

VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE CLONES ELITE DE SERINGUEIRA COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES ISSR

Jamile da Silva Oliveira⁽¹⁾, Fábio Gelape Faleiro⁽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.oliveira@embrapa.br, 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: Euphorbiaceae, *Hevea brasiliensis*, caracterização molecular, ISSR,

INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.) pertence à família Euphorbiaceae e inclui 11 espécies descritas no gênero, dentre as quais a de maior importância é a *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. de Juss) Mueller-Argovienis (COSTA et al., 2001). As espécies de *Hevea* são encontradas naturalmente na Bacia Amazônica e em partes do planalto adjacente. Uma peculiaridade do Brasil, é que podem ser encontradas todas as espécies, uma vez que o território brasileiro compreende a maior parte do território de origem (Wycherley, 1992).

Programas de melhoramento genético da seringueira têm um papel importante no incremento da produção de borracha, sendo este um dos principais objetivos do melhoramento nessa cultura. A crescente procura por novos clones de seringueira tem exigido pesquisas relacionadas com recursos genéticos e melhoramento, de forma a permitir aos melhoristas o desenvolvimento de clones elite para recomendação (AGUIAR; GONÇALVES, 2006). Nos últimos anos, a Embrapa tem avançado nesta linha de pesquisa e identificado clones elite, os quais estão sendo avaliados em diferentes regiões. O estudo da variabilidade genética desses clones elites é uma etapa básica e essencial. Neste estudo, objetivou-se quantificar a variabilidade genética existente entre clones elites e acessos do Banco de Germoplasma de Seringueira (BGHevea) da Embrapa Cerrados.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados, analisando 29 materiais, incluindo clones elite e outros acessos do Banco de Germoplasma de Seringueira relacionados na Tabela 1. Um acesso de *Hevea spruceana* foi utilizado como outgroup. Amostras de DNA genômico de cada genótipo 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 (A_{260}) e a relação A_{260}/A_{280} 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/ μ L.

As reações de amplificação para obtenção de marcadores ISSR foram efetuadas em um volume total de 13 μ L, sendo: 4,9 μ L de água Milli Q, 1,3 μ L de tampão, 0,39 μ L de $MgCl_2$ 50 mM; 0,26 μ L dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) 10 μ M; 1,95 μ L de um iniciador (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) 2 μ M; 0,2 μ L da enzima Taq DNA polimerase (1 unidade) e 3 μ L de DNA (15 ng). Inicialmente, foram testados 18 *primers* ISSR (Tabela 2). A partir desses testes, foram selecionados oito *primers* para obtenção de marcadores ISSR que geraram maior quantidade de bandas polimórficas e apresentaram melhor qualidade das amplificações (Tabela 2).

As amplificações 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 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). A matriz de dissimilaridade genética foi empregada para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando o método do UPGMA (*Unweighted pairgroup method arithmetic average*) (SNEATH e SOKAL, 1973) como critério de agrupamento, e a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais, usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS (SAS Institute Inc., 2008) e Statistica (STATSOFT Inc., 2007).



Tabela 1. Relação dos genótipos avaliados e pertencentes ao Banco de Germoplasma de Seringueira da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2017.

Amostra	BGHevea	Genótipos	Origem
1	745*	OS 22	Malásia
2	759*	PB 291	Malásia
3	762*	PB 311	Malásia
4	763*	PB 312	Malásia
5	764*	PB 413	Malásia
6	765*	PB 324	Malásia
7	766*	PB 326	Malásia
8	768*	PB 350	Malásia
9	769*	PB 355	Malásia
10	770*	PC 119	Malásia
11	776*	PM 10	Malásia
12	840*	RRIM 713	Malásia
13	850*	RRIM 901	Malásia
14	859*	RRIM 937	Malásia
15	860*	RRIM 938	Malásia
16	863*	SCAT 7/20/56	China
17	648	GT 1	Indonésia
18	831	RRIM 600	Malásia
19	778	PR 255	Indonésia
20	749	PB 217	Malásia
21	639	F 4542	Pará
22	638	F 4512	Pará
23	746	P 10	Pará
24	<i>H. spruceana</i>	Spr	Acre
25	635	CPAC 1	Amazonas
26	752	PB 235	Malásia
27	676	IAN 6486	Pará
28	677	IAN 6543	Pará
29	771*	PC 140	Malásia

*clones elite

Tabela 2. *Primers* testados e utilizados para obtenção dos marcadores ISSR em 29 genótipos de seringueira, sequência 5'→3' e o número de bandas polimórficas (BP). Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2017.

