

Divergência Genética de Seringueira Baseado em Marcadores EST-SSRs

LINEU R. C. ROMÃO¹; JULIANA M. K. C. PERSEGUINI²; LUCIANA B. RUBIANO³;
PAULO S. GONÇALVES⁴; JORGE C. M. MONDEGO⁵.

Nº 11119

RESUMO

Hevea brasiliensis é a espécie de árvore mais amplamente cultivada para a produção de látex, borracha natural. A conservação e utilização dos recursos genéticos são essenciais para a melhoria das espécies cultivadas. Neste estudo, examinamos a utilidade dos EST-SSRs para avaliar a diversidade genética de 51 árvores de borracha, e verificar a possibilidade de transferibilidade desses marcadores para seis espécies selvagens de *Hevea*. A quantidade de informações fornecidas por distância genética modificada de Roger foi usada para analisar dados de EST-SSR, e UPGMA dividiu as amostras em três grandes grupos com alta diferenciação genética entre eles ($F_{ST}= 0,28$). O software Structure também foi realizado e distribuiu os 51 clones em oito grupos. Considerando todos os genótipos e o agrupamento do Structure, o arranjo era tal que correspondia ao agrupamento dendrograma. Os 30 EST-SSRs polimórficos mostraram o número de 2 a 10 alelos e eles foram transferidos para amplificar seis espécies selvagens. Esse estudo destacou que microssatélites funcionais (EST-SSRs) foram muito eficientes na avaliação da diversidade genética entre os clones de seringueira e foram capazes de gerar informações suficientes para garantir o seu uso entre os materiais estreitamente relacionados. O ciclo reprodutivo da seringueira estende-se entre os 20-30 anos, distribuídos ao longo de três etapas, de seleção, polinização e avaliação de rendimento. O conhecimento prévio da diversidade genética dos pais pode ser preditiva para a sua capacidade de combinação, a fim de diminuir o número de cruzamentos dialélicos e pode ser explorada por melhoristas para direcionar cruzamentos e gerar amplos cultivares.

1. Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, UNICAMP, Campinas-SP,
karlineu@yahoo.com.br

2. Colaboradora: Doutorado em Genética e Melhoramento Vegetal e Biotec., IAC, Campinas-SP,

3. Orientadora: Pesquisadora, IAC, Campinas-SP,

4. Coorientador: Pesquisador, IAC/EMBRAPA, Campinas-SP,

5. Colaborador: Pesquisador, IAC, Campinas-SP.

ABSTRACT

Hevea brasiliensis is the most widely cultivated tree species for producing natural rubber latex. The conservation and utilization of genetic resources is essential for improvement of crop species. In this study, we examined the usefulness of EST-SSRs for assessing the genetic diversity of 51 rubber trees, and verified the transferability of this marker system for six wild species of *Hevea*. The amount of information provided by modified Roger's genetic distance was used to analyze EST-SSR data, and UPGMA clustering divided the samples in three major groups with high genetic differentiation among them ($F_{ST} = 0.28$). Structure software was also performed and the distributed the 51 clones in to eight groups. Considering all the genotypes and Structure clustering, the arrangement was such that corresponded to the dendrogram clustering. The 30 polymorphic EST-SSRs showed a range of alleles 'number from 2 to 10 and they were transferable to amplify six wild species. This study highlighted that functional microsatellites (EST-SSRs) were very efficient in evaluating the genetic diversity among the rubber tree clones and were capable of generating sufficient information to ensure their use among very closely related materials. Breeding cycle in rubber extends to 20-30 years between pollination and yield assessment, distributed over three selection stages. The previous knowledge of the parental genetic diversity may be predictive for their combining ability in order to diminish the number of diallel crosses and could be exploited by breeders in order to direct further crosses and generate broad-based cultivars.

INTRODUÇÃO

Hevea brasiliensis (Wild. Ex. Adr. De. Juss. Muell. Arg.) É nativa da Floresta Amazônica, e é uma das espécies de árvore mais amplamente cultivada para a produção de látex, borracha natural da árvore. Borracha foi uma mercadoria inegavelmente benéfica nos últimos 100 anos (Priyadarshan e Gonçalves, 2003). De acordo com Gonçalves et al. (2002), apesar de ser o berço da seringueira e do principal produtor e exportador no final do século XIX, o Brasil passou a importar esta matéria-prima no início do século passado. Dados do IRSG (2011) mostraram que em 2009 a produção mundial de borracha natural atingiu 9.702 milhões de toneladas, dos quais o Brasil só tem contribuído com 107.800 toneladas, cerca de 1% do total. Seringueira é uma espécie perene de polinização cruzada e monóica da família Euphorbiaceae e tem um longo processo de melhoramento, com ciclos de seleção e

