

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da Agricultura e Pecuária*

NOGUEIRA-PECÃ
Cultivo, benefícios e perspectivas

*Carlos Roberto Martins
Marília Lazarotto
Marcelo Barbosa Malgarim*

Editores Técnicos

Embrapa
Brasília, DF
2024

Capítulo 1

Biotecnologia

Caroline Marques Castro
Natércia Roberto Pinheiro da

Introdução

O termo biotecnologia, segundo a Convenção da Diversidade Biológica, é definido como qualquer aplicação tecnológica que usa sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados, para desenvolver ou modificar produtos ou processos para uso específico (CBD, 2020). A aplicação da biotecnologia causou, e vem causando, grandes mudanças em muitas áreas, seja na saúde, com a fabricação de medicamentos, assim como em diversos setores da indústria e na agricultura, com ênfase no desenvolvimento de cultivares que supram a necessidade de aumentar a oferta de alimentos e as demandas da sociedade.

No melhoramento genético de plantas, os ganhos obtidos no último século são, em grande parte, fruto dos avanços da biotecnologia. A área evoluiu constantemente. As técnicas biotecnológicas empregadas vão desde a indução de mutações, utilizada inicialmente na década de 1930, visando aumentar a variabilidade genética disponível, passando pela identificação de genes de interesse, transgenia, seleção genômica e, recentemente, na segunda década do século XXI, pela edição genética.

Uma mudança de paradigma no melhoramento genético de plantas após o desenvolvimento de técnicas modernas de biotecnologia. Em vários cultivos essa mudança ocorreu de forma bem mais rápida do que na nozeira-pecã (*Carica illinoensis*). Espécie diploide, com 16 cromossomos ($2n = 2x = 32$), apresenta algumas características, como plantas de grande porte e de vida longa, período juvenil de 3 a 4 anos, alto grau de heteroziosidade, que é mantido pela dicotomia, as quais, em conjunto, limitaram, por muitos anos, estudos genéticos nessa cultura (Medana et al., 2011).

Recentemente, os avanços nos métodos de sequenciamento do genoma, com plataformas automatizadas e robotizadas, assim como na área da bioinformática, permitiram que espécies para as quais, até pouco tempo, havia pouca informação sobre o seu genoma, passassem a ter acesso a essa informação, como, no caso, a nozeira-pecã. Os relatos sobre o genoma dessa espécie são recentes (Fenins et al., 2018; Guan et al., 2018; et al., 2018; Can et al., 2018).

Neste capítulo, aborda-se o uso de ferramentas moleculares e estudos com a nozeira-pecã, sendo discutido o seu emprego e análises da diversidade genética, e o emprego genético e o estado da arte do que está disponível de informações com relação ao genoma e genes dessa espécie.

Diversidade genética

Marcadores moleculares vêm sendo utilizados com frequência em estudos de caracterização molecular e diversidade genética e nozeira-pecã. O uso dessa tecnologia tem colaborado no direcionamento, de forma mais eficiente, das ações de pesquisa que visam a conservação do germoplasma de pecã, assim como o seu uso por programas de melhoramento genético (Grau et al., 2011).

Vários trabalhos foram realizados visando conhecer a magnitude da variabilidade genética de nozeira-pecã disponível para uso diferentes marcadores genéticos foram empregados nestes estudos. Inicialmente foram analisados sistemas isoenzimáticos, como no estudo desenvolvido por Rafter et al. (1994), e que foi avaliado se a diversidade genética nas coleções e situ de pecã representa a diversidade encontrada em populações naturais dessa espécie. Três tipos de populações foram analisadas, uma a cada um conjunto de plantas, representando cultivares, a segunda com progenies de cinco plantas-mães, coletas em diferentes locais, totalizando indivíduos, e uma terceira população, composta por amostras de coletas de oito populações selvagens, de cinco estados americanos, com cerca de 100 amostras de cada população. Vários sistemas isoenzimáticos foram analisados e, dos loci avaliados, 13 foram polimórficos para pelo menos uma das três populações, e a heterozigosidade esperada foi de 0,167. A maior diversidade genética foi encontrada na população selvagem ($H_e=0,167$), e a menor nas progênies ($H_e=0,144$). O número de alelos encontrados nessas duas populações foi similar, entretanto, vários alelos, encontrados em baixa frequência nas populações selvagem e de progênies, não foram identificados na população composta pela coleção de cultivares, evidenciando o estreitamento da base genética nas cultivares.

