



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE UnB PLANALTINA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE MACAÚBA COM BASE EM  
MARCADORES MOLECULARES**

**ANA CLARA OLIVEIRA COMBY**

Planaltina – DF

**ANA CLARA OLIVEIRA COMBY**

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE MACAÚBA COM BASE EM  
MARCADORES MOLECULARES**

*Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora, como exigência parcial para a obtenção de título de Licenciado do Curso de Ciências Naturais, da Faculdade UnB Planaltina, sob a orientação da Profª. Erina Vítório Rodrigues.*

Planaltina – DF

Maio, 2021

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço àqueles que caminharam ao meu lado durante essa jornada acadêmica;

Aos professores pela compreensão e dedicação;

Aos colegas pela parceria e acolhimento;

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas de iniciação científica;

Aos amigos pelo apoio emocional e pela companhia;

Aos familiares pelo amor incondicional e pelo afeto.

A minha orientadora, Erina Vitório Rodrigues, por não desistir, por me incentivar e por acreditar.

E em especial ao meu pai e a minha avó, sem eles nada disso seria possível.

## RESUMO

O esgotamento dos recursos naturais não renováveis torna iminente a busca por alternativas sustentáveis. O biodiesel é um biocombustível com grande potencial como alternativa aos combustíveis provenientes de matéria-prima não renovável e, atualmente, diversas culturas vegetais são utilizadas para sua produção, uma delas é a macaúba, que apresenta quantidade relevante de produção de óleo. Visto isso, esse trabalho objetivou quantificar a diversidade genética em genótipos de macaúba com base em marcadores moleculares. Foram amostrados 300 genótipos de macaúba, oriundos de cinco estados brasileiros, Minas Gerais, São Paulo, Pará, Goiás e Distrito Federal. Foi realizada a extração de DNA do tecido vegetal, posteriormente as amostras foram genotipadas e, por fim, o sequenciamento foi realizado com base em marcadores moleculares SNPs. Os resultados indicaram baixa diversidade genética entre as populações. Porém, foi encontrada maior dispersão geográfica nas populações do Distrito Federal, Goiás e Minas Gerais e, por consequência, maior diversidade genética. Portanto, para futuras seleções dos programas de melhoramento genético, a fim de gerar progênies potenciais com variabilidade genética, é aconselhável, realizar seleção de maior número de indivíduos dentro das famílias.

Palavras-chave: *Acrocomia aculeata*; Biocombustível; SNP.

## **ABSTRACT**

The depletion of non-renewable natural resources makes the search for sustainable alternatives imminent. Biodiesel is a biofuel with great potential as an alternative to fuels from non-renewable raw materials and, currently, several plant crops are used for its production, one of them is macauba, which has relevant oil production. Given this, this study aimed to quantify genetic diversity in macauba genotypes based on molecular markers. 300 individuals from macauba, from five Brazilian states, Minas Gerais, São Paulo, Pará, Goiás and the Distrito Federal, were sampled. DNA extraction from plant tissue was performed, posteriorly the samples were genotyped and finally the sequencing was performed based on molecular markers SNPs. The results indicated low genetic diversity and low interspecific variability in all populations. However, greater geographical dispersion was found in the populations of the Distrito Federal, Goiás and Minas Gerais and, consequently, greater genetic diversity. Therefore, for future selections of breeding programs, to generate progenies with genetic variability, it is advisable, carry out the selection of a larger number of individuals within families.

Keywords: Macaúba; Biofuel; Genetic diversity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel no Brasil em valores percentuais, de acordo com o Anuário Estatístico Brasileiro de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis do ano 2020. .... 11
- Figura 2.** Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os 300 genótipos de macaúba, obtido pelo método UPGMA, utilizando a distância Euclidiana média como medida de dissimilaridade.....23
- Figura 3.** Análise dos componentes principais.. ....24
- Figura 4.** Probabilidade de alocação dos genótipos de macaúba com base na análise discriminante de componentes principais (ADCP) considerando K=3. ....25
- Figura 5.** Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC). ....26

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Análise de variância molecular (AMOVA) e estimativa de variância entre e dentro das populações de macaúba. ....21
- Tabela 2.** Parâmetros de diversidade genética entre as populações de macaúba...22

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	10
2.1. Biodiesel e o cenário no Brasil.....	10
2.2. Aspectos gerais da macaúba.....	12
2.3. Importância socioeconômica da macaúba .....	13
2.4. Melhoramento genético.....	14
2.5. Diversidade genética.....	16
2.6. Marcadores moleculares.....	17
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	20
3.1. Material vegetal, extração de DNA e genotipagem .....	20
3.2. Análise geneético-estatística.....	20
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	21
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	27
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	28

## 1. INTRODUÇÃO

Grande parte da energia consumida mundialmente é proveniente de combustíveis fósseis, ou seja, de matérias-primas finitas e não renováveis que estão relacionadas a emissão de gases poluentes. A limitação dos recursos naturais e a preocupação com o excesso de poluição incentivou a busca por processos sustentáveis que pudessem atender a demanda energética populacional e, conjuntamente, reduzir os danos ambientais, como a utilização de biodiesel. A matéria-prima para produção de biodiesel vem da extração de óleo de diversas culturas vegetais, tais como soja, milho, amendoim, algodão, babaçu, macaúba e outras. No Brasil, a principal fonte para produção de biodiesel é a soja, cerca de 68,3% (ANP, 2019), porém diversos estudos estão buscando a possibilidade de implementação de novas culturas, uma delas é a macaúba (NOBRE et al., 2015).

A macaúba é considerada uma alternativa para diversificação da matéria-prima, por possuir alto potencial produtivo de óleo, característica essencial para a produção de biodiesel. Além de sua alta produtividade de óleo, cerca de 2,5 a 4,0 t ha<sup>-1</sup> (DOMICIANO et al., 2015), a macaúba é uma alternativa sustentável, uma vez que pode ser associada a sistemas agroflorestais, diminuindo impactos ambientais. O cultivo da macaúba é uma atividade recente e a maior parte de sua população é de espécies nativas e não domesticadas, por isso sua colheita e manejo são prioritariamente extrativistas e sua produção considerada ineficiente (VIEIRA, 2017).

A obtenção de matéria-prima para produção de biodiesel está fortemente atrelada a programas de melhoramento genético, que buscam estudar e desenvolver genótipos que melhor atendam às demandas de produção, levando em consideração fatores ambientais, sociais e econômicos. Os programas de melhoramento genético são possíveis tendo como base o conhecimento prévio das características genotípicas e fenotípicas das culturas, assim como a caracterização dos seus bancos de germoplasma (MANFIO et al., 2012).

A macaúba é uma espécie perene e ainda pouco estudada, por isso ainda se encontra na fase de pré-melhoramento, ou seja, muitas de suas características fenotípicas e genotípicas ainda se encontram em fase de coleta e avaliação. Para a avaliação da diversidade genética podem ser utilizados os marcadores moleculares visto que eles conseguem identificar pequenas alterações no DNA e com isso permitir que sejam feitas inferências sobre a diversidade genética da espécie (SBG, 2017).

