

*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

Embrapa Clima Temperado

R-000, 00 00, Caixa Postal 000
00000-000 Pelotas, RS
fone 00000000-0000
0000000000000000
0000000000000000

Unidade responsável pelo conteúdo e edição

Embrapa Clima Temperado

Coletivo local de Publicações

Presidente

Luís Antônio Costa de Castro

Vice-presidente

Barbara Bettarini Cattaneo

Secretaria-executiva

Barbara Céleste Cosenza

Meadores

Liza Briegas, Fernando Jackson, Marilaine

Caban Belo, Sonia Desimoni

Revisão de texto

Barbara Céleste Cosenza

Normalização bibliográfica

Marilaine Caban Belo

Editoração eletrônica

Satélia Santos Ficatelli

Foto de capa

Caio Lanzetta

1ª edição

Impressão e encadernação

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais e/ou de propriedade intelectual.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Clima Temperado

Nº000 Noqueira-peco/cultivo, benefícios e perspectivas /Carlos Roberto Martins, Marília Cabarotto, Marcelo Barbosa Malarió, editores técnicos /Brasília, 2000 Embrapa, 2000. 000 p. color., 00000, 00000 c0

I00N 000-00-0000-000-0

00Nopeco/Carta illinoiensis/Roberto Martins, Carlos Cabarotto, Marília Malarió, Marcelo Barbosa 1000érie

C00 00000

Capítulo 1

Biotecnologia

Caroline Marques Castro
Natércia Sobato Pinheiro et al.

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 é constante evolução. As técnicas biotecnológicas estão sendo usadas desde a introdução de culturas, utilizada inicialmente na década de 1900, 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 quebra de paradigma no campo de desenvolvimento genético de plantas apesar do desenvolvimento de técnicas modernas de biotecnologia. Vários cultivos dessa cultura ocorreu de forma bem mais rápida do que na noz-pecaria (*Carica illinoensis*). Espécie diploide, com 16 cromossomos ($2n = 2x = 32$), apresenta algumas características, como plantas de grande porte e de vida longa, período floral de 2 a 3 anos, alto rau de heterosíntese, que é combatido pela dicotilédona, as quais, então, conseguem, por muitos anos, estudos genéticos nessa cultura (Medina et al., 2010).

Recentemente, os avanços nos métodos de sequenciamento do genoma, como plataformas automatizadas e robóticas, assim como na área da bioinformática, permitiram que espécies para as quais, até pouco tempo, havia pouca informação sobre o seu genoma, passasse a ter acesso a essa informação, como, no caso, a noz-pecaria. Os relatos sobre o genoma dessa espécie são recentes (Liu et al., 2015; Yuan et al., 2016; Gentle et al., 2017; Khan et al., 2017).

Neste capítulo, aborda-se o uso de ferramentas moleculares e estudos concernentes ao noz-pecaria, sendo discutido o seu uso e aplicações da diversidade genética, e o aporte genético e o estado da arte do que é disponível de informações relacionadas ao genoma e genes dessa espécie.

Diversidade genética

Marcadores moleculares vêm sendo utilizados com frequência em estudos de caracterização molecular e diversidade genética e noz-pecaria. O uso dessa tecnologia 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 programações de melhoramento genético (Grau et al., 2010).

Outros trabalhos foram realizados visando conhecer a magnitude da variabilidade genética de noz-pecão disponível para uso em diferentes marcadores genéticos fora e previdos nestes estudos. Inicialmente foram analisados sistemas isoenzimáticos, como no estudo desenvolvido por Ritter et al. (1999), que foi avaliado se a diversidade genética nas coleções ex-situ de pecão representa a diversidade encontrada em populações naturais dessa espécie. Três tipos de populações foram analisadas, uma com um conjunto de 100 plantas, representando cultivares; uma secundária com progenies de cinco plantas cada, coletadas em diferentes locais, totalizando 250 indivíduos, e uma terceira população, composta por amostras de coletas de oito populações selvagens, de cinco estados americanos, com cerca de 10 amostras de cada população. Diversos sistemas isoenzimáticos foram analisados e, dos 20 loci avaliados, 13 foram polimórficos para pelo menos uma das três populações, e a heterodiosidase esperada (H_e) foi de 0,160. A maior diversidade genética foi encontrada na população selvagem ($H_e=0,167$), e a menor nas progenies ($H_e=0,144$). O número de alelos encontrados nessas duas populações foi similar, entretanto, vários alelos, encontrados em baixa frequência nas populações selvagens e de progenies, 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 em cadeia (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 pecão, entre esses o Random Amplified Polymorphic DNA (RAP) ou Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Interimole difference Repeat (IPIR) e crosssatélites ou simple sequence Repeats (SSR).

