



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –
CITA



**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ESPECTROSCÓPICA DE
CLONES DE *Hevea brasiliensis* (SERINGUEIRA)**

ANDRÉ LUCAS DOMINGOS DA SILVA

RIO BRANCO, AC
Junho / 2020

ANDRÉ LUCAS DOMINGOS DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ESPECTROSCÓPICA DE
CLONES DE *Hevea brasiliensis* (SERINGUEIRA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

Orientador: Dr^a. TATIANA DE CAMPOS

Co-orientadora: Dr^a. CLARICE MAIA CARVALHO

RIO BRANCO, AC
Junho / 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA – CITA


**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ESPECTROSCÓPICA DE
CLONES DE *Hevea brasiliensis* (SERINGUEIRA)**

ANDRÉ LUCAS DOMINGOS DA SILVA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 01 de junho de 2020



TATIANA DE CAMPOS
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA



ANSELMO FORTUNATO RUIZ RODRIGUEZ
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE



MARCUS VINICIO NEVES D'OLIVEIRA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

À Deus, por sempre abençoar minha vida, e à
minha família, que me apoiou todos os dias.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter abençoado minha vida com saúde e sabedoria durante essa etapa.

À meus queridos pais, que me apoiaram possibilitando total dedicação na concepção deste trabalho.

À Dr^a. Tatiana de Campos, pela excelente orientação e pelos ensinamentos. Tenho certeza que cresci academicamente, profissionalmente e como pessoa, graças a você.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Inovação Tecnológica para a Amazônia, pela oportunidade de dar continuidade em minha formação profissional e acadêmica.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pela assistência técnica de pessoal qualificado e estrutura necessária para condução dos experimentos.

À coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa. Sem esse auxílio seria extremamente difícil me manter no programa e cumprir os prazos.

Aos queridos colegas de laboratório, Jônatas Oliveira, Nathalia Almeida, Lídia Cavalcante e Clemesson Souza por me ensinar as técnicas laboratoriais e os procedimentos estatísticos com tanta paciência e cuidado.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Inovação Tecnológica para a Amazônia, pelos ensinamentos.

À todas as pessoas que de alguma forma participaram da construção deste trabalho.

A todos vocês, muito obrigado!

RESUMO

A seringueira (*Hevea brasiliensis*) é a espécie mais explorada para obtenção de borracha natural a partir do seu látex. Esta matéria prima é amplamente utilizada na indústria da pneumática, materiais médicos e derivados da borracha. Sua importância se dá por produzir látex com qualidade e quantidade superior de polímeros de borracha em relação as demais espécies, tornando a borracha natural um material estratégico no setor. Muitas variedades clonais comerciais têm sido desenvolvidas nos programas de melhoramento. A identificação morfológica é, muitas vezes, subjetiva e insuficiente para a diferenciação dos genótipos. Assim, há uma demanda por ferramentas de identificação de plantas. Marcadores moleculares tem sido usado em outras culturas com sucesso. Outro método que tem se mostrado assertivo na discriminação de espécies arbóreas da Amazônia foi a espectroscopia VIS-NIR. Com o objetivo de discriminar clones comerciais de seringueira, as duas técnicas foram utilizadas. Dez microssatélites foram testados e a combinação de dois locos (A2365 e A2368) foi eficiente para discriminar os clones com perfil alélico único. A espectroscopia VIS-NIR apresentou potencial de discriminação dos clones utilizando a faixa VIS em folhas jovens e a faixa NIR em folhas maduras com presença de doença. Conclui-se que ambas as técnicas foram capazes de diferenciar os clones possibilitando a certificação clonal.

Palavras-chave: Certificação clonal, *Fingerprinting*, Infravermelho Próximo, Microssatélite.

ABSTRACT

The rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is the most exploited species for obtaining natural rubber from its latex. This raw material is widely used in the pneumatics, medical materials and rubber products industry. Its importance is given by producing latex with superior quality and quantity of rubber polymers in relation to other species, making natural rubber a strategic material in the sector. Many commercial clonal varieties have been developed in breeding programs. Morphological identification is often subjective and insufficient to differentiate genotypes. So, there is a demand for plant identification tools. Molecular markers have been used successfully in other cultures. Another method that has been shown to be assertive in the discrimination of tree species in the Amazon was the VIS-NIR spectroscopy. In order to discriminate commercial rubber clones, both techniques were used. Ten microsatellites were tested and the combination of two loci (A2365 and A2368) was efficient in discriminating clones with a single allelic profile. VIS-NIR spectroscopy showed potential for discrimination of clones using the VIS strip on young leaves and the NIR strip on mature leaves with the presence of disease. It is concluded that both techniques were able to differentiate the clones enabling clonal certification.

Keywords: Clonal certification, Fingerprinting, Near Infrared, Microsatellite.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1. | Distribuição geográfica do gênero <i>Hevea</i> . Fonte: adaptado de Souza (2018). | 14 |
| Figura 2. | Fotos das características morfológicas de <i>Hevea</i> spp. (A) Árvore adulta; (B) extremidade de um ramo lateral de um racemo; (C) Fruto; (D) Semente; (E) Casca; (F) Madeira. Fonte: Árvores Brasileiras (1992). | 16 |
| Figura 3. | Analogia entre a impressão digital do polegar humano e a impressão digital genética. Fonte: Faleiro et al., 2011. | 20 |
| Figura 4. | Dendrograma relacionando 15 genótipos de <i>H. brasiliensis</i> , de acordo com a distância genética modificada de Rogers para o agrupamento no método UPGMA com dez microssatélites. Linhas pontilhadas destacam os três grupos formados (A, B e C). | 43 |
| Figura 5. | Gráfico de delta (K) com $K = 2$, obtido pela aplicação do modelo estatístico de Evanno et al. (2005), no programa STRUCTURE, a partir da análise dos 15 clones comerciais de <i>H. brasiliensis</i> . | 44 |
| Figura 6. | Histograma relacionando os 15 genótipos de <i>H. brasiliensis</i> de acordo com a análise bayesiana gerada pelo programa STRUCTURE. As colunas representam os indivíduos. As cores representam os dois pools gênicos ($K=2$). | 45 |
| Figura 7. | Espectros pré-tratados inteiros (A, B e C) pelo método MSC em folhas de diferentes estádios fenológicos para os 14 clones: Folhas jovens (A); Folhas maduras (B) e Folhas maduras com presença de doenças (C). Eixo X: comprimento de ondas; Eixo Y: Absorbância. | 54 |
| Figura 8. | Análise de componentes principais de folhas jovens. Espectro visível (A) e Espectro NIR (B). | 56 |
| Figura 9. | Análise de componentes principais de folhas maduras. Espectro na faixa Visível (A) e Espectro na faixa NIR (B). | 57 |
| Figura 10. | Análise de componentes principais de folhas maduras com presença de doença. Espectro visível (A) e Espectro NIR (B). | 58 |

LISTA DE TABELAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Tabela 1. Lista de variedades clonais de <i>H. brasiliensis</i> mais conhecidas e sua respectiva origem. | 19 |
| Tabela 2. Acessos de <i>H. brasiliensis</i> e a descrição do país de coleta e genitores. | 37 |
| Tabela 3. Descrição dos dez locos microssatélites, incluindo a sequência do primer, motivo repetitivo e amplitude alélica. | 38 |
| Tabela 4. Caracterização de dez microssatélites em 15 acessos de <i>Hevea brasiliensis</i> com os parâmetros genéticos: número de alelos por loco (N); Alelos raros (A) Heterozigosidade esperada (H_E); Heterozigosidade observada (H_O); conteúdo de polimorfismo (PIC) e Poder discriminatório (DP). | 40 |
| Tabela 5. Genotipagem baseada em impressões digitais com os locos microssatélites A2365 e A2368. | 42 |
| Tabela 6. Acessos de <i>H. brasiliensis</i> presentes no jardim clonal da Embrapa Acre. | 52 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL..... | 12 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 14 |
| 2.1 ASPECTOS GERAIS DO GÊNERO <i>Hevea</i> | 14 |
| 2.2 HISTÓRICO DE PRODUÇÃO DE BORRACHA | 16 |
| 2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA SERINGUEIRA..... | 17 |
| 2.4 CLONES COMERCIAIS DE SERINGUEIRA | 18 |
| 2.5 FINGERPRINTING MOLECULAR DE PLANTAS..... | 20 |
| 2.6 ESTUDOS MOLECULARES NO GÊNERO <i>Hevea</i> | 21 |
| 2.7 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)..... | 23 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 27 |
| 3. OBJETIVOS | 34 |
| 3.1 GERAL | 34 |
| 3.2 ESPECÍFICOS | 34 |
| 4. CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DE PADRÕES ALÉLICOS PARA <i>FINGERPRINTING</i> DNA DE SERINGUEIRA COM MARCADOR MICROSSATÉLITES..... | 35 |
| 4.1 INTRODUÇÃO | 36 |
| 4.2 MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 4.2.1 Material vegetal | 37 |
| 4.2.2 Análise dos microsatélites | 37 |
| 4.2.3 Análises estatísticas..... | 39 |
| 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 39 |
| 4.4 CONCLUSÃO | 46 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 47 |
| 5. CAPÍTULO II: POTENCIAL DA TÉCNICA DE ESPECTROSCÓPIA VIS-NIR PARA IDENTIFICAÇÃO DE CLONES DE SERINGUEIRA..... | 50 |
| 5.1 INTRODUÇÃO | 51 |
| 5.2 MATERIAL E MÉTODOS | 51 |
| 5.2.1 Coleta do material | 52 |
| 5.2.2 Análise dos dados..... | 52 |
| 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 53 |
| 5.4 CONCLUSÃO | 60 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 61 |

| | |
|------------------------|----|
| CONCLUSÕES GERAIS..... | 64 |
|------------------------|----|

1. INTRODUÇÃO GERAL

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. de Juss.) Muell. – Arg], ocorre naturalmente na América do Sul e é considerada uma das espécies mais importantes do gênero *Hevea*. Sua importância se deve ao cultivo para obtenção do látex, utilizado para produção de borracha natural (GONÇALVES et al., 1989a; PRIYADARSHAN; CLEMENT-DEMANGE, 2004; HOMMA, 2012).

A espécie ganhou destaque comercial, pois possui características únicas que o tornam vital para indústria de pneus e derivados da borracha (MORENO et al., 2008). A borracha natural é superior aos polímeros sintéticos, pois apresenta elevada elasticidade, impermeabilidade e resistência a fricção (PRIYADARSHAN; CLEMENT-DEMANGE, 2004; PRIYADARSHAN et al., 2009).

Entretanto, esta cultura enfrenta grandes problemas fitossanitários. O fungo patogênico *Microcyclus ulei* (Henn.) Arx., causador do mal-das-folhas, dizimou seringais no Brasil em meados de 1930 (LIEBEREI, 2007). Os países do sudeste asiático, por possuírem condições climáticas desfavoráveis para o crescimento de *M. ulei*, conseguiram estabelecer áreas de cultivo e tornaram-se os maiores produtores de látex no mundo, caracterizando estes locais como áreas de escape (WEBSTER; BAULKWILL, 1989; *International Rubber Study Group – IRSG*, 2017).

Para superar problemas de produtividade e resistência da planta ao *M. ulei* no Brasil e no mundo, diversos estudos de melhoramento genético têm sido desenvolvidos (GONÇALVES et al., 2013; GONÇALVES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017). O uso de variedades específicas em razão dos seus níveis de tolerância ou produtividade, são resultantes das recomendações das pesquisas nos programas de melhoramento. A busca de novas cultivares clonais comerciais é uma demanda constante dos programas. Mas as variedades devem apresentar um genótipo único para obter um certificado de uso (ROSA et al., 2010). Para discriminar, métodos de caracterização e identificação são empregados, porém ainda não há estudos que verificam a autenticidade dos clones de seringueira lançados.