Isso posto, o objetivo desse trabalho foi quantificar a diversidade genética em genótipos de macaúba com base em marcadores moleculares.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Biodiesel e o cenário no Brasil**

O biodiesel começou a ser estudado de forma aprofundada no século XIX, no ano de 1895, por dois grandes teóricos da época, Rudolf Diesel e Henry Ford. Rudolf Diesel criou o primeiro motor funcional movido a biodiesel, porém na época a disponibilidade de petróleo era abundante e seu valor muito baixo, fazendo com que o estudo do biodiesel fosse adiado (BRASIL, 2006).

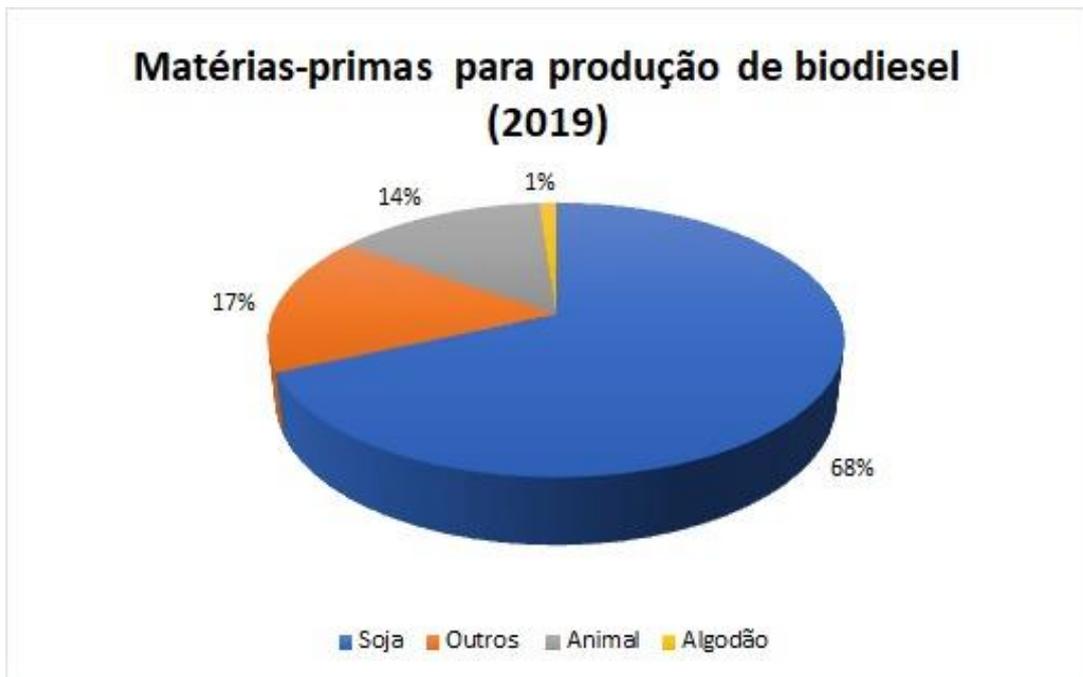
Com o desenvolvimento da indústria, o petróleo, que estava sendo utilizado demasiadamente, passou a ser visto como um recurso limitado. A atenção voltada para a sua escassez teve como consequência o aumento do seu valor no mercado e o incentivo de busca por novas fontes de combustível que fossem ilimitadas e renováveis, retornando, dessa forma, os estudos com o biodiesel (COSTA et al., 2012). Além disso, a constante preocupação com a poluição ambiental causada pela emissão de gases da utilização dos combustíveis fósseis, não apenas do petróleo, mas dos combustíveis fósseis em geral, implicou na procura por sistemas sustentáveis para preservação da natureza e da vida. Um desses sistemas é o uso do biodiesel no mercado de combustíveis (POUSA; SANTOS; SUAREZ, 2007).

A principal fonte de matéria-prima para produção de biodiesel são culturas vegetais, que variam de acordo com a demanda. Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível

“O biodiesel é um combustível renovável obtido a partir de um processo químico denominado transesterificação. Por meio desse processo, os triglicerídeos presentes nos óleos e gordura animal reagem com um álcool primário, metanol ou etanol, gerando dois produtos: o éster e a glicerina” (ANP, 2016).

No Brasil, existe grande variação de fontes de matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel, algumas de origem vegetal, como soja, milho, algodão, girassol, mamona, dendê, macaúba e outros, e as de origem animal, como sebo bovino, gordura de frango e de suínos. Segundo Ramos (2016), existe variabilidade na utilização de matérias-primas para produção de biodiesel, porém a soja representa

em média mais de 68% dessa cadeia, seguido do sebo bovino que representa cerca de 14% (Figura 1) (ANP, 2020).



**Figura 1.** Matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel no Brasil em valores percentuais, de acordo com o Anuário Estatístico Brasileiro de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis do ano 2020.

A soja como a principal oleaginosa para a produção do biocombustível acarreta alguns desafios, um deles é conseguir a conciliação entre a demanda da indústria de combustível e da indústria alimentícia. Para que a quantidade de soja seja suficiente para todas as demandas do mercado, seria necessário que grande parte dos territórios destinados a agricultura fossem ocupados por plantações de soja, o que poderia acarretar prejuízos ambientais. Entretanto, existem alternativas que permitem o aumento da produção de óleo sem prejudicar a demanda da indústria alimentícia, como por exemplo a diversificação de plantas destinadas à produção de biodiesel.

Algumas espécies vegetais como o dendê e a macaúba podem produzir quatro vezes mais óleo que a soja em um mesmo espaço de área (LAVIOLA et al., 2016). Para que a implementação dessas novas culturas seja possível, é preciso que, assim como a soja, elas sejam estudadas, conhecidas e domesticadas para que apresentem escala de produção, domínio tecnológico e logística. Por isso, pesquisadores de diversas áreas trabalham essas culturas estabelecendo programas de melhoramento

genético de plantas, cujo principal objetivo é desenvolver genótipos que reúna várias características de interesse e que trarão benefícios à produção agrícola.

## **2.2. Aspectos gerais da macaúba**

As palmeiras, como são popularmente conhecidas, pertencem à família Arecaceae. Existem registros fósseis dessa família da era Paleozóica, antes de suas espécies se diferenciarem, fato que ocorreu ao longo do tempo, e deu origem a diversidade existente atualmente. Na biologia, a palmeira é considerada da alta realeza, devido a sua estatura e a disposição de suas folhas que remetem a uma coroa (MOURA, 2007).

A palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata*), também conhecida como bocaiuva e coco-espinho, é uma palmeira nativa brasileira. Caracterizada por possuir espinhos longos e pontiagudos na região dos nós e frutos comestíveis, sendo diferenciadas principalmente pela altura e pela localização geográfica (NOBRE et al., 2015).

Amplamente distribuída no território brasileiro, pode ser encontrada em praticamente todos os biomas, com maior abundância no Cerrado e Pantanal. É encontrada em outros territórios da América do Sul, como Argentina, Paraguai, Colômbia, Bolívia e Costa Rica, além do México e das Antilhas na América Central (CETEC, 1983). No Brasil, podem ser encontradas concentrações populosas nas regiões centrais, como nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Essa distribuição tão dispersa influenciou tanto na diversificação da espécie, como no aparecimento de sinonímias e na variação do nome popular dado à palmeira.

