 30, 45 e 60 dias. UFLA, Lavras/MG, 1998.

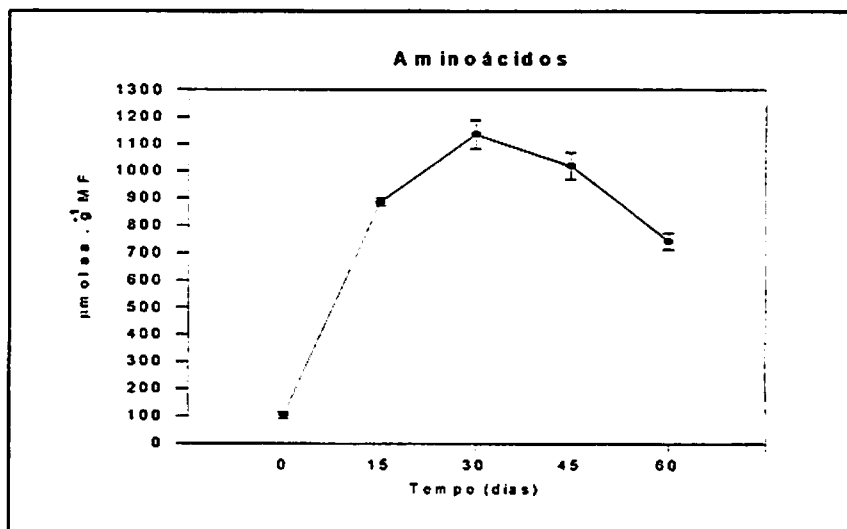


FIGURA 7. Teores de aminoácidos do explante e de calos de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) formados a partir de segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado com 2,26µM de 2,4-D e 8,88µM de BAP, durante 0, 15, 30, 45 e 60 dias. UFLA, Lavras/MG, 1998.

Observa-se, neste estudo, um padrão semelhante de acúmulo e redução nos teores de proteínas e aminoácidos durante o crescimento *in vitro* de calos obtidos a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil. Em geral observou-se um acúmulo nos teores até o 30^o dia de inoculação, período no qual iniciou-se a redução.

O teor de aminoácidos observado entre os dias 0 e 15^o mostrou um aumento de aproximadamente 858% em relação ao teor inicial (103,09 $\mu\text{mol.g MF}^{-1}$), atingindo seu valor máximo 30 dias após a inoculação, porém sem a mesma intensidade. Este aumento no teor de aminoácidos pode ser devido a uma absorção considerável do íon amônio e de glicina do meio de cultura. Segundo George, Puttock e George (1988), a presença de amônio no meio de cultura resulta no aumento da síntese de aminoácidos e proteínas, os quais são produzidos utilizando energia liberada no catabolismo dos carboidratos. O teor de proteínas totais, no entanto, entre os dias 0 e 15^o, apresentou um discreto aumento, porém, atingindo também um teor máximo no 30^o dia após a inoculação.

Estes resultados indicam que até o 15^o dia após a inoculação uma quantidade muito pequena de proteínas foi sintetizada, enquanto altos teores de aminoácidos foram produzidos ou absorvidos. Entretanto, entre 15^o e 30^o dia, o teor de proteínas totais apresentou uma elevação de aproximadamente 493%, possivelmente utilizando os aminoácidos formados ou absorvidos no período anterior. Resultados semelhantes foram observados por Paiva Neto (1996), estudando calos originados de segmentos foliares de moreira (*Clorophora tinctoria*).

Os teores de proteínas e aminoácidos apresentaram elevação entre os dias 0 e 30^o após a inoculação, período que coincide com a fase lag da curva de crescimento de calos. Certamente, esta elevação expressa a síntese de novas

proteínas e aminoácidos formados a partir da degradação de carboidratos, a qual é necessária para a produção de energia a ser utilizada na fase exponencial de crescimento, onde ocorre uma maior divisão celular e, conseqüentemente, maior taxa de crescimento.

Após o 30^o dia de inoculação os teores avaliados tanto de aminoácidos quanto de proteínas apresentaram uma redução até o 60^o dia, período em que iniciou-se a fase de desaceleração da curva de crescimento. Esta redução pode estar relacionada com a diminuição dos nutrientes disponíveis no meio de cultura, para absorção pelos explantes.