Para detectar as diferenças genéticas que possam diferenciar plantas, marcadores moleculares como microsatélites são utilizados. Entretanto, o uso de muitos marcadores é um fator que prolonga o tempo de análises e os custos envolvidos. Tessier et al. (1999) desenvolveram um parâmetro que avalia o poder discriminatório de marcadores moleculares, a partir de um perfil alélico único para cada indivíduo, utilizando um ou mais locos combinados.

Desse modo, é possível selecionar marcadores altamente informativos com a finalidade de utilizar o menor número possível deles sem perder poder informativo da técnica molecular.

A genética molecular tem se mostrado eficiente na caracterização e discriminação de seringueiras (LE GUEN, 2009; SOUZA et al., 2015; SOUZA, 2018). Em um estudo com mais de 1000 genótipos de seringueira e 13 microssatélites, foi possível agrupar indivíduos segundo sua origem, bem como detectar amostras redundantes e determinar uma coleção nuclear com apenas 99 indivíduos que representaram 85% da diversidade genética total (SOUZA et al., 2015). Essa identificação possibilitou rastrear a origem geográfica e verificar sua identidade, além de otimizar a coleção de plantas sem perder a variabilidade genética.

Outra técnica que pode ser usada é a espectroscopia no infravermelho próximo (*Near Infrared Spectroscopy* – NIRS), que tem se mostrado eficiente, e de baixo custo para discriminar indivíduos da mesma espécie (SIRISOMBOON et al., 2013). Para isso, diferentes amostras vegetais podem ser analisadas, como madeira, folhas, sementes, vagens, dentre outros (CARNEIRO, 2008; VERAS et al., 2010; SIRISOMBOON et al., 2013). Bergo (2014) desenvolve a certificação de mogno, espécie de corte proibido, e espécies semelhantes a partir do NIRS utilizando blocos de madeira.

Os resultados da técnica molecular e espectroscopia no do infravermelho proximo apontam grande poder de detecção e possuem capacidade de agrupar os indivíduos segundo a origem do material e/ou por espécie. Além disso, revela o possível uso dessa ferramenta para discriminação de plantas de interesse, certificação de coleções presentes em entidades pesquisadoras bem como identificação de variedades protegidas e para fins de fiscalização.

Considerando importância econômica da seringueira e a restrita base genética nos clones comerciais, torna-se essencial identificar ferramentas robustas para a atribuição do perfil singular de cada um deles.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DO GÊNERO *Hevea*

As plantas laticíferas estão agrupadas em sete famílias: Euphorbiaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Moraceae, Papaveraceae e Sapotaceae (CORNISH et al., 1993). A família Euphorbiaceae é composta por aproximadamente 334 gêneros, dos quais 72 ocorrem no Brasil, contemplando mais de 2500 espécies de plantas (PRIYADARSHAN; CLEMENT-DEMANGE, 2004; TRINDADE; LAMEIRA, 2014). Destas, o Brasil possui 11 espécies conhecidas no gênero *Hevea*: *H. brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell.-Arg.; *H. guianensis* Aublet; *H. benthamiana* Muell.-Arg.; *H. pauciflora* (Spruce ex Benth.); *H. nitida* Mart. ex Muell.-Arg.; *H. spruceana* (Benth.); *H. paludosa* Ule Jarb.; *H. rigidifolia* (Spruce ex Benth.) Muell.-Arg.; *H. camporum* Ducke; *H. microphylla* Ule e *H. camargoana* Pires (GONÇALVES et al., 1997; SECCO, 2008), e sua distribuição pode ser observada na Figura 1.



Figura 1. Distribuição geográfica do gênero *Hevea*. Fonte: adaptado de Souza (2018).

O gênero *Hevea* começou a ser descrito para registro taxonômico e classificação em 1775, ano em que Jean Baptiste Christian Eusée-Aublet descreveu a espécie *H. guianensis* (PRIYADARSHAN et al., 2009). Em 1791, Richard realizou a alteração do nome *Hevea* para *Siphonia*, que era uma latinização de *Heve*. Em 1824, Jussieu publicou o binômio *Siphonia brasiliensis* para a seringueira verdadeira. Entretanto, em 1865 o gênero *Hevea* foi restabelecido para atender o código Internacional de Nomenclatura, dessa forma, ficou estabelecido o binômio *Hevea brasiliensis* para seringueira (PIRES et al., 2002).

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Will. Ex Adr. De Juss.) Muell. Arg.] é nativa da região Amazônica (GONÇALVES et al., 1989a). Algumas características são comuns entre as espécies do gênero *Hevea*: são plantas lenhosas e arbóreas (exceto *H. camargoana* que é arbustiva); pertencem ao grupo das dicotiledôneas, são plantas monoicas e suas folhas são compostas trifoliadas; possuem flores unissexuadas e pequenas, com disposição em racimo, as quais apresentam-se na cor roxa avermelhada em *H. spruceana* e amarelada nas demais espécies (SECCO, 2008).

Comumente em *Hevea*, as flores possuem um cálice com cinco lobos que surgem de um disco basal de cinco glândulas, mas não apresentam pétalas. Seu fruto normalmente contém três sementes que ficam dispostas em uma cápsula trilobular e possui deiscência explosiva, exceto em *H. spruceana* e *H. microphylla* (GONÇALVES et al., 1990b) (Figura 2).

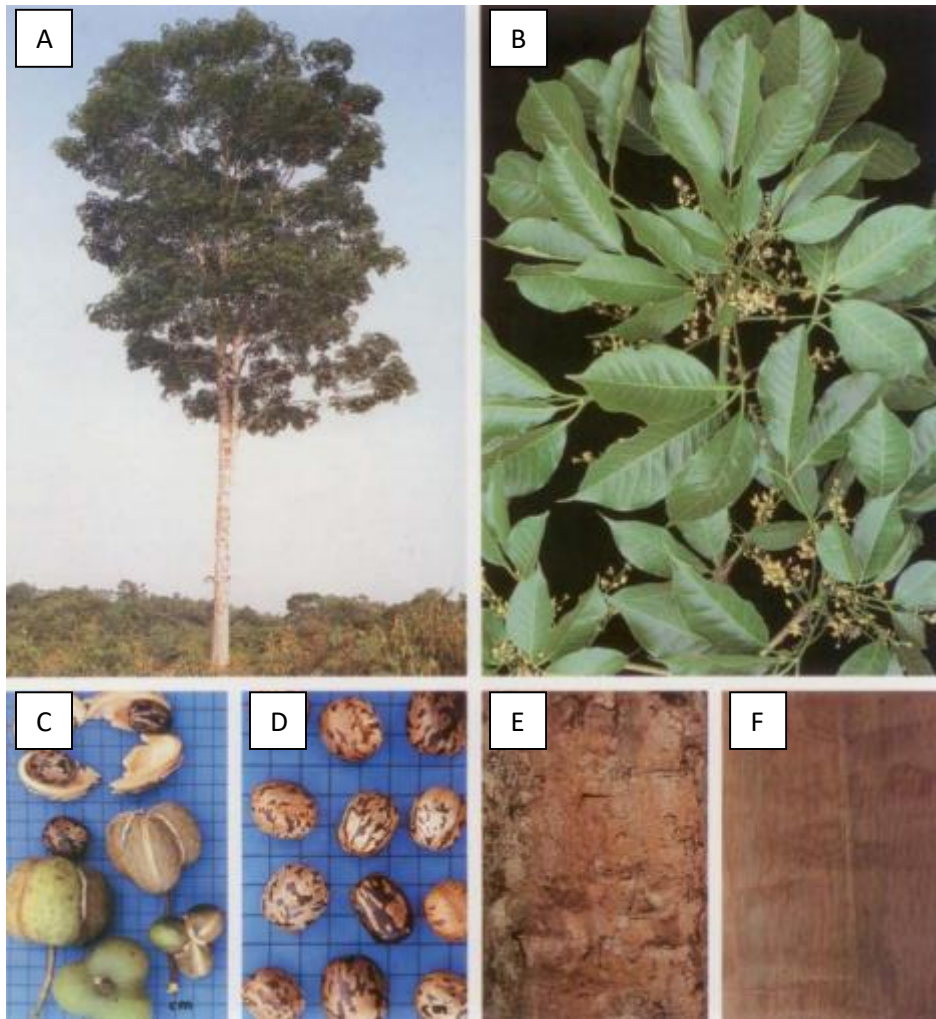


Figura 2. Fotos das características morfológicas de *Hevea* spp. (A) Árvore adulta; (B) extremidade de um ramo lateral de um racemo; (C) Fruto; (D) Semente; (E) Casca; (F) Madeira. Fonte: Árvores Brasileiras (1992).

2.2 HISTÓRICO DE PRODUÇÃO DE BORRACHA

Historicamente o Brasil foi o maior produtor mundial de borracha natural até 1912. No mesmo período, os países do sudeste asiático investiam nessa cultura, iniciando a sua produção até superar o quantitativo produzido pelo Brasil e fazendo com que, mais tarde, perdesse a condição de país exportador (MARTINS; ARRUDA, 1993).

No início do século XX, durante o “ciclo da borracha”, o Brasil contribuía com 98% de toda a produção mundial (BERNARDES et al., 1990). Entretanto, ainda na década de 1930, uma doença foliar devastadora denominada “mal-das-folhas”, causada pelo ascomiceto *Microcyclus ulei* (Henn.) Arx, gerou muitos prejuízos nos locais de ocorrência natural (LIEBEREI, 2007).

Em razão disso, a seringueira passou a ser cultivada para fins comerciais em diversos países. Sua domesticação fora da área de ocorrência natural se iniciou em 1876, quando Henry Wickham visitou Boim, no estado do Pará, e coletou cerca de 70 mil sementes. Estas foram levadas para o Jardim Botânico Real em Londres, porém, em razão da alta recalcitrância da semente, poucas mudas foram obtidas. As mudas que germinaram foram levadas a países do sudeste asiático formando a base das plantações existentes naqueles países (WEBSTER; BAULKWILL, 1989).

A domesticação da seringueira foi possível graças a excelente capacidade de adaptação da planta as diferentes condições ecológicas (GONÇALVES; MARQUES, 2008). Fatores como baixa umidade do ar e poucos meses de precipitação, diminuem o período de troca de folhas e molhamento dos folíolos, evitando a proliferação *M. ulei* (ALVARENGA; CAMARGO, 2008). Além disso, há a existência de áreas não infestadas pelo fungo, conhecidas como “áreas de escape”.

Os países do sudeste asiático como a Tailândia, Indonésia, Malásia, Índia, Vietnã e China obtiveram sucesso no plantio e destacam-se por terem se tornado os maiores produtores de borracha natural no mundo (WEBSTER; BAULKWILL, 1989; IRSG – *International Rubber Study Group*, 2017). Em 2018, a Ásia foi responsável por produzir 12,6 milhões de toneladas de borracha natural, aproximadamente 90% da produção mundial, que alcançou a marca de 13,9 milhões de toneladas, enquanto que a América do Sul produziu apenas 339 mil toneladas, cerca de 2,4% da produção mundial (IRSG, 2020).