É uma planta perene, e na fase de plena maturação a estirpe atinge média de 15 a 20 metros de altura, e de 20 a 30 centímetros de diâmetro. Possui folhas verdes, compridas e de aspecto volumoso, devido à sua disposição em diferentes planos. Além disso, apresenta espinhos de aproximadamente dez centímetros na região dos nós e na região central das folhas (LORENZI; NEGRELLE, 2006).

A inflorescência amarela em cacho pendente possui até 80 centímetros de comprimento, protegida por uma espata de 2 metros, apresenta flores unissexuais, ou seja, há na mesma inflorescência flores do sexo feminino e masculino, sendo as masculinas localizadas no topo e as femininas na base (CARVALHO; SOUZA;

MACHADO, 2011). A floração acontece praticamente durante todo o ano, sendo o amadurecimento dos frutos entre os meses de setembro a janeiro. É uma planta alógama, sua reprodução é majoritariamente cruzada, por isso seus principais polinizadores são besouros e o vento secundariamente. Os frutos são esféricos e de cor marrom amarelado, possuem epicarpo rígido, mesocarpo fibroso, comestível e rico em glicerídeos, endocarpo de cor escura, rígido e com grande potencial energético, dentro do endocarpo há uma amêndoa oleaginosa e comestível (LORENZI; NEGRELLE, 2006).

### **2.3. Importância socioeconômica da macaúba**

Todas as partes da planta de macaúba podem ser aproveitadas e produzidos diversos produtos. O caule é transformado em madeira, utilizada em construções, os brotos são comestíveis, podendo ser feitos conserva, as folhas podem ser utilizadas para confecção de redes de pesca e objetos de decoração e artesanato, do fruto podem ser retirados insumos para a indústria alimentícia, cosmética e de biocombustível (LORENZI; NEGRELLE, 2006). Porém, dentre todos, o que chama mais atenção e que tem melhor aproveitamento é o fruto, principalmente por seu potencial produtivo de óleo. A polpa (mesocarpo) e a amêndoa (endocarpo), além de ser comestível e muito nutritiva, possui alto percentual de óleo, cerca de 70% e 50%, respectivamente (NETO et al., 2016).

Da polpa pode ser extraído óleo para produção de biodiesel por meio de processos de transesterificação relativamente simples e barato (DAMIAN FARROW, JOSEPH BAKER, 2015). Da amêndoa, pode ser extraído biocombustível utilizado em motores de aviações. Segundo Lobato (2012), a polpa da macaúba produz cerca de 4.000 litros de óleo por ha·ano<sup>-1</sup>. Valores tão altos surpreendem pesquisadores, quando comparados aos valores obtidos com o cultivo de soja, por exemplo, tornando a macaúba uma cultura promissora para a indústria do biocombustível.

Além disso, há outros fatores que agregam importância econômica ao cultivo de macaúba. Um deles é o fato de sua utilização e colheita ser feita majoritariamente extrativista por comunidades locais, que muitas vezes utilizam os seus derivados como fonte de renda. Outra grande importância associada a macaúba é a ambiental, uma vez que ela pode ser associada a sistemas agroflorestais e assim ser cultivada em conjunto com outras culturas (CARDOSO et al., 2017).

## 2.4. Melhoramento genético

A população mundial vem crescendo exponencialmente a cada ano, segundo a FAO, é estimado de 9,7 bilhões de pessoas em 2050 (FAO, 2018), e com ela a fome e a subnutrição se tornam uma realidade cada vez mais comum nas diversas comunidades. O ritmo do crescimento populacional é muito maior que o aumento da produção agrícola, o que torna cada vez mais inevitável busca por aumento da oferta de alimentos. A pouco mais de 200 anos, um economista inglês chamado Thomas Robert Malthus, previu em seus estudos que a demanda por alimento não acompanharia o crescimento populacional.

Esta previsão não faz parte da atual realidade, apesar da fome ser um problema social que acompanha a humanidade desde o início das primeiras grandes civilizações, sua causa está relacionada a má distribuição e não a falta de alimentos. Esse atraso, ao que parece um fato inevitável, aconteceu devido ao surgimento de novas tecnologias que permitiram a expansão da produção, como máquinas, que facilitaram principalmente para a mão de obra, e pesquisas, que descobriram e desenvolveram novas cultivares por meio do melhoramento genético.

O melhoramento genético é uma prática muito antiga, utilizada pelas civilizações do período neolítico. Sem instrumentos ou qualquer tecnologia, os procedimentos eram feitos manuais e de forma intuitiva. Diversas espécies vegetais que são utilizadas por grande parte da população mundial, como milho, soja, arroz e trigo, tinham um aspecto completamente destoantes do atual antes do homem manipulá-lo (SQUILASSI, 2003).

As primeiras atividades voltadas ao melhoramento genético eram feitas de forma inconsciente, com o tempo, passou a ser intuitiva, como a seleção de sementes das plantas que possuíam as características mais desejadas, como aroma, produtividade, sabor, cor, entre outras, até que essa prática passou a ser de forma consciente. Porém, apenas no século XIX a ideia de melhoramento genético foi concretizada, principalmente pelo trabalho de Gregor Mendel (1822 – 1884), (MACHADO, 2014) com grande contribuição à genética por meio dos seus estudos sobre herança, o que possibilitou o desenvolvimento do conhecimento na área de produção agrícola, além de outras da genética e melhoramento.

Porém o aumento da produção agrícola acarreta preocupações, sendo a principal delas o impacto ambiental. O aumento da produção agrícola requer mais

territórios destinados a plantações, também requer a utilização intensa de outros recursos naturais, como a água, o solo e seus nutrientes. Em contrapartida uma maior produção está relacionada a um crescimento populacional e por consequência ao crescimento das áreas urbanas, de cidades, casas e áreas destinadas as atividades industriais, deixando a área destinada a produção agrícola cada vez mais limitada. Assim, um dos grandes desafios dos melhoristas é aumentar a produtividade de alimentos sem aumentar a quantidade de áreas, ou seja, produção de forma sustentável.

A partir dos desafios apresentados, o melhoramento genético é uma ferramenta que tem o objetivo de expandir o aumento da produção, por meio do desenvolvimento das cultivares, aumentando sua produtividade sem a necessidade da expansão territorial. Com os avanços dos estudos em genética e as tecnologias trazidas pela revolução industrial, as técnicas de melhoramento genético se tornaram essenciais no desenvolvimento humano e, atualmente, são de extrema importância, não apenas na agropecuária, mas em todas as áreas como na saúde, na alimentação, no transporte e nas indústrias em geral.

O planejamento é uma etapa essencial no programa de melhoramento genético e deve ser iniciado antes de qualquer outra etapa, uma vez que é nela que o objetivo do programa será estabelecido. No planejamento, alguns pontos importantes devem ser levados em consideração, como a demanda e oferta, o produto e a sua finalidade. Visto que os programas de melhoramento estão fortemente atrelados a diversificação e a manutenção das matérias-primas utilizadas na produção. E são responsáveis pelo aprimoramento das cultivares oleaginosas, através de cruzamentos, seleções e experimentos.

