

# TECNOLOGIA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE CLONES DE SERINGUEIRA (*Hevea* spp.) POR MEIO DE ANÁLISE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Rivaldalve Coelho Gonçalves<sup>1</sup>. Tatiana de Campos<sup>2</sup>. Jaire Alves Ferreira Filho<sup>3</sup>. <sup>1</sup>M. Sc., D. Sc. Fitopatologia, Pesquisador A, <sup>1,2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CPAFAC. Rodovia BR 364, km14, Rio Branco, AC. CEP: 69.900.970. [rivaldalve.goncalves@embrapa.br](mailto:rivaldalve.goncalves@embrapa.br). <sup>3</sup>Universidade Federal do Acre.

**Identificação do evento:** Apresentado no III Congresso Brasileiro de Heveicultura – 24 a 26 de julho de 2013, Guarapari/ES.

**Resumo:** A área plantada com seringueira no Brasil tem aumentado nos últimos anos em vários Estados brasileiros, contudo, os jardins clonais de onde são coletadas as hastes para a multiplicação clonal não são certificados geneticamente. A identificação morfológica ou fenotípica por isoenzimas de clones não apresenta precisão suficiente para proporcionar a máxima segurança aos projetos de pesquisa, transferência de tecnologia e fomento a heveicultura, o que, em grande escala, aumenta o risco potencial biótico e abiótico dos reflorestamentos com seringueira. Em alguns casos, clones com bom desempenho produtivo em um local apresenta grande vigor e baixa produtividade em outro, indicando possível troca de material ou mesmo a falta de adaptabilidade de um mesmo clone aos sítios considerados. Para discriminar todos os clones atualmente no mercado ou nas coleções que são utilizadas na pesquisa científica, é necessária a apropriação de um protocolo tecnológico que permita a discriminação e certificação genética das coleções e jardins clonais nos viveiros comerciais e de pesquisa. O perfil de marcadores moleculares do tipo microssatélites de sequências expressas ou não constituem-se em elementos apropriados para a avaliação de diversidade genética de seringueira ao nível de clones e espécies. Neste trabalho, a partir de primers microssatélites de seringueira previamente publicados, nove locus foram estudados em 34 clones. Foi demonstrado que dois locus, entre aqueles avaliados, são apropriados para discriminar 17 clones, dos 34 avaliados e, quatro locus permitiram o cálculo da heterozigosidade esperada e observada, as quais mostraram-se em níveis elevados na população avaliada.

**Palavras-chave:** jardim clonal, certificação, DNA, *Hevea brasiliensis*

## Introdução

A seringueira é uma árvore nativa de florestas tropicais de diversos países localizados na América do Sul. Até o momento, são reconhecidas 11 espécies de seringueira mas, a espécie *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. é a mais cultivada para a produção de borracha natural no mundo. A área plantada com seringueira no Brasil, destinada a colheita em 2011, foi de 135.835 ha enquanto que em 2009, era de 154.509 ha (IBGE, 2013). Apesar da queda na área destinada a colheita, a área plantada com seringueira tem aumentado no Brasil, para suprir, principalmente, a demanda por borracha natural, uma vez que as importações desta têm sido cada vez maior. No Acre, plantios de seringueira com 30 anos de idade continuam a produzir látex e a gerar renda para os produtores. A retomada dos plantios deu-se dentro da Política de Valorização do Ativo Ambiental Florestal do Acre, por meio do Programa de Florestas Plantadas. Para dar suporte tecnológico no que tange ao material genético empregado no Programa, a Embrapa tem trabalhado para realizar testes clonais visando selecionar e recomendar clones que tenham resistência genética a doença mal-das-folhas-da-seringueira e, as outras doenças que ocorrem nos plantios. Treze clones sugeridos para plantio na região sudeste do Acre estão sendo multiplicados e plantados, mantendo-se a identificação baseada na macromorfologia de cada clone. Contudo, para a pesquisa científica e para o programa de fomento a heveicultura no Brasil é necessária a identificação genética dos clones e a certificação genética dos jardins clonais e coleções de plantas utilizadas na pesquisa. Esta certificação visa evitar e corrigir erros devido a troca dos códigos dos clones, aumentando o grau de certeza na execução dos projetos. A identidade genética de clones de seringueira tem sido estabelecida por meio de marcadores moleculares do tipo isoenzimas (LECONTE et al., 1994). Esta técnica baseia-se em 12 sistemas de enzimas aplicados as proteínas foliares seguido de eletroforese em gel de amido. A eletroforese de isoenzimas apresenta como desvantagem a impossibilidade de discriminar todos os clones de uma população e, apesar de ter sido reconhecida como técnica padrão para a identificação genética de clones de seringueira, até o momento, no Brasil, esta tecnologia para a finalidade proposta não está sendo empregada ao nível comercial.