2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA SERINGUEIRA

O látex é uma suspensão aquosa composta por 30 a 40% de partículas de borracha (GONÇALVES et al., 1990a). Estas partículas são constituídas por unidades de poli-isopreno (C_5H_8) tornando-se um polímero de hidrocarbonetos. A borracha natural é um metabólito secundário (*cis* 1,4 poli-isopreno) proveniente do floema secundário da planta (PRIYADARSHAN; CLEMENT-DEMANGE, 2004). Apresenta alto peso molecular e mostra-se superior aos polímeros sintéticos, ganhando destaque comercial no que diz respeito a resistência, elasticidade e impermeabilidade (GONÇALVES et al., 1990a; PRIYADARSHAN et al., 2009). Assim, esta matéria prima passou a ser utilizada em fábricas para manufatura de produtos amplamente utilizados, como pneus, produtos de uso médico e também em calçados, adesivos e outros materiais que demandam das características da borracha natural (MORENO

et al., 2008). Além de *H. brasiliensis*, as espécies *H. pauciflora* e *H. rigidifolia* também são capazes de produzir borracha natural, porém, com menor teor de polímeros de borracha (GONÇALVES et al., 1989b; GONÇALVES et al., 1990a).

No Brasil, as maiores plantações de *H. brasiliensis* encontram-se no estado de São Paulo (69%), seguido dos estados da Bahia (7%), Goiás (6%), Minas Gerais (5%), Mato Grosso (5%) e Espírito Santo (4%), responsáveis por cerca de 2,3% da produção mundial em 2018, aproximadamente de 333 mil toneladas, movimentando 749 mil reais em 2018 (IBGE, 2019).

2.4 CLONES COMERCIAIS DE SERINGUEIRA

Para garantir a produtividade, o cultivo de clones de seringueira vem sendo empregados em plantações, pois apresentam uniformidade de características desejáveis. Entretanto, a uniformidade nas plantações pode apresentar baixa resistência a doenças e mudanças ambientais, uma vez que possuem base genética restrita (GONÇALVES; MARQUES, 2008).

Os clones comerciais são obtidos de cruzamentos e são classificados em primários, secundários e terciários. Os primários são provenientes de parentais desconhecidos; os secundários são obtidos a partir de cruzamentos controlados entre clones primários e, por fim, os terciários são obtidos de cruzamentos onde pelo menos um parental é um clone secundário (GONÇALVES et al., 2001).

O melhoramento genético possibilita a obtenção de genótipos cada vez mais promissores (SIMÕES NETO et al., 1999). Estas variedades são identificadas com abreviaturas baseadas em sua origem (GONÇALVES; MARQUES, 2008) e as mais conhecidas estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de variedades clonais de *H. brasiliensis* mais conhecidas e sua respectiva origem (SOUZA, 2018).

| Abreviação | Local de Origem |
|-------------------|---|
| AC | Acre, Brasil |
| AVROS | Algemene Vereniging Rubber planters Oostkust Sumatra, Indonésia |
| CDC | Clavellina Dothidella Resistant |
| CNS | Centro Nacional de Seringueira, Brasil |
| FA | Ford Acre, Brasil |
| FB | Ford Belém, Brasil |
| FDR | Firestone Dothidella Resistant, Brasil |
| Fx | Ford cruzamento, Brasil |
| GU | Guatemala |
| GI | Glenshiel, Malásia |
| GT | Godang Tapen, Indonésia |
| Har | Harbel, Libéria |
| IAC | Instituto Agronômico de Campinas, Brasil |
| IAN | Instituto Agronômico do Norte, Brasil |
| IRCA | Institute de Recherches sur le Caoutchouc |
| LCB | S'Lands Caoutchouc Bedrijven, Indonésia |
| MDF | Madre de Dios Firestone, Brasil |
| MDX | Madre de Dios Cruzamento, Brasil |
| PB | Prang Besar, Malásia |
| PFB | Pé-franco da Belterra, Brasil |
| PR | Proefstation voor rubber, Indonésia |
| PMB | Plantação Michelin Bahia, Brasil |
| RO | Rondônia, Brasil |
| RRIC | Rubber Research Institute of Ceylon, Sri Lanka |
| RRIM | Rubber Research Institute of Malaysia, Malasia |
| SIAL | Seleção do Instituto Agronômico de Leste, Brasil |
| Tjir | Tjirandji, Indonésia |

2.5 FINGERPRINTING MOLECULAR DE PLANTAS

O DNA ou RNA são sequências nucleotídicas que armazenam todas as informações que constituem um ser vivo. Cada indivíduo possui um perfil genético único, determinado pela sequência de nucleotídeos que constituem seu material genético. Este perfil gera uma identidade molecular denominada DNA *fingerprinting* (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O *fingerprinting* é uma impressão digital genética exclusiva de um indivíduo, podendo ser comparada a uma impressão digital utilizada em documentos de identidade (Figura 3).

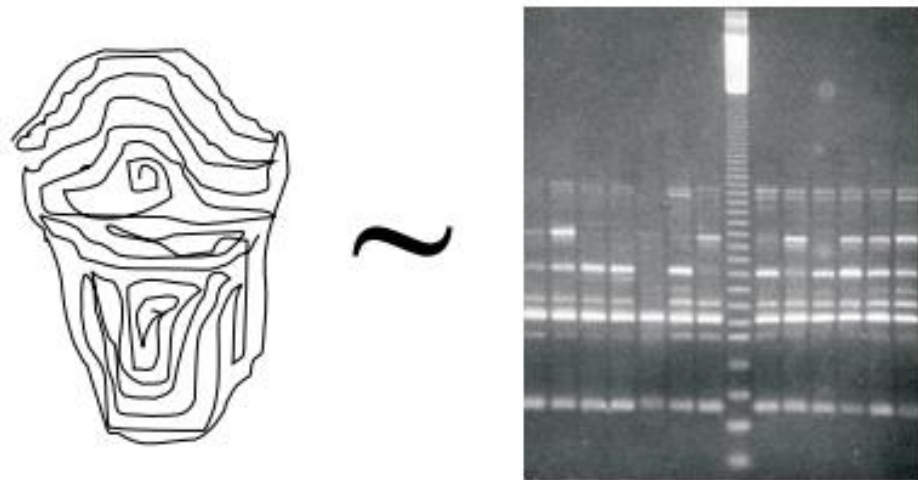


Figura 3. Analogia entre a impressão digital do polegar humano e a impressão digital genética. Fonte: Faleiro et al., 2011.

Instituições de pesquisa enfrentam problemas para compartilhamento de dados em razão de problemas de identificação do material genético. Os principais erros são de homonímia (o mesmo nome para diferentes acessos); sinonímia (diferentes nomes para o mesmo acesso); má administração de materiais genéticos; etiquetagem errada; mistura de material de propagação (sementes, mudas, estacas, fragmentos para enxertia, etc) e crescimento de ramos entre parcelas (FALEIRO et al., 2011).

Variedades de cultivares melhoradas são continuamente lançadas, e muitas delas tendem a ser semelhantes devido ao estreitamento da base genética da maioria das espécies cultivadas, dificultando a identificação morfológica destas entre as existentes. Isto cria a necessidade de melhoria em métodos de identificação e abre horizontes para sua utilização na certificação e proteção de propriedade intelectual das variedades comerciais (SCHUSTER et al., 2009).

A análise de *fingerprinting* tem se mostrado eficiente para identificação e tem sido utilizada com sucesso em trabalhos de diversidade e *fingerprinting* molecular (WANG et al.,

2017, WHITE et al., 2018). Yamada et al. (2004) utilizaram marcadores RAPD em uma coleção de germoplasma com 40 acessos de Cacau e conseguiram caracterizar dois acessos antes identificados incorretamente, além de observar a existência de redundância de duas variedades clonais que se tratavam do mesmo acesso.

Rosa et al. (2010), utilizaram 24 locos microssatélites para caracterizar 14 variedades de batata. Os resultados obtidos permitiram discriminar todas as variedades utilizando dois microssatélites e determinaram perfis genéticos únicos para cada indivíduo.

Miranda et al (2015) analisaram 21 variedades elite de mandioca com 33 ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Quatro *primers* foram selecionados para *fingerprint* por apresentar alto poder discriminatório (probabilidade de dois indivíduos aleatórios apresentar alelos diferentes, $D=1-C$).

Ferreira (2019) realizou um estudo para estabelecer *fingerprinting* para abacaxi, foram utilizados 24 *primers* ISSR em 14 variedades de abacaxi. Nove *primers* foram suficientes para gerar o *fingerprinting* desse conjunto de genótipos. Para dissimilaridade genética foram identificados valores entre 0,15 e 0,38. As baixas distâncias genéticas permitiram a formação de nove agrupamentos. Cada grupo foi formado por indivíduos coletados na mesma região, correlacionando o local de coleta e a origem.

Estes trabalhos demonstram a capacidade de discriminação entre variedades clonais, rastreamento de origem, detecção de redundâncias e o potencial para certificação clonal para a proteção à cultivares (SCHUSTER et al., 2009).

2.6 ESTUDOS MOLECULARES NO GÊNERO *Hevea*

Para realizar estudos de caracterização genética, marcadores moleculares podem ser empregados com eficiência pois utilizam informações armazenadas no DNA que são herdadas geneticamente, para diferenciar dois ou mais indivíduos (MILACH, 1998).

Besse et al. (1994), utilizaram marcador codominante *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) em 164 indivíduos provenientes de populações silvestres e cultivadas de *H. brasiliensis*. Foram encontrados altos níveis de polimorfismo nos clones cultivados e formação de agrupamentos distintos entre os acessos selvagens. Os autores sugeriram a incorporação dos materiais em programas de melhoramento.

Trabalhos utilizando marcadores dominantes também foram desenvolvidos. O marcador *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) foi eficiente para confirmar a identidade de 17 genótipos do jardim clonal da Universidade de Lavras/MG. Os autores encontraram um erro de

identificação em dois genótipos, descritos como o clone comercial RRIM 701. Também detectaram o agrupamento de plantas redundantes (BICALHO et al., 2008).

Outro marcador codominante comumente utilizado é o microssatélite. Os marcadores microssatélites ou repetições de sequências simples (*Simple Sequence Repeats – SSR*), são regiões de DNA com repetições em *tandem* de pequenas unidades de um a seis nucleotídeos. Estas repetições estão presentes por todo o genoma e para acessá-las são utilizadas sequências flanqueadoras. Assim, devido a variações no número de repetições do microssatélite, obtemos o polimorfismo dos indivíduos analisados (VIEIRA et al., 2016). Estes marcadores são eficientes pois possuem grande poder discriminatório, apresentando um número alto de alelos e heterozigidade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1988). Em razão destas características, tornaram-se ideais para estudos de identificação molecular (VIEIRA et al., 2016).

Os microssatélites contribuíram significativamente em estudos no gênero *Hevea*. Low et al. (1996), conseguiram detectar altos índices de polimorfismo nas espécies *H. guianensis*, *H. camargoana*, *H. pauciflora*, *H. banthamiana* e *H. brasiliensis* armazenadas em bancos de dados. Bibliotecas enriquecidas foram criadas por Atan et al. (1996), Bindu-Roy et al. (2004) e Saha et al. (2005), possibilitando a identificação de grandes números de marcadores microssatélites.

Lespinasse et al. (2000) desenvolveram o primeiro mapa genético para *H. brasiliensis*, utilizando marcadores RFLPs, AFLPs, isoenzimas e SSR. Os microssatélites também foram úteis em estudos de diversidade genética realizados por Lekawipat et al. (2003) e Saha et al. (2005). A partir do desenvolvimento de biblioteca enriquecida, Souza et al. (2009) desenvolveram 27 marcadores microssatélites para *H. brasiliensis*. Le Guen et al. (2010) também desenvolveram 296 novos marcadores microssatélites com base em biblioteca enriquecida.

