

TESTE DE PATERNIDADE, PARENTESCO E IDENTIDADE GENÉTICA ENTRE CLONES DE SERINGUEIRA USANDO CARACTERES MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

Fábio Gelape Faleiro⁽¹⁾, Jamile da Silva Oliveira⁽¹⁾, Wanderlei Antonio Alves de Lima⁽¹⁾, Josefino de Freitas Fialho⁽¹⁾, Adriano Delly Veiga⁽¹⁾, Marcelo Fideles Braga⁽¹⁾, Ailton Vitor Pereira⁽²⁾

⁽¹⁾ Embrapa Cerrados, jamile.oliveira54@gmail.com, fabio.faleiro@embrapa.br, wanderlei.lima@embrapa.br, josefinno.fialho@embrapa.br, adriano.veiga@embrapa.br, marcelo.fideles@embrapa.br. ⁽²⁾ Embrapa Produtos e Mercado, ailton.pereira@embrapa.br

Palavras-chave: *Hevea brasiliensis*, marcadores moleculares, caracterização morfoagronômica, melhoramento genético

INTRODUÇÃO

A seringueira é uma árvore nativa de florestas tropicais de diversos países da América do Sul, sendo reconhecidas 11 espécies, dentre as quais a *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. é a mais produtiva e cultivada para a produção de borracha natural no mundo, em mais de 12 milhões de hectares.

Como ferramenta auxiliar no melhoramento genético, marcadores moleculares do DNA têm sido utilizados com sucesso em estudos sobre testes de paternidade, confirmação da fecundação cruzada, análises de grau de parentesco e identidade genética em diferentes espécies de plantas. As técnicas moleculares podem ser utilizadas de forma isolada ou em conjunto com outras técnicas como as que utilizam descritores morfológicos ou morfoagronômicos (Marques et al., 2000). Os marcadores moleculares apresentam algumas vantagens como a alta capacidade de revelar polimorfismos mesmo entre genótipos muito próximos geneticamente. Os descritores morfoagronômicos, por sua vez, apresentam como vantagens, o baixo custo e a facilidade de obtenção, além de serem utilizados nos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade exigidos nos processos de proteção de cultivares.

Neste estudo, objetivou-se estabelecer o possível grau de parentesco, semelhança genética e confirmar a identidade entre dois clones elites de seringueira utilizados na base de cruzamentos e nos ensaios de competição de clones do programa de melhoramento realizado na Embrapa.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular e nas áreas experimentais de seringueira da Embrapa Cerrados. Foram analisados dois clones de seringueira: CPAC 01 e PB 235. Amostras de DNA genômico de cada clone foram extraídas a partir de tecido foliar, utilizando-se a metodologia de extração do CTAB, com modificações (FALEIRO et al., 2003). A quantidade de DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm (A₂₆₀), e a relação A₂₆₀/A₂₈₀ foi utilizada para avaliar a pureza e a qualidade das amostras (SAMBROOCK et al., 1989). As amostras de DNA de cada clone foram diluídas para 5 ng/μL.

As reações de amplificação para obtenção de marcadores ISSR foram efetuadas em um volume total de 13 μL, sendo: 4,9 μL de água Milli Q, 1,3 μL de tampão, 0,39 μL de MgCl₂ 50 mM; 0,26 μL dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) 10 μM; 1,95 μL de um iniciador (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) 2 μM; 0,2 μL da enzima Taq DNA polimerase (1 unidade) e 3 μL de DNA (15 ng).

As reações de amplificação para a obtenção de marcadores RAPD foram efetuadas em um volume total de 13 μL, sendo: 6,29 μL de água Milli Q, 1,3 μL de tampão 1x (Invitrogen), 0,78 μL de MgCl₂ 50 mM; 0,13 μL dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) 10 μM; 1,3 μL de um iniciador (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) 2 μM; 0,2 μL da enzima Taq DNA polimerase (1 unidade) e 3 μL de DNA (15 ng).

Inicialmente, foram testados 18 *primers* ISSR e 19 *primers* decâmeros RAPD (Tabela 1). A partir desses testes, foram selecionados e utilizados seis *primers* para obtenção de marcadores ISSR e três *primers* RAPD que geraram maior quantidade de bandas polimórficas e apresentaram melhor qualidade das amplificações.