Outra possibilidade tecnológica para o estabelecimento de identidade genética de clones de seringueira é o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites, devido as vantagens deste tipo de marcador, dentre as quais, a alta capacidade de revelar polimorfismos mesmo entre materiais genéticos que possam apresentar o mesmo padrão isoenzimático, a baixo custo e risco potencial. Por isto, uma das técnicas mais indicadas para se estudar polimorfismos entre seqüências de DNA é a de marcadores moleculares microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats), (TAUTZ; RENS, 1984). Os SSRs são marcadores codominantes, multialélicos e amplamente distribuídos no genoma eucariótico (TÓTH et al., 2000).

Com o objetivo de desenvolver uma tecnologia que permita a identificação de plantas clonais a partir do DNA genômico com alta precisão foi realizado este trabalho de caracterização e identificação de polimorfismo alélico em seringueira.

## Material e Métodos

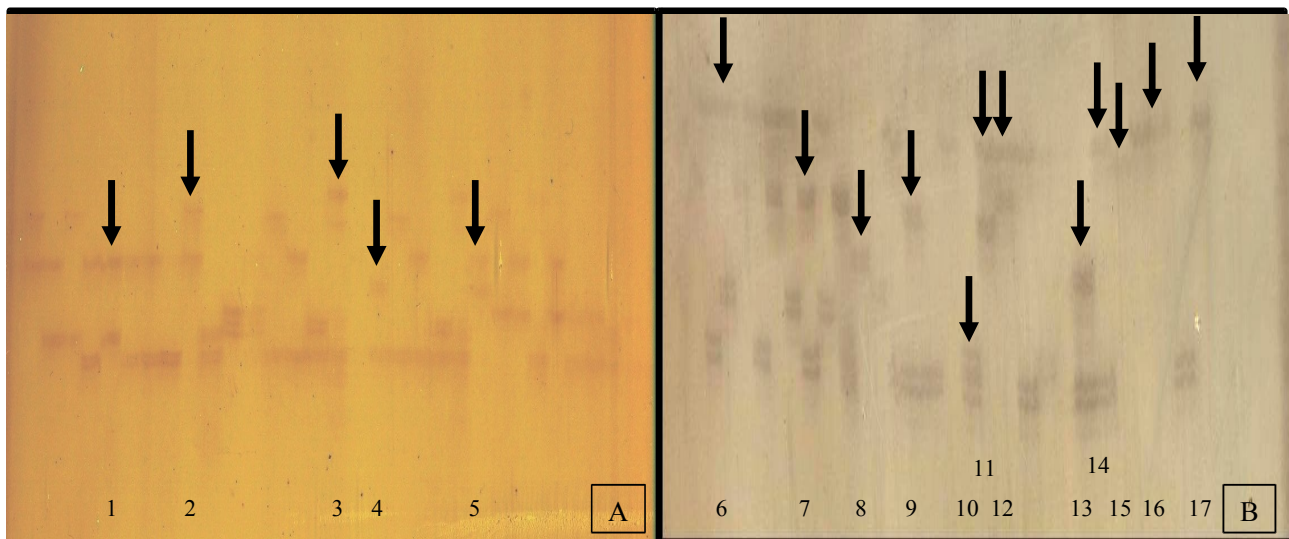
As plantas clonais utilizadas neste estudo são da Coleção de Plantas de Seringueira da Embrapa Acre, em Rio Branco, AC. Os clones utilizados para amostragem foram: CD 1174, CDC 56, CDC 312, FDR 4575, FDR 5240, FDR 5597, FDR 5665, FDR 5788, FDR 5802, Fx 3864, Fx 3899, Fx 4098, IAC 35, IAC 40, IAC 411, IAC 41, IAC 400, IAN 717, IAN 873, IAN 6484, IRCA 111, Fx 4098, MDF 180, MDX 624, MDX 607, PB 350, PMB 1, RRIM 600, RRIM 901, RRIM 908, RRIM 911, RRIM 922, RRIM 938 e TR 01.

Uma folha no estágio A foi coletada e armazenada em gelo até o momento da extração do DNA no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LabMol) da Embrapa Acre. A extração de DNA foi feita pelo método adaptado de Doyle e Doyle (1990). O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose (1%) m/v comparando-se com padrões conhecidos de DNA de bacteriófago  $\lambda$ .