Em um estudo com 307 genótipos coletados em 19 pontos distintos ao longo das bacias hidrográficas da Amazônia foi detectada diferenciação genética entre as populações de acordo com a separação das redes hidrográficas da região (LE GUEN et al., 2009). Um estudo com mais de 1000 genótipos com 13 marcadores microssatélites (SOUZA et al., 2015) permitiu agrupar os genótipos por local de origem, revelando um potencial de rastreamento de indivíduos com identidade perdida ou com identificação equivocada. Nesta pesquisa, também foi possível detectar acessos redundantes, possibilitando a identificação correta das amostras e/ou exclusão de indivíduos.

Souza (2018), realizou um estudo semelhante com 318 acessos de *Hevea* sp. armazenados em coleções *ex situ*. No trabalho foi possível realizar o agrupamento de clones

comerciais asiáticos com 46 indivíduos de origem amazônica. Também foi possível estabelecer uma coleção nuclear com 59 acessos preservando 85% da diversidade genética total. Esses trabalhos mostram que a espécie tem correlação da divergência genética e sua origem, possibilitando inferir o local de coleta.

Trabalhos com base no sequenciamento de nova geração também têm sido desenvolvidos. Salgado (2014) realizou uma Montagem de novo e na análise do transcriptoma de clones comerciais de *H. brasiliensis* por RNA-seq e encontrou 2.628 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), 1.397 microssatélites (SSRs) e 13.563 genes diferencialmente expressos. Outro estudo com RNA-seq realizado por Mantello et al. (2019), buscou avaliar a resposta a frio em genótipos de referência na heveicultura, RRIM 600 (resistente ao frio) e GT 1 (tolerante ao frio), e encontraram marcadores SSRs, SNPs e sítios de *splicing* alternativo, que configuram mecanismos de adaptação a estresse abiótico.

Estudos com mapeamento genético também foram desenvolvidos em *H. brasiliensis*. Conson (2016) realizou o mapeamento genético-molecular e análise de locos de características quantitativas (QTLs) associados e identificaram 19 QTLs relacionados ao crescimento. A partir da genotipagem por sequenciamento (GBS) foi possível mapear 1.082 marcadores, entre SSRs e SNPs, fornecendo novos dados em regiões ainda pouco saturadas.

2.7 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)

Um clássico experimento executado por Newton em 1666, mostrou uma luz branca passando através de um prisma se decompondo em cores distintas. Essa região que se vê é chamada de espectro visível, uma pequena fração do espectro eletromagnético (HEWITT, 2002; MARTINS; SILVA, 2015). Posteriormente em 1800, Sir Frederick estudou uma região deste espectro a partir da manipulação de temperaturas, hoje essa região é conhecida como “infravermelho” (BLANCO; VILLARROYA, 2002).

A região do infravermelho próximo situa-se imediatamente acima do espectro visível em termos de comprimento de onda, ou seja, é a região mais “próxima” após a região visível, seu comprimento de onda tem intervalo de 781 a 2500 nm (número de onda: 12.800 e 4.000 cm^{-1}) (HALLIDAY, 2007).

A espectroscopia no infravermelho tem ampla aplicabilidade, sendo capaz de analisar de moléculas pequenas á sistemas complexos como células e tecidos (BERTHOMIEU; HIENERWADEL, 2009). O princípio empregado na espectroscopia é a interação da vibração de moléculas, originadas da radiação eletromagnética do equipamento com a amostra do estudo

(PASQUINI, 2003). A eficiência da técnica tem popularizado o uso do equipamento, fazendo com que esteja presente em muitos laboratórios, e sua versatilidade permite analisar diversos tipos de matriz, em estado sólido, amorfo ou cristalino, como também soluções aquosas, solventes orgânicos, madeiras e folhas (MANTSCH; CHAPMAN, 1995; FORATO et al., 2010).

De acordo com a teoria quântica, a radiação eletromagnética é formada por fótons de energia, ao incidir sobre uma amostra orgânica, ela poderá ser absorvida ou não (BARBOSA, 2007). Uma molécula apresentará absorção no infravermelho quando suas vibrações moleculares sofrerem alterações no momento dipolar (PRICE et al., 2001). Como cada molécula apresenta um modo de vibração característico, isto se torna útil para identificação dos compostos, principalmente os grupos funcionais: O-H, N-H, C=O (PRICE et al., 2001; BARBOSA, 2007; PAVIA et al., 2010). Esta interação entre a radiação e as amostras podem ocorrer por meio da absorvância, reflectância, transmitância e transflectância, a sua escolha depende do tipo de amostra e equipamento que será utilizado. A reflectância e transmitância são os métodos mais utilizados, o primeiro para sólidos, o segundo para líquidos (BARBOSA, 2007).

Para obter um espectro por reflectância deve-se incidir a radiação infravermelha sobre uma amostra, essa interação ocasiona oscilações induzidas que podem excitar os átomos ou moléculas, fazendo-os irem de um nível energético a outro (PRICE et al., 2001). Quando a amostra saltar um nível, estará absorvendo a radiação, e quando voltar, estará refletindo, assim, o espectro será obtido a partir da diferença nos níveis de absorvância e reflectância em cada material (BARBOSA, 2007).

O espectro no infravermelho é capaz de confirmar a ausência ou presença de determinado agrupamento funcional, utilizando um grande número de bandas de absorção como base, os picos podem ser interpretados pela frequência, intensidade, comprimento de onda e estruturas finas presentes no espectro. Fornecendo informações sobre o ambiente químico, natureza e concentração de átomos e moléculas (PRICE et al., 2001; BARBOSA, 2007).

Os espectros podem apresentar elevado número de variáveis em uma única amostra, em razão dessa densidade de dados, é necessário utilizar ferramentas para trata-los e extrair as informações relevantes, outro ponto importante no tratamento é a correção de erros ou falhas que ocorrem no decorrer das etapas de obtenção do espectro, desde a coleta e processamento das folhas, até a coleta dos espectros no equipamento (FERREIRA et al., 1999). Ao remover dados anômalos, deformados, e ruídos com o pré-tratamento dos dados, possibilitando a formulação de um modelo mais representativo dos dados (COSTA FILHO, 2003).

Outro cuidado ao tratar dados, é a execução de métodos corretivos de desvios, gerados por diferenças na granulometria das amostras e orientação das partículas, que ocasionam o espalhamento indesejado da luz. A correção do espalhamento multiplicativo (*Multiplicative Scatter Correction* - MSC) é um pré tratamento muito utilizado nestes casos, a correção aplicada possibilita que todas as amostras tenham o mesmo nível de espalhamento da amostra de referência, semelhante à média espectral das demais amostras (COSTA FILHO, 2003; CHEN et al., 2013).

Devido ao grande número de variáveis geradas a partir dos espectros, faz-se o uso de ferramentas estatísticas multivariadas, estas análises permitem a classificação, manipulação e interpretação dos dados obtidos (BLANCO; VILLARROYA, 2002). Uma das ferramentas mais utilizadas na interpretação dos dados é a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis* - PCA), essa análise correlaciona um grande número de variáveis, por meio de combinações lineares, criando um novo conjunto de variáveis que podem ser melhor interpretadas (MENDES, 2014).

A reconfiguração dos dados é feita a partir de um novo sistema de eixos para representar as amostras utilizando um número menor de fatores. Assim, a natureza multivariada dos dados pode ser observada definindo componentes principais que se alinhem com os dados (FERREIRA et al., 1999). Desta forma, a função das componentes principais é descrever a variação entre os pontos usando o menor número possível de eixos, pois a PCA permite agrupar amostras a partir de diferenças e similaridades, reduzindo a dimensão do conjunto de dados, ao mesmo tempo que preserva o máximo de informações (BARROS NETO, 2006).

O *Near Infrared Spectroscopy* (NIRS), têm sido utilizados para discriminação de matrizes distintas como compostos orgânicos, tecidos vegetais e elementos compostos e substâncias mais complexas, pois apresentam resultados precisos a partir de análises rápidas, não-destrutivas e qualitativas (FOLEY et al., 1998).

A eficiência desta técnica com materiais semelhantes tem sido comprovada em diversos estudos, Xie et al. (2007) conseguiram discriminar 164 frutos de tomates (*Solanum lycopersicum* L.), onde 70 frutos eram transgênicos e 94 eram não transgênicos, utilizando a PCA com MSC otimizaram o resultado apresentando 100% de acerto ao discriminar as amostras em dois grupos distintos (transgênicos e não-transgênicos).

Em um estudo para analisar folhas secas a 50 °C e moídas de *Eucalyptus globulus* (258 amostras) e *Eucalyptus nines* (50 amostras), foi possível separar as duas espécies em grupos distintos utilizando MSC e PCA, mostrando que a ferramenta poderia evitar a necessidade de

classificação botânica, sendo o espectro de folhas suficiente para identificação (CASTILLO et al., 2008).

Os índices espectrais de vegetação entre dois clones comerciais de seringueira (GT1 e PB235) foram analisados utilizando o infravermelho próximo (Amaral et al., 2011). Foram identificadas diferenças entre os componentes de folha das duas variedades, indicando que mesmo sendo clones da mesma espécie, suas diferenças genéticas refletiram na composição fenotípica de suas folhas e revelaram um potencial de identificação pioneiro para a espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, A. P. et al. Implantação e condução de Seringal. In: ALVARENGA, A.P. et al. **Seringueira**. Viçosa: EPAMIG, 2008. 893 p.
- AMARAL, C. H. et al. Variação espectral de clones de seringueira utilizando imagens hiperespectrais do sensor aerotransportado ProSpecTIR-VS de duas datas do final do outono. **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO**, v. 15, p. 8469-8475, 2011.
- ATAN, S. et al. Construction of a microsatellite enriched library from *Hevea brasiliensis*. **Journal Natural Rubber Research**, v.11, n. 1, p. 247-255, 1996.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**, Viçosa: ED. UFV, MG, Brasil, 2007. 189 p.
- BARROS NETO, B. de et al. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.
- BESSE, P. et al. Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. **Theoretical Applied Genetics**, v. 88, n. 2, p. 199-207, 1994.
- BERGO, M. C. J. **Transferência de calibração na discriminação de mogno e espécies semelhantes utilizando NIRS e PLS-DA**. 2014. 152 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, 2014.
- BERNARDES, M. S. et al. Mercado brasileiro de borracha vegetal. In: BERNARDES, M. S. et al. **Sangria da seringueira**. Piracicaba, ESALQ / USP / FEALQ, 1990, p. 179.
- BERTHOMIEU. C; HIENERWADEL. R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynthesis Research**. p. 157-170, 2009.
- BICALHO, Karine Cristina et al. Similaridade genética entre clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*), por meio de marcadores RAPD. **Ciência Aerotécnica**, v. 32, n. 5, p. 1510-1515, 2008.
- BINDU-ROY, C.B. et al. Identification of simple sequence repeats in rubber (*Hevea brasiliensis*). **Current Science**, v. 87, n. 6, p. 807-811, 2004.
- BLANCO, M.; VILLARROYA, I. N. I. R. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 240-250, 2002.
- CARNEIRO, M. E. **Classificação de lâminas de madeira de pinus spp por espectroscopia óptica**. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CASTILLO R. et al. Supervised pattern recognition techniques for classification of Eucalyptus species from leaves NIR spectra. **Journal of Chilean. Chemistry Society**, v. 53, n. 4, p. 1709-1713, 2008.

