

( ) Apresentação Oral

(X) Apresentação de Pôster

## VARIABILIDADE GENÉTICA DE CLONES DE SERINGUEIRA COM USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

André Lucas Domingos da Sila<sup>1</sup>, Tatiana de Campos<sup>2\*</sup>

1. Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (CITA) da Universidade Federal do Acre (UFAC);
2. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Acre).

\* Autor correspondente: tatiana.campos@embrapa.br

### Introdução:

A seringueira [(*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. De Juss.) Muell. Arg.] nativa da Região Amazônica (GONÇALVES et al., 1989), pertence à família Euphorbiaceae (TRINDADE; LAMEIRA, 2014) e é a espécie mais importante e explorada do gênero *Hevea* (MORENO et al., 2005).

Dados do International Rubber Study Group (2018) apontam que, em 2017, a produção mundial de borracha natural foi de 13,5 milhões de toneladas. No Brasil, a produção foi de, aproximadamente, 32,2 mil toneladas (IBGE, 2017). Entretanto, a produção de borracha natural brasileira tem sido insuficiente para suprir a demanda das indústrias nacionais, sendo necessário importar até dois terços de borracha natural para abastecer as fábricas (EMBRAPA, 2016).

O melhoramento genético contribui significativamente nesses casos, possibilitando a obtenção de acessos com maior produtividade (SILVA et al., 2014). Para isso, é importante caracterizar a diversidade genética existente nas coleções *ex situ* (bancos de germoplasma) (SOUZA et al., 2015). Para acessar a diversidade genética das coleções, marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) têm sido empregados com sucesso nessas populações (GOUVÊA et al., 2010; SILVA et al., 2016), pois são altamente polimórficos, multialélicos e codominantes (FORTES et al., 2016). Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade e variabilidade genética de 14 acessos de *H. brasiliensis* com uso de marcadores microssatélites.

### Material e Métodos:

Foram coletadas amostras foliares de 14 genótipos de *H. brasiliensis* do jardim clonal localizado na Embrapa Acre e levados ao Laboratório de Morfogenese e Biologia Molecular.

Utilizou-se o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990) com modificações para a extração do DNA. A quantificação do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%. As reações de amplificação seguiram o protocolo de Schuelke (2000). Foram utilizados sete microssatélites desenvolvidos para seringueira (LE GUEN et al., 2009). Os produtos das amplificações foram visualizados em gel de agarose 3%.

Organizados em *multiplex*, de acordo com amplitude dos locos e do fluoróforo utilizado, as amostras foram genotipadas em sequenciador automático AB 3500xL (*Applied Biosystems*) no Laboratório de Análises Genéticas e Moleculares da Universidade Estadual de Campinas. No sequenciador, os tamanhos dos fragmentos foram detectados de acordo com o padrão GeneScan-600 (LIZ), e visualizados em eletroferograma no programa GeneMarker 2.7.4.

Para a caracterização da diversidade genética foram calculados o número de alelos ( $N$ ) por loco, a Heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), Heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e o conteúdo de informação polimórfica ( $PIC$ ). As estimativas foram obtidas pelos softwares TFPGA (MILLER, 1997) e GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2007). Utilizou-se a distância genética modificada de Rogers (WRIGHT, 1978) e foi feito um dendograma pelo critério de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*).

### Resultados e Discussão:

Para os sete microssatélites testados, o número de alelos ( $N$ ) variou de seis (BAC55-B02) a 12 (A2736) com média de 9,14 alelos por loco. Em um estudo com 30 genótipos houve variação

entre seis a 18 com média 13,4 alelos por loco (DOURADO, 2016).

A heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) foi alta, variando de 0,77 (A2365) a 0,91 (A2736), com média de 0,85. Um estudo com 1.117 acessos de seringueira, com 13 microssatélites, onde foram utilizados os sete locos do presente estudo, os valores de  $H_E$  variaram entre 0,63 e 0,84 com média de 0,76 (SOUZA et al., 2015). Assim, mesmo com um número amostral reduzido, nota-se que há variabilidade genética entre os genótipos e é representativa da diversidade da espécie.

A heterozigosidade observada ( $H_O$ ) apresentou de 0,57 (TA2163) a 1 (A2406 e BAC55-B02), com média de 0,76. Souza et al. (2015) encontrou intervalo de  $H_O$ , entre 0,57 a 0,69 e média de 0,64. Altos valores de  $H_O$  são esperados em espécies alógamas, como a seringueira, pois há predomínio de reprodução cruzada. Como os clones são propagados por enxertos, a heterozigosidade é conservada.