muitas dificuldades em levantar 'progênies F2'. Neste grupo, a análise genética convencional é bastante difícil e consome muito tempo (Saha et al., 2007). Marcadores moleculares têm sido usados para acessar o conteúdo da diversidade genética entre genótipos de seringueira (Besse et al, 1994;. Shoucai et al, 1994;. Luo et al, 1995;. Low et al, 1996;. Varghese et al, 1997. ; Lespinasse et al, 2000;. Roy et al, 2004;.. Saha et al, 2005).

Microsatélites ou Simple Sequence Repeats (SSRs) apresentam características de co-dominância, alto polimorfismo, ampla cobertura do genoma e herança mendeliana. Assim por diante, eles são capazes de discriminar indivíduos intimamente relacionados (BRONDANI et al. 1998). Há alguns relatos que mostram o uso bem sucedido e aplicação de SSRs em melhoramento de seringueira (Venkatachalam et al, 2006;. Feng et al, 2009;. Guen et al, 2009;... Gouvêa et al, 2010, Le Guen et al, 2011). A presença de SSRs em transcrições de genes conhecidos sugere que eles poderiam ter um papel na expressão do gene ou função. EST-SSRs (Expressed Sequence Tag) foram já desenvolvidos para *Hevea* sp. (Feng et al, 2009).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e extração de DNA

Um total de 45 genótipos de seringueira (*H. brasiliensis*), do Instituto Agrônomo (IAC, Campinas, SP, Brasil), e seis selvagens (*H. guianensis*, *H. rigidifolia*, *H. nitida*, *H. pauciflora*, *H. benthamiana* e *H. camargoana*) gentilmente fornecido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brasil) foram usados neste estudo. DNA genômico total foi extraído de pó liofilizado folhas jovens usando o método CTAB (Hoisington et al., 1994). Os genótipos do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) consistiam de asiáticos, Africano, da Amazônia e da série IAC.

Análise SSR

Um total de 30 EST-SSRs foram selecionados do estudo realizado por Feng et al. (2009). Estes marcadores são derivados de uma biblioteca de cDNA desenvolvida para analisar a expressão de gene em laticíferos por Chow et al. (2007).

Amplificações foram realizadas em um volume final de 15 µL contendo 50 ng de DNA, tampão 1X, 0,2 µM de cada primer, 100 µM de cada dNTP, 2,0 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, e 0,5 U de Taq DNA polimerase. As seguintes condições foram utilizadas para amplificação: 1 min a 94° C, em seguida, 30 ciclos de

1 min a 94º C, 1 min na temperatura específica de anelamento para cada SSR e 1 min a 72º C, com uma extensão final de 5 min a 72º C. Os produtos PCR foram verificados em agarose 3% separados por eletroforese em gel de poliacrilamida de 6% e posteriormente colorados com nitrato de prata.

Análise de dados

Os dados EST-SSR foram marcados pela presença (1) ou ausência (0) de bandas, e os resultados foram transformados em dados genotípicos para identificar loci e frequências alélicas. As distâncias genéticas (GDs) foram calculadas a partir dos dados EST-SSR para todos os possíveis pares consanguíneos utilizando a distância genética Modificada de Roger (MRD; Goodman e Stuber, 1983), versão 1.3 (Miller, 1997).

Os valores de conteúdo de polimorfismo (PIC) foram calculados utilizando a seguinte fórmula:

$$PIC = \sum_{i=1}^n f_i^2 - \sum \sum 2f_i^2 f_j^2 \quad \text{Formula 1.}$$

Onde f_i é a frequência do alelo i^o (marcador) para o i^o locus do SSR (Lynch e Walsh, 1998). Discriminação valores de potência (DP) para o primer k^o foram calculados utilizando a fórmula::