CONSON, A. R. O. **Mapeamento genético-molecular e análise de QTLs associados ao crescimento em Hevea brasiliensis utilizando marcadores microssatélites e SNPs= Genetic mapping and QTL analysis of growth-related traits in Hevea brasiliensis using microsatellite and SNP markers.** 2016. 104 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2016.

CORNISH, K. S. D. J. et al. Fundamental similarities in rubber particle architecture and function in three evolutionarily divergent plant species. 1993.

COSTA FILHO, P. A. **Estudo comparativo entre técnicas de inteligência artificial e modelos lineares em determinações quantitativas no infravermelho próximo.** 2003. 215 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas SP, 2003.

CHEN, H. et al. The combined optimization of Savitzky-Golay smoothing and multiplicative scatter correction for FT-NIR PLS models. **ISRN Spectroscopy**. v. 2013, p.1-9, 2013.

FALEIRO, F. G. et al. **Biotechnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária.** Planaltina: Embrapa, 2011. 730 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p.

FERREIRA, M. M. C et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

FERREIRA, C. F. et al. Estabelecimento de fingerprint molecular em abacaxi via marcadores microssatélites não ancorados. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2019.

FOLEY, W. J. et al. Ecological applications of near infrared reflectance spectroscopy—a tool for rapid, cost-effective prediction of the composition of plant and animal tissues and aspects of animal performance. **Oecologia**, v. 116, n. 3, p. 293-305, 1998.

FORATO, L. A. et al. A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações. **Embrapa Instrumentação-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

GONÇALVES, P. S. et al. Biologia, citogenética e ploidia de espécies do gênero *Hevea*. **O Agrônomo**, v. 41, n. 1, p. 40-64, 1989a.

GONÇALVES P.S. et al. Correlations studies between plugging index, yield, girth and bark thickness in Hevea clones. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 12, n. 2, p. 589-603. 1989b.

GONÇALVES, P.S. et al. Variabilidade genética da produção anual da seringueira: estimativas de parâmetros genético e estudo de interação genótipo x ambiente. **Bragantia**, v. 49, n. 2, p. 305-320, 1990a.

GONÇALVES, P. S.; CARDOSO, M.; ORTOLANI, A. A. Origem, variabilidade e domesticação da Hevea; uma revisão. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 25, n. 2, p. 135-156, 1990b

GONÇALVES, P. S. et al. Melhoramento Genético da Seringueira: Uma revisão. In: **Documentos IAC**, 54. Campinas: Instituto Agrônomo, 1997.

GONÇALVES, P S. et al. das. **Manual de heveicultura para o Estado de São Paulo, Série Tecnologia APTA**, Campinas: Instituto Agronomico, 2001. 78 p.

GONÇALVES, P. S.; MARQUES, J. R. B. Melhoramento Genético da Seringueira: passado, presente e futuro. In: ALVARENGA, A. P. et al. **Seringueira**. Viçosa: Epamig, 2008. p. 401-407.

GONCALVES, R. C. et al. A. Tecnologia para a identificação de clones de seringueira (*Hevea* spp.) por meio de análise de marcadores microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HEVEICULTURA, 3, 2013, Guarapari, **Anais...** Guarapari: Cedagro, 2013.

GONCALVES, R. C. et al. Resistência de campo em *Hevea brasiliensis* à doença mal-das-folhas-da-seringueira no Acre, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HEVEICULTURA, 5., 2017, Goiânia. **Anais...** Goiânia: APROB-GO/TO, 2017.

HALLIDAY. D. et al. **Fundamentos de física**. 6º ed. Editora LTC, 2007. 372 p.

HEWITT, P. G. **FÍSICA Conceitual**. 12ª edição. Porto Alegre: Bookman, 2002. 812 p.

HOMMA, A. K. O. Extrativismo vegetal ou plantio: qual a opção para a Amazônia?. **Estudos Avançados**, v. 26, n. 74, p. 167-186, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2019. Produção Agrícolas Municipal 2018. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 29 fevereiro 2020.

INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP – IRSG, 2017. **Rubber Statistical Bulletin**. Disponível em: < <http://www.rubberstudy.com/welcome>>. Acesso em: 20 março 2019.

INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP – IRSG, 2020. **Rubber Statistical Bulletin**. Disponível em: < <http://www.rubberstudy.com/welcome>>. Acesso em: 03 de março 2020.

LE GUEN, V. et al. Genetic structure of Amazonian populations of *Hevea brasiliensis* is shaped by hydrographical network and isolation by distance. **Tree Genetics Genomes**, v. 5, n. 4, p. 673–683, 2009.

LE GUEN, V. et al. Development and characterization of 296 new polymorphic microsatellite markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Plant Breeding**, v. 130, n. 2, p. 294-296, 2010.

LESPINASSE, D. et al. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) bases on RPLP, AFLP, microsatellite and isozyme markers. **Theoretical Applied Genetics**, v. 100, n. 1, p. 127-138, 2000.

LEKAWIPAT, N. et al. Genetic diversity analysis of wild germplasm and cultivated clones of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. by using microsatellite markers. **Journal Rubber Research**, v. 6, n. 1 p. 36-47, 2003.

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.

LOW, F.C. et al. Recent advances in the development of molecular markers for *Hevea* studies. **Journal Natural Rubber Research**, v. 11, n. 1, p.32-44, 1996.

MANTELO, C. C. et al. Deep expression analysis reveals distinct cold-response strategies in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **BMC Genomics**, v. 20, n. 455, p. 1, 2019.

MARTIN, N. B.; ARRUDA, S. T. A produção brasileira de borracha natural: situação atual e perspectivas. **Informações Econômicas**, v. 23, n. 9, p. 9-55, 1993.

MARTINS, R. A.; SILVA, C. C. As pesquisas de Newton sobre a luz: Uma visão histórica. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 37, n. 4, p. 4202-1-4202-32, 2015.

MENDES, Reneida Aparecida Godinho. **Utilização da espectroscopia em reflectância no infravermelho próximo para discriminação de espécies da família Myrtaceae**. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado em Botânica da Universidade de Brasília) – Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Brasília, 2014.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS Brasil, 1998. 17-28 p.

- MIRANDA, C. M. et al. Fingerprint de variedades elites de mandioca via marcadores ISSR. In: **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Resumo em anais de congresso**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 16., 2015, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, PR, 2015.
- MORENO, R. M. B. Propriedades físicas e propriedades tecnológicas da borracha natural. In: Alvarenga, A. P.; CARMO, C. A. F. S. (Ed.) **Seringueira**. Viçosa: Epamig, 2008. p. 805-851.
- OLIVEIRA, J. S. et al. Variabilidade genética entre clones elite de seringueira com base em marcadores moleculares ISSR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HEVEICULTURA, 5., 2017, Goiânia. **Anais...** Jaboticabal: Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão, 2017.
- PASQUINI, C. Espectroscopia no infravermelho próximo: fundamentos, aspectos práticos e aplicações analíticas. **Revista da sociedade química brasileira**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.
- PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia, tradução da 4ª edição norte-americana**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PIRES, J. M. et al. **Taxonomia e Fitogeografia das seringueiras**. Belém: Embrapa-Amazônia Oriental, 2002, 103 p.
- PRIYADARSHAN, P. M.; CLEMENT-DEMANGE, A. Breeding *Hevea* Rubber: Formal and Molecular Genetics. **Advances in Genetics**, v. 52, n. 1, p. 51-115, 2004.
- PRIYADARSHAN, P. M. et al. Breeding *Hevea* Rubber. In: JAIN, S.M. e al. **Breeding Plantation Crops**. New York: Springer Science, 2009. 469 p.
- PRICE, N. C. et al. **Principles and problems in physical chemistry for biochemists**. Oxford University Press, Oxford, 2001.
- ROSA, P. M. et al. Potato cultivar identification using molecular markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 1, p. 110-113, 2010.
- 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.
- SALGADO, L. R. **Montagem de novo e análise do transcrito de Hevea brasiliensis por RNA-seq e busca por marcadores moleculares**. 2014. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- SECCO, R. S. A botânica da seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell-Arg.] In: ALVARENGA, A.P. et al. **Seringueira**. Viçosa: EPAMIG, 2008. 893 p.

SIRISOMBOON, P. et al. Shortwave near infrared spectroscopy for determination of dry rubber content and total solids content of Para rubber (*Hevea brasiliensis*) latex. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 21, n. 4, p. 269-279, 2013.

SIMÕES NETO, D. E. et al. Desempenho de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) em diferentes ambientes do Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 7, 1999. Londrina, **Anais...** Londrina, 1999. p. 29-33.

SOUZA, L. M. et al. 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. **Caracterização da diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de seringueira**. 2018. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas e das Naturezas, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2018.

SCHUSTER, I. et al. Marcadores moleculares no pós-melhoramento. In: BOREM, A. et al. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Folha de Viçosa, 2009. 102-128 p.

TESSIER, C. et al. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 1, p. 171–177. 1999.

TRINDADE, M. J. DE S.; LAMEIRA O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 19, n. 4, 2014.

VERAS, Germano et al. Classification of biodiesel using NIR spectrometry and multivariate techniques. **Talanta**, v. 83, n. 2, p. 565-568, 2010.

VIEIRA, M. L. C. et al. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 312-328, 2016.

WANG, J. S. et al. Genetic Diversity in Various Accessions of Pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] Using ISSR and SSR Markers. **Biochem Genet**, v. 55, n. 5-6, p. 347-366, 2017.

WEBSTER, C. C.; BAULKWILL, W. E. J. Rubber Tropical Agricultural Series. **Singapura: Longman Scientific and Technical**, v. 12, n. p. 614, 1989.

WHITE, L. A. S. et al. Genetic diversity of a native population of *Myrcia ovata* (Myrtaceae) using ISSR molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 17, n. 3, p. 1-11, 2018.

YAMADA, M. M. et al. Use of RAPD markers in the germplasm collection of the Cacao Reseach Center (CEPEC) for genotype identification. **Agrotrópica**, v. 16, n. 2, p. 35-38, 2004.

XIE, L. et al. Discrimination of transgenic tomatoes based on visible/near-infrared spectra. **Analytica Chimica Acta**, v. 584, n. 2, p. 379-384, 2007.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Realizar a discriminação de clones comerciais de seringueira (*Hevea brasiliensis*) para certificação clonal.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Determinar um conjunto mínimo de microssatélites para discriminar 15 clones de seringueira;
- b) Verificar o potencial da espectroscopia VIS-NIR para discriminar 14 clones de seringueira.

4. CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DE PADRÕES ALÉLICOS PARA FINGERPRINTING DNA DE SERINGUEIRA COM MARCADOR MICROSSATÉLITES

RESUMO

A seringueira (*Hevea brasiliensis*) é nativa da região amazônica e é amplamente explorada devido à borracha natural produzida a partir do látex. Existem muitas variedades clonais, sem testes de certificação. Para desenvolver uma impressão digital molecular, 15 clones comerciais foram usados para identificar um padrão genético padrão. Foram utilizados dez microssatélites. As estimativas genéticas obtidas foram: número de alelos por locus (N), esperada (H_E) e heterozigosidade observada (H_O), conteúdo polimórfico da informação (PIC) e poder discriminatório (DP). O número de alelos (N) variou de cinco a 14, com média de 9,3. As médias de H_E (0,80) foram maiores H_O (0,60) indicando uma seleção para homozigotos. A informatividade dos locus foram verificadas com médias de PIC (0,77) e DP (0,90) demonstrando alto polimorfismo dos microssatélites. O dendrograma representou a formação de três grupos relacionando a origem dos clones. Para desenvolver uma impressão digital molecular, 15 clones comerciais foram usados para identificar um padrão genético padrão. Com base em perfis alélicos, um conjunto de dois microssatélites (A2365 e A2368) foi capaz de distinguir todos os clones examinados. O histograma revelou dois agrupamentos responsáveis pela composição genética dos clones; a cultivar MDF 180 do Peru apresentou uma composição diferente dos clones brasileiros. Concluiu-se que a análise das impressões digitais era robusta com microssatélites, possibilitando a certificação clonal.