Segundo Borém (2017), o melhoramento genético pode ser descrito nessas três etapas respectivamente, sendo, de forma resumida, seleção de genitores e posterior cruzamento com o objetivo de resgatar variedades das espécies nativas e cruzá-las na intenção de gerar novas populações; a seleção com objetivo de identificar as espécies que apresentam as características mais desejadas e maior variabilidade entre si, e condução de experimento com o objetivo de avaliar o desempenho e a adaptabilidade das cultivares selecionadas. O sucesso de um programa de melhoramento depende do conhecimento de variação genética contida na espécie (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

## 2.5. Diversidade genética

A diversidade genética é de extrema importância para o sucesso dos programas de melhoramento genético. O conhecimento da variabilidade genética, bem como a formação e acesso aos bancos de germoplasma são fundamentais para o sucesso de suas etapas (MANFIO et al., 2012). Os bancos de germoplasma são essenciais para os programas de melhoramento, visto que, eles representam a informação de todo patrimônio genético de uma espécie e os programas de melhoramento genético necessariamente utilizam essas informações para fazer combinações das características desejadas nas cultivares a fim de manter a diversidade entre as espécies aumentando assim a variabilidade das populações (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

Periodicamente são feitos estudos para análise da diversidade genética em cultivares, isso ocorre devido à preocupação em manter a variabilidade genética, principalmente as cultivares comerciais, uma vez que a redução da diversidade genética aumenta a suscetibilidade às pragas e às mudanças ambientais, o que, inevitavelmente, leva a perda do potencial de ganhos genéticos e prejuízos em plantações de larga escala, além de uma possível extinção de espécie (SMITH et al., 2015).

Por ter se mostrado uma cultivar promissora, a macaúba também está sendo alvo de diversos estudos voltados ao conhecimento de sua diversidade genética. Nesse sentido, Domiciano et al. (2015) estimaram parâmetros genéticos e a diversidade em progênies de macaúba com base em características morfológicas e fisiológicas, os autores avaliam quinze progênies de macaúba da região Centro-Oeste, e concluíram que não houve variabilidade genética para os caracteres fisiológicos, mas houve variabilidade para os caracteres morfológicos.

Reis et al. (2017) também avaliaram a diversidade genética da macaúba em características do fruto com objetivo de obter informações sobre a variabilidade genética das culturas de 35 municípios do Goiás, para uso comercial na região Centro-Oeste. Os resultados apresentaram a formação de cinco grupos, também observaram que grande parte da variabilidade existente na espécie estava contida nas amostras analisadas.

Outro estudo importante foi conduzido por De Sá et al. (2021) que estimaram diversidade genética via REML-BLUP de macaúba conservada *ex situ*. Os autores

reportam que a estruturação do germoplasma é fundamental para auxiliar na escolha dos parentais visando a seleção de indivíduos recombinantes com desempenho superior em gerações segregantes. Os resultados demonstraram a existência de variabilidade em caracteres morfoagronômicos de importância relacionada aos objetivos de melhoramento da macaúba (produtividade e rendimento de óleo) e que cruzamentos entre plantas superiores de acessos distantes podem ser promissores para a obtenção de recombinantes com desempenhos superiores.

Ao longo dos anos as pesquisas sobre diversidade genética se tornaram mais frequentes, principalmente depois dos avanços com a tecnologia, que facilitaram a análise da diversidade genética para além das características fisiológicas e morfológicas, estendendo-se para os aspectos moleculares, como fragmentos de DNA, a partir de marcadores moleculares (ZUCCHI; CAVALLARI; SIQUEIRA, 2011).

## **2.6. Marcadores moleculares**

As novas tecnologias permitiram que diversas técnicas de biologia molecular fossem desenvolvidas, em especial as técnicas utilizadas para identificação de variabilidade genética a nível de DNA. Essas técnicas alcançam um panorama completo do genoma do organismo, e a partir dele obtém inúmeros marcadores moleculares, os quais podem ser utilizados com diversos objetivos, entre eles estudos de diversidade genético

Os marcadores moleculares representam importante avanço no campo da genética molecular. Ao longo da história, diversos marcadores genéticos foram utilizados pela comunidade científica. Desde marcadores morfológicos, os primeiros a serem utilizados, até marcadores bioquímicos e enzimáticos, antes do advento dos marcadores moleculares. Os marcadores moleculares são definidos como uma sequência de DNA que identificam polimorfismo no genoma de certos indivíduos aparentados, e permitem que sejam feitas inferências sobre a diversidade genética da espécie e as interrelações dos organismos a nível molecular (SBG, 2017).

Em um estudo conduzido na China, Mao et al. (2017) buscaram analisar a eficácia de diferentes marcadores moleculares, para avaliar a diversidade genética e a estrutura populacional de *Senna obtusifolia*, uma espécie de planta herbácea que também pode ser encontrada no Nordeste brasileiro. No estudo os autores constataram que os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) apresentam

dados mais confiáveis quando combinados a outro tipo de marcador e forneceu informações úteis para o programa de pesquisa e melhoramento de germoplasma. Este estudo mostra a importância da existência de diversos marcadores moleculares que utilizam de diferentes métodos para identificação da diversidade genética.

A existência de diferentes alelos em um mesmo gene é denominada polimorfismo genético. A mudança de um único nucleotídeo quando dois alelos são comparados é chamada de polimorfismo de um único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNPs). Essa alteração, recentemente, passou a ser utilizada como um marcador molecular promissor para os pesquisadores, uma vez que os SNPs possuem grande frequência e distribuição no genoma, sendo recomendado principalmente para organismos aparentados. Além disso, os SNPs são um importante instrumento, quando utilizados como marcadores moleculares, para diversas áreas de estudo. Alguns exemplos de sua aplicabilidade são nos estudos evolutivos, filogenéticos e ecológicos, incluindo áreas da genética do DNA humano, tais como tratamento de doenças, análises forenses e determinação de paternidade (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Para a identificação dos SNPs é indispensável a utilização de ferramentas de bioinformática. Existem *softwares* que analisam milhares de sequências geradas em um curto período, o que seria humanamente impossível. Eles possuem diversas aplicações, dentre elas genotipagem de cultivares, mapeamento genético, seleção assistida por marcadores, entre outras (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Vários estudos têm sido conduzidos em espécies oleaginosas para a análise da diversidade genética, visto que tal conhecimento é essencial para as estratégias de melhoramento genético. Montes et al. (2014) avaliaram estrutura genética e a diversidade no germoplasma com marcadores SSR (*Simple Sequence Repeatse*) e SNP em 70 acessos de germoplasma de pinhão-manso espalhados pelo mundo. Concluíram que a diversidade genética na América Central e no México foi maior que nas outras regiões, e que a utilização de marcadores moleculares irá acelerar o desenvolvimento de cultivares melhoradas de pinhão- manso o que também foi apontado em outros estudos mais recentes.

Anggraeni et al. (2017) identificaram a diversidade genética do pinhão manso, na região da Indonésia. A análise entre 52 acessos indonésios de pinhão-manso foi realizada com base em características de rendimento e marcadores de SNPs. Os

autores concluíram a partir de suas análises dos marcadores moleculares que havia uma baixa variabilidade nas espécies locais, por isso era recomendado a introdução de novos germoplasmas na região, com o intuito de manter a diversidade genética das populações (ANGGRAENI et al., 2017).

