

## Identificação Molecular de Clones de Seringueira com Marcadores Microssatélites

André Lucas Domingos da Silva<sup>1</sup>, Jonatas Chagas de Oliveira<sup>2</sup> e Tatiana de Campos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Biólogo, estudante do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Inovação Tecnológica, Universidade Federal do Acre, bolsista Capes na Ufac, Rio Branco, AC.

<sup>2</sup>Graduado em Ciências Biológicas, técnico da Universidade Federal do Acre, 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*) é amplamente explorada como fonte de borracha natural, um metabólito secundário estratégico e de constituição molecular singular, dotada de características como resistência, elasticidade e impermeabilidade, que somente essa espécie consegue produzir. Entretanto, a genética dos clones comerciais é baseada em poucos genótipos. É essencial certificar que a identidade genética tem sido mantida em bancos de germoplasma. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade e variabilidade genética de 14 acessos comerciais de *H. brasiliensis* utilizando marcadores microssatélites. Os produtos amplificados foram genotipados em gel desnaturante de poliacrilamida (5%). As estimativas genéticas obtidas foram: heterozigiosidade esperada ( $H_E$ ), heterozigiosidade observada ( $H_O$ ), número de alelos por loco (N) e conteúdo de informação polimórfica (PIC). Os 10 locos microssatélites revelaram 79 alelos. As médias de  $H_E$ ,  $H_O$  e PIC foram de 0,78, 0,55 e 0,75, respectivamente. Um dendrograma foi obtido a partir da distância genética modificada de Rogers. Conclui-se que os microssatélites foram polimórficos e acessaram a diversidade dos acessos. Os genótipos analisados não apresentam redundância.

Termos para indexação: diversidade genética, *Hevea brasiliensis*, identidade genética, polimorfismo.

## Introdução

A borracha natural é uma matéria-prima insubstituível para produção de mais de 50 mil produtos como pneus, adesivos, materiais cirúrgicos e outros (Rippel; Bragança, 2009). Dados do International Rubber Study Group (International Rubber Study Group, 2018) mostram que em 2017 a produção mundial de borracha natural foi de 13,5 milhões de toneladas e o consumo foi de 13,2 milhões de toneladas. Mais de 90% dessa produção é oriunda de países do Sudeste Asiático como Tailândia, Indonésia, Malásia, Índia, Vietnã e China, tornando-os autossuficientes (International Rubber Study Group, 2018). No Brasil, a produção foi de, aproximadamente, 32 mil toneladas (IBGE, 2017), a maior parte concentrada nos estados de São Paulo (58%), Bahia (13%), Minas (8%), Mato Grosso (8%) e Goiás (6%), porém, ainda não é suficiente para atender a demanda industrial interna, fazendo-se necessário importar cerca de dois terços da demanda exigida pela indústria (Embrapa, 2016).

A borracha natural pode ser encontrada em mais de 2.500 espécies vegetais que produzem látex (Moreno, 2002), dentre as quais a seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. De Juss.) Muell. Arg] se destaca por possuir características físico-químicas de interesse industrial, tais como resistência à fricção, elasticidade, qualidade da borracha e quantidade produzida pelos indivíduos, o que torna essa espécie a mais explorada comercialmente (Gonçalves; Fontes, 2009; Rippel; Bragança, 2009).

Entretanto, no Brasil, o desenvolvimento dessa cultura encontra dificuldades para se estabelecer em plantios de larga escala em virtude dos severos ataques de ferrugem-foliar, causada pelo fungo patogênico *Microcyclus ulei*, o que torna a produção de borracha natural insuficiente para atender a demanda das indústrias nacionais (Lieberei, 2007).

Para aumentar a produtividade de uma cultura ou selecionar indivíduos resistentes a estresse climático e doenças, existem bancos de germoplasma utilizados em programas de melhoramento genético (Silva et al., 2014). Entretanto essas coleções ex situ (banco ativo de germoplasma – BAG) podem ser redundantes devido à duplicação de acessos e compartilhamento de materiais entre unidades de pesquisa (Shan et al., 2007). Assim, é fundamental que essas coleções sejam caracterizadas corretamente para gerar o perfil genético dos clones que possa ser usado para identificá-los.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade e variabilidade genética de 14 clones comerciais de *H. brasiliensis* utilizando marcadores microssatélites para identificar locos que indicam o perfil molecular para discriminação varietal.