O valor de PIC variou de 0,75 (A2365) a 0,88 (A2406). De acordo com Botstein et al. (1980) o valor de  $PIC$  superior a 0,5 é considerado um marcador altamente informativo. Portanto, os resultados deste parâmetro indicam que a variabilidade foi acessada com marcadores significativamente polimórficos para as estimativas genéticas.

Com base no agrupamento UPGMA não foram identificados acessos redundantes.

### Conclusões:

Os sete microssatélites testados foram altamente polimórficos, e eficientes para caracterizar a diversidade e diferenciar os acessos e não foi constatado redundância entre os genótipos.

### Palavras-chave:

Marcador SSR, Diversidade genética, *Hevea brasiliensis*.

### Apoio financeiro:

Embrapa, Capes.

### Referências bibliográficas

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

DOURADO, C.L. **Melhoramento em progênies de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. Adr. De Juss.) Muell. -Arg.] Por caracteres quantitativos e moleculares do tipo SSR em duas variáveis de diferentes procedência**. Disponível em <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150728>>. Acessado em 10/04/2019.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – Embrapa. **Produção Agrícola**. Disponível em: <[www.embrapa.br/agropensa/bases-de-dados](http://www.embrapa.br/agropensa/bases-de-dados)>. Acessado em: 10/04/2019.

FORTES, A.C.R.; OLIVEIRA, M.D.S.P.; OLIVEIRA, N.P.; SANCHES, E.D.N.M.; CUNHA, E.F.M. Transferibilidade de locos microssatélites desenvolvidos em outras espécies de palmeiras para *Astrocaryum vulgare* Mart. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 59, n. 1, p. 80-86, 2016.

GONÇALVES, P.S.; CARDOSO, M.; BOAVENTURA, M.A.M.; MARTINS, A.L.M.; LAVORENTI, C. Biologia, citogenética e ploidia de espécies do gênero *Hevea*. **O Agrônomo**, v.41, n.1, p. 40-64, 1989.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Levantamento sistemático sobre pesquisas agrícolas**. Disponível em: <[www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)>. Acessado em: 09/04/2019.

INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP - IRSG. **Rubber statistical bulletin**. Disponível em: <<http://www.rubberstudy.com/pub-stats-bulletin.aspx>>. Acessado em: 09/04/2019.

LE GUEN, V.; DOARÉ, F.; WEBER, C.; SEGUIN, M. Genetic structure of Amazonian populations of *Hevea brasiliensis* is shaped by hydrographical network and isolation by distance. **Tree Genet Genomes**, v. 5, n. 4, p. 673-683, 2009.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Análise de dados genéticos**: programa de computador para análise de dados alélicos. Versão 1.1 (d12), 2001. Disponível em: <<https://phylogeny.uconn.edu/software/>>. Acessado em: 12/04/2019.

MILLER, M.P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA)**: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, version 1.3. Disponível em: <<http://www.marksgeneticssoftware.net/tfpga.htm>>. Acessado em 12/04/2019.

MORENO, R.M.B.; GONÇALVES, P.S.; MATTOSO, L.H.C. **Desenvolvimento da borracha Natural crua de novos clones de seringueira (hevea spp.) da serie IAC para recomendação ao Pantio no Estado de São Paulo: II –As Propriedades Tecnológicas DRC (%), % de nitrogênio, % de Cinzas e % de Extrato Acetônico.** Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/30355/1/CiT322006.pdf>>. Acessado em: 12/04/2019.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.

SILVA, B.M.; ROSSI, A.A.B.; DARDENGO, J.F.E.; ARAUJO, V.A.A.C.; ROSSI, F.S.; OLIVEIRA, L.O.; CLARINDO, W.R. Diversidade genética estimada com marcadores entre sequências simples repetidas em cultivos comerciais de Cupuaçuzeiro. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 108-113, 2016.

SILVA, G.A.P.; GEZAN, S.A.; CARVALHO, M.P.; GOUVEA, L.R.L.; VERARDI, C.K.; OLIVEIRA, A.L.B. Genetic parameters in a rubber tree population: heritabilities, genotype-by-environment interactions and multi-trait correlations. **Tree Genetics & Genomes**, v. 10, n. 6, p. 1511-1518, 2014.

SOUZA, L. M.; LE GUEN, V.; CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SILVA, C.C.; MANTELLO, C.C. Genetic Diversity Strategy for the Management and Use of Rubber Genetic Resources: More than 1,000 Wild and Cultivated Accessions in a 100-Genotype Core Collection. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1-20, 2015.

TRINDADE, M.J.S.; LAMEIRA O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 4, 2014.