Palavras-chave: Certificação varietal, Certificação genética, SSR.

ABSTRACT

The rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is native to Amazon region and it is widely exploited due to natural rubber produced from latex. There are many clonal varieties, without certification tests. In order to develop a molecular fingerprinting, 15 commercial clones were used to identify a standard genetic pattern. Ten microsatellites were used. The genetic estimates obtained were: number of alleles per locus (N), expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosity, polymorphic information content (PIC) and discriminatory power (DP). The number of alleles (N) ranged from five to 14, with an average of 9.2. The H_E means (0.80) were higher H_O (0.60) indicating a selection for homozygotes. The informativeness of the locus was verified with means of PIC (0.77) and DP (0.90) showing high polymorphism of the microsatellites. The dendrogram represented the formation of three groups relating the origin of the clones. In order to develop a molecular fingerprinting, 15 commercial clones were used to identify a standard genetic pattern. Based on allelic profiles, a set of two microsatellites (A2365 and A2368) was able to distinguish all examined clones. The histogram revealed two clusters responsible for the genetic composition of the clones, the cultivar MDF 180 from Peru showed a different composition from the Brazilian clones. It was concluded that the fingerprinting analysis was robust with microsatellites, enabling clonal certification.

Keywords: Fingerprinting, Identification, SSR, Authenticity.

4.1 INTRODUÇÃO

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Will. Ex Adr. De Juss.) Muell. Arg.] é uma planta arbórea nativa da região Amazônica (GONÇALVES et al., 1989). A borracha natural possui características físico-químicas únicas, tornando-a um material estratégico para mais de 50 mil produtos industrializados (JAIN et al., 2009; RIPPEL; BRAGANÇA, 2009).

A borracha natural de *H. brasiliensis* tornou essa espécie a mais utilizada na exploração comercial, pois possui boa qualidade e quantidade de polímeros de borracha na composição do látex (GONÇALVES; FONTES, 2009). No entanto, problemas fitossanitários causados pelo fungo *Microcyclus ulei* (Henn.) Arx causaram muitos danos à cultura (GASPAROTO; PEREIRA, 1997). Na tentativa de superar problemas de produtividade, foram realizados estudos para selecionar genótipos com características promissoras para programas de melhoramento genético, como resistência ao estresse climático e doenças. Para esse fim, muitas plantas foram removidas de seu local natural para compor coleções *ex situ*, servindo como fontes de recursos genéticos para programas de melhoramento (SOUZA et al., 2015).

Coleções *ex situ* apresentam redundâncias devido a acessos duplicados (SHAN et al., 2007). Essas coleções têm custos operacionais para sua manutenção, tornando crucial caracterizar corretamente seus acessos, para diferenciar e excluir duplicatas com segurança e para identificar genótipos. A caracterização molecular é uma ferramenta capaz de otimizar o conjunto de acessos em uma coleção, agrupando um número suficiente de genótipos que representam claramente a diversidade genética da amostra analisada (SOUZA et al., 2015).

Para caracterizar a diversidade genética, marcadores moleculares são utilizados. Entre eles, os microssatélites têm sido amplamente utilizados, tanto em variedades clonais quanto em populações de seringueiras naturais (SAHA et al., 2005; LE GUEN et al., 2009; GOUVÊA et al., 2010; SOUZA et al., 2015; SOUZA, 2018). Os microssatélites são marcadores ideais para estudos de diversidade genética, pois são altamente polimórficos, multialélicos e codominantes (KALIA et al., 2011; FORTES et al., 2016).

Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a identificação molecular de clones comerciais de borracha e estabelecer um conjunto mínimo de marcadores capazes de identificá-los e discriminá-los.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

Quinze clones comerciais de *H. brasiliensis* foram coletados na Embrapa Acre (Rio Branco / AC) (Tabela 2). O DNA genômico foi extraído de folíolos jovens de acordo com o método descrito por Doyle e Doyle (1990). A quantificação do DNA foi determinada de acordo com o sistema de quantificações fluorométricas Qubit®.

Tabela 2. Acessos de *H. brasiliensis* e a descrição do país de coleta e genitores.

| | Clones Comerciais | Origem | Parentais |
|----|-------------------|-----------|-----------------------|
| 1 | CD 1174 | Guatemala | Avros 1581 x MDF 180 |
| 2 | FDR 5802 | Brasil | Harbel 67 x CD 47 |
| 3 | CDC 312 | Guatemala | Avros 308 x MDX 40 |
| 4 | CDC 56 | Guatemala | MDX 91 x RRIM 614 |
| 5 | FX 3864 | Brasil | PB 86 x FB 38 |
| 6 | PMB 01 | Brasil | Clone primário |
| 7 | FDR 5240 | Brasil | Harbel 68 x TU 42-525 |
| 8 | FDR 5597 | Brasil | Harbel 68 x TU 42-525 |
| 9 | FDR 5788 | Brasil | Harbel 8 x MDF180 |
| 10 | MDX 624 | Brasil | Avros 1581 x MDF* |
| 11 | FDR 5665 | Brasil | Harbel 62 x MDX 25 |
| 12 | MDF 180 | Peru | Clone primário |
| 13 | FDR 4575 | Brasil | Harbel 8 x IAN 3893 |
| 14 | MDX 607 | Brasil | Avros 1581 x MDF* |
| 15 | RRIM600 | Malásia | TJIR 1 e PB 86 |

* = acesso desconhecido

4.2.2 Análise dos microssatélites

Dez microssatélites desenvolvidos por Le Guen et al. (2009) (Tabela 3) foram utilizados. As reações de amplificação foram realizadas conforme descrito por Sousa et al. (2015). Os produtos de amplificação foram genotipados em um sequenciador automático AB 3500xL (Applied Biosystems). As amostras foram multiplexadas, organizadas com base no tamanho dos fragmentos e no tipo de fluoróforo (SOUZA, 2018). As leituras das amostras foram realizadas usando o padrão GeneScan-600 LIZ® no programa GeneMarker versão 2.7.4. As falhas de genotipagem no sequenciador foram repetidas seguindo o protocolo de genotipagem em géis de poliacrilamida (CRESTE et al., 2001).

Tabela 3. Descrição dos dez locos microssatélites, incluindo a sequência do primer, motivo repetitivo e amplitude alélica.

| Locos | Sequência F (5'-3') | Sequência R (5'-3') | Motivo repetitivo | Amplitude alélica (pb) |
|---------|--------------------------------------|--|----------------------|---------------------------|
| A2365 | CACGACGTTGTA AACGACGCTATCCATCAGGCAA | CTCCTTCTTTCTCCCC | CT | 190–228 |
| A2368 | CTATTCTACATTCTCCATGTC | CACGACGTTGTA AACGACCTTCTTATTTTACTGGGCT | CT | 229–271 |
| A2389 | CTTTCTTTTGGTCTTTCTC | CACGACGTTGTA AACGACGCAACTCATCCACCAC | CT | 188–228 |
| A2406 | GTCCACAGAAATAAACTCA | CACGACGTTGTA AACGACAGCCATTTTCTCACCTC | CT | 113–171 |
| A2413 | ATCCAAACCTGCTCATAC | CACGACGTTGTA AACGACGACCCCTATCCAAAAGA | CT | 286–322 |
| A2684 | CACGACGTTGTA AACGACTATGCGAACAAGGAAAG | ACAGGGATTTACACATACAA | CT | 258–300 |
| A2736 | CACGACGTTGTA AACGACGCAACCTGATGAATAAA | AAATGAGAAACAAGAAGACC | CT | 102–148 |
| | GA | | | |
| BAC55 | GATGCCCTTGATTATGTT | CACGACGTTGTA AACGACACTTAATGGGCTTTTCC | CT | 153–177 |
| B02 | | | | |
| TA2163 | ATGCAACAGAGTAGGAGA | CACGACGTTGTA AACGACTCAAAGCAAATGAAGTG | (CT) (CA) | 194–242 |
| TAs2558 | ACTCAATACAAAGGAAGGT | CACGACGTTGTA AACGACAGTTCCAAAGGTCGTG | (CT) (CA) | 218–256 |

pb= pares de base

Os parâmetros para selecionar os *loci* para análise de fingerprinting consideraram: A - ausência de bandas de inespecíficas; B - marcadores com alto poder discriminatório e C - número mínimo de marcadores que podem discriminar variedades.

4.2.3 Análises estatísticas

Os microssatélites foram caracterizados quanto ao número de alelos por loco (N), heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O), conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada loco e a média destas estimativas para todos os locos, utilizando as equações, presentes no *software Tools for Population Genetic Analyses* - TFPGA versão 1.3 (MILLER, 1997). Para comparar a eficiência dos marcadores para identificação das variedades, o poder discriminatório (DP) foi estimado para cada loco (TESSIER et al., 1999).

As análises de distâncias genéticas foram calculadas utilizando a distância modificada de Rogers (WRIGHT, 1978), com base na matriz de distâncias gerada pelo programa TFPGA versão 1.3 (MILLER, 1997), utilizando o critério de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) para construção do dendrograma no programa MEGAX (KUMAR et al., 2018).

O número de grupos (K) foi obtido pelo programa STRUCTURE versão 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000), baseado em estatística bayesiana. Estes grupos são formados por indivíduos que compartilham o mesmo *pool* gênico. O programa foi executado com K variando de $K = 1$ a $K = 10$. Foram feitas 20 simulações independentes para cada K , utilizando o modelo “admixture”, frequências alélicas independentes, 10.000 burn-in e 100.000 simulações de Monte Carlo de Cadeias de Markov (MCMC). A determinação do número K mais provável foi realizada utilizando o aplicativo Structure Harvester v. 0.6.9 (EARL, 2012), com base nos valores de ΔK segundo Evanno et al. (2005). A atribuição dos acessos dentro dos grupos foi realizada de acordo com a probabilidade de cada indivíduo pertencer a cada um dos grupos.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dez microssatélites foram polimórficos (Tabela 4). O número de alelos por locus (N) variou de cinco (BAC55-B02) a 14 (TA2163), com média de 9,2 (Tabela 3). Outros clones comerciais apresentaram estimativas semelhantes quando genotipados também com microssatélites (SILVA, 2019).