Tabela 1. *Primers* testados e utilizados para obtenção dos marcadores ISSR e RAPD, para dois clones elite de seringueira, sequência 5'→3' e o número de bandas polimórficas (BP) e monomórficas (BM). Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2017.

<i>Primer</i> ISSR	Sequência 5'→3'	BP	BM	<i>Primer</i> RAPD	Sequência 5'→3'	BP	BM
1-TriAAG3'RC	AAGAAGAAGAAGAAG	-	-	1-OPD-04	TCTGGTGAGG	-	-
2-TriACA3'RC	ACAACAACAACAACA	-	-	2-OPD-07	TTGGCACGGG	-	-
3-RriCAA3'RC	CAACAACAACAACAA	-	-	*3-OPD-08	GTGTGCCCCA	-	6
4-TriAAC3'RC	AACAACAACAACAAC	-	-	4-OPD-10	GGTCTACACC	-	-
5-TriAGC3'RC	AGCAGCAGCAGCAGC	-	-	5-OPD-16	AGGGCGTAAG	-	-
*6-TriAGG3'RC	AGGAGGAGGAGGAGG	1	8	6-OPE-16	GGTGACTGTG	-	-
*7-TriCAG3'RC	CAGCAGCAGCAGCAG	2	9	7-OPE-18	GGACTGCAGA	-	-
8-DiGA5'C	CGAGAGAGAGAGAGA	-	-	8-OPE-20	AACGGTGACC	-	-
9-DiCA3'YG	CACACACACACACAC	-	-	9-OPF-01	ACGGATCCTG	-	-
*10-DiCA5'CR	CACACACACACACAC	2	4	10-OPF-14	TGCTGCAGGT	-	-
11-DiGT3'YG	GTGTGTGTGTGTGTG	-	-	11-OPF-17	AACCCGGGAA	-	-
12-DiCA3'G	CACACACACACACAC	-	-	12-OPG-01	CTACGGAGGA	-	-
*13-DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAG	2	5	13-OPG-05	CTGAGACGGA	-	-
14-DiGA5'CY	AGAGAGAGAGAGAGA	-	-	14-OPG-08	TCACGTCCAC	-	-
*15-DiGT5'CY	GTGTGTGTGTGTGTGT	-	3	15-OPG-17	ACGACCGACA	-	-
*16-DiGA3'YC	GAGAGAGAGAGAGAG	-	4	16-OPH-04	GGAAGTCGCC	-	-
17-DiGA3'T	GAGAGAGAGAGAGAG	-	-	17-OPH-13	GACGCCACAC	-	-
18-DiCA3'RG	CACACACACACACAC	-	-	*18-OPH-16	TCTCAGCTGG	-	7
				*19-OPH-17	CACTCTCCTC	2	3
Total		6	33	Total		2	16

* *Primers* selecionados e utilizados para gerar os marcadores ISSR e RAPD nos dois clones de seringueira.

As ampliações foram realizadas em termociclador e em seguida, foi realizada a separação eletroforética. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores ISSR e RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foi estimada a dissimilaridade genética entre os diferentes genótipos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (NEI e LI, 1979), com o auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2013).

Para caracterização morfoagronômica dos dois clones de seringueira foram utilizados 17 descritores multcategóricos de folhas preconizados pelo SNP-C-MAPA (Tabela 2).

As distâncias genéticas entre os dois clones foram calculadas com base em análises multivariadas, considerando os 17 descritores morfoagronômicos das folhas. As estimativas foram baseadas no complemento do índice de coincidência simples, calculado com auxílio do programa computacional Genes (CRUZ, 2013).

Tabela 2. Descritores de estruturas foliares de seringueira (*Hevea* Aubl.) do SNPC-MAPA publicado em dezembro de 2010, exceto as características 15, 16 e 17.