## Material e métodos

O experimento foi conduzido a partir de setembro de 2018 na Embrapa Acre, em Rio Branco, Acre. Amostras foliares de 14 genótipos de *H. brasiliensis* foram coletadas no jardim clonal localizado na Embrapa Acre e levadas ao Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LabMol) da Unidade.

Para extração do DNA, foi utilizado o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990), com modificações (100 mg a 200 mg de amostra foliar, macerados em TissueLyser® Qiagen). A quantificação do DNA foi realizada por meio do Qubit Fluorometer®.

Todas as reações de amplificação seguiram o protocolo de Schuelke (2000). Foram utilizados 10 locos microssatélites para seringueira, desenvolvidos por Le Guen et al. (2009) e utilizados por Souza (2018).

As condições de amplificação foram realizadas em termociclador (Analitikjena), com etapas de 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 a 52 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1,5 minuto, finalizando com uma extensão de 5 minutos a 72 °C. Os produtos das amplificações foram visualizados em gel de agarose a 3% e comparados a um marcador de peso molecular padrão (ladder 50 pb Ludwig Biotecnologia Ltda.).

Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram separados em gel desnaturante de poli(acrilamida) (5%). Para coloração do gel, foi utilizado nitrato de prata (Creste et al., 2001). A interpretação dos fragmentos amplificados foi realizada com marcador de peso molecular padrão (ladder 50 pb Ludwig Biotecnologia Ltda.). Para a caracterização da diversidade genética foram calculados o número de alelos por loco (N), a heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) e heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC). As estimativas foram obtidas pelos softwares TFPGA (Miller, 1997). Utilizaram-se a distância genética modificada de Rogers (Wright, 1978), obtida pelo programa TFPGA, e um dendrograma feito pelo critério de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean).

## Resultados e discussão

Os 10 microssatélites testados foram altamente polimórficos. O número de alelos (N) variou de cinco (A2368 e BAC55-B02) a 11 (A2413 e TA2163) com média de 7,9 alelos por loco (Tabela 1).

**Tabela 1.** Caracterização dos 10 locos em número de alelos por loco (N), heterozigidade esperada ( $H_E$ ), heterozigidade observada ( $H_o$ ) e conteúdo de polimorfismo (PIC) para os 14 acessos estudados.

Loco	N	$H_E$	$H_o$	PIC
A2365	6	0,76	0,50	0,73
A2368	5	0,74	0,50	0,71
A2389	6	0,56	0,42	0,54
A2406	8	0,73	0,42	0,70
A2413	11	0,88	0,78	0,85
A2684	9	0,87	0,57	0,83
A2736	10	0,84	0,71	0,81
BAC55-B02	5	0,74	0,78	0,72
TA2163	11	0,87	0,38	0,84
TAs2558	8	0,85	0,46	0,81
<b>Total</b>	<b>79</b>			
<b>Média</b>	<b>7,9</b>	<b>0,78</b>	<b>0,55</b>	<b>0,75</b>

Em um estudo realizado por Silva (2019), utilizando 15 microsatélites, dos quais 10 fazem parte deste trabalho, em duas populações de seringueira compostas por variedades clonais e indivíduos silvestres, com 18 e 46 indivíduos, respectivamente, obtiveram-se no total 197 alelos, com variação de 3 a 20 alelos por loco e média de 9,3. Ao observar os dados para cada população, o conjunto com 46 indivíduos apresentou média de 11,9 alelos por loco e com 18 indivíduos apresentou média de 6,7 alelos, semelhante a este trabalho. Assim, a coleção presente na Embrapa Acre, apesar de reduzida, apresenta a diversidade alélica aproximada de uma população com quase 50 indivíduos. Dourado (2016), que realizou um estudo com 30 genótipos (silvestres e variedades clonais melhoradas), encontrou variação de 6 a 18 alelos por loco, com média de 13,4 alelos, resultado um pouco superior ao deste estudo. Isso é reflexo da presença de variedades clonais comerciais junto aos indivíduos silvestres no conjunto amostral de Dourado. As populações naturais cedem alelos raros, aumentando as médias obtidas na genotipagem. As diferenças entre as médias de alelos entre as populações do estudo de Silva, Dourado e deste trabalho, segundo Moser e Lee (1994), estão relacionadas à quantidade de indivíduos analisados e também ao quantitativo de marcadores utilizados nos estudos. Essas variáveis podem afetar diretamente a significância das estimativas realizadas.