Tabela 4. Caracterização de dez microssatélites em 15 acessos de *Hevea brasiliensis* com os parâmetros genéticos: número de alelos por loco (N); Alelos raros (A) Heterozigosidade esperada (H_E); Heterozigosidade observada (H_O); conteúdo de polimorfismo (PIC) e Poder discriminatório (DP).

| Loco | N | A ($<0,05\%$) | H_E | H_O | PIC | DP |
|-----------|-----|----------------------|-------|-------|-------|------|
| A2365 | 9 | 3 | 0,83 | 0,80 | 0,80 | 0,96 |
| A2368 | 9 | 5 | 0,73 | 0,53 | 0,71 | 0,84 |
| A2389 | 8 | 5 | 0,59 | 0,46 | 0,57 | 0,78 |
| A2406 | 9 | 3 | 0,88 | 0,26 | 0,85 | 0,93 |
| A2413 | 9 | 1 | 0,87 | 0,73 | 0,84 | 0,96 |
| A2684 | 7 | 2 | 0,62 | 0,40 | 0,60 | 0,83 |
| A2736 | 9 | 3 | 0,83 | 0,60 | 0,80 | 0,92 |
| BAC55-B02 | 5 | 0 | 0,76 | 0,73 | 0,74 | 0,89 |
| TA2163 | 14 | 6 | 0,93 | 0,60 | 0,90 | 0,97 |
| TAs2558 | 13 | 8 | 0,88 | 0,86 | 0,86 | 0,97 |
| Total | 92 | 36 | - | - | - | - |
| Média | 9,2 | 3,6 | 0,80 | 0,60 | 0,77 | 0,90 |

A heterozigosidade esperada (H_E) variou de 0,59 (A2389) a 0,93 (TA2163), com média de 0,80 (Tabela 4). Os valores de heterosigosidade observada (H_O) variaram entre 0,26 (A2406) e 0,86 (TAs2558) com média de 0,60. Todos os locos tiveram valores de H_O menores que H_E . Esse resultado indica um déficit de heterozigotos. Esse perfil genético já havia sido reportado em outros trabalhos (Le Guen et al., 2009; Souza et al., 2015; Souza, 2018). O déficit em heterozigotos pode ser resultado da pressão para homozigotos exercida por cruzamento natural de plantas aparentadas devido a longevidade da espécie, bem como o cruzamento controlado para obtenção de cultivares (LAURANCE et al., 2004). Tal fato é coerente com a origem dos genótipos analisados, com apenas dois clones primários (PMB 01 e MDF 180). Os clones primários apresentaram alelos raros nos dez microssatélites analisados exceto a variedade PMB 01 que compartilhou alelo com o clone RRIM 600 no loco A2736 e com os clones Fx 3864 e RRIM 600 no loco BAC55-B02. É importante notar que estes três indivíduos foram coletados em estados próximos no Brasil.

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) variaram entre 0,57 (A2389) a 0,90 (TA2163), com média de 0,77 (Tabela 4). Estes valores indicam que os microssatélites

utilizados no estudo possuem altamente informativos. Botstein et al. (1980) definiram que marcadores com valores de *PIC* superiores a 0,5 são altamente informativos. Além disso, o *PIC* pode ser utilizado para estabelecer relações entre materiais intimamente relacionados, como paternidade ou a probabilidade de os pais serem heterozigotos assim como conhecer os genitores a partir do genótipo dos filhos (BOTSTEIN et al., 1980). Perseguini et al. (2012) obtiveram média de 0,59 (entre 0,23 a 0,86), valores um pouco inferiores à do presente estudo. Isso pode estar relacionado ao marcador EST-SSR utilizado. Esses locos são mais conservados e tendem a acessar menos polimorfismo, por outro lado podem ser mais transferíveis entre espécies dentro do gênero (SCOTT et al., 2000; EUJAYL et al., 2001).

O conjunto de microssatélites analisados apresentou poder discriminatório (*DP*) entre 0,78 (loco A2389) a 0,97 (locos TA2163 e TAs2558), com média de 0,93 (Tabela 4). As estimativas de *DP* permitem selecionar locais com maior probabilidade de diferenciar entre dois indivíduos. Valores mais baixos de *DP* (0,07 a 0,90, com média de 0,40 por loco) também foram detectados com EST-SSRs (PERSEGUINI et al., 2012).

Os microssatélites A2365 e A2368 com *DP* 0,96 e 0,84, respectivamente, apresentaram um perfil alélico único para identificar os acessos. O loco A2365 discriminou nove indivíduos com perfis distintos e três perfis compartilhados, um para os indivíduos FX 3864, FDR 5597 e FDR 5788 outro para acessos FDR 5665 5 FDR 4576 e o ultimo para os clones MDF 180 e MDX 607. Esses genótipos foram discriminados pelo loco A2368, que apresentava nove perfis exclusivos e um comum perfil entre seis indivíduos (CDC 312, FDR 5240, FDR 5597, MDX 624, FDR 5665 e MDX 607) (Tabela 5).

Tabela 5. Genotipagem baseada em impressões digitais com os locos microssatélites A2365 e A2368.

| Alelo ⁺ | 193-196 | 194-198 | 194-230 | 196-196 | 196-198 | 196-212 | 196-230 | 198-198 | 198-212 | 198-213 | 202-219 | 248-255 | 250-250 | 250-255 | 250-257 | 255-255 | 255-260 | 255-269 | 255-274 | 257-269 | 267-270 |
|--------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| CD 1174 | | | | | + | | | | | | | | | | | + | | | | | |
| FDR 5802 | | | | | | | | + | | | | | | | | | + | | | | |
| CDC 312 | | | | | | + | | | | | | | + | | | | | | | | |
| CDC 56 | | | | | | | + | | | | | + | | | | | | | | | |
| FX 3864 | | | | | | | | | + | | | | | | | | | | + | | |
| PMB 01 | | | | | | | | | | | + | | | | | | | + | | | |
| FDR 5240 | | | + | | | | | | | | | | + | | | | | | | | |
| FDR 5597 | | | | | | | | | + | | | | + | | | | | | | | |
| FDR 5788 | | | | | | | | | + | | | | | | + | | | | | | |
| MDX 624 | + | | | | | | | | | | | | + | | | | | | | | |
| FDR 5665 | | | | | | | | | | + | | | + | | | | | | | | |
| MDF 180 | | | | + | | | | | | | | | | | | | | | | | + |
| FDR 4575 | | | | | | | | | | + | | | | | | | | | | + | |
| MDX 607 | | | | + | | | | | | | | | + | | | | | | | | |
| RRIM 600 | | + | | | | | | | | | | | | + | | | | | | | |

Rosa et al. (2010), discriminaram 14 variedades de batata (*Solanum tuberosum*) também usando dois microssatélites. Assim, o conjunto de loci A2365 e A2368 foi eficaz para a identificação varietal de clones e possui vantagens metodológicas adequadas para uso rotineiro. Dessa forma, podem ser amplamente utilizados em estudos com genótipos de seringueira, permitindo uma análise direta, rápida e de baixo custo, capaz de garantir a correta discriminação e certificação desse conjunto de cultivares comerciais.

Não foram identificados acessos redundantes (Figura 4). O par mais divergente foram os clones MDX 624 vs FDR 5802 com uma distância genética de 0,85.

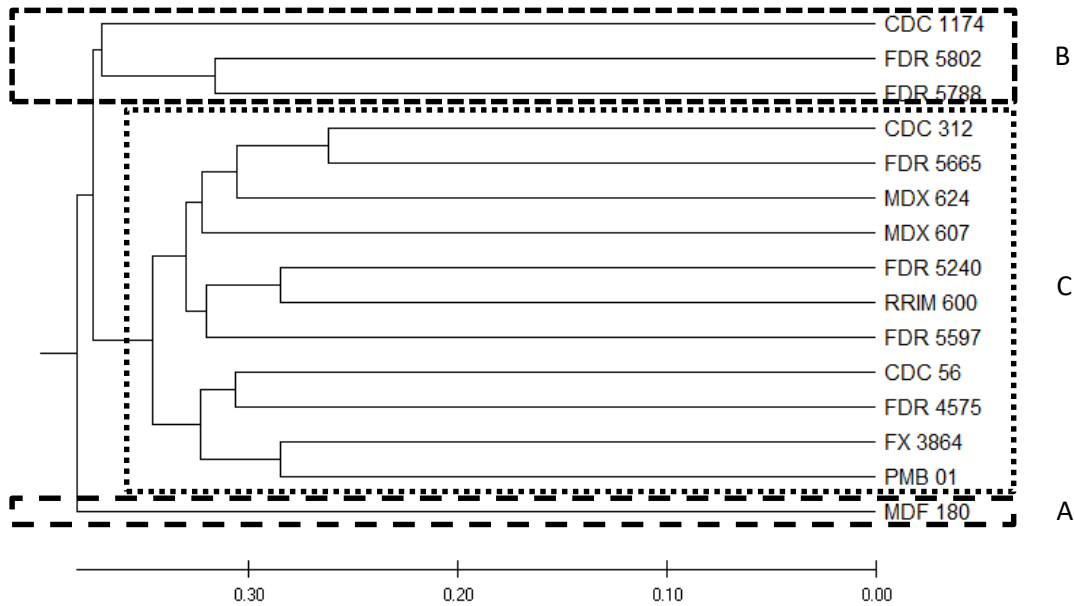


Figura 4. Dendrograma relacionando 15 genótipos de *H. brasiliensis*, de acordo com a distância genética modificada de Rogers para o agrupamento no método UPGMA com dez microssatélites. Linhas pontilhadas destacam os três grupos formados (A, B e C).

Os indivíduos mais próximos geneticamente foram os clones CDC 312 e FDR 5665, com 0,52 de distância. As suas origens são Guatemala e Brasil, respectivamente, mas verifica-se que um dos parentais que deram origem a estas cultivares são da variedade MDX, enquanto que os outros pais são da Indonésia (Avros) e Libéria (Harbel) (Tabela 2). É importante ressaltar que a seringueira não é nativa destes países, portanto suas cultivares compartilham recursos genéticos com clones da região amazônica.

Houve formação de agrupamentos de clones relacionando a origem e parentais (Figura 4). O Grupo A formado apenas pelo clone MDF 180, Grupo B com as variedades CD 1174, FDR 5802 e FDR 5788 e Grupo C com os clones CDC 312, FDR 5665, MDX 624, MDX 607, FDR 5240, RRIM 600, FDR 5597, CDC 56, FDR 4575, FX 3864 e PMB 01. Ao verificar dados de origem e parentais, foram encontradas relações que explicassem os agrupamentos. O grupo A possui origem em Madre de Dios – Peru, um dos locais de ocorrência natural da espécie, sendo sua variedade clonal amplamente utilizada em cruzamentos controlados para obtenção de novas variedades. As variedades do grupo B possuem origem no Brasil e Guatemala com parentais da linha clonal Harbel e MDF, justificando a similaridade destes genótipos. Os indivíduos do grupo C tem origem no Brasil, Guatemala e Malásia, entretanto os indivíduos da Guatemala e Malásia são produtos de cruzamentos de plantas com origem em área de ocorrência natural o que corrobora sua similaridade (Tabela 2).

A similaridade dos indivíduos dentro do grupo pode estar relacionada com a base genética restrita formada por plantas coletadas por Henry Wickham no Pará, que deu origem a diversas variedades clonais como RRIM e Harbel que participaram dos cruzamentos nos clones comerciais mais comuns. Os clones IAN, MDX e MDF são variedades criadas na região nativa da espécie, e o cruzamento destes parentais pode resgatar uma diversidade semelhante aos indivíduos naturais da região Amazônica, tornando-se geneticamente próximos (WEBSTER; BAULKWILL, 1989). A proximidade entre as variedades dentro da região nativa da espécie se dá pela distribuição de sua estrutura genética por mecanismos de dispersão como a rede hidrográfica da bacia amazônica que atravessam países como Peru, Bolívia Colômbia e Estados brasileiros como Pará e Amazonas. As possíveis diferenças estão relacionadas ao isolamento natural das plantas em áreas-chave (LE GUEN et al., 2009).