Estudos com marcadores moleculares, para estimar a diversidade genética em progênies de macaúba, estão sendo realizados no Brasil. Laviola et al. (2019) realizaram um estudo com objetivo de estimar a diversidade genética em genótipos de macaúba por meio de marcadores SNPs. Os autores utilizaram acessos do banco ativo de germoplasma de macaúba (BAGMC) localizado na Embrapa Cerrados em Planaltina-DF e como resultados obtiveram a formação de 21 grupos distintos. Esses resultados são promissores, uma vez que a formação de vários grupos indica mais variabilidade entre os genótipos, que por sua vez reflete sucesso na escolha de genótipos para a formação de populações de melhoramento genético.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Material vegetal, extração de DNA e genotipagem

Os genótipos estudados pertencem ao BAGMC (Banco Ativo de Germoplasma de Macaúba), instalado na área experimental da Embrapa Cerrados, localizada em Planaltina-DF. O BAGMC é constituído de 1.200 plantas, arranjados em delineamento experimental de blocos casualizados, com quatro plantas por parcela. As plantas são oriundas de diversas regiões do território brasileiro abrangendo cinco estados, Minas Gerais, São Paulo, Pará, Goiás e Distrito Federal. Foram amostrados 300 genótipos de macaúba.

A extração de DNA foi realizada a partir de três folhas de cada planta de macaúba, totalizando 300 plantas. As amostras foram coletadas e colocadas em sacos de plásticos, devidamente identificados, acondicionadas em uma caixa de isopor contendo gelo, transportadas ao laboratório de Genética e Biotecnologia da Embrapa Agroenergia e armazenadas em freezer -20 °C.

A extração de DNA das folhas de macaúba foi realizada conforme o protocolo do manual do fabricante *NucleoSpin Plant II* (Macherey-Nagel), com modificações. A quantificação e qualidade das amostras foram realizadas com auxílio do Espectrofotômetro *NanoDrop* para avaliação da razão entre os comprimentos de onda A260/A280, que representa a quantidade de ácidos nucléicos pela quantidade de proteína na amostra. Foram consideradas adequadas amostras com A260/A280 entre 1,80 e 2,10, indicando haver baixa quantidade de proteínas e RNA nas amostras.

As amostras foram genotipadas utilizando a plataforma *Axiom myDesign Genotyping Arrays*. O sequenciamento foi realizado com base nos marcadores moleculares SNPs.

#### 3.2. Análise genético-estatística

A qualidade dos marcadores foi checada com os parâmetros: *missing* 5% e MAF 5%, resultando em 2.336 SNP. A análise de variância molecular (AMOVA), proposta por Excoffier et al. (1992), foi utilizada para analisar a diversidade genética entre os genótipos de macaúba de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + D_{ij},$$

em que:  $Y_{ij}$ : medida de dissimilaridade entre pares de  $j$  indivíduos em  $i$  subpopulação;  $\mu$ : constante geral;  $P_i$ : efeito da subpopulação  $i$ ;  $D_{ij}$ : efeito da dissimilaridade entre pares de  $j$  indivíduos em  $i$  subpopulação.

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foi obtido de acordo com a expressão:

$$PIC_L = 1 - \sum_{i=1}^k P_{li}^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2P_{li}^2 P_{lj}^2 \text{ em que}$$

$P_{li}^2$  e  $P_{lj}^2$  é a frequência do  $i$ -ésimo e  $j$ -ésimo alelo, respectivamente, no  $i$ -ésimo SNP. A diversidade genética de Nei (DG), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), observada ( $H_o$ ) e coeficiente de endogamia ( $F_{st}$ ) foram obtidos por:  $DG = 1 - p_j^2 - q_j^2$ ;  $H_e = 1 - \sum_{j=1}^a P_i^2$ ;  $H_o = \frac{nH_j}{N}$  e  $F_{st} = 1 - \frac{H_e}{H_o}$ ; em que:  $nH_j$  é o número de genótipos heterozigotos (do tipo  $A_1A_2$  ou  $A_2A_1$ ) no  $i$ -ésimo indivíduo. As análises estatísticas e moleculares foram realizadas com o auxílio do *software* R (R Core Team, 2020).

Posteriormente foi realizada a análise de divergência genética, empregando-se as técnicas multivariadas. Para análise de agrupamento foi utilizado o método da ligação média entre grupos (UPGMA) utilizando a distância euclidiana média como medida de dissimilaridade. Também, realizou-se análise de componentes principais com posterior dispersão gráfica dos genótipos. Para determinação do número ótimo de grupos foi utilizado o pacote *NbCluster*, implementado no *software* R (R Core Team, 2020).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variância entre populações foi de 37,46 e a variância dentro das populações foi de 233,38 (Tabela 1). Esses valores apontam que existe maior variabilidade intraespecífica, ou seja, que a distância genética entre os indivíduos de uma mesma família é maior do que a distância genética entre as famílias. A variabilidade genética aumenta quando indivíduos mais distantes geneticamente são cruzados entre si, o que evita o estreitamento das populações.

**Tabela 1.** Análise de variância molecular (AMOVA) e estimativa de variância entre e dentro das populações de macaúba.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	Variância	Porcentagem (%)
Entre populações	4	2126	37,46	13,83
Dentro de populações	281	233	233,38	86,17
Total	285	259	270,85	100
Índice de fixação ( $F_{st}$ )	0,10	-	-	-

GL: Grau de Liberdade

A diversidade genética (DG) encontrada para cada população foi semelhante, sendo a população 2 mais diversa e população 3 a menos diversa (Tabela 2). Esses valores são condizentes com a heterozigosidade encontrada em cada uma, visto que a heterozigosidade representa a probabilidade de dois alelos pertencentes ao mesmo *locus* serem diferentes entre si. Podendo concluir que quanto menor o número de heterozigosidade observada, menor será a diversidade genética.