A heterozigidade esperada ( $H_E$ ) variou de 0,56 (A2389) a 0,87 (A2413), com média de 0,78 (Tabela 1). O estudo de Souza et al. (2015), realizado com 1.117 acessos de seringueira, utilizando 13 microsatélites, dos quais 10 fazem parte do presente estudo, apresentou valores de  $H_E$  variando entre 0,63 e 0,84, com média de 0,76. Isso indica que, mesmo em uma amostragem reduzida de acessos, há variabilidade genética entre os genótipos e por sua vez representa a diversidade da espécie.

Em espécies alógamas como a seringueira são esperados valores altos de heterozigidade observada ( $H_o$ ). Entretanto, neste trabalho, o resultado obtido foi menor que o esperado, indicando um déficit de heterozigotos. Os valores de  $H_o$  neste estudo variaram entre 0,38 (TA2163) e 0,78 (A2413 e BAC55-B02), com média de 0,55. Souza et al. (2015) também encontraram essa deficiência, obtendo valores de  $H_o$  entre 0,57 e 0,69 e média de 0,64.

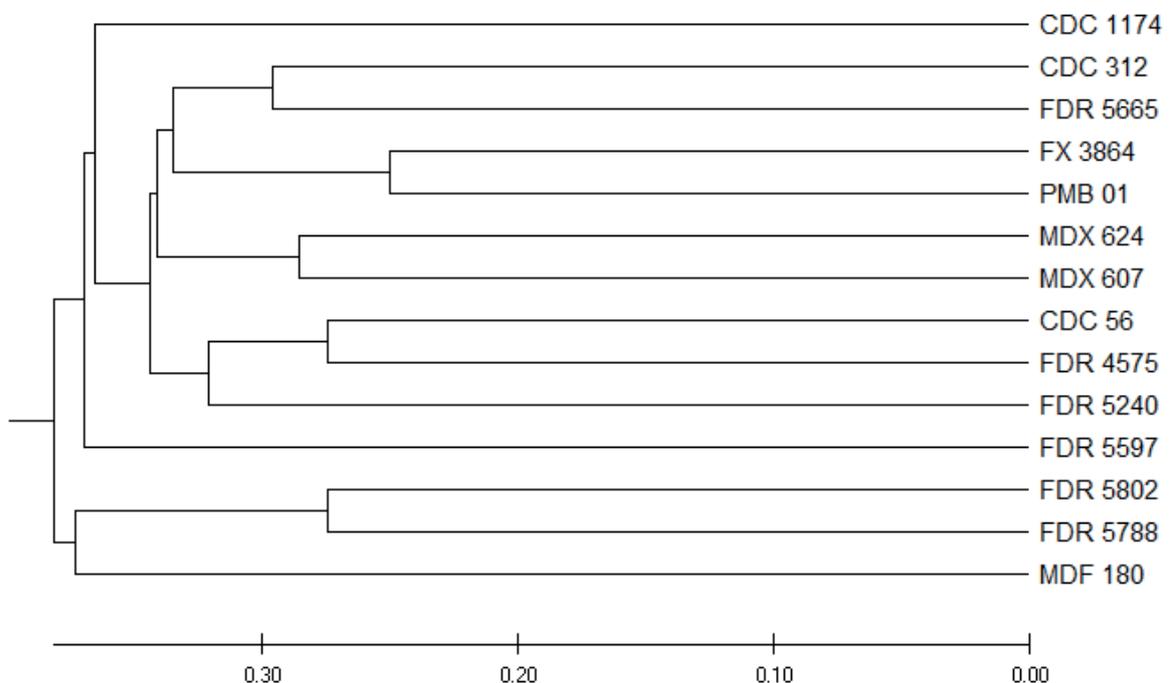
Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram considerados altos para todos os locos estudados. Segundo Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados altamente informativos. Neste trabalho, os valores de PIC variaram entre 0,54 (A2389) e 0,85 (A2413), com média de 0,75 por loco. Portanto, os resultados obtidos indicam que a variabilidade foi acessada com marcadores altamente polimórficos para as estimativas genéticas.