Marcadores RAPD foram usados para identificar 43 cultivares americanas de noz-pecão e a similaridade genética entre elas. No total foram analisados 100 marcadores RAPD. Cada cultivar apresentou um perfil único molecular (fingerprint). 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 pedreiros daqueles acessos cujo histórico é conhecido (Conner et al., 1999).

Marcadores AFLP foram usados para verificar a fidelidade genética de plantas de noz-pecão 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 linhagem. Entretanto, essa variação não foi relacionada com diferenças fenotípicas detectáveis (Endra et al., 2000).

No Brasil, marcadores AFLP foram usados para estimar a diversidade genética de 100 acessos de noz-pecão coletados em pomares do Sul do país. Com base em 154 fragmentos AFLP, foi identificada de médio a alto nível de diversidade no leopoldino avaliado, com heterodiosidase esperada estimada em 0,16, e o índice de diversidade de Shannon, em 0,10 (Poletto et al., 2000).

Na China, a diversidade genética de 100 tipos de noz-pecão cultivados no país, incluindo 20 cultivares introduzidas, um acesso de *Carica catapaensis* e um de *C. glans nigra*, foi estimada com base em marcadores IPIR e crosssatélites (IPIR). Os 100 pares de primers IPIR 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 100 tipos foram divididos em quatro grupos, de acordo com a sua origem. Alta diversidade genética foi identificada, com heterodiosidase média esperada estimada em 0,16, e o índice de diversidade de Shannon, em 0,10. Nesse estudo foi identificada uma maior diversidade genética nas cultivares chinesas, quando comparada com as cultivares americanas avaliadas (Xia et al., 2000).

Em outro estudo, marcadores crosssatélites plastidiais (cpIPIR) e nucleares (nIPIR) foram usados para acessar a variabilidade genética em populações nativas de noz-pecão oriundas dos Estados Unidos e do México. No total, 100 tipos de noz-pecão, representando 100 populações nativas, foram avaliados. Os resultados obtidos foram semelhantes, tanto com base nos três crosssatélites plastidiais, como nos

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 base no n SSR, sugerindo, dessa forma, que os cpSSRs de plastídios são importantes ferramentas para identificar a estrutura de população em nogueira-pecã (Grauke et al., 2011).

Estudos de transferibilidade para a nogueira-pecã, *Carica illinoiensis*, de marcadores microsatélites (SSR) desenvolvidos para *C. carica*, a partir de sequências de cDNA 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 nogueira-pecã. Além disso, com base nos resultados obtidos, é indicativo de que os tipos de mecanismos responsáveis pela apomorfia em *C. carica* e em nogueira-pecã são distintos (além disso).

A busca por novos marcadores SSR é contínua, por serem codominantes, com alto conteúdo informativo, alta variação 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 com o RAP, ACP e IORER u trabalhado recente, desenvolvido por Chan et al. (2006), novos marcadores SSR foram validados em nogueira-pecã. A análise de 100 acessos, com base em 100 marcadores SSR, sendo os 10 novos, resultou em oito marcadores SSR publicados, mostrando uma heterodisididade média esperada de 0,552, no germoplasma avaliado, e um conteúdo de informação de polimorfismo (Polymorphic Information Content - PIC) com média de 0,40 por loci SSR.

Recentemente, através da técnica de fenotipação por sequenciamento (*next-generation sequencing* - NGSeq), um painel de diversidade, composto por 1000 acessos da coleção americana de nogueira-pecã (*Carica National Collection of Genetic Resources for Fruits and Vegetables* - NCGR), foi utilizado para a descoberta de marcadores singulares (single nucleotide polymorphisms - SNP) no genoma de nogueira-pecã. Cerca de 100 mil SNP foram identificados e, desses, 17 SNP foram associados com a expressão do caráter tipo de floração (Bentley et al., 2010).

Mapeamento genético

Os únicos mapas de ligação genética de nogueira-pecã foram desenvolvidos com base em marcadores RAPD e ACP e um estudo realizado por Reedanari et al. (2006) construídos separadamente para as cultivares Paúnee e Elliot. Total de 100 marcadores moleculares (RAP e ACP) resultante com dois marcadores orfológicos, tipo de dicotelia e cor do estigma, foram usados nas análises. O mapa de ligação Paúnee cobriu 100 cM do genoma com 100 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 100 cM do genoma, sendo 100 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 dicotelia e cor do estigma sugeriu 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 illinoiensis*

O primeiro estudo de sequenciamento do genoma de nogueira-pecã foi realizado por Jenkins et al. (2010) e evidências de leitura curta foram geradas e contadas na plataforma HiSeq 2000 para dois lenitivos, a cultivar comumente plantada Paúnee e um acesso derivado do México, denominado MEX-1000.

Recentemente, foi publicada a sequência completa do genoma de dois genótipos de *Carica*, a cultivar 'Papaya-C. illinoensis' e da noz-rica-chinesa, acesso AHU-C. catulensis. As bibliotecas genómicas foram sequenciadas na plataforma 454-sequencing e obtidas, respectivamente, 224,000 e 220,000 bases de sequências. O tamanho total do genoma da noz-rica-chinesa foi estimado em 706,43 Mb, para a noz-rica-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 genómicos, ainda são pouco numerosos os registros para a cultura da noz-rica-chinesa. 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	220
Genes	224
Proteínas	220,000

Fonte: Adaptado de NCBI (2020).

Atualmente, existem poucos estudos relacionando genes a rotas estabelecidas em noz-rica-chinesa. 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.

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

Tabela 2. Genes descritos em noz-rica-chinesa, funções, principais técnicas moleculares utilizadas e referência bibliográfica.

Genes	Funções	Principais técnicas moleculares	Referência bibliográfica
<i>Cari</i> , <i>Cari</i> , treonina fosfatase, aciltransferase, desaturase, outros	Biossíntese de ácidos graxos e de proteínas alterativas, processos biológicos, componentes celulares, funções moleculares	RNA-seque e RT-PCR	Mattison et al. (2000)
<i>Cafl</i> 1, <i>Cafl</i> 2 e <i>FOD</i>	Biossíntese lipídica	Transcrição	Quan et al. (2000)
<i>FL</i> , <i>CL</i> , <i>CP</i> , <i>F3'</i> , <i>F3'5'H</i> , <i>DFR</i> , <i>FL</i> , <i>LOR</i> , <i>OR</i>	Biossíntese de flavonóides	RNA-seque	Quan et al. (2000)
<i>LOR</i> , <i>OR</i> , <i>LF</i> , <i>DLL</i>	Floração	RNA-seque	Quan et al. (2000)
<i>Cafl</i> 1, <i>ROR-M</i>	Processo de enxertia forçado de união no enxerto	Transcrição e RT-PCR	Qu et al. (2000)

Considerações finais

Nas últimas décadas, grandes avanços foram obtidos nas pesquisas na área da biotecnologia. De forma dinâmica, a constante evolução nos procedimentos de análises genômicas, assim como a redução no custo de geração de dados de sequência de DNA, aproximadamente cada vez mais o uso prece de dessas novas ferramentas genéticas para acelerar o desenvolvimento de novas cultivares. Os processos de seleção tradicionais, e o funil dos longos períodos de juventude da noz-de-pecão, levam, em média, cerca de 15 anos da realização do cruzamento inicial até a liberação de uma nova cultivar.

Com o aumento no conhecimento em torno do genoma da nogueira-pecã, com a identificação de genes e suas funções, surge também a perspectiva de estudos de edição gênica, ferramenta bastante eficiente, tanto na elucidação de funções nínicas, quanto para a criação de novas cultivares.

Todo o crescimento que se obteve nos últimos anos na oferta de informações acerca do genoma da nogueira-pecífica coque se tem a uma perspectiva, no futuro próximo, de que o uso prévio dessas ferramentas biotecnológicas venha a disponibilizar para a sociedade cultivares que atendam seus anseios e necessidades de forma mais rápida e eficiente.

Referencias

- BEEDANAGARI, S. R.; DOVE, S. K.; WOOD, B. W.; CONNER, P. J. A first linkage map of pecan cultivars based on RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 90, p. 100-105, 1995.

ENTREZ, N.; GRAUDE, M.; EIN, P.; GENOT, E.; PIN, B.; SEGUIN, G.; GAND, G.; AND NP. Marker analysis of diverse accessions of pecan (*Carica illinoiensis*). *Tree Genetics and Genomes*, v. 1, p. 1-10, 2005.

CONNER, P.; WOOD, B. Identification of pecan cultivars and their genetic relatedness as determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 121, p. 300-303, 1996.

CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY. Disponível em: <https://cbd.int/convention/articles/a/cbd.html>. Acesso em: 20 de setembro de 2023.

GRAUDE, M.; EIN, R.; GRUZA, M.; CAJAL, EIN, P.; THE forest and tree applications for molecular markers in the repository and pecan breeding program. *Acta Horticulturae*, n. 400, p. 205-210, 1997.

GRAUDE, M.; MENOOA, M.; ERRERA, M.; AMI, M.; ER, A.; OO, P. Geographical patterns of genetic variation in native pecans. *Tree Genetics and Genomes*, v. 1, p. 1-10, 2005.

UANG, R.; UANG, S.; UN, S.; UANG, S.; ANG, S.; Transcriptome Analysis of Genes Involved in Lipid Biosynthesis in the Developmental Biology of Pecan (*Carica illinoiensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 10, p. 3800-3805, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf049000w>.

UANG, S.; IAO, S.; ANG, S.; ANG, R.; ANG, S.; UANG, C.; EN, C.; The Genomes of pecan and Chinese pecan provide insights into *Carica* evolution and nut nutrition. *Agroforestry Science and Technology*, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2012.

ENGIN, S.; ION, S.; GRIMMO, O.; CEMUT, S.; GRAUDE, M.; Towards a reference pecan genome sequence. *Acta Horticulturae*, v. 800, p. 205-210, 2008.

JIA, X.; WANG, T.; ZHAI, M.; LI, Y.; GUO, Z. Genetic diversity and identification of Chinese-grown pecan using ISSR and SSR markers. *Molecules*, v. 19, p. 10000-10005, 2014.

ENG, S.; EN, S.; IA, G.; UANG, S.; UANG, S.; C; ANG, S.; UANG, S.; ANG, S.; Development of SSR markers in *Carica catapaensis* and their transferability to other species of *Carica*. *Current Genomics*, v. 15, p. 100-105, 2014.

MATTISON, C.; PIRAI, R.; ETTO, R.; INC, R.; MAISON, C.; AN, C.; RAEAR, S.; GRAHAM, C.; TARER, M.; ORANE, C.; ECOTE, P.; RNA-Sequencing Analysis of Developmental Pecan (*Carica illinoiensis*) Bracts Reveals Parallel Expression Patterns along Allerlen and Lipid Metabolism Genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 1, p. 200-205, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf304000w>.

National Center for Biotechnology Information. [Welcome to NCBI](https://ncbi.nlm.nih.gov/) Disponível em: <https://ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 20 de setembro de 2023.

POLLOTT, T.; POLOTT, I.; MUNI, M.; REINIGER, S.; RICARDO, N.; TEENON, S.; MORPHOLOGICAL, Cytological and Genetic analysis of southern Brazilian pecan (*Carica illinoiensis*) accessions. *Cientia Horticulturae*, v. 10, p. 1-10, 2005.

RÖTER, S.; AMRIC, S.; OO, S.; Genetic diversity within provenance and cultivar germplasm collections and wild populations of pecan. *Journal of Heredity*, v. 96, p. 200-205, 2005.

ENRAME, M.OCERT, G.PAR, ETSTEIN, Yield performance and molecular evaluations of pecan trees regenerated from somatic embryogenic cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.100, p.100-105, 1975.

ANG, M.OLI, C.CEN, U. C. A. O., GENG, G. Morphological characterization and transcriptome analysis of pistillate flowering in pecan (*Carica illinoensis*). *Cientia Horticulturae*, v.10, p.100-105, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1973-3140v10n100105>

ANG, C. A. O., REN, C. C. ANG, U. C. A. O., M. O. L. I. Characterization and development of genetic resources in pecan (*Carica illinoensis*), v.10, p.100-105, 2010.

ANG, C. A. O., REN, C. C. ANG, M. O. L. I. RNA-seq Reveals Flavonoid Biosynthesis-Related Genes in Pecan (*Carica illinoensis*) Nernels. *Agricultural and Food Chemistry*, v.10, n.10, p.100-105, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00000>

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 draft union formation in pecan (*Carica illinoensis*). *Forests*, v.10, n.10, p.100-105, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/forests1010000>

Literatura recomendada

GRAUKE, L. J.; PRICE, H. J.; JOHNSTON, J. S. Genome size of pecan as determined by flow cytometry. *Science*, v.100, p.100-105, 1975.

ENRAME, M. ETSTEIN, R. E. *Carica illinoensis* pecan. In: T. R. E. Reddy (ed.), *Biotechnology in fruit and nut crops*. Cambridge Publishing, 1990.