**Tabela 2.** Parâmetros de diversidade genética entre as populações de macaúba.

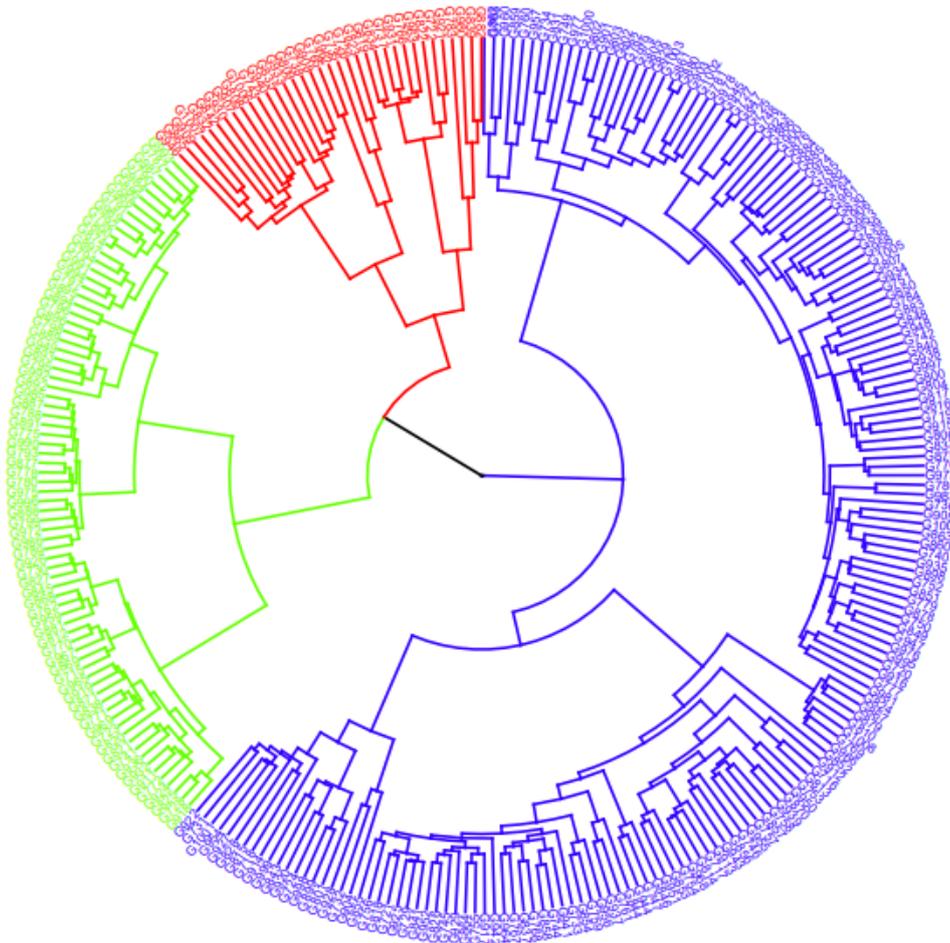
População	N	DG	PIC	MAF	Ho	He	Fi	nPA
pop1	108	0,18	0,15	0,12	0,12	0,18	0,29	10
pop2	57	0,19	0,16	0,13	0,16	0,19	0,14	44
pop3	78	0,16	0,14	0,11	0,15	0,16	0,09	49
pop4	17	0,17	0,14	0,12	0,16	0,17	0,04	1
pop5	6	0,18	0,14	0,13	0,16	0,18	0,10	32
Média	-	0,19	0,16	0,13	0,14	0,19	0,26	-

N: Número de indivíduos observados; DG: diversidade genética de Nei; PIC: conteúdo médio da informação polimórfica; MAF: menor frequência alélica; Ho: Heterozigosidade média observada; Fi: coeficiente de endogamia.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) é um indicador de qualidade do marcador utilizado. Neste trabalho, os marcadores utilizados foram considerados poucos informativos, uma vez que os valores de PIC encontrados foram abaixo de 0,25. Segundo Botstein et al. (1980) valores inferiores a este são pouco informativos. O coeficiente de endogamia ( $F_i$ ) está relacionado ao cruzamento de indivíduos aparentados. Apesar dos valores encontrados serem baixos, nenhum deles foi nulo ou negativo, o que indica que em todas as populações foram encontradas progênes

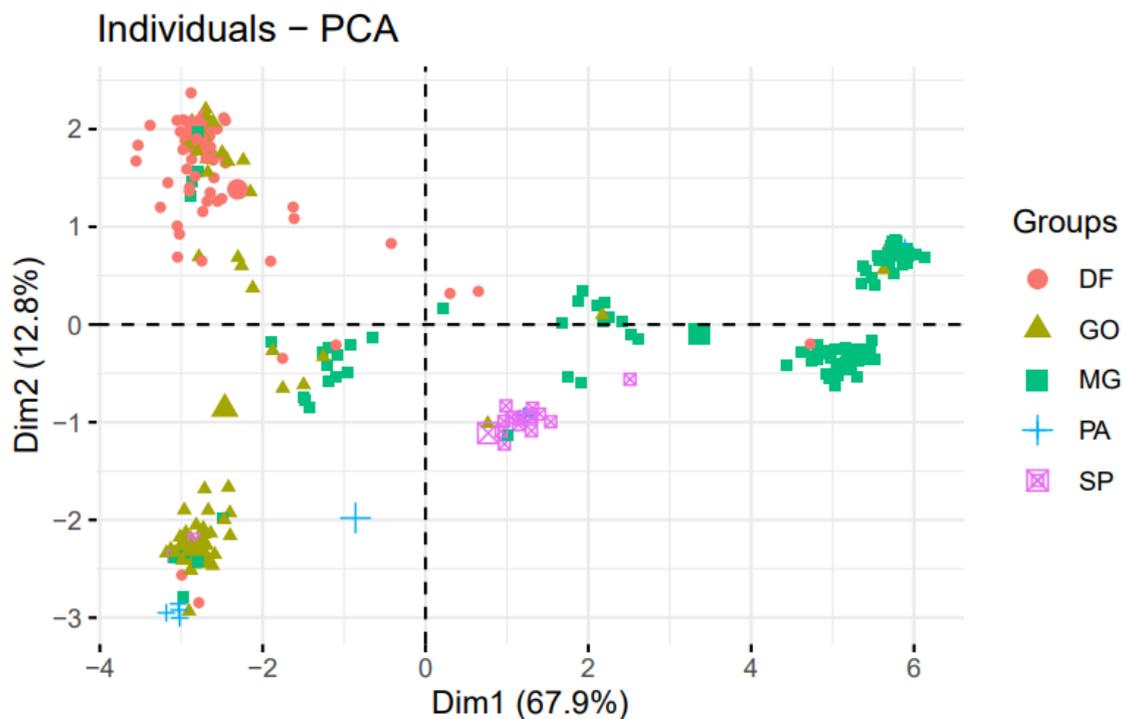
provenientes de cruzamentos endogâmicos. Isso pode ser explicado pelo fato de a macaúba ser uma planta alógama e por sua reprodução ser majoritariamente cruzada.

A formação de grupos foi obtida pela utilização da medida de dissimilaridade, e os genótipos foram separados em três grupos distintos. A maior parte dos 300 genótipos ficaram alocados em um mesmo grupo (cor azul) indicando que esses indivíduos são mais semelhantes entre si do que os indivíduos dos demais grupos. De Sá et al. (2021), caracterizaram a variabilidade genética em ecótipos de macaúba preservados no banco de germoplasma ativo da Embrapa Cerrados. Em seus resultados eles obtiveram um dendrograma que mostrou a separação dos indivíduos em sete grupos. Eles observaram que havia uma tendência em agrupar os genótipos de acordo com a origem geográfica, e esses grupos dividiam-se em subgrupos, indicando a existência de variabilidade.



**Figura 2.** Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os 300 genótipos de macaúba, obtido pelo método UPGMA, utilizando a distância Euclidiana média como medida de dissimilaridade.