O conjunto de microssatélites analisados apresentou dois marcadores (A2413 e TA2163) com os maiores valores de poder discriminatório ( $H_E$  0,88 e 0,87 e PIC 0,85 e 0,84, respectivamente) que combinados mostraram perfis únicos de bandas para os 14 indivíduos analisados. Assim, o número de microssatélites empregados em estudos com genótipos de seringueira pode ser reduzido, acelerando etapas de bancada e garantindo a correta discriminação e certificação dos indivíduos.

Com base no agrupamento feito em um dendrograma pelo critério UPGMA (Unweighed Pair Group Method With Arithmetic Mean), não foram identificados acessos redundantes no conjunto amostral do estudo, indicando que os indivíduos são diferentes (Figura 1).

Os acessos mais divergentes foram os clones MDF 180 e FDR 5597, com distância genética de 0,84. Na Figura 1 observam-se ambos os indivíduos ligados a parentais mais distantes, evidenciando a distância genética entre eles.

Os indivíduos mais próximos geneticamente foram os clones FX 3864 e PMB 01, com 0,50 de distância. Na Figura 1 é possível verificar esses indivíduos ligados diretamente a um parental comum para ambos.



**Figura 1.** Agrupamento UPGMA relacionando os 14 genótipos de *Hevea brasiliensis*, de acordo com a distância genética modificada de Rogers.

## Conclusões

Os 10 locos microsatélites testados são altamente polimórficos e eficientes para caracterizar a diversidade genética entre os acessos de *Hevea brasiliensis*. Dessa forma, o melhorista pode otimizar o trabalho ao detectar os indivíduos com características singulares de interesse para o melhoramento.

Os locos A2413 e A2163 apresentam perfis únicos de bandas e podem ser utilizados para certificação da identidade de variedades protegidas.

Não foi constatada redundância entre os genótipos analisados. As cultivares MDF 180 e FDR 5597 são as mais contrastantes e podem ser empregadas em programas de melhoramento genético para obtenção de novas variedades.

## Agradecimento

Aos colegas de laboratório pelo empenho ao ensinar a técnica e os métodos estatísticos empregados neste trabalho, à Embrapa Acre por conceder auxílio técnico e infraestrutura para realização deste estudo e à Capes pelo auxílio financeiro por meio da concessão da bolsa.

## 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.
- 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, n. 4, p. 299-306, 2001.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- DOURADO, C. L. **Melhoramento em progênies de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. de Juss.) Muell.-Arg.] por caracteres quantitativos e marcadores moleculares do tipo SSR em duas populações de diferentes procedência**. 2016. 97 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- EMBRAPA. Agropensa. **Produção agrícola**. 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agropensa/bases-de-dados>. Acesso em: 2 ago. 2019.
- GONÇALVES, P. D. S.; FONTES, J. R. A. Domesticação e melhoramento da seringueira. In: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. (Ed.). **Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas**. Viçosa: UFV, 2009. p. 395-423.
- IBGE. **Levantamento sistemático sobre pesquisas agrícolas**. 2017. Disponível em: [www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br). Acesso em: 9 ago. 2019.
- INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP. **Statistical summary of world rubber situation**. 2018. Disponível em: <http://www.rubberstudy.com/statistics.aspx>. Acesso em: 9 ago. 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.
- LIEBEREI, R. South American leaf blight of the rubber tree (*Hevea* spp.): new steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. **Annals of Botany**, v. 100, n. 6, p. 1125-1142, 2007.

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. 33 p.

MORENO, R. M. B. **Avaliação e monitoramento das propriedades do látex e da borracha natural de clones de seringueira recomendados para plantio no planalto do Estado de São Paulo**. 2002. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

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.

RIPPEL, M. M.; BRAGANÇA, F. do C. Natural rubber and nanocomposites with clay. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 818-826, 2009.

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.

SILVA, M. S. **Diversidade, estrutura genética e parentesco em populações de [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Aдр. de Juss.) Muell.-Arg.] conservadas ex situ**. 2019. 81 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

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.

SOUZA, C. S. de. **Caracterização da diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de seringueira**. 2018. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Inovação Tecnológica) – Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco.

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

SHAN, F.; CLARKE, H. J.; YAN, G.; PLUMER, J. A.; SIDDIQUE, K. H. M. Identification of duplicates and fingerprinting of primary and secondary wild annual Cicer gene pools using AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 3, p. 519-527, 2007.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 590 p. V. 4: variability within and among natural populations.