Para a reação de PCR foram utilizados nove pares de primers aneladores de locus microssatélites (SEGUIN, 1997). As reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) seguiram as seguintes condições: 1 minuto a 94 °C; 30 ciclos de [1 min. 94 °C, 1 min. a Ta (temperatura de anelamento) específica e 1 min a 72 °C], seguidos de 5 min a 72 °C. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose (3%) m/v, e aplicados em gel de poliacrilamida desnaturante (6%) m/v, usando solução “DNA ladder” 10 pb (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) como marcador de peso molecular. Em seguida, foi realizada a coloração de nitrato de prata no gel (CRESTE et al., 2001). As estimativas de heterozigidade esperada ( $H_E$ ) e observada ( $H_O$ ), as distâncias genéticas e a análise de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average) foram feitas no software TFGPA (Tools For Population Genetic Analyses) (MILLER, 1997).

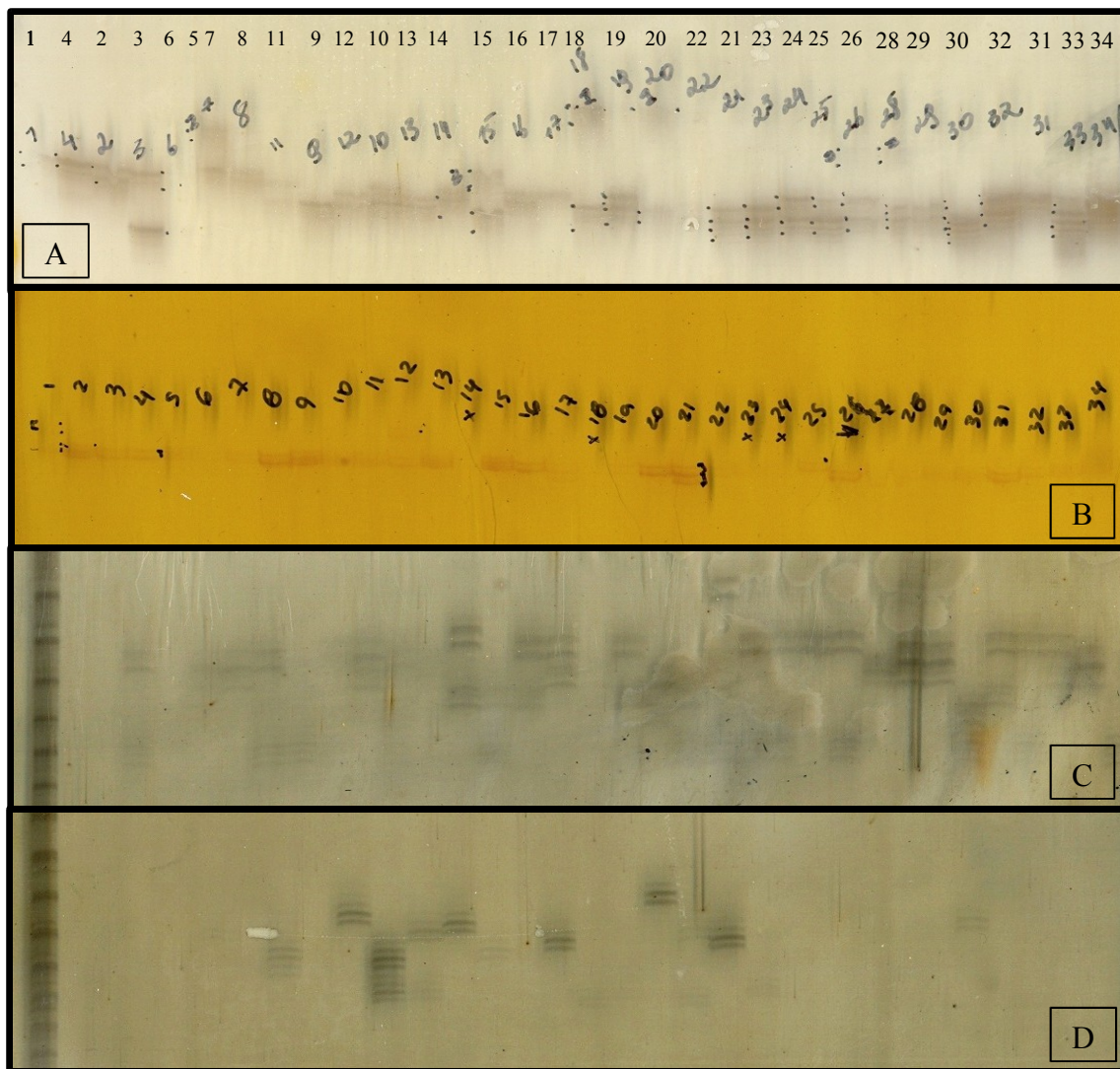
## Resultados e Discussão

Nesse estudo foi possível selecionar dois locus apropriados para a identificação de clones de seringueira, já que as bandas migraram de forma bem separada e nítida, o que permitiu identificar 17 clones entre os 34 utilizados (Figura 3).