6 CONCLUSÕES

- A curva de crescimento média de matéria fresca de calos formados a partir de explantes foliares de castanha-do-brasil apresenta um crescimento tipo sigmoide, com cinco fases distintas: lag (entre 0 - 30 dias de inoculação), exponencial (30 - 53 dias), linear (53 - 60 dias), desaceleração (60 - 67 dias) e estacionária (67 - 90 dias de inoculação).
- O maior percentual de crescimento (74 %) foi observado durante a fase exponencial, e o menor percentual de crescimento (6%) foi obtido na fase de desaceleração.
- A repicagem destes calos para um novo meio de cultura deve ser realizada 60 dias após a inoculação dos explantes.
- Os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores foram reduzidos durante o período de inoculação (60 dias), sendo que esta redução mostrou-se mais intensa até o 30^º dia após a inoculação, período em que a curva de crescimento de calos se encontrava na fase lag, indicando que a degradação destes açúcares serviu como fonte de energia para a fase subsequente do crescimento de calos.
- A sacarose acrescentada ao meio de cultura não é necessária para a indução e crescimento de calos, podendo, assim, ser excluída da composição do meio.
- A análise quantitativa de aminoácidos e proteínas indicou que até o 15^º dia após a inoculação houve uma alta síntese ou absorção de aminoácidos, os quais foram utilizados na formação de novas proteínas até o 30^º dia após a inoculação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, I.N. de Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem de *Cissus sicyoides*. Lavras:UFLA, 1998. 113p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- ANJALI, C.; CHANDRA, R. SANGEETA, K; RAGHUVVEER, P. CHATRATH, A.; KHETARPAL, S. & POLISETTY, R. *Indian Journal of Plant Physiology*, v.1, n.2, p.80-83, 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. New York, v.72, p.248-254, 1976.
- CAMARGO, I. P. de. Estudos sobre a propagação da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb.& Bonpl.). Lavras:UFLA, 1997, 124p.(Tese de Doutorado - Fitotecnia).
- CHENEVARD, D.; JAI-ALLEMAND, C.; GENDRAUD, M. & FROSSARD, J.S. The effect of sucrose on the development of hybrid walnut microcuttings (*Junglan nigra x Junglan regia*). Consequences on their survival during acclimatization. *Annales des Sciences Forestieres*, v.52, n.2, p.147-156, 1995.
- GEORGE, E.F.; PUTTOCK, J.M. & GEORGE, H.J. *Plant Culture Media: Commentary and Analysis*. Exegetics Limited, 1988, v.2, 420p.
- LAMEIRA, Osmar Alves. Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.). Lavras: UFLA, 1997. 88p (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- LEMONS, G.B. de. Crescimento e atividade de enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. Lavras: UFLA, 1996. 56p. (Tese - Mestrado em Fisiologia Vegetal)

- LIMA, D. U. de. Avaliação sazonal da produção de borracha e do metabolismo do carbono e do nitrogênio em plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) cultivadas em Lavras, Minas Gerais. Lavras: UFLA, 1998, 71p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- MEZZETTI, B.; CONTE, L.S. & ROSATI, P. *Actinidia deliciosa in vitro*: II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Berlin, v.26, p.153-160, 1991.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*, v.31, p.426-428, 1959.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- PAIVA NETO, V. B. de. Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud). Lavras:UFLA, 33p., 1996 (Dissertação - Mestrado - Fisiologia Vegetal).
- PASSOS, L. P. Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996, 223 p.
- SANTOS, M.R.A. Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach. Lavras:UFLA, 1998. 80p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- SHIMIZU, T.; CLIFTO, A.; KOMAMINE, A.; FOWLER, M.W. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in batch suspension culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.40, p.125-129, 1977.
- SMITH, R.M. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. San Diego: Academic Press, 1992.171p.
- STEIN, W.; MOORE, S. A modified ninhydrin reagent for photometric determination of amino acids and related compounds. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v.176, p. 367-372, 1948.



YADAV, N.R.; MAHERCHANDANI, N.; YADAV, R.C. Regeneration in tobacco callus and some correlated changes in protein and carbohydrate metabolism. *Crop Improvement*, v.22, n.1, p. 1-6, 1995.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *The Biochemical Journal*, London, p.508-514, 1954.



CAPÍTULO 3

ESTUDO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM PLANTIOS RACIONAIS DE CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K.).

1 RESUMO

SERRA, Ana Gabriela Polaro. Estudo da divergência genética em plantios racionais de castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). Lavras: UFLA, 1999, 72p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia - Área de Concentração em Fisiologia Vegetal)¹

A devastação de castanhais nativos na Amazônia, em virtude de programas de colonização e da implantação de outras atividades comerciais, está provocando a diminuição da variabilidade genética de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), imprescindível para programas de melhoramento e expansão de áreas de cultivo. O presente trabalho teve por objetivo estudar a divergência genética em plantios racionais de castanheira-do-brasil, através do marcador molecular RAPD. Utilizou-se 34 indivíduos sendo 17 indivíduos provenientes do Banco de Germoplasma do Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (CPATU), localizado na cidade de Belém - PA e 17 provenientes de um reflorestamento na cidade de Cláudia - MT. O DNA de folhas destes indivíduos foi extraído, purificado e quantificado. Foram usados 51 primers, de onde foram obtidas 144 bandas polimórficas. As distâncias genéticas foram obtidas pelo complemento do coeficiente de similaridade de Sorensen-Dice, e a representação gráfica destas distâncias foi obtida pelo método UPGMA de agrupamento. Os resultados obtidos 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 apresentou indivíduos dos dois Estados. O segundo grupo apresentou indivíduos apenas do Estado do Mato Grosso e o terceiro grupo apresentou apenas indivíduos do estado do Pará. Embora os marcadores RAPD mostraram-se eficientes na separação dos indivíduos de acordo com os centros de origem, no segundo e terceiro grupos

formados no gráfico de agrupamento, estes foram pouco eficientes na separação dos indivíduos, dentro de cada população estudada (subgrupos).