$$DP_k = 1 - \sum_{j=1}^I p_j \frac{Np_j - 1}{N - 1} \quad \text{Formula 2.}$$

Onde N é o número de indivíduos e p_j é a frequência do padrão j (Tessier et al, 1999). PIC foi utilizado para medir a informação de um determinado *locus* marcador para o conjunto de genótipos, enquanto DP foi usado para medir a eficiência de SSRs para identificar variedades, levando em consideração a probabilidade de dois indivíduos escolhidos aleatoriamente para ter padrões diferentes. Mudanças na variabilidade genética das populações foram avaliadas pela estimativa de heterozigosidade esperada (H_e), número de alelos, desequilíbrio de ligação F_{st} , as estatísticas F para a hierarquia das populações (F_{is}). A estrutura genética da amostra foi investigada utilizando o algoritmo de agrupamento Bayesiano implementado pelo Structure v.2.2 (Pritchard et al., 2000). O modelo 'Admixture' foi usado em todo o conjunto de dados sem nenhuma informação prévia da população, além da opção "non-correlated allele frequencies between populations". Dez corridas foram aplicadas

com o burn-in de 200.000 e um comprimento de execução de 500.000 interações, realizadas por um número de clusters que varia de $K = 2$ para $K = 20$. Para determinar o número mais provável de grupos, a estatística “ad hoc” definidos por Evanno et al.(2005) de ΔK foi usado. A média dos valores absolutos de $L'(K)$, dividido pelo desvio padrão, onde $L(K)$ representa a probabilidade média de mais de dez corridas plotados para cada K . A análise hierárquica da variância foi realizada para testar a significância da diferenciação entre as populações e os grupos, definido pelo software Structure.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de diversidade genética dos clones de seringueira

O dendrograma (Figura 1) apresentou alta variabilidade genética com as distâncias genéticas que variaram de 0,35-0,77. Uma alta estrutura genética foi observada a partir do padrão de agrupamento, que foi capaz de dividir os 51 clones em três grandes grupos. O primeiro grupo foi composto principalmente pelos clones do IAC, desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético do Instituto Agronômico de (clones IAC). Os clones asiáticos e africanos também foram agrupados dentro deste grupo. O segundo grupo consistiu de clones provenientes da Malásia (RRIM = Rubber Research Institute of Malaysia) e o terceiro grupo consistiu de seis espécies de *Hevea* distintas, apresentando maior distância genética. Este último grupo mostrou uma clara separação entre espécies selvagens de *Hevea* em relação a outros genótipos de *H. brasiliensis*. Estas amostras foram submetidas a vários ciclos de reprodução, já que as maiores distâncias genéticas interespecíficos são observadas. No dendrograma (Figura 1), pôde-se observar que a menor distância genética foi intraespecífica e pertencentes aos genótipos derivados da mesma instituição (Grupo 1: PB = Prang Besar, Grupo 2: PB = Prang Besar e RRIM). Além disso, os genótipos IAC (Grupo 1) apresentaram maior distância genética de clones da Malásia (Grupo 2), sugerindo uma maior variabilidade genética entre genótipos brasileiros que poderia ser explicada pela pressão de seleção presente em cada programa de melhoramento.

A heterozigosidade total observada (H_o) para o grupo 1 foi de 0,25883 e a heterozigosidade esperada (H_e) foi de 0,60264; para o grupo 2, H_o foi de 0,27090 e H_e 0,51366. Para o terceiro grupo, a H_o foi de 0,25606 e H_e 0,64131. Inesperadamente, a heterozigosidade observada nas amostras de população reprodutora foram tão elevadas como as amostras selvagens. Isto poderia sugerir que os heterozigotos têm sido preferencialmente selecionados no âmbito dos programas

de melhoramento, uma característica muito importante quando se considera a importância de manter a diversidade genética em programas de melhoramento (Jones et al, 2006). O *Fst* (Weir e Cockerham, 1984) foi alto (27,64%) e destacou que há uma grande porção da variabilidade entre os grupos do dendrograma. Além disso, 72,36% de variação foi repartido entre as populações (FIS).

Os EST-SSRs utilizados neste estudo foram muito eficientes na promoção da distinção de acessos de seringueira que têm parental comum, masculino e feminino, como observado pelos clones seguintes: 1) RRIM 710 e RRIM 713, cujos pais foram RRIM 601 e 701 RRIM; 2) RRIM 908 e RRIM 911, derivada do cruzamento PB 5 / 51 e RRIM 623, 3) RRIM 915 e RRIM 919, cujos pais foram RRIM 605 e PB 5 / 51 (Figura 1). Os clones PB235 (falso) e PB235 (verdadeiro) poderia ser perfeitamente diferenciados (Figura 1) pelos EST-SSRs, provando que esses marcadores poderiam ser muito úteis para a realização de análise de impressões digitais eficaz. De fato, as impressões digitais podem ser aplicadas para verificar a identidade dos parentais dos clones durante a micropropagação e para certificar a pureza de híbridos da F1. O uso de marcadores moleculares para realizar análise de impressão digitais foi relatado por outros autores (Caruso et al, 2008;.. Treuren van et al, 2010), com a mesma eficiência para separar genótipos fenotipicamente semelhantes, como nos dois PB235 clones utilizados neste estudo.