Posteriormente, com a descoberta da tecnologia da reação da polimerase e cadeia (*DNA Polymerase Chain Reaction*; PCR), no final da década de 1980, um grande número de classes de marcadores foi desenvolvido e passou a ser usado em pecã, entre esses *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) e *Microsatélites* ou *Simple Sequence Repeat* (SSR).

Marcadores RAPD foram usados para identificar 43 cultivares americanas de nozeira-pecã e a similaridade genética entre elas. No total foram analisados 100 marcadores RAPD. Cada cultivar apresentou um perfil único molecular (*fingerprint*) e embora a origem de muitas das cultivares avaliadas seja desconhecida, algumas datam do ano de 1875, as estimativas de similaridade genética obtidas mostraram considerável concordância com os pedigrees das quais acessos cujo histórico é conhecido (Conner e Wood, 1994).

Marcadores AFLP foram usados para verificar a fidelidade genética de plantas de nozeira-pecã regeneradas a partir de cultivo *in vitro* através da embriogênese somática. A análise detectou algumas diferenças, sendo que algumas árvores apresentaram maior diversidade, quando comparadas com outras, da mesma linha. Entretanto, essa variação não foi relacionada com diferenças fenotípicas detectáveis (Wendra e et al., 2000).

No Brasil, marcadores AFLP foram usados para estimar a diversidade genética de 100 acessos de nozeira-pecã coletados em pomares do Sul do país. Com base em 154 fragmentos AFLP, foi identificada de médio a alto nível de diversidade no *Coreopsis* a ser avaliado, com heterozigosidade esperada estimada em 0,167, e o índice de diversidade de Shannon, em 1,33 (Poletto et al., 2000).

Na China, a diversidade genética de 100 genótipos de nozeira-pecã cultivados no país, incluindo cultivares introduzidas, um acesso de *Carica catenensis* e um de *glans nigra*, foi estimada com base em marcadores ISSR e Microsatélites (SSR). Os pares de primers ISSR utilizados nesse estudo produziram no total de 94 fragmentos polimórficos, enquanto os oito SSR amplificaram no total 70 bandas polimórficas. Os resultados oriundos de ambos os tipos de marcadores foram similares. Os genótipos foram divididos em quatro grupos, de acordo com a sua origem. Alta diversidade genética foi identificada, com heterozigosidade média esperada estimada em 0,167, e o índice de diversidade de Shannon, em 1,33. Nesse estudo foi identificada uma maior diversidade genética nas cultivares chinesas, quando comparada com as cultivares americanas avaliadas (Lia et al., 2000).

Em um outro estudo, marcadores microsatélites plastidiais (cpSSR) e nucleares (nrSSR) foram usados para acessar a variabilidade genética em populações nativas de nozeira-pecã oriundas dos Estados Unidos e do México. No total, 100 genótipos de nozeira-pecã, representando 100 populações nativas, foram avaliados. Os resultados obtidos foram semelhantes, tanto com base nos três microsatélites plastidiais, como nos 100

microssatélites nucleares. As análises genéticas populacionais, para todos os agrupamentos identificados, mostraram que os resultados com base na variação cpSSR apresentaram maior estrutura geográfica do que os com base no mtDNA, sugerindo, dessa forma, que os mtDNAs de plastídios são importantes ferramentas para identificar a estrutura de população em noqueira-pecã (Grauke et al., 2011).