¹ Orientador: Renato Paiva - UFLA

2 ABSTRACT

SERRA, Ana Gabriela Polaro. Study of genetic divergency in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) cultivated trees Lavras: UFLA, 1999, 72p. (Dissertation - Master of Agronomy / Plant Physiology)¹

Depletion of native amazonian species as a response to colonization and new economic activities is reducing the genetic variability of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.), a vital characteristic for breeding programs as well as for the expansion of cultivated areas. The objective of the present work was to study the genetic divergency in Brazil nut cultivated trees through the molecular-marker RAPD. Thirty four plants (individuals) were studied with 17 being from the germoplasm bank of the East Amazonian Agroforest Research Center (CPATU) located in Belém, state of Pará, and 17 from a reforestation area of Cláudia, state of Mato Grosso. Leaf DNA from these plants was extracted, purified and quantified. Fifty one primers were used from which 144 polymorphic bands were obtained. Genetic distances were obtained by the similarity coefficient of Sorensen-Dice and their graphic representation through the UPGMA grouping method. The results indicated the presence of genetic divergency 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 showed individuals only from the state of Mato Grosso, the third group presented individuals only from the state of Pará. Although the use of RAPD was efficient in separating individuals from the second and third groups based on their geographic origins, it was not so efficient in separating individuals within each studied population.

¹ Adviser: Renato Paiva - UFLA

3 INTRODUÇÃO

As características de interesse agrônômico normalmente são de natureza quantitativa, ou seja, são controladas por muitos genes e com forte influência do ambiente.. Entretanto, as características fenotípicas não fornecem informações seguras sobre o potencial de uma planta para estudos de melhoramento (Belele, 1997).

Grande parte dos problemas que ocorrem com os métodos de avaliação fenotípica podem ser amenizados pela avaliação direta do genótipo, através de métodos de análise baseados em DNA (Tingey, Rafalski e Williams, 1992).

Marcadores baseados em DNA podem ser utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento de uma planta, desde que quantidade suficiente desta molécula possa ser obtida. A identificação de genótipos em estádios iniciais de desenvolvimento da planta abre a possibilidade de acelerar o processo de seleção e recombinação dos indivíduos desejados. Como consequência, reduz-se o tempo necessário para completar uma geração de melhoramento, o que aumenta consideravelmente a eficiência do programa. Este aspecto é particularmente importante no melhoramento de espécies perenes frutíferas e florestais (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

O primeiro marcador de DNA desenvolvido através de estudos de biologia molecular foi o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição. Esta técnica baseia-se nas diferenças de tamanho dos fragmentos obtidos pela digestão do DNA por enzimas de restrição. Durante a década de 1980, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando a enzima DNA-polimerase levou à descrição de outras classes de marcadores.

A técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foi inicialmente descrita em 1990 por dois grupos de pesquisadores norte-americanos distintos que trabalharam independentemente: Williams et al. (1990) e Welsh & McClelland (1990). Esta técnica utiliza primers de seqüência arbitrária para amplificar regiões aleatórias do genoma. Desde sua descrição, o uso de marcadores RAPD na análise genética e no melhoramento de plantas tem tido uma difusão extremamente rápida, sendo, provavelmente, hoje, o marcador molecular de maior utilização com vegetais (Duarte, 1998).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1995), as principais aplicações dos marcadores RAPD são: obtenção de “fingerprints” genômicos de indivíduos, cultivares e populações; análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre espécies; construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e localização de genes de interesse econômico.

O objetivo deste trabalho foi estudar a divergência genética em plantios racionais de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) através do marcador molecular RAPD.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL

Este experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS) - EMBRAPA, localizado na cidade de Sete Lagoas - MG.

4.2 MATERIAL GENÉTICO

Foram avaliados 34 indivíduos (árvores) de castanha-do-brasil de plantios racionais, sendo que 17 foram coletados no banco de germoplasma *in vivo* de castanha-do-brasil, no Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (CPATU) na cidade de Belém-PA, o qual possui clones provenientes de diferentes regiões do Estado do Pará (Tabela 1). Esses indivíduos foram denominados de PA1 até PA17. Os outros dezessete indivíduos restantes foram coletados aleatoriamente em um reflorestamento no Município de Cláudia, localizado ao norte do Estado de Mato Grosso. A esses indivíduos foi dada a identificação de MT1 até MT17.

Tabela 1. Clones, origem 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 (CPATU). UFLA, Lavras/MG, 1998.

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

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

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

Após o banho-maria, foram adicionados 10mL da mistura clorofórmio:álcool isoamil (24:1), os tubos foram invertidos e centrifugados a 5000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e os ácidos nucleicos

foram precipitados pela adição de 30mL da solução de acetato de amônio:álcool isoamil (1:6), permanecendo a temperatura de -20°C por 12 horas.

Após a precipitação, os ácidos nucléicos foram transferidos para tubos de microcentrífuga “Eppendorf”, centrifugados e colocados para secar. Em seguida, os ácidos nucléicos foram rehidratados em tampão TE (1mM de TRIS e 0,1mM e EDTA). Uma segunda extração foi feita adicionando-se o mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamil (24:1), seguida de centrifugação e coleta do sobrenadante, o qual foi precipitado pela adição de, pelo menos, três vezes o volume de uma solução de álcool acetato de sódio (20:1). Após a precipitação, os ácidos nucléicos foram rehidratados em tampão TE.

4.4 PURIFICAÇÃO DE DNA

A purificação do DNA foi feita seguindo a metodologia descrita por Ausubel (1998). Às amostras extraídas foi adicionado igual volume da solução de fenol:clorofórmio:isoamyl na proporção de 25:24:1, sendo então misturadas e centrifugadas por 15 segundos. O sobrenadante foi recolhido e transferido para outro tubo, onde adicionou-se 1/10 do volume de uma solução de acetato de sódio 3M, pH 5,2. Após misturadas, foram adicionadas de 2 a 2,5 vezes o volume de etanol 100% gelado e as amostras foram levadas para um freezer, em temperatura de -20°C durante 30 minutos.