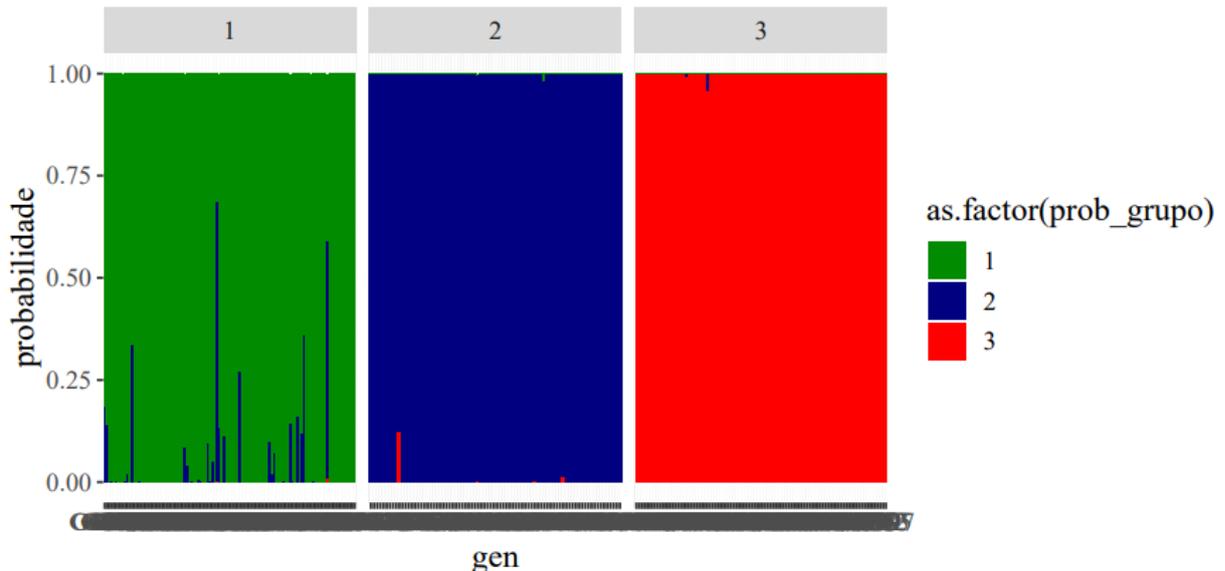
O gráfico de PCA (*Principal Component Analysis*) mostra a distribuição dos genótipos agrupados de acordo com as regiões de origem (Figura 3). É perceptível que todos os grupos se sobrepõem e alguns deles estão mais dispersos. Como é o caso dos grupos do Distrito Federal (DF), Goiás (GO) e Minas Gerais (MG), que estão presentes em todos os quadrantes. Já os grupos de São Paulo (SP) e Paraná (PR) apresentam pouca dispersão. Em um trabalho recente De Lima et al. (2020) encontraram resultados condizentes aos apresentados no gráfico de PCA deste trabalho. Ao avaliar populações de *Acrocomia aculeata* encontradas no Brasil perceberam um padrão geográfico de dispersão, que indica as populações do oeste, próximas as áreas do DF, GO e MG, com maior diversidade genética, uma vez que, essa dispersão indica uma maior variância entre os indivíduos do mesmo grupo.



**Figura 3.** Análise dos componentes principais com formação de cinco grupos de acordo com a origem das espécies.

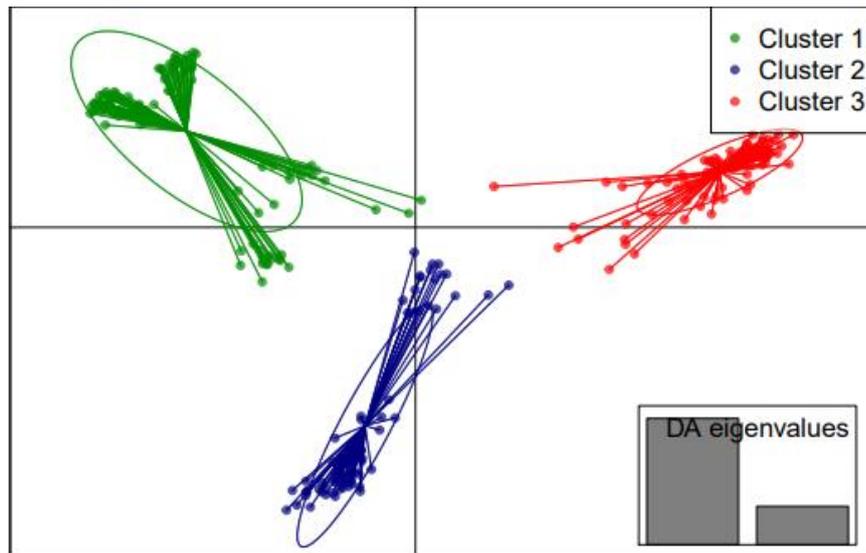
O fator de probabilidade representa a probabilidade que um indivíduo tem de pertencer a um determinado grupo. Cada linha na vertical observada na Figura 4 representa um genótipo e cada cor representa um grupo. Os genótipos que

apresentam a linha completa de apenas uma cor têm probabilidade de 100% de corresponder a apenas um determinado grupo, já os genótipos que apresentam mais de uma cor em sua linha têm probabilidades variadas de pertencer a grupos variados. Uma vez que a uniformidade das cores de um genótipo traz certeza e torna as informações mais claras acerca do direcionamento do genótipo ao grupo com indivíduos mais próximos geneticamente.



**Figura 4.** Probabilidade de alocação dos genótipos de macaúba com base na análise discriminante de componentes principais (ADCP) considerando K=3.

A Análise Discriminante de Componentes Principais foi utilizada de forma suplementar ao fator de probabilidade para identificar a formação de grupos tomando como referência a representação dos indivíduos dentro de cada grupo. Na Figura 5 estão apresentados os três grupos formados e atestados pelas análises anteriores, e o desempenho de cada indivíduo dentro do seu respectivo grupo. Os pontos mais ao centro dos círculos simbolizam os genótipos com maior probabilidade de pertencer ao grupo referido. Os pontos mais distantes dos círculos são aqueles que apresentam certas características que os aproximam dos outros grupos, por tanto são aqueles com maior probabilidade de pertencer a um ou mais grupos.



**Figura 5.** Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC).

## **5. CONCLUSÃO**

Há baixa diversidade genética entre as populações. As famílias foram subdivididas em três grupos, ficando a maior parte dos 300 genótipos alocados em um único grupo, o que indica maior variabilidade genética dentro das populações. Foi encontrada maior dispersão geográfica nas populações do Distrito Federal, Goiás e Minas Gerais e, por consequência, maior diversidade genética dos genótipos oriundos dessas regiões. Portanto, para futuras seleções dos programas de melhoramento genético, a fim de gerar progênieis potenciais com variabilidade genética, é aconselhável, realizar seleção de maior número de indivíduos dentro das famílias.