De fato, os EST-SSRs usados foram muito eficientes para acessar a diversidade genética de *Hevea brasiliensis*, uma vez que foram capazes de dividir os genótipos de seringueira em dois grandes grupos claramente estruturados. Um conjunto de SSRs genômicos utilizados por Gouvea et al (2010) dividiu estes clones em seis grupos distintos, porém a divisão não foi tão clara como a mostrada por esses marcadores EST-SSRs.

Os SSRs reportados por Feng et al(2009) foram usados para estabelecer uma correspondência entre o dendrograma e agrupamentos do Structure (Figura 1 e Figura 3), observou-se que o grupo um do dendrograma correspondeu inteiramente aos grupos do Structure I, II, IV e VI. O grupo dois do dendrograma correspondeu ao grupos do Structure III e VII, enquanto o grupo três do dendrograma correspondeu inteiramente ao grupo VI da divisão do Struture. Assim, a análise do Structure foi também eficiente para acessar a organização genética de espécies de *Hevea*, embora ele tenda a gerar uma diferenciação mais profunda de subgrupos.

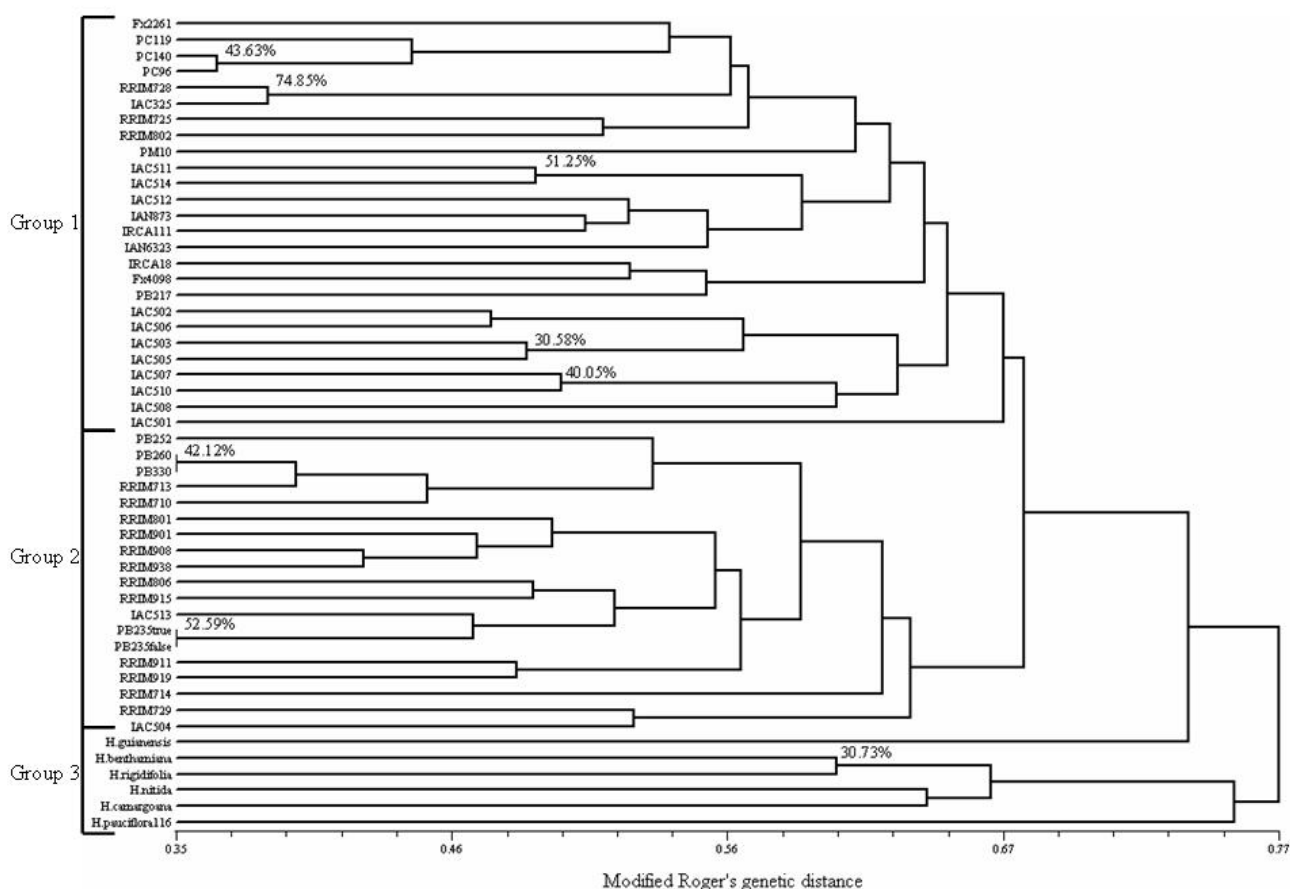


Figura 1. Análise de UPGMA cluster de distâncias genéticas modificada de Roger com base em dados de 30 EST-SSRs, utilizados na avaliação dos 51 clones de seringueira. Nós do Bootstrap foram representados em percentuais.

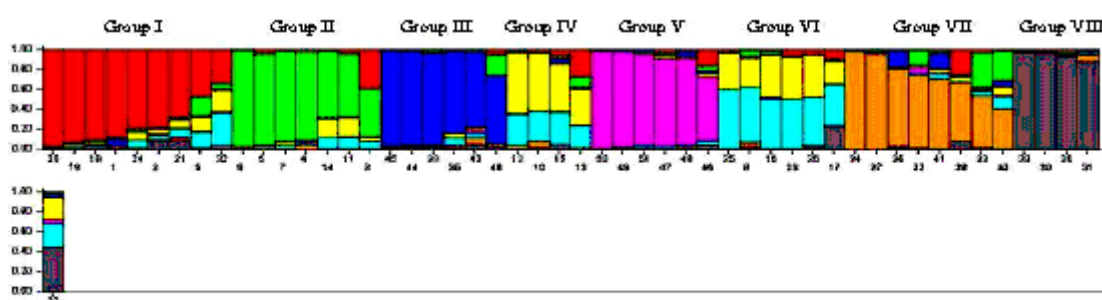


Figura 3. Distribuição dos 51 clones de seringueira em grupos de acordo com a análise do Structure ($k = 8$), com base nos 30 EST-SSRs utilizados na avaliação dos 51 genótipos de seringueira. Os clones foram representados por barras verticais, sendo cada cor associada a um grupo diferente.

CONCLUSÃO

Avaliação de germoplasma tem implicações importantes para o melhoramento genético da seringueira, em termos de previsão da capacidade de combinação gênica ou à procura de novos alelos. A diversidade genética encontrada entre os clones