Primer ISSR	Sequência 5'→3'	BP
1-TriAAG3'RC	AAGAAGAAGAAGAAG	-
2-TriACA3'RC	ACAACAACAACAACA	-
3-RriCAA3'RC	CAACAACAACAACA	-
*4-TriAAC3'RC	AACAACAACAACAAC	12
*5-TriAGC3'RC	AGCAGCAGCAGCAGC	09
*6-TriAGG3'RC	AGGAGGAGGAGGAGG	12
*7-TriCAG3'RC	CAGCAGCAGCAGCAG	14
8-DiGA5'C	CGAGAGAGAGAGAGA	-
9-DiCA3'YG	CACACACACACACAC	-
*10-DiCA5'CR	CACACACACACACAC	08
11-DiGT3'YG	GTGTGTGTGTGTGTG	-
12-DiCA3'G	CACACACACACACAC	-
*13-DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAG	20
14-DiGA5'CY	AGAGAGAGAGAGAGA	-
*15-DiGT5'CY	GTGTGTGTGTGTGTGT	15
*16-DiGA3'YC	GAGAGAGAGAGAGAG	11
17-DiGA3'T	GAGAGAGAGAGAGAG	-
18-DiCA3'RG	CACACACACACACAC	-
Total		101

* *Primers* selecionados e utilizados para gerar os marcadores ISSR, nos 29 genótipos de seringueira.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos 29 genótipos de seringueira, por meio do uso dos oito *primers*, gerou um total de 101 marcadores ISSR, perfazendo uma média de 12,62 marcadores por *primer*. A elevada porcentagem de marcadores polimórficos e a média de marcadores por iniciador demonstrou a alta variabilidade genética entre os genótipos. Esse resultado pode ser explicado pelas diferentes procedências dos genótipos utilizados e pela eficiência da técnica de ISSR na quantificação da variabilidade em genótipos de seringueira.

Pela matriz de dissimilaridade, observou-se que os valores de distâncias variaram de 0,1 a 0,5 (dados não apresentados), sendo que as maiores distâncias genéticas foram observadas entre os clones 763 e Spr; 768 e 746; 769 e 735 e 752. A maior distância entre o clone 763 e Spr era esperada, considerando que são de espécies diferentes. Gouvêa et al. (2010), utilizando marcadores microssatélites para quantificar a variabilidade entre clones de seringueira, encontraram alta diversidade genética para 60 genótipos de *H. brasiliensis*.

A variabilidade genética entre os 29 genótipos de seringueira, observada no presente estudo, pode ser atribuída à própria natureza de reprodução do gênero, predominantemente alógama, com frequentes eventos de recombinação e segregação. Além disso, os genótipos elite analisados no presente trabalho são procedentes de pools genéticos de diferentes origens.

Em clones de seringueira, já foram relatadas similaridades genéticas com amplitudes bem variadas. Varghese et al. (1997) encontraram similaridade de 0,05-0,75 e Marques et al. (2002) encontram índice de similaridade variando de 0,18 a 0,40, indicando a variabilidade existente nessa espécie. Os marcadores genéticos moleculares já foram também usados em seringueira para identificação de clones, como no trabalho realizado por Gonçalves, Campos e Ferreira Filho (2013), no qual, utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélite identificaram clones de seringueira por perfil único de DNA.

O agrupamento gerado a partir de análises moleculares (Figura 1) revelou a formação de diferentes grupos de similaridade. A correlação cofenética encontrada foi alta ($r = 0,85$), respaldando as interpretações feitas a partir da análise de agrupamento. Esses resultados indicam que o agrupamento dos genótipos demonstrado no dendrograma representou bem as distâncias genéticas estimadas entre os genótipos pela matriz de dissimilaridade. Ventakatachalan et al. (2002), Marques et al. (2002) e Varghese et al. (1997) também verificaram a formação de diferentes grupos de similaridade, sendo que nos trabalhos citados, ancestrais em comum serviram para diferenciar os grupos de similaridade.