Características	Descrição	Código
1- Lançamento Foliar: Formato da parte superior	Agudo	1
	Obtudo	2
	Redondo	3
	Achatado	4
2 - Folha: Formato do folíolo central comparado com os laterais	Similar ou ligeiramente diferente	1
	Moderadamente diferente	2
	Muito diferente	3
3 - Folha: intensidade da cor verde na parte superior	Clara	3
	Média	5
	Escura	7
4 - Folha: brilho na parte superior	Ausente ou fraco	1
	Médio	2
	Forte	3
5 - Folha: textura da superfície da parte superior	Lisa ou ligeiramente rugosa	1
	Moderadamente rugosa	2
	Muito rugosa	3
6 - Folha: pubescência nos nervos da parte inferior dos folíolos	Ausente	1
	Presente	2
7 - Lâmina do folíolo: atitude em relação ao pecíolo (Inclinação do folíolo em relação ao pecíolo)	Semi-ereto	1
	Horizontal	2
	Semi-inclinado	3
8 - Lâmina do folíolo: comprimento	Curto	3
	Médio	5
	Longo	7
9 - Lâmina do folíolo: posição da parte mais larga	Em direção a base	1
	No meio	2
	Em direção ao ápice	3
10 - Lâmina do folíolo: eixo na seção longitudinal (corte longitudinal do folíolo)	Reto	1
	Convexo	2
	Sigmoide	3
11 - Lâmina do folíolo: ondulação da margem	Ausente ou fraca	1
	Média	2
	Forte	3
12 - Lâmina do folíolo: formato da base (folha: forma da parte basal do folíolo)	Afilada	1
	Cuneiforme	2
	Obtusa	3
13 - Lâmina do folíolo: formato do ápice exceto a ponta. (folha: forma da parte apical do folíolo exceto a ponta)	Agudo	1
	Obtuso	2
	Arredondada	3
14 - Pecíolo: atitude (Inclinação do pecíolo em relação ao caule)	Semi-ereto	1
	Horizontal	2
	Semi-inclinado	3
15 - Folha: cor do pecíolo	Verde totalmente	1
	Verde amarelado	2
	Verde amarronzado	3
	Marrom esverdeado	4
	Verde arroxeado	5
	Roxo esverdeado	6
	Marrom ou roxo (pecíolo novo)	7
16 - Folha: Proximidade dos folíolos	Predominantemente separados	1
	Próximo e ligeiramente separados	2
	Próximos e ligeiramente trespassados	3
	Predominantemente trespassados	4
17 - Folha: corte transversal do folíolo	Plano	1
	Ligeiramente côncavo ou em V bem aberto	2
	Muito Côncavo ou em V mais fechado	3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos dois clones de seringueira por meio do uso dos oito *primers* ISSR, gerou um total de 39 marcadores ISSR, perfazendo uma média de 6,5 marcadores por *primer*. Enquanto os três *primers* RAPD geram um total de 18 marcadores, perfazendo uma média de 6 marcadores por *primer*. Na Figura 1, está ilustrado o perfil de distribuição dos marcadores ISSR e RAPD, para os dois clones elite de seringueira.

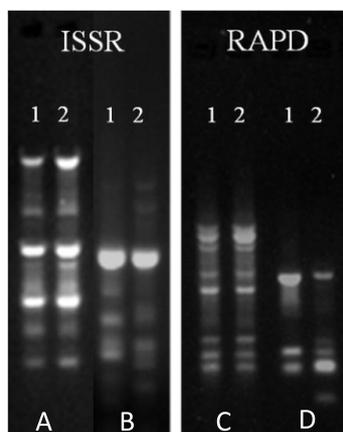


Figura 1. Marcadores ISSR e RAPD dos clones CPAC 01 (1) e PB 235 (2) gerados pelos primers TriAGG3'RC (A), TriCAG3'RC (B), OPH-16 (C) e OPH-17 (D).

A elevada porcentagem de marcadores monomórficos e a média de marcadores por iniciador demonstrou a baixa variabilidade genética entre os dois clones elite. Esse resultado pode ser explicado por um possível parentesco entre os clones, sustentando a hipótese de que o clone PB 235 seja o genitor do CPAC 01. Esse resultado demonstra também a elevada eficiência das técnicas ISSR e RAPD na distinguibilidade entre os clones de seringueira. Gonçalves, Campos e Ferreira Filho (2013) utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélite identificaram clones de seringueira por perfil único de DNA.

Quanto aos descritores morfoagronômicos, dos 17 utilizados, 15 foram idênticos para os dois clones elite de seringueira e dois dos descritores diferiram, sendo eles o comprimento do folíolo central da folha madura e a atitude dos folíolos da folha madura, com relação à proximidade entre eles. Esses dois descritores foram bastante efetivos na diferenciação dos dois clones em estudo (Figura 2).