Estudos de transferibilidade para a noqueira-pecã, *Carica illinoensis*, de marcadores microssatélites mtDNA desenvolvidos para *Coccoloba ensis*, a partir de sequências de c-DNA associadas ao desenvolvimento de fruto e também de sequências associadas ao desenvolvimento de botões florais femininos, mostraram uma taxa de transferibilidade de 63,02%, disponibilizando um grande número de marcadores SSR com potencial para serem utilizados na noqueira-pecã. Além disso, com base nos resultados obtidos, é indicativo de que os tipos de mecanismos responsáveis pela apoptose em *Coccoloba ensis* e em noqueira-pecã são distintos e atuam de forma independente.

A busca por novos marcadores SSR é contínua, por serem codominantes, com alto conteúdo informativo, alta variabilidade alélica e excelente reproducibilidade, o que os coloca em vantagem, quando comparados a outros importantes tipos de marcadores baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) como o RAPD, AFLP e LDR. Um trabalho recente, desenvolvido por Zanetti et al. (2011), encontrou novos marcadores SSR foram validados em noqueira-pecã. A análise de acessos, com base em 10 marcadores SSR, sendo os 10 novos, quanto a oito marcadores SSR já publicados, mostrou uma heterozigosidade média esperada de 0,552, no germoplasma avaliado, e um conteúdo de informação de polimorfismo (*Polymorphic Information Content* - PIC) com média de 0,333 por loci SSR.

Recentemente, através da técnica de genotipagem por sequenciamento de *enotipagem por sequenciamento de DNA* (*enotyping by sequencing* - EBS) ou painel de diversidade, com o uso de 1000 acessos da coleção americana de noqueira-pecã (*Carica national Collection of Genetic Resources for Decans and Cucurbitaceae* - NCGR) foi utilizado para a descoberta de marcadores *single nucleotide polymorphisms* (SNP) no genoma de noqueira-pecã. Cerca de 1000 SNPs foram identificados e, desses, 17 SNPs foram associados com a expressão do caráter tipo de floração (Bentley et al., 2011).

Mapeamento genético

Os únicos mapas de ligação genética de noqueira-pecã foram desenvolvidos com base em marcadores RAPD e AFLP e um estudo realizado por Reedana-Cari et al. (2008) foram construídos mapas independentes para as cultivares *Paonee* e *Elliot*. Um total de 1000 marcadores moleculares (RAPD e AFLP) quanto a dois marcadores morfológicos, tipo de dicotomia e cor do estigma, foram usados nas análises. O mapa de ligação *Paonee* cobriu 1000 cM do genoma com 1000 marcadores dispersos e 10 grupos de ligação maiores e 13 menores, e com distância média de 12,7 cM entre os marcadores adjacentes. Já o mapa de ligação *Elliot* cobriu 1000 cM do genoma, sendo 1000 marcadores dispersos e 10 grupos de ligação principais e 9 menores, com uma distância média de 11,2 cM entre os marcadores adjacentes. A segregação para as características tipo de dicotomia e cor do estigma sugere que ambos os caracteres são controlados por locus únicos, fortemente ligados (1,9 cM) e localizados no grupo de ligação 16 do mapa 'Elliot'. A protoginia, assim como os estigmas de coloração verde, são dominantes em relação à protandria e estigmas vermelhos.

Genoma de *Carica illinoensis*

O primeiro estudo de sequenciamento do genoma de noqueira-pecã foi realizado por Zeng et al. (2011) com sequências de leitura curta para seradas e montadas na plataforma de ilumi-na para dois genótipos, a cultivar comumente plantada *Paonee* e um acesso derivado do México, denominado *Mexico-1*.

Recentemente, foi publicada a sequência completa do genoma de dois genótipos de *Carica*, a cultivar 'Paonee' e *Carica illinoensis* e da nogueira-chinesa, acesso NC_019111. As bibliotecas genômicas foram sequenciadas na plataforma HiSeq 2500 e foram obtidas, respectivamente, mais de 100,00 e 100,00 bases de sequências. O tamanho total do genoma da nogueira-pec foi estimado em 100,00, e em 706,43 Mb, para a nogueira-chinesa. Em ambas as espécies foram identificados cerca de 31 mil genes codificadores de proteínas (Huang et al., 2019).

Genes candidatos

Com base em pesquisas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), principal base de dados genômicos, ainda são poucos numerosos os registros para a cultura da nogueira-pec. Contudo, é possível encontrar o genoma de *Carica illinoensis*, assim como outros registros de genes, proteínas e nucleotídeos e suas respectivas sequências (Tabela 1).

Tabela 1. Número de registros para *Carica illinoensis* nas principais categorias da base de dados da NCBI

Categoria	Número de entradas
Genomas	1
Nucleotídeos	1000
Genes	1000
Proteínas	10000

Fonte: adaptado de NCBI (2019)

Atualmente, existem poucos estudos relacionando genes a rotas metabólicas e nogueira-pec. Porém, com a recente disponibilização do genoma, a tendência é de que o número de publicações desse tipo aumente, contribuindo para definir as funções de mais genes envolvidos nos diversos metabolismos, principalmente daqueles relacionados às características de interesse para a cultura.

Já são descritas as funções de genes envolvidos e rotas metabólicas da biossíntese lipídica, síntese de flavonoides, floração e no processo de enxertia, dentre outras (Tabela 2).

Tabela 2. Genes descritos em nogueira-pec, funções, principais técnicas moleculares utilizadas e referência bibliográfica.

Genes	Funções	Principais técnicas moleculares	Referência bibliográfica
Cari, Cari, treonina fosfatase, aciltransferase, desaturase, outros	Síntese de ácidos graxos e de proteínas alergênicas, processos biológicos, componentes celulares, funções moleculares	RNA-seq e RT-PCR	Mattison et al. (2019)
Cañilias D e F	Biossíntese lipídica	Transcriptoma	Quan et al. (2019)
FL, C, CF, F3'H, F3'5'H, DFR, LOR, R	Biossíntese de flavonóides	RNA-seq	Chan et al. (2019)
L, LOR, LFR, DLR	Floração	RNA-seq	Chan et al. (2019)
Cañilia R-R-M	Processo de enxertia (formação de união no enxerto)	Transcriptoma e RT-PCR	Qu et al. (2019)

ENRAME, MOCERT, GPAR, ETTEIN, field performance and molecular evaluations of pecan trees regenerated from somatic embryonic cultures **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 133, p. 1000-1005, 2012

ANG, M, CEN, H, U, CAO, GENG, G Morphological characterization and transcriptome analysis of pistillate flowering in pecan (*Carica illinoensis* **Scientia Horticulturae**, v. 133, p. 1000-1005, 2012 <https://doi.org/10.1016/j.scientia.2012.05.001>

ANG, CAO, REN, CANG, U, CAO, ANG, C Characterization and development of phenolic PRs in pecan (*Carica illinoensis* **Forests**, v. 10, p. 1-10, 2019

ANG, CAO, REN, CANG, ANG, RNA-se Reveals flavonoid Biosynthesis-Related Genes in Pecan (*Carica illinoensis* **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 1, p. 100-105, 2018 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03000>

ZHU, K.; FAN, P.; MO, Z.; TAN, P.; FENG, G.; LI, F.; PENG, F. Identification, expression and co-expression analysis of R2R3-MYB family genes involved in graft union formation in pecan (*Carica illinoensis* **Forests**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2019 <https://doi.org/10.3390/10010101>

Bibliografía recomendada

GRAUKE, L. J.; PRICE, H. J.; JOHNSTON, J. S. Genome size of pecan as determined by flow cytometry. **Horticulture**, v. 133, p. 1000-1005, 2012

ENRAME, M, ETTEIN, *Carica illinoensis* pecan In IT, REEd **Biotechnology of Fruit and Nuts Crops**. Cambridge CA: Publiscin, 2012 p. 1000-1005