avaliados pode ser explorada por melhoristas a fim de planejar melhor os cruzamentos. Além disso, SSRs podem ser úteis e importantes para realizar análises de impressões digitais, e na liberação de novo cultivar. Além disso, estes marcadores também poderiam ser usados para estudos filogenéticos, incluindo diferentes espécies *Hevea* como são totalmente transferíveis entre eles. Finalmente, em relação às perspectivas de programas de melhoramento de seringueira a seleção assistida por marcadores (MAS), poderia ser uma ferramenta útil para aumentar a eficiência do melhoramento, encurtando experimentos de longa duração, reduzindo o trabalho de campo e custos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao IAC, pela oportunidade de estágio.

À FAPESP, pelo financiamento do projeto

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564-567

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*). *Mol. Breeding*, v.23, p.85-97, 2009.

GOUVEA, L. R. L. et al. Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers. *Genet. Mol. Biol.* [online]. 2010, vol.33, n.2, pp. 308-318.

V. LE GUEN, C. GAY, T. C. XIONG, L. M. SOUZA, M. RODIER-GOUD and M. SEGUIN (2011). Development and characterization of 296 new polymorphic microsatellite markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Breeding* 130, 294—296

Odong T.L., van Heerwaarden J., Jansen J., van Hintum T.J.L., van. Eeuwijk F.A. (2011). Determination of genetic structure of germplasm collections: are traditional hierarchical clustering methods appropriate for molecular marker data? *Theor Appl Genet*, doi 10.1007/s00122-011-1576-x.

Tim H. Jones, Dorothy A. Steane, Rebecca C. Jones, David Pilbeam, René E. Vaillancourt, Brad M. Potts (2006). Effects of domestication on genetic diversity in *Eucalyptus globules*. *Forest Ecology and Management*, 234:78–84.



5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2011
9 a 11 de agosto de 2011 – Campinas, SP