**Figura 3.** A - Loco AGHE25 evidenciando o perfil único de bandas dos clones (1. MDX624, 2. FDR5665, 3. FDR 5788, 4. RRIM 908, 5. RRIM 901) e B - Loco AGHE56 evidenciando o perfil único de clones (6. IAC35, 7. MDF180, 8. FDR4575, 9. MDX607, 10. Fx3899, 11. IAN 6484, 12. Fx4098, 13. IAN6484, 14. IAN873, 15. PB350, 16. IAC40, 17. IAC411).

Apenas um, dos nove locus testados, foi monomórfico e, em dois locus, não ocorreu amplificação. Os outros quatro locus apresentaram um perfil de bandas incompatíveis com o objetivo do estudo quanto a distinção nítida das marcas no gel (Figura 4). A não amplificação desses locus pode ser devido a Ta (temperatura de anelamento) utilizada não ter sido adequada para a reação de PCR ou outro problema não identificado neste estudo.



**Figura 4.** Fotografia de géis com quatro locus microssatélites diferentes mostrando perfis com bandas de difícil identificação. A - loco AGHE21, B - loco AGHE51, C - loco AGHE175 e D - loco AGHE69. Números acima nas fotografias A e B indicam o clone.

Os locus AGHE21, AGHE51, AGHE175 e AGHE69 permitiram o cálculo da taxa de heterozigosidade, a qual foi variável, sendo a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ); 0,82 a 0,30 e a heterozigosidade observada ( $H_o$ ); 0,97 a 0,30. O número de alelos/locus variou de 4 a 10.

Os resultados mostram que a tecnologia de marcadores moleculares do tipo microssatélite permite a identificação de clones de seringueira por perfil único de DNA, bem como, constatar a heterozigosidade na população de clones analisada. Esta tecnologia tem sido utilizada para a avaliação da diversidade genética de seringueira (SAHA et al., 2005; FENG et al., 2009) separando clones com alta acurácia e, no Brasil, poderá servir como ferramenta tecnológica para a certificação genética dos jardins clonais, dos bancos de germoplasma e das coleções de plantas utilizadas em pesquisa, transferência de tecnologia e extensão rural.

### Conclusões

Neste trabalho, os resultados mostram que a tecnologia de marcadores moleculares do tipo microssatélite permite a identificação de clones de seringueira por perfil único de DNA, sendo o loco AGHE25 útil para evidenciar o perfil único de bandas dos clones MDX624, FDR5665, FDR 5788, RRIM 908, RRIM 901 e o loco AGHE56 útil para evidenciar perfil único de DNA dos clones FDR 4575, Fx 3899, Fx 4098, IAC35, IAC 40, IAC 411, IAN 6484, IAN 6484, IAN 873, MDF 180, MDX 607 e PB 350, bem como, o estudo da heterozigosidade em população de clones para os programas de melhoramento genético.

## Referências Bibliográficas

CRESTE, S.; TUMANN, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology**, v. 19, p. 299-306, 2000.

DOYLE, J. J. ; DOYLE, J. L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15. 1990.

IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**: Banco de Dados Agregados: Tabela 1613: Área plantada, área colhida, quantidade produzida e valor da produção da lavoura permanente. [Rio de Janeiro] 2012. Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=t&o=11&i=P>. Acesso em 17/04/2012.

FENG , S. P., LI, W. G. ; HUANG, H. S. ; WANG, J. Y.; WU, Y. T. Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Molecular Breeding**, V. 3, N. 1, p. 85-97. 2009.

LECONTE, A., LEBRUN, P., NICOLAS, D., SEGUIN, M. Electrophoresis application to rubber clone identification. **Plantation, rechange, development**, 28-33. 1994.

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. Northern Arizona University, Arizona, 1997.

SAHA, T. ; BINDU ROY, C. ; NAZEER, M. A. Microsatellite variability and its use in the characterization of cultivated clones of *Hevea brasiliensis*. **Plant Breeding**, v. 124, n. 1, p. 86–92. 2005.

SEGUIN, M.; GAY, C.; CHEN, X. T.; RODIER-GOUD, M. Microsatellite markers for genome analysis of rubber tree (*Hevea* spp.). **The IRRDB Symposium Biotechnology & Rubber Tree**, 25-28. 2001. Montpellier, France.

TAUTZ, D. ; RENZ, M. Simple Sequence repeats are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v.12, p. 4127-4137, 1984.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genomes Research**, v.10, p. 81-967, 2000.

## Agradecimentos

Agradecemos aos pesquisadores Vincent Le Guen, Carlos Raimundo Reis Mattos, Josefino de Freitas Fialho, a Plantações Michelin da Bahia Ltda, ao Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, CIRAD, França e, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA.