

## Estudo da Diversidade Genética de Acessos de Seringueira das Coleções da Embrapa

Lídia do Nascimento Cavalcante<sup>1</sup>, Clemeson Silva de Souza<sup>2</sup> e Tatiana de Campos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Acre, bolsista de iniciação científica Pibic/CNPq na Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

<sup>2</sup>Graduado em Ciências Biológicas, mestre em Ciências e Inovação Tecnológica para a Amazônia, Rio Branco, AC.

<sup>3</sup>Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

**Resumo** – A seringueira (*Hevea brasiliensis* Mull.Arg) é a espécie vegetal de maior capacidade produtiva de látex para fabricação de borracha natural. Devido à grande importância dessa cultura muitas coleções *ex situ* para conservar germoplasma foram formadas e precisam ser devidamente caracterizadas. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência dos marcadores microssatélites como ferramenta para estudos de diversidade genética em 50 acessos de *Hevea* spp. e discriminar os acessos por meio de parâmetros genéticos. Amostras foliares foram coletadas no Banco de Germoplasma da Embrapa Cerrados. O DNA foi extraído e a genotipagem foi realizada com 10 locos. As distâncias genéticas foram calculadas utilizando-se a distância modificada de Rogers e foram usadas na construção do dendrograma pelo critério de agrupamento UPGMA. A distância genética variou de 0,16 a 0,90, sendo o clone IAN 873 o mais divergente. As médias de  $H_E$ ,  $H_O$  e PIC foram de 0,86, 0,61 e 0,86, respectivamente. O número de alelos variou de 15 (A2406) a 25 (A2389 e TAs2558), com média de 20,2 alelos por loco. Os dez microssatélites foram eficientes para informar a diversidade genética com elevado polimorfismo. Não houve detecção de material redundante e identificaram-se genótipos divergentes para uso no programa de melhoramento genético.

Termos para indexação: *Hevea* spp., germoplasma, microssatélites.

### Introdução

A seringueira (*Hevea brasiliensis* Mull.Arg) pertence à família Euphorbiaceae e inclui 11 espécies no gênero. A espécie de maior importância é a *Hevea brasiliensis* que apresenta a maior capacidade produtiva de látex direcionado à fabricação de borracha natural (Costa et al., 2001).

O estabelecimento da seringueira como a principal fonte de borracha natural existente é devido as suas excelentes características físico-químicas não obtidas em polímeros produzidos artificialmente. O melhoramento dessa cultura iniciou-se após a introdução de algumas mudas no Sudeste Asiático. Essa região encontra-se livre de ocorrência da doença causada pelo fungo *Microcyclus ulei*, que tem limitado o desenvolvimento da cultura (Le Guen et al., 2009).

Segundo os dados do International Rubber Study Group (2017), em 2016, a produção mundial de borracha natural atingiu 12,4 milhões de toneladas e informações divulgadas pelo IBGE (2017) revelaram que o Brasil produziu 32.270 toneladas. Em virtude da crescente demanda por borracha natural e das constantes destruições das populações naturais, muitas coleções *ex situ* (banco de germoplasma) foram organizadas. Os acessos desses bancos de germoplasma são considerados parte importante da biodiversidade e podem ser usados em pesquisas e em programas de melhoramento. Desse modo, é essencial avaliar a diversidade genética presente nas coleções.

Para a caracterização da diversidade, há vários marcadores moleculares disponíveis. Os marcadores microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) vêm sendo utilizados com sucesso na caracterização da diversidade de clones cultivados e em populações de seringueira

(Souza et al., 2015). Devido as suas características, os microssatélites são marcadores ideais para estudar a variabilidade genética em populações, por serem altamente polimórficos, multialélicos e codominantes (Fortes et al., 2016).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência dos marcadores microssatélites como ferramenta para estudos de diversidade genética em 50 acessos de *Hevea* spp. e discriminar os acessos por meio de parâmetros genéticos.

## Material e métodos

As amostras de folhas dos 50 genótipos (38 acessos de *H. brasiliensis*, 8 híbridos *H. brasiliensis* x *H. pauciflora*, 1 *H. guianensis* e 3 *H. pauciflora*) foram coletadas no Banco de Germoplasma da Embrapa Cerrados e enviadas ao Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LabMol) da Embrapa Acre.

O DNA genômico total foi extraído usando o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987) com modificações e foi quantificado por meio de eletroforese em gel de agarose (1%). Após terem suas concentrações estimadas, as amostras de DNA foram diluídas em OLB a uma concentração de 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

As reações de amplificação foram feitas seguindo o protocolo de Schuelke (2000) com 10 microssatélites desenvolvidos para seringueira (Le Guen et al., 2009). As reações foram preparadas com 20 ng de DNA, 1 U de Taq-DNA polimerase, 2 mM de cloreto de magnésio, 0,25 mM de cada dNTP, 0,16  $\mu\text{M}$  de *primer* direto, 0,2  $\mu\text{M}$  de *primer* reverse, 0,2  $\mu\text{M}$  de *primer* M13 marcado com fluorescências 6-carboxy-fluorescine (FAM) hexachloro-6-carboxy-fluorescine (HEX) e tampão de enzima (1X). As condições de amplificação foram realizadas em termociclador (Analitikjena), com as seguintes etapas: desnaturação inicial do DNA a 95 °C por 5 minutos, seguida de 15 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão a 95 °C por 45 segundos, 59 °C por 1 minuto (-0,5 °C por ciclo) e 72 °C por 1,5 minuto, respectivamente, e 25 ciclos adicionais de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento 52 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1,5 minuto, finalizando com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos das amplificações foram visualizados em gel de agarose (3%), comparados a um marcador de peso molecular padrão (1 Kb).

Após a desnaturação com formamida os fragmentos foram genotipados em sequenciador automático AB 3500xL (Applied Biosystems) no Laboratório de Análises Genéticas e Moleculares da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Para a leitura dos marcadores no sequenciador automático as reações foram organizadas com base no tamanho dos fragmentos e no tipo de fluoróforo utilizado. Os tamanhos alternativos de cada loco foram visualizados na forma de picos, os quais foram marcados junto ao padrão GeneScan-600 (LIZ) em eletroferograma no programa GeneMarker versão 2.7.0.

Para a caracterização da diversidade genética foram realizadas as estimativas de heterozigidade observada ( $H_o$ ) obtidas por:  $H_o = n^\circ$  de heterozigotos/ $n^\circ$  total de indivíduos amostrados e heterozigidade esperada ( $H_e$ ) e expressa pela fórmula abaixo:

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2$$

Os parâmetros foram obtidos no software GDA (Lewis; Zaykin, 2011). Além disso, o programa TFPGA (Miller, 1997) foi utilizado para calcular o número de alelos (N) por loco, obtido pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) expresso pela fórmula:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2f_i^2 f_j^2$$

As distâncias genéticas foram calculadas utilizando-se a distância modificada de Rogers e usadas na construção do dendrograma pelo critério de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

## Resultados e discussão

Os dez microssatélites testados nos 50 acessos foram altamente polimórficos (Figura 1). O número de alelos variou de 15 (A2406) a 25 (A2389 e TAs2558) com uma média de 20,2 alelos por loco. Lekawipat et al. (2003) avaliaram 108 acessos de *Hevea brasiliensis*, incluindo 40 clones cultivados (Wickham) e 68 acessos silvestres (acessos amazônicos de 1981) coletados da Floresta Amazônica, com 12 microssatélites, e encontraram uma variação de 5 a 21, com média de 14 alelos por loco.

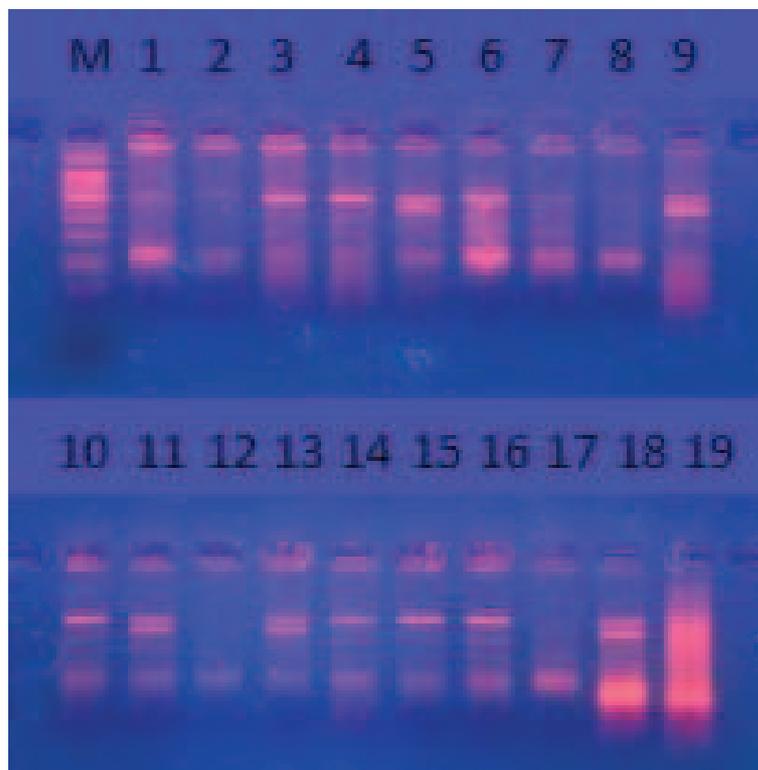


Foto: Lídia do Nascimento Cavalcante

**Figura 1.** Perfil de amplificação em gel de agarose do loco A2368 em 19 acessos de *Hevea* spp., sendo M o marcador de tamanho molecular 50 pb.

Apesar do presente estudo utilizar menor número de locos, identificou mais alelos. Tal fato pode ser decorrente da origem genética dos acessos analisados, pois foram utilizados genótipos selvagens, com base genética mais diversa. Lekawipat et al. (2003) utilizaram maior quantidade de acessos e locos, sendo grande parte clones de Wickham, com base genética estreita, o que contribui para a diminuição de alelos. Segundo Moser e Lee (1994), é importante o número de marcadores utilizados em uma análise e quantidade de acessos estudados, pois esse número pode afetar diretamente a significância das estimativas realizadas.

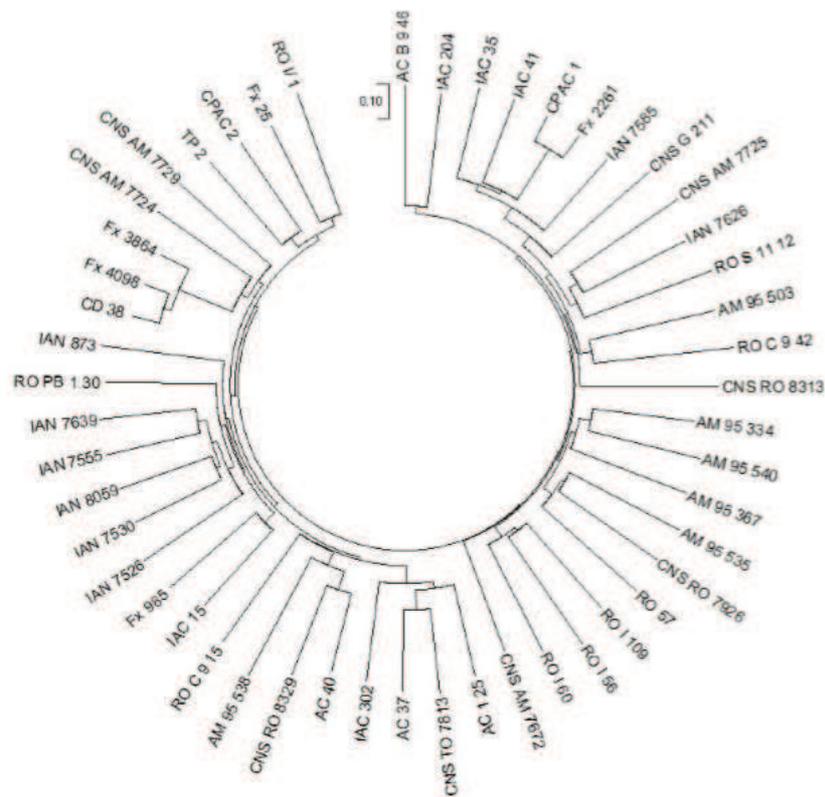
Segundo a classificação definida por Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são definidos como altamente informativos. Dessa forma, os locos utilizados foram informativos. O loco TAs2558 (0,91) foi identificado com o maior valor de PIC e o loco BAC55-B02 (0,82) com o menor valor, sendo a média de 0,86. A heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) foi alta, variou de 0,82 (BAC55-B02) a 0,92 (TAs2558), com média de 0,86. Espera-se que o valor do PIC seja similar ao da estimativa da heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), sendo ambos sinônimos de diversidade genética.

A heterozigosidade observada ( $H_O$ ) variou de 0,42 (A2365) a 0,78 (TAs2558), com média de 0,61. Em todos os locos os valores de  $H_O$  foram inferiores aos de  $H_E$ , indicando um déficit de heterozigotos. A diferença observada entre  $H_E$  e  $H_O$  pode ser em função da ocorrência de alelos nulos e endocruzamento. Esse déficit também foi encontrado no trabalho de Le Guen et al. (2009).

Os dez SSRs de *H. brasiliensis* utilizados amplificaram com eficiência em 12 acessos pertencentes às espécies *H. pauciflora* e *H. guianensis*, além dos híbridos obtidos entre essas espécies. Alguns estudos já testaram a transferibilidade de microssatélites entre espécies de *Hevea* (Mantello et al., 2012; Perseguini et al., 2012). Saha et al. (2005) observaram que SSRs desenvolvidos para *H. brasiliensis* amplificaram *H. benthamiana* e *H. spruceana*, indicando alta conservação de regiões genômicas flanqueadoras de microssatélites nessas espécies.

Com base na distância modificada de Rogers os acessos foram agrupados pelo método UPGMA (Figura 2). A distância genética variou entre 0,16 e 0,90. Outros trabalhos verificaram a diversidade genética com marcadores RAPD em clones da população de Wickham e RRIM e os valores de similaridade genética variaram entre 0,37 e 0,98 (Oktavia; Kuswanhadi, 2011). Fei et al. (2011) analisaram 19 acessos com 36 locos microssatélites e identificaram similaridade entre 0,59 e 0,98. Os valores de distância genética encontrados por esses autores comparados ao deste estudo reforçam que os acessos dos bancos de germoplasma da Embrapa representam a variabilidade da espécie.

Não houve detecção de material redundante na coleção e as análises genéticas geradas no presente estudo contribuirão para o conhecimento e conservação dos acessos de seringueira, além de fornecer informações úteis ao programa de melhoramento da espécie.



**Figura 2.** Agrupamento UPGMA representando a relação genética entre os 50 acessos de *Hevea*, de acordo com a distância modificada de Rogers.

## Conclusões

Conclui-se que os dez microssatélites testados são polimórficos entre os acessos de seringueira e eficientes para caracterizar a diversidade genética e discriminar os acessos. Os SSRs de *H. brasiliensis* são transferíveis para as espécies *H. pauciflora* e *H. rigidifolia*. Não há material redundante na coleção.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), por conceder a bolsa de iniciação científica, e à equipe do Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular e à Dra. Tatiana de Campos pelo apoio, orientação e confiança.

## Referências

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.

COSTA, R. B.; GONÇALVES, P. de S.; RÍMOLI, A. O.; ARRUDA, E. J. Melhoramento e conservação genética aplicados ao desenvolvimento local – o caso da seringueira (*Hevea* sp.). **Interações - Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 1, p. 51- 58, 2001.

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

FEI, Y.; BAO-HUA, W.; SU-PING, F.; JING-YI, W.; WEI-GUO, L.; YAO-TING, W. Development, characterization, and cross-species/genera transferability of SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 3, p. 335-344, 2011.

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, jan./mar. 2016.

IBGE. **Levantamento sistemático sobre pesquisas agrícolas**. Disponível em: <[www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)>. Acesso em: 20 fev. 2017

INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP. **Rubber statistical bulletin**. 2017. Disponível em: <<http://www.rubberstudy.com/pub-stats-bulletin.aspx>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

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, Oct. 2009.

LEKAWIPAT, N.; TEERAWATANASUK, M. M.; RODIER-GOUD, M. S. N.; VANAVICHIT, A.; TOOJINDA T.; TRAGOONRUNG, S. Genetic diversity analysis of wild germplasm and cultivated clones of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. by using microsatellite markers. **Journal Rubber Research**, v. 6, p. 36-47, 2003.

MANTELLLO, C. C.; SUZUKI, F. I.; SOUZA, L. M.; GONÇALVES, P. S.; SOUZA, A. P. Microsatellite marker development for the rubber tree (*Hevea brasiliensis*): characterization and cross-amplification in wild *Hevea* species. **BMC Research Notes**, v. 5, p. 1-13, 2012.

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. Arizona: Northern Arizona University, 1997.

MOSER, H.; LEE, M. RFLP variation and genealogical distance, multivariate distance, heterosis and genetic variance in oats. **Theoretical Applied Genetics**, v. 87, p. 947-986, 1994.

OKTAVIA, F.; KUSWANHADI, M. L. Genetic relationship of Wickham and IRRDB 1981 rubber population based on RAPD markers analysis. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 18, n. 1, p. 27-32, 2011.

PERSEGUINI, J. M. K. C.; ROMÃO, L. R. de C.; BRIÑEZI, B.; SCALOPPI JUNIOR, E. J.; GONÇALVES, P. de S.; BENCHIMOL, L. L. Genetic diversity of cultivated accessions and wild species of rubber tree using EST-SSR markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 8, p. 1087-1094, 2012.

SAHA, T; BINDU R. C.; NACER, 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.

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

SOUZA, L. M. de; LE GUEN, V.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SILVA, C. C.; MANTELLLO, C. C.; CONSON, A. R. O.; VIANNA, J. P. G.; ZUCCHI, M. I.; SCALOPPI JUNIOR, E. J.; FREITAS FIALHO, J. de; MORAES, M. L. T. de; GONÇALVES, P. de S.; SOUZA, A. P. de. 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.