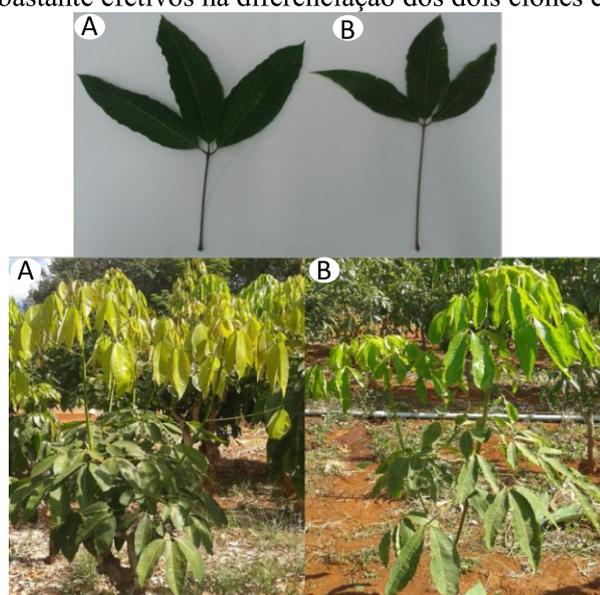


Figura 2. Folha e planta dos clones de seringueira PB 235 (A) e CPAC 01 (B).

As estimativas da distância genética entre os dois clones de seringueira com base nos marcadores moleculares ISSR e RAPD foram de 0,08 e 0,06, respectivamente. A estimativa da distância genética com base nos descritores morfoagronômicos relacionados as características de folha, foi de 0,12. De modo geral, as técnicas utilizadas demonstraram que os dois clones de seringueira não são idênticos, entretanto são próximos geneticamente, indicando que existe um grau de parentesco entre eles.

Hernandez et al. (2006) relataram que marcadores RAPD foram capazes de diferenciar clones de seringueira de origem sul-americana da maioria dos outros que foram reintroduzidos da Ásia e Marques et al. (2002) relataram que tais marcadores foram eficientes para diferenciar clones das séries SIAL e Fx. Os resultados do presente estudo ressaltam a importância dos marcadores moleculares e descritores morfológicos para realizar estudos de dissimilaridade genética e das relações genéticas entre os clones utilizados nos programas de melhoramento genético da seringueira.

CONCLUSÃO

Com base em marcadores moleculares ISSR e RAPD e descritores morfológicos das folhas, pode-se concluir que os clones CPAC 01 e PB 235 não são idênticos, mas apresentam uma alta similaridade genética, indicando possível parentesco, sustentando a hipótese de que o clone PB 235 seja o genitor do CPAC 01.

REFERÊNCIAS

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

GONÇALVES, R. C.; CAMPOS, T.; FERREIRA FILHO, J. A. Tecnologia para a identificação de clones de seringueira (*Hevea* spp.) por meio de análise de marcadores microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HEVEICULTURA, 2, 2013, Guarapari. **Anais...** Gurapari, 2013. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/976118/1/24847.pdf>>. Acesso: 23/08/2017.

HERNANDEZ, R. C. A.; KAFURI, L. A.; ISAZA, R. R.; ARIAS, M. L. Análise da variação genética em clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*) de origem asiática, sul e centro-americana com marcadores RAPD. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 8, n. 2, p. 29-34, 2006.

MARQUES, J.R.B.; ARAÚJO, I.S.; GOMES, L.M.C.; BAHIA, R.C.S.; FALEIRO, F.G. Caracterização fenotípica e molecular do clone SIAL 893 de seringueira (*Hevea brasilienses*) recomendado para o cultivo no estado da Bahia. In: Genetics and Molecular Biology v. 23, (suplemento), 46º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA. **Resumos...**2000. p. 520-521.

MARQUES, J.R.B.; FALEIRO, F.G.; ARAÚJO, I.S. e ANHERT, D. Diversidade genética entre clones de seringueira das Séries SIAL e FX com base em marcadores RAPD. **Agrotropica**, v. 14, n.3, p. 159-164, 2002.