## 6. REFERÊNCIAS

- ANGGRAENI, T. D. A. et al. **Genetic diversity of *Jatropha curcas* collections from different islands in Indonesia**. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*, vol. 16, n.4, 2018, p. 334-342.
- ANP [Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustível]. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2020**. 2020. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/arquivos/central-conteudos/anuario-estatistico/2020/anuario-2020.pdf>. Acesso em: 28 de abril de 2021.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, H. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BORÉM, A., CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Editora Independente, São Paulo- SP, 2006.
- BORÉM, A., MIRANDA, G, V., FRITSCHÉ- NETO, R. **Melhoramento de Plantas – 7ª Edição**. Editora UFV, Minas Gerais, 2017.
- BRASIL, Ministério da Educação. Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica. **Biodiesel**. Brasília, DF, 2006.
- CARDOSO, A. et al. **Opportunities and challenges for sustainable production of *A. aculeata* through agroforestry systems**. *Industrial Crops and Products*, v. 107, n. January, p. 573–580, 2017.
- CARVALHO, K. J.; SOUZA, A. L.; MACHADO, C. C. **Ecologia, Manejo, Silvicultura e Tecnologia da Macaúba**. *Macaúba *Acrocomia aculeata*(Jacq.) Lood. ex. Mart., p. 35, 2011.*
- CETEC – Centro Tecnológico de Minas Gerais. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais: Estudo das oleaginosas nativas de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 1983.
- CICONINI, G. **Caracterização de frutos e óleo de polpa de macaúba dos biomas Cerrado e Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil**. Universidade Católica Dom Bosco programa de pós-graduação em Biotecnologia, 2012.
- COSTA, V. L. et al. **A introdução do Biodiesel na matriz energética brasileira : contextualização histórica, cadeia produtiva e processo produtivo**. *ADMpg Gestão Estratégica*, v. 5, n. 1, p. 43–51, 2012.

- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética** 1. ed. Suprema Gráfica Editora, Minas Gerais, 2011.
- DE LIMA, N.E.; MEEROW, A.W.; MANFRIN, M.H.; **Estrutura genética de dois *Acrocomia* ecotypes (Arecaceae) em savanas brasileiras e florestas sazonalmente secas.** *Tree Genetics & Genomes* **16**, 56 (2020). <https://doi.org/ez54.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11295-020-01446-y>
- DE SÁ, S. F.; DOS SANTOS, L. C. A.; DA CONCEIÇÃO, L. D. S. et al. Genetic diversity via REML-BLUP of ex situ conserved macauba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] ecotypes. **Genetic Resources and Crop Evolution** (2021). <https://doi.org/ez54.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10722-021-01180-x>
- DOMICIANO, G. P. et al. **Parâmetros genéticos e diversidade em progênies de Macaúba com base em características morfológicas e fisiológicas.** *Ciência Rural*, v. 45, n. 9, p. 1599–1605, 2015.
- LOBATO, Breno. **Macaúba é matéria-prima promissora para biodiesel.** Brasília, DF. 2012. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2329636/macauba-e-materia-prima-promissora-para-biodiesel>. Acesso em: 20 de nov de 2019.
- FAO, Food. **The future of food and agriculture - Alternative pathways to 2050.** 2018.
- LAVIOLA, B. G. et al. **Diversidade genética entre genótipos de macaúba com base em marcadores moleculares.** In: Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, n 7º., 2019, Florianópolis, Santa Catarina.
- LAVIOLA, B.G. et al. **Potencial do pinhão-manso e de palmeiras para a diversificação de matéria-prima na produção de biodiesel.** In: MENEZES, R. S. (Org.). *Biodiesel no Brasil: impulso tecnológico.* Lavras: UFLA, 2016. p. 119-140.
- LORENZI, G. M. A. C.; NEGRELLE, R. R. B. ***Acrocomia aculeata* (JACQ.) LODD. EX MART.: ASPECTOS ECOLÓGICOS.** *Visão Acadêmica*, v. 7, n. 1, 2006.

- MACHADO, A. **Construção histórica do melhoramento genético de plantas: do convencional ao participativo**. Revista Brasileira de Agroecologia, v. 9, n. 1, p. 35–50, 2014.
- MANFIO, C. E. et al. **Avaliação de progênies de macaúba na fase juvenil e estimativas de parâmetros genéticos e diversidade genética**. Pesquisa Florestal Brasileira, v. 32, n. 69, p. 63–68, 2012.
- MAO, R. et al. **Genetic diversity and population structure assessment of Chinese *Senna obtusifolia* L. by molecular markers and morphological traits of seed**. Acta Physiologiae Plantarum, vol. 40, n.1, 2018.
- MOURA, E. F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. Tese (Doutorado). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2007. 66 p.
- NETO, P. C., FRAGA, A. C., MENEZES, R. S., RAMOS, G. L. **9º Congresso Brasileiro de Plantas e Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel**. Volume 1. Anais – Artigos Científicos. Rio Grande do Norte, 2016.
- NOBRE, D. A. C. et al. **MACAÚBA: PALMEIRA DE EXTRAÇÃO SUSTENTÁVEL PARA BIOCOMBUSTÍVEL**. Colloquium Agrariae, v. 10, n. 2, p. 92–105, 2015.
- POUSA, G. P. A. G.; SANTOS, A. L. F.; SUAREZ, P. A. Z. **History and policy of biodiesel in Brazil**. Energy Policy, v. 35, n. 11, p. 5393–5398, 2007.
- RAMOS, L. P. et al. **Biodiesel: Matérias - Primas, Tecnologia de Produção e Propriedades Combustíveis**. Revista Virtual de Química, v. 9, n. 1, p. 317–369, 2017.
- REIS, E.F. et al. **Genetic diversity of macaúba fruits from 35 municipalities of the state of Goiás, Brazil**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 52, n. 4, Brasília, abril, 2017.
- RESENDE, M. D. V. SELEGEN-REML/BLUP: **Sistema estatístico de seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 359p.
- ROSCOE, R.; RICHETTI, A.; MARANHO, E. **Análise de viabilidade técnica de oleaginosas para produção de biodiesel em Mato Grosso do Sul**. Revista Política Agrícola, 16, 48-59, 2007.

SMITH, S.; BUBECK, D.; NELSON, B.; STANEK, J.; GERKE, J. **Genetic diversity and modern plant breeding**. In: Genetic diversity and erosion in plants: Springer, 2015. p. 55-88.

SQUILASSI, M.G. **Melhoramento de plantas e a produção de alimentos**. 18 p, 2003. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 56). Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br>

TOLEDO, D. W. F. **Estudo da viabilidade da produção de biodiesel a partir do óleo de macaúba por processo artesanal**. Faculdade de filosofia, ciências e letras do alto São Francisco - FASF, v. 151, p. 10–17, 2015.

TURCHETTO-ZOLET, Andreia Carina et al. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017.E-book. Disponível em: [https://www.sbg.org.br/sites/default/files/e\\_book\\_marcadores\\_moleculares\\_sbg\\_2017\\_final.pdf](https://www.sbg.org.br/sites/default/files/e_book_marcadores_moleculares_sbg_2017_final.pdf).

VIEIRA, F. C. **Diversidade genética em progênies de macaúba**. 2016-2017. 94 f. Tese (programa de pós-graduação em biocombustíveis), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2017.

ZUCCHI, M. I.; CAVALLARI, M. M.; SIQUEIRA, M. V. B. M. **A importância do conhecimento sobre a diversidade e estrutura genética de populações e sua utilidade para a conservação e manejo de espécies vegetais**. Pesquisa & Tecnologia, vol. 8, n.2 Jul-Dez 2011.