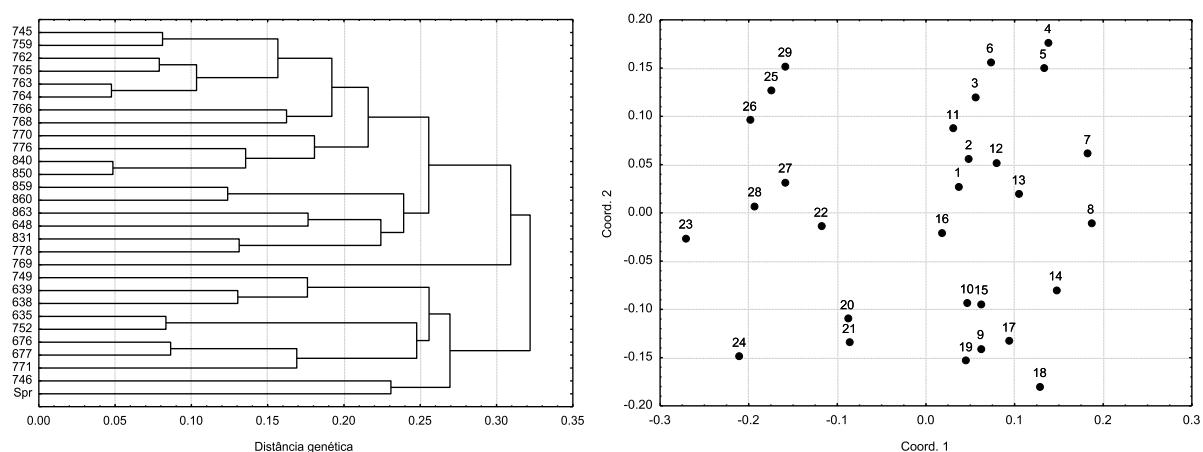


Figura 1. Análise de agrupamento e dispersão gráfica de 29 genótipos de seringueira, com base na matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando-se 101 marcadores ISSR. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento. O método das coordenadas principais foi utilizado na análise de dispersão gráfica. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,85. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2017. Os números, correspondem aos genótipos relacionados na Tabela 1.

Pela análise de agrupamento e dispersão gráfica, observou-se que os genótipos apresentam variabilidade genética entre si, indicando que tais genótipos são importantes para ações de pesquisa e desenvolvimento relacionadas aos programas de caracterização e uso de recursos genéticos e melhoramento da cultura. Esta variabilidade genética verificada entre os clones elite também é importante para respaldar uma futura recomendação desses materiais para plantio, no sentido de aumentar o potencial produtivo dos clones e diminuir a vulnerabilidade genética dos seringais.

Além disso, a exploração adequada dessa variabilidade existente no Banco de Germoplasma de Seringueira da Embrapa Cerrados, por meio da identificação de parentais produtivos e da realização de hibridações controladas entre genótipos com divergência genética satisfatória, poderá ser usada para aumentar a eficiência do melhoramento genético na obtenção de novas cultivares de seringueira.

CONCLUSÃO

Por meio dos marcadores moleculares ISSR é possível quantificar a variabilidade genética existente entre clones elite e outros acessos do banco de germoplasma de seringueira da Embrapa Cerrados e estabelecer diferentes grupos de similaridade. Tais informações são importantes para futuras ações de pesquisa e desenvolvimento envolvendo a recomendação de clones elite para plantio em diferentes regiões e a identificação de parentais produtivos e divergentes entre si, para uso na base de cruzamentos de programas de melhoramento genético.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. T. E.; GONÇALVES, P. S. Diversidade genética em genótipos de *Hevea* de origens amazônica e asiática. *Ceres*, v. 53, n. 307, p. 285-291, 2006.

COSTA, R. B.; GONÇALVES, P. S.; ODÁLIA-RIMOLI, A.; ARRUDA, E. J. Melhoramento e conservação genética aplicados ao Desenvolvimento Local – o caso da seringueira (*Hevea* sp). **Revista Internacional de Desenvolvimento Local** 1:51-58, 2001.

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.

FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. (Comunicado Técnico, No.92).

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: demandas para a pesquisa**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006, 54p.

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.

GOUVÊA, L. R. L.; RUBIANO, L. B.; CHIORATTO, A. F.; ZUCCHI, M. I.; PAULO DE SOUZA GONÇALVES, P. S. Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, n. 33, v.2, p. 308-318, 2010.

MARQUES, J. R. B.; FALEIRO, F. G.; ARAUJO, I. S.; ANHERT, D. Diversidade genética entre clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*) das séries Fx e SIAL com base em marcadores moleculares RAPD. *Agrotropica*, v. 14, n. 3, p. 159-164, 2002.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2008. 846 p.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman, 1973, 573 p.



STATSOFT, Inc. Statistica for Windows (data analysis software system), version 7.1. **Statsoft**, Tulsa, Oklahoma (USA), 2007.

VARGHESE, Y. A.; KNAAK, C.; SETHURAJ, M. R.; ECKE, W. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Hevea brasiliensis*. **Plant Breeding**, v. 116, n. 1, p. 47-52, 1997.

VENKATACHALAN, P.; THOMAS, S.; PRIYA, P.; THANSEEM, I.; GIREESH, T.; SARASWATHY, C. K.; THULASEEDHARAN, A. Identification of DNA Polymorphism among clones of *Hevea brasiliensis* Muell-Arg. using RAPD analysis. **Plant Cell Reports**, v.15, p.172-181, 2002.

WYCHERLEY, P. R. The genus *Hevea* – Botanical aspects. *In*: SETHURAJ, M. R.; MATHEW, N.M. **Natural Rubber: Biology, Cultivation and Technology**. The Netherlands: Elsevier. 1992, p. 50-66