Após serem retiradas do freezer as amostras foram centrifugadas em alta velocidade (10000 rpm), durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao precipitado 1mL de etanol 70%. As amostras foram novamente misturadas e centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet foi seco em temperatura ambiente e finalmente dissolvido em tampão TE.

4.5 TRATAMENTO COM RNase

Em cada tubo contendo 100 μ L de solução de ácidos nucleicos, foram adicionados 10 μ L de solução de RNase (10mg/mL). Os tubos foram homogeneizados e incubados em banho-maria durante 20 minutos a 35°C.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

O DNA foi quantificado através de espectrofotômetro e eletroforese em gel de agarose. A quantificação no espectrofotômetro foi realizada utilizando-se 5 μ L de amostra e 995 μ L de água destilada e lida a uma absorbância de 260nm.

A quantificação eletroforética foi feita em gel de agarose 0,8%, em que o padrão de banda obtido forneceu a qualidade e quantidade do DNA extraído, quando comparado com um padrão conhecido. Para a corrida do gel foi necessária aproximadamente 1 hora sob uma voltagem fixa de 100V. Aliquotas de 10 μ L de solução de DNA foram homogeneizados com 10 μ L de tampão TE e 5 μ L de Dye e aplicadas nas canaletas do gel. Após a corrida, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (10%) durante 30 minutos e as bandas foram visualizadas através de exposição do gel à luz ultravioleta.

4.7 PREPARO DAS AMOSTRAS E AMPLIFICAÇÃO

A enzima DNA Taq-polimerase utilizada nas amplificações foi extraída e purificada no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada CNPMS/EMBRAPA.

Foram utilizados 51 primers da marca Operon para as ampliações (Tabela 2).

Para cada reação de RAPD foram misturados: 9,5µL de água ultra pura estéril, 2,5µL de tampão de PCR 10X, 1µL de mix dNTPs 10mM, 1µL de primer 4µM, 1µL de DNA-Taq Polimerase 1un/µL e 10µL de solução de DNA 5ng/µL, tendo um volume final de 25µL. Após a adição de todos os componentes da reação, na ordem acima, os tubos foram homogeneizados manualmente, acoplados à placa de reação, vedados e submetidos a 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; a) 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.

TABELA 2 Primers utilizados na amplificação de DNA de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) nos indivíduos do Estado do Pará e do Mato Grosso. EMBRAPA - CNPMS, Sete Lagoas/MG, 1998.

Primers	Seqüência de nucleotídeos 5' → 3'	PM	Primers	Seqüência de nucleotídeos 5' → 3'	PM
OPA1	CAGGCCCTTC	2955	OPC12	TGTCATCCCC	2930
OPA4	AATCGGGCTG	3059	OPC13	AAGCCTCGTC	2979
OPA5	AGGGGTCTTG	3090	OPC15	GACGGATCAG	3068
OPA9	GGGTAACGCC	3044	OPJ19	GGACACCACT	2988
OPA10	GTGATCGCAG	3059	OPL8	AGCAGGTGGA	3108
OPA17	GACCGCTTGT	3010	OPO3	CTGTTGCTAC	2985
OPA18	AGGTGACCGT	3059	OPO6	CCACGGGAAG	3053

OPB1	GTTTCGCTCC	2961		OPO7	CAGCACTGAC	2988
OPB4	GGACTGGAGT	3099		OPO9	TCCCACGCAA	2948
OPB8	GTCCACACGG	3004		OPO10	TCAGAGCGCC	3004
OPB10	CTGCTGGGAC	3035		OPO13	GTCAGAGTCC	3019
OPB12	CCTTGACGCA	2979		OPO12	CAGTGCTGTG	3050
OPB18	CCACAGCAGT	2988		OPO15	TGGCGTCCTT	3001
OPC2	GTGAGGCGTC	3075		OPO20	ACACACGCTG	2988
OPC3	GGGGGTCTTT	3081		OPR4	CCCGTAGCAC	2964
OPC6	GAACGGACTC	3028		OPR9	TGAGCACGAG	3068
OPC8	TGGACCGGTG	3075		OPR10	CCATTCCCCA	2899
OPC11	AAAGCTGCGG	3068		OPR12	ACAGGTGCGT	3059
OPS7	TCCGATGCTG	3010		OPR15	GGACAACGAG	3077
OPS8	TTCAGGGTGG	3090		OPW1	CTCAGTGTCC	2970
OPS9	TCCTGGTCCC	2946		OPW2	ACCCCGCAA	2933
OPS11	AGTCGGGTGG	3115		OPW3	GTCCGGAGTG	3075
OPS16	AGGGGGTTCC	3019		OPW5	GGCGGATAAG	3108
OPS17	TGGGACCAC	3044		OPW7	CTGGACGTCA	3019
OPS19	GAGTCAGCAG	3068		OPW8	GACTGCCTCT	2970
				OPW9	GTGACCGAGT	3059
				OPW10	TCGCATCCCT	2930
				OPW13	CACAGCGACA	2997
				OPW18	TTCAGGGCAC	3019
				OPW19	CAAAGCGCTC	2988

4.8 OBTENÇÃO DOS PADRÕES DE BANDAS

As amostras amplificadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TAE, por uma hora a 100V. Para tanto, foram adicionados a cada uma 5µL de Dye Xylene Cyanole-Orange para DNA, sendo as mesmas ressuspensas com micropipeta. Após a corrida, o gel foi transferido para uma bandeja contendo água e solução de brometo de etídio na concentração de 10%, e submetida a agitação por 30 minutos, a temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas.

4.9 ANÁLISES DOS PADRÕES DE BANDAS

Na avaliação dos géis, 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, designada 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 o coeficiente de similaridade de Sorensen-Dice (Duarte, 1998), através da expressão:

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

sendo: a - indica que houve concordância entre o par de genótipos analisados; e b e c - indicam que não houve concordância entre os genótipos analisados.

As variáveis da expressão foram obtidas conforme demonstrado no esquema:

		indivíduo x	
		1	0
indivíduo y	1	a (1,1)	b (0,1)
	0	c (1,0)	d (0,0)

As similaridades foram transformadas em medidas de distâncias genéticas pela seguinte equação:

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

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

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 REAÇÃO DE RAPD

Foram utilizados 51 primers nas amplificações do DNA genômico dos indivíduos provenientes dos Estados do Pará e Mato Grosso, os quais 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 de locos polimórficos por primer foi 2,8 variando de um para os primers OPC11, OPW3, OPW8, OPW18 e OPR10, até sete para o primer OPW7. Um exemplo de padrão de bandas polimórficas está representado nas Figuras 8 e 9.

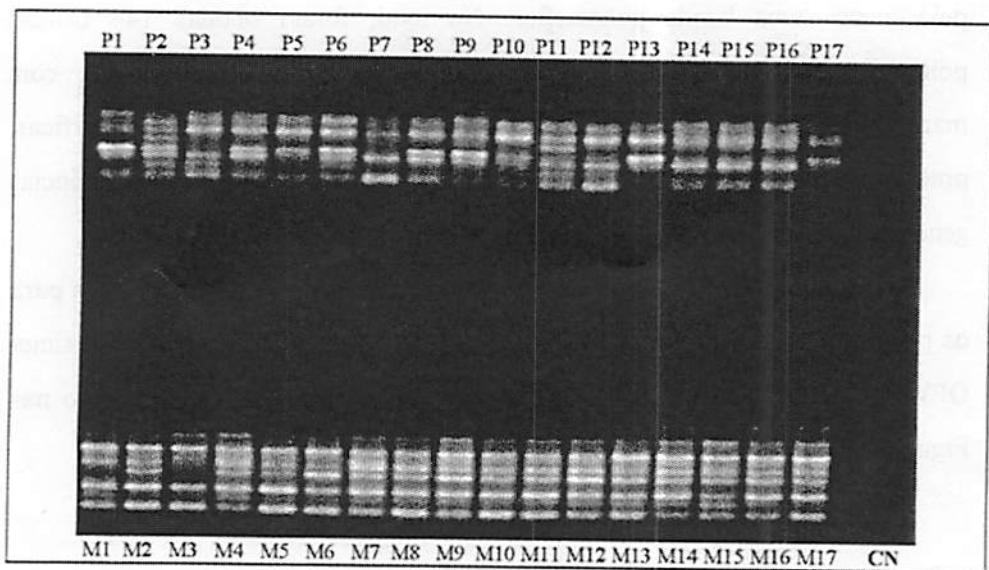


FIGURA 8: Produto da amplificação de DNA de folhas de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) de indivíduos provenientes de regiões do Estado do Pará (PA1 a PA17) e indivíduos provenientes do Estado do Mato Grosso (MT1 a MT17), obtido com o primer OPS11. CN = controle negativo. EMBRAPA - CNPMS, Sete Lagoas/MG, 1998.

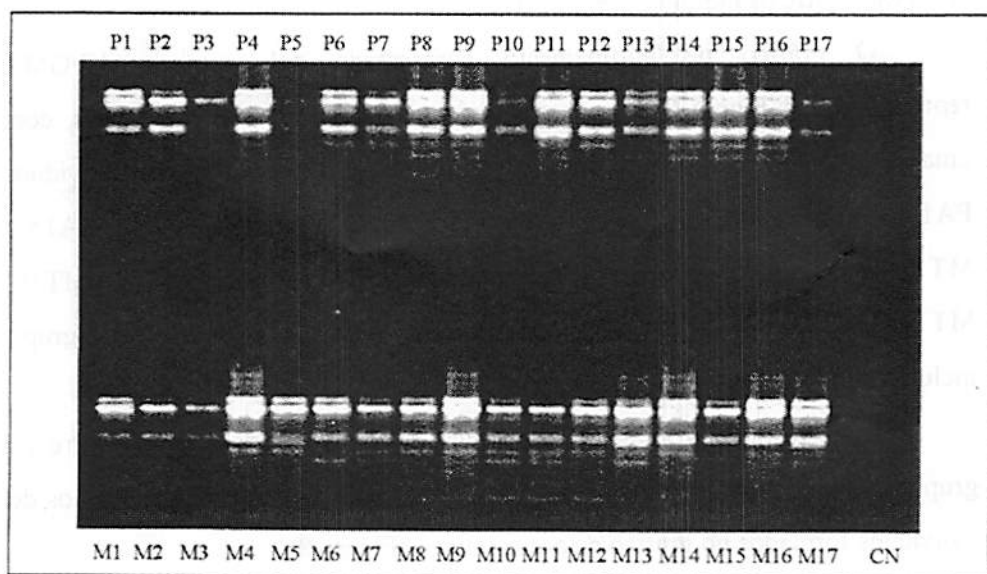


FIGURA 9: Produto da amplificação de DNA de folhas de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) de indivíduos provenientes de regiões do Estado do Pará (PA1 a PA17) e indivíduos provenientes do Estado do Mato Grosso (MT1 a MT17), obtido com o primer OPS19. CN = controle negativo. EMBRAPA - CNPMS, Sete Lagoas/MG, 1998.

5.2 AVALIAÇÃO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA

A partir das 144 bandas polimórficas obtidas, construiu-se uma matriz de distâncias genéticas (anexos, Tabela 6A), sendo que a distância genética média foi 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 observada entre os indivíduos PA5 e MT11.

O gráfico de agrupamento apresentado pelo método UPGMA representado na Figura 8 separa os indivíduos analisados em três grupos, com uma distância genética limite de 72%. O primeiro grupo incluiu os indivíduos PA10, PA17, PA5, PA3, MT13, MT6, MT3, PA12, PA2, PA7, PA13, PA15 e MT15; no segundo grupo estão os indivíduos MT11, MT7, MT17, MT16, MT10, MT14, MT9, MT12, MT8, MT4, MT5, MT2, e MT1, e o terceiro grupo incluiu os indivíduos PA11, PA15, PA16, PA14, PA9, PA8, PA4 e PA1.

Estes resultados indicam a presença de variabilidade genética entre os grupos de indivíduos de acordo com suas origens e também dentro dos grupos de indivíduos formados no gráfico de agrupamento (Figura 8).

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 destes indivíduos 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 podemos inferir que as sementes de alguns indivíduos provenientes do reflorestamento (MT), podem ter sido coletadas em regiões 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*), principal agente dispersor de sementes desta espécie, possuem um alcance restrito (Peres e Baider, 1997). Mori e Prance (1988), estudando a ecologia de castanheiras, afirmam 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 (Mori e Prance, 1979). Buckley et al. (1988) observaram uma diferenciação genética muito pequena em populações naturais de castanha-do-brasil analisadas através de izoenzimas.

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 observada.

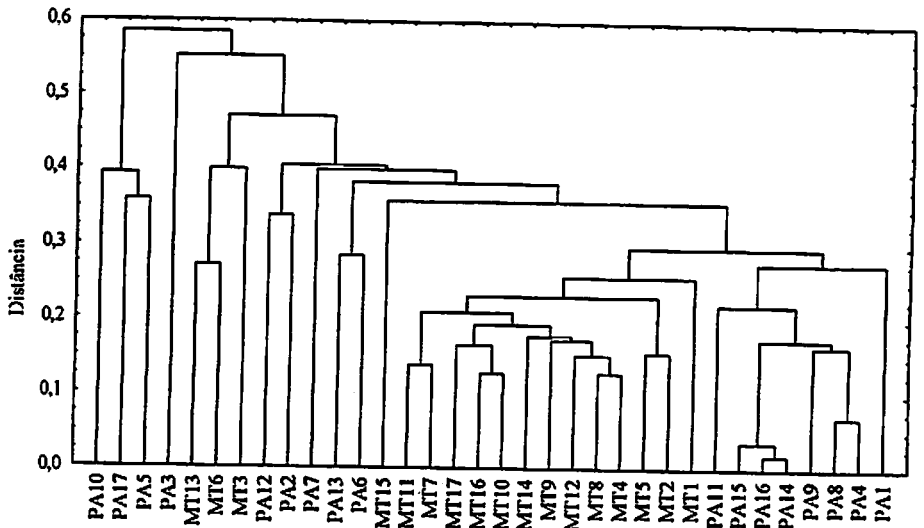


FIGURA 10. Gráfico de agrupamento das distâncias genéticas entre indivíduos de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) provenientes dos Estados do Pará (PA1 a PA17) e do Mato Grosso (MT1 a MT17). EMBRAPA-CNPMS, Sete Lagoas/MG, 1998.

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, no qual 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 (1988), que estudando sistemas de manutenção de populações naturais de castanha-do-brasil através de izoenzimas, observou que, dentro de uma mesma população desta espécie, existe um alto nível de variação genética, devido a uma alta taxa de cruzamento entre os indivíduos.

No terceiro grupo, observa-se a presença dos indivíduos PA11, PA15, PA16, PA14, PA9, PA8, PA4 e PA1, todos provenientes do Estado do Pará. A tendência de formação de subgrupos, como no primeiro e segundo grupo, também foi observada. 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. Observamos neste grupo de indivíduos, agrupamentos de acordo com as regiões em que foram coletados no Estado do Pará.

Os resultados obtidos estão relacionados com as origens geográficas dos indivíduos provenientes do Pará e Mato Grosso, porém, a formação do grupo 1 no gráfico de agrupamento, mostra a presença de similaridade genética entre alguns indivíduos provenientes dos dois Estados de forma semelhante aos encontrados por Kanashiro, Harris e Simons (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), utilizando 47 primers. O grau de similaridade entre essas populações foi calculado através 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, ou seja, de acordo 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 do Rio Branco que é geograficamente mais isolada.

Peres e Baider (1997), estudando a distribuição espacial de castanha-do-brasil na floresta amazônica, confirmam que estas freqüentemente apresentam-se em grupos bastante discretos em bosques naturais, o que resulta em uma alta aglomeração na distribuição espacial na paisagem.

6 CONCLUSÕES

- Três grupos de indivíduos foram observados através do gráfico de agrupamento: o primeiro compunha-se de indivíduos dos Estados do Pará e do Mato Grosso, podendo ter a mesma origem, ou seja, serem provenientes de uma mesma população ancestral.

- No segundo e terceiro grupos de indivíduos observou-se uma separação mais evidente em relação às origens geográficas, pois o segundo grupo compunha-se somente de indivíduos do Estado do Mato Grosso e o terceiro apresentou apenas indivíduos do Estado do Pará.

- 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).

- A maioria dos indivíduos coletados como clones no banco de germoplasma do CPATU apresenta divergência genética.

- Os indivíduos que apresentaram menor divergência genética entre si (PA15, PA16 e PA14) são provenientes da cidade de Alenquer no Estado do Pará e pertencentes ao Clone Santa Fé I.

- A distância genética média entre os indivíduos foi de 39%, sendo a menor (4%) observada entre os indivíduos PA14 e PA16 e a maior (72%), observada entre os indivíduos PA5 e MT11.



7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSUBEL, F.M. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1998, v.1.
- BELELE, C. L. *Análise Bioquímica e Molecular da Diversidade Genética entre Cultivares Mesoamericanos e Andinos de Feijoeiro Comum (Phaseolus vulgaris L.)*. Uberlândia: UFU, 1997. 65 p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Bioquímica)
- BUCKLEY, D.P.; O'MALLEY, D.M.; APSIT, V.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. 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, 1988.
- DUARTE, J. M. *Estudo da divergência genética em raças de feijão por meio de marcadores RAPD*. Lavras: UFLA, 1998. 78p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)
- DUCKE, A. Plantas de cultura pré-colombiana na Amazônia Brasileira. *Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte*. Belém. v.8, p.2-24, 1946.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p. (EMBRAPA-CENARGEN Documentos 20)
- KANASHIRO, M.; HARRIS, S.A.; SIMONS, A. RAPD Diversity in Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* Humb. And Bonpl., Lecythidaceae). *Silvae Genetica*, v.46, n.4, p.185-252, 1997.
- MORI, S.A.; PRANCE, G.T. Taxonomy, ecology and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). *Advanced Economical Botany* (in press), 1988.
- 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 markes. *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, p.1-270, 1979.
- TINGEY, S.V.; RAFALSKI, J.A.; WILLIAMS, J.G.K. Genetic analysis with RAPD markers. **Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**. p. 3-8, 1992.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**. v. 18, n. 22, p. 7213-7217, 1990.
- 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. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

ANEXOS

... ..

ANEXOS

ANEXO A

Página

TABELA 1A. Análise de variância das médias das repetições dos pesos da curva de crescimento de calos obtidos a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.).....	70
TABELA 2A. Análise de variância das médias das repetições dos teores de açúcares solúveis totais determinados em calos obtidos a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.).....	70
TABELA 3A. Análise de variância das médias das repetições dos teores de açúcares redutores determinados em calos obtidos a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.).....	71
TABELA 4A. Análise de variância das médias das repetições dos teores de proteínas totais determinados em calos obtidos a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.).....	71
TABELA 5A. Análise de variância das médias das repetições dos teores de aminoácidos determinados em calos obtidos a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.).....	71
TABELA 6A Matriz de distância de indivíduos de castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.) provenientes dos Estados do Pará (1 a 17) e do. Mato Grosso (18 a 34).....	72

ANEXOS

ANEXO A

TABELA 1A. Análise de variância das médias das repetições dos pesos da curva de crescimento de calos obtidos a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K).

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Prob.>F
Tempo	11	7,669	0,697	0,00001**
Resíduo	132	0,52	0,003	
Total	143	8,19		

C.V. = 19,0%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 2A. Análise de variância das médias das repetições dos teores de açúcares solúveis totais determinados em calos obtidos a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K)

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Prob.>F
Tempo	4	19243,5	4810,87	0,00001**
Resíduo	10	375,53	37,553	
Total	14	19619,0		

C.V. = 4.9%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 3A. Análise de variância das médias das repetições dos teores de açúcares redutores determinados em calos obtidos a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.).

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Prob.>F
Tempo	4	29178,8	7294,71	0,00001**
Resíduo	10	136,5	13,65	
Total	14	29315,3		

C.V. = 6,8%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 4A. Análise de variância das médias das repetições dos teores de proteínas totais determinados em calos obtidos a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.).

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Prob.>F
Tempo	4	72,56	18,14	0,00001**
Resíduo	10	0,51	0,05	
Total	14	73,07		

C.V. = 5,8%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 5A. Análise de variância das médias das repetições dos teores de aminoácidos determinados em calos obtidos a partir de segmentos foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.).

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Prob.>F
Tempo	4	1833686,9	458421,7	0,00001**
Resíduo	10	8456,8	845,68	
Total	14	1842143,7		

C.V. = 3,8%

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 6A Matriz de distância de indivíduos de castanha-do-brasil provenientes dos Estados do Pará (1 a 17) e do Mato Grosso (18 a 34). EMBRAPA - CNPMS, Soc. Lagoas/MG, 1998.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34			
1	0,12																																				
2	0,44	0,51	0,21	0,59	0,32	0,37	0,17	0,20	0,41	0,10	0,31	0,20	0,33	0,33	0,11	0,43	0,32	0,43	0,61	0,37	0,33	0,39	0,18	0,41	0,42	0,49	0,31	0,43	0,51	0,40	0,47	0,18	0,16				
3	0,25	0,68	0,20	0,57	0,11	0,56	0,41	0,16	0,41	0,16	0,37	0,33	0,34	0,32	0,10	0,60	0,63	0,61	0,49	0,57	0,61	0,61	0,51	0,42	0,46	0,49	0,42	0,41	0,49	0,48	0,45	0,41	0,37				
4	0,66	0,27	0,41	0,07	0,13	0,31	0,22	0,32	0,28	0,15	0,14	0,14	0,18	0,31	0,10	0,62	0,33	0,32	0,33	0,26	0,33	0,26	0,32	0,21	0,21	0,41	0,21	0,37	0,26	0,30							
5	0,50	0,52	0,61	0,70	0,12	0,70	0,35	0,66	0,66	0,61	0,56	0,69	0,67	0,71	0,72	0,66	0,71	0,68	0,68	0,70	0,68	0,73	0,68	0,72	0,69	0,70	0,67	0,67									
6	0,44	0,28	0,29	0,42	0,37	0,37	0,38	0,27	0,28	0,26	0,46	0,32	0,34	0,60	0,38	0,32	0,31	0,32	0,35	0,46	0,50	0,45	0,40	0,43	0,40	0,47	0,35	0,41	0,35	0,38							
7	0,16	0,40	0,54	0,43	0,33	0,40	0,43	0,33	0,32	0,31	0,48	0,46	0,39	0,38	0,41	0,39	0,38	0,37	0,45	0,43	0,41	0,38	0,44	0,32	0,47	0,37	0,52	0,43	0,46								
8	0,18	0,48	0,23	0,28	0,24	0,20	0,19	0,19	0,43	0,40	0,39	0,61	0,30	0,40	0,55	0,30	0,31	0,40	0,25	0,31	0,32	0,31	0,44	0,32	0,47	0,37	0,53	0,43	0,38								
9	0,56	0,22	0,35	0,42	0,17	0,19	0,19	0,56	0,32	0,35	0,67	0,21	0,16	0,34	0,27	0,29	0,29	0,16	0,20	0,26	0,35	0,27	0,40	0,30	0,30	0,33											
10	0,55	0,41	0,37	0,57	0,56	0,51	0,37	0,61	0,56	0,61	0,53	0,51	0,59	0,50	0,55	0,60	0,38	0,56	0,56	0,66	0,66	0,57	0,61	0,57	0,61	0,50	0,56										
11	0,11	0,41	0,21	0,22	0,22	0,22	0,19	0,39	0,33	0,37	0,30	0,37	0,48	0,31	0,32	0,30	0,32	0,28	0,30	0,41	0,31	0,32	0,28	0,30	0,41	0,31	0,32	0,39	0,35								
12	0,41	0,31	0,34	0,31	0,55	0,46	0,46	0,39	0,38	0,47	0,57	0,32	0,37	0,43	0,42	0,38	0,40	0,57	0,41	0,54	0,40	0,42															
13	0,01	0,19	0,19	0,31	0,51	0,47	0,61	0,47	0,45	0,38	0,43	0,48	0,48	0,51	0,42	0,46	0,57	0,46	0,50	0,51	0,49																
14	0,01	0,02	0,62	0,28	0,25	0,60	0,20	0,29	0,48	0,25	0,20	0,22	0,28	0,20	0,22	0,28	0,20	0,22	0,20	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22		
15	0,61	0,28	0,23	0,60	0,21	0,10	0,48	0,23	0,21	0,22	0,20	0,21	0,27	0,20	0,22	0,20	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22		
16	0,62	0,39	0,38	0,62	0,35	0,61	0,56	0,39	0,38	0,61	0,61	0,58	0,62	0,61	0,58	0,62	0,61	0,57	0,57	0,56																	
17	0,30	0,31	0,20	0,31	0,37	0,27	0,23	0,23	0,29	0,28	0,22	0,31	0,25	0,46	0,27	0,21																					
18	0,53	0,17	0,16	0,20	0,16	0,21	0,21	0,21	0,20	0,22	0,33	0,23	0,31	0,22	0,21																						
19	0,39	0,19	0,19	0,13	0,16	0,22	0,15	0,13	0,13	0,17	0,10	0,21	0,16																								
20	0,41	0,35	0,43	0,35	0,43	0,42	0,37	0,38	0,48	0,38	0,48	0,38	0,48	0,38	0,48	0,38	0,48	0,38	0,48	0,38	0,48	0,38	0,48	0,38	0,48	0,38	0,48	0,38	0,48	0,38	0,48	0,38	0,48	0,38	0,48	0,38	
21	0,21	0,22	0,21	0,14	0,23	0,37	0,23	0,31	0,24	0,22	0,33	0,23	0,31	0,22	0,21																						
22	0,16	0,17	0,20	0,17	0,11	0,14	0,10	0,17	0,10	0,21	0,16																										
23	0,21	0,25	0,15	0,20	0,38	0,43	0,17																														
24	0,23	0,18	0,20	0,35	0,20	0,22																															
25	0,15	0,22	0,22	0,23	0,23	0,19																															
26	0,41	0,33	0,33	0,29																																	
27	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16		
28	0,21	0,25	0,15	0,20	0,38	0,43	0,17																														
29	0,23	0,18	0,20	0,35	0,20	0,22																															
30	0,15	0,22	0,22	0,23	0,23	0,19																															
31	0,41	0,33	0,33	0,29																																	
32	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16			
33	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16			
34	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16			