A análise bayesiana do programa STRUCTURE e a estatística de Evanno et al. (2005) indicou que o maior valor de delta K apresenta dois grupos (clusters) distintos ($K=2$). A partir desse dado foi possível obter um histograma mostrando a composição genética de cada indivíduo e seu respectivo agrupamento por semelhança a ancestralidade (Figura 5 e 6).

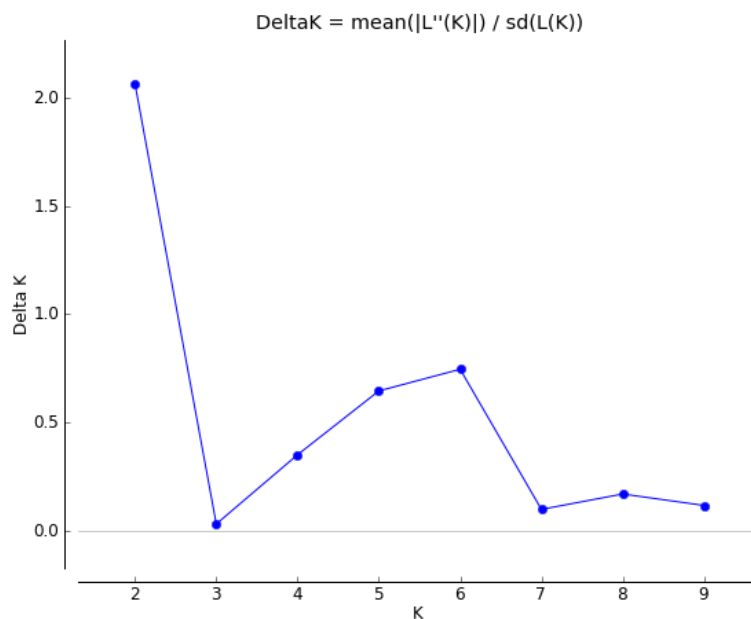


Figura 5. Gráfico de delta (K) com $K = 2$, obtido pela aplicação do modelo estatístico de Evanno et al. (2005), no programa STRUCTURE, a partir da análise dos 15 clones comerciais de *H. brasiliensis*.

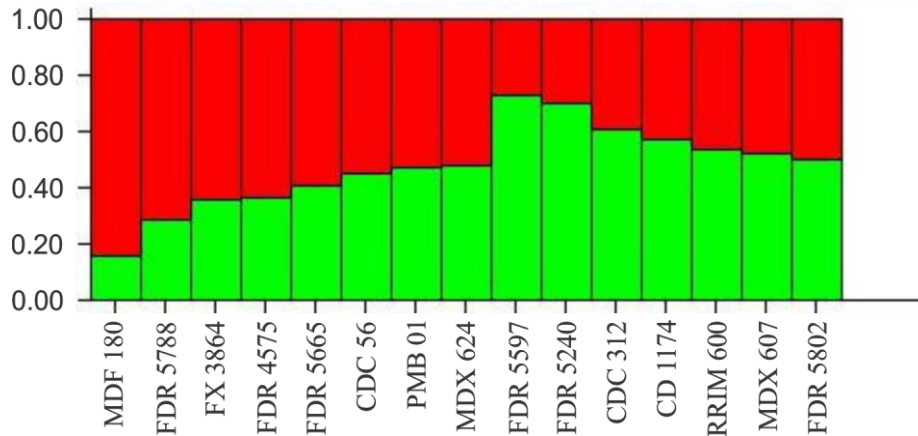


Figura 6. Histograma relacionando os 15 genótipos de *H. brasiliensis* de acordo com a análise bayesiana gerada pelo programa STRUCTURE. As colunas representam os indivíduos. As cores representam os dois pools gênicos (K=2).

O histograma (Figura 6) mostra a composição genética e a proporção de cada pool nos clones. O pool vermelho apresentou predominância na composição dos indivíduos CDC 56, FX 3864, PMB 01, FDR 5788, MDX 624, FDR 5665, MDF 180 e FDR 4575. Clones com origem parental comum tinham composição genética semelhante. Os FDR 5240 e FDR 5597 têm os mesmos pais e mostraram predominância do pool verde em sua composição genética. O clone FDR 5788 tem como parental o clone primário MDF 180 justificando seu *pool* de composição semelhante. Os indivíduos CD 1174, MDX 624 e MDX 607 também tiveram os pais da linha MDF, mas foram agrupados no pool verde. Isso se deve ao segundo progenitor de seus cruzamentos, pertencente à variedade clonal Avros (Indonésia), que possui uma base genética restrita e está intimamente relacionada à região amazônica. Foi encontrado o RRIM 600 da Malásia, que também possui uma forte relação genética com os genótipos amazônicos devido à ancestralidade (GONÇALVES et al., 1999). Essa relação genética também foi verificada em outros estudos genéticos (Souza et al., 2015; Souza, 2018).

Essa análise se torna uma ferramenta complementar robusta para certificar a autenticidade dos clones, permitindo o rastreamento de sua origem geográfica, relacionando outros indivíduos com base em sua ancestralidade. Complementa satisfatoriamente a caracterização morfológica tradicional e pode ser adotado em programas de melhoramento.

4.4 CONCLUSÃO

Nós descrevemos um modelo para o perfil de DNA em clones de seringueira. Um conjunto de dois microssatélites pode ser usado combinado para certificar a identidade dos clones de seringueira. Acreditamos que a introdução dessa abordagem em prática seria uma ferramenta poderosa a ser usada para apoiar a proteção de clones comerciais de seringueira por meio da certificação da genética molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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*. 1980, 32 (3), 314-331. ISSN 0002-9297.

CRESTE, S.; TUMANN, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology*. 2001, 19 (4), 299-306. ISSN 0167-4412.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA fresh tissue. *Focus*. 1990, 12 (1), 13-15. ISSN 1541-4094.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 2012, 4 (2), 359-361. ISSN 1877-7260.

EUJAYL, I. SORRELLS, M.; BAUM, M.; WOLTERS, P.; POWELL, W. Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRs and genomic SSRs. *Euphytica*. 2001, 119 (1-2), 39-43. ISSN 0014-2336.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 2005, 14 (8), 2611-2620. ISSN 1755-0998.

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 Brasileira de Ciências Agrárias*. 2016, 59 (1), 80-86. ISSN 1981-0997.

GASPAROTTO, L and PEREIRA, J. C. R. Doenças da seringueira no Brasil. Brasília. 1º ed. Brasília: EMBRAPA, 1997. ISBN 85-85007-99-0.

GONÇALVES, P. S. CARDOSO, M.; BOAVENTURA, M. A. M.; MARTINS, A. L. M.; LAVORENTI, C. Biologia, citogenética e ploidia de espécies do gênero *Hevea*. *O Agrônomo*. 1989, 41 (1), 40-64. ISSN 0365-2726.

GONÇALVES, P. S.; BORTOLETTO, N.; ORTOLANI, A. A.; BELLETTI, G. O.; SANTOS, W. R. Desempenho de novos clones de seringueira. III. Seleção promissora para a região de Votuporanga, Estado de São Paulo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 1999, 34 (6), 971-980. ISSN 1678-3921.

GONÇALVES, Paulo S.; FONTES, José R. A. Domesticação e melhoramento da seringueira. In BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. (Ed) *Domesticação e Melhoramento: Espécies Amazônicas*. Viçosa, 2009, pp. 395.

GOUVÊA, L. R. L. RUBIANO, L. B.; CHIORATTO, A. F.; ZUCCHI, M. I.; GONÇALVES, P. D. S. Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*. 2010, 33 (2), 308-318. ISSN 0100-8455.

JAIN, S. M.; PRIYADARSHAN, P. M. Breeding plantation tree crops: tropical species. 1^a ed. New York: Springer, 2009. ISBN 978-0-387-71201-7.

KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*. 2011, 177 (3), 309-334. ISSN 0014-2336.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018, 35 (6), 1547-1549. ISSN 0737-4038.

LAURANCE, W. F.; NASCIMENTO, H. E.; LAURANCE, S. G.; CONDIT, R.; D'ANGELO, S.; ANDRADE, A. Inferred longevity of Amazonian rainforest trees based on a long-term demographic study. *Forest Ecology and Management*. 2004, 190 (2-3), 131-143. ISSN 0378-1127.

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 Genetics Genomes*. 2009, 5 (4), 673-683. ISSN 1614-2950.

MILLER, Mark Perry. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Available at: <http://www.marksgeneticssoftware.net/index.html>. 2020.

PERSEGUINI, J. M. K. C. ROMÃO, L. R. D. C.; BRINEZ, B.; SCALOPPI JUNIOR, E. J.; GONÇALVES, P. D. F.; BENCHIMOL, L. L. Genetic diversity of cultivated accessions and wild species of rubber tree using EST-SSR markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2012, 47 (8), 1087-1094. ISSN 1678-3921.

PRITCHARD, J. K. STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000, 155 (2), 945-959. ISSN 1943-2631.

RIPPEL, M. M; BRAGANÇA, F. C. Borracha natural e nanocompósitos com argila. *Química nova*. 2009, 32 (3), 818-826. ISSN 0100-4042.

ROSA, P. M.; CAMPOS, T. D.; SOUZA, A. C. B. D.; SFORÇA, D. A.; TORRES, G. A. M.; SOUZA, A. P. D. Potato cultivar identification using molecular markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2010, 45 (1), 110-113. ISSN 1678-3921.

SAHA, T; BINDU R. C.; NACER, M. A. Microsatellite variability and its use in the characterization of cultivated clones of *Hevea brasiliensis*. *Plant Breeding*. 2005, 124 (1), 86-92. ISSN 1439-0523.

SOUZA, L. M.; LE GUEN, V.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SILVA, C. C.; MANTELLO, C. C.; CONSON, A. R. O.; VIANA, J. P. G.; ZUCCHI, M. I.; SCALOPPI JUNIOR, E. J.; FIALHO, J. F.; MORAES, M. L. T.; GONÇALVES, P. S.; SOUZA, A. P. 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*. 2015, 10 (7), 1-20. ISSN 1932-6203.

SOUZA, C. S. Caracterização da diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de seringueira. Rio Branco: Universidade Federal do Acre, 2018. Dissertação de Mestrado.

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

SCOTT, K.D.; EGGLER, P.; SEATON, G.; ROSSETTO, M.; ABLETT, E. M.; LEE, L. S.; HENRY, R. J. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical Applied Genetics*. 2000, 100 (5), 723-726. ISSN 0040-5752.

SHAN, F.; CLARKE, H. J.; YAN, G.; PLUMMER, 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*. 2007, 54 (3), 519-527. ISSN 0925-9864.

TESSIER, C. DAVID, J.; THIS, P.; BOURSQUOT, J. M.; CHARRIER, A. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 1999, 98 (1), 171-177. ISSN 0040-5752.

WEBSTER, C. C.; BAULKWILL, W. E. J. Rubber Tropical Agricultural Series. *Singapura: Longman Scientific and Technical*. 1989, 12 (1), 614.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations, vol 4: variability within and among natural populations. 1ªed. Chicago: University of Chicago Press, 1978. ISBN 9780226910413.

5. CAPÍTULO II: POTENCIAL DA TÉCNICA DE ESPECTROSCÓPIA VIS-NIR PARA IDENTIFICAÇÃO DE CLONES DE SERINGUEIRA

RESUMO

A seringueira é natural da região amazônica e é considerada uma das mais importantes espécies do gênero *Hevea*, em razão das propriedades superiores de seu látex. Clones comerciais têm sido recomendados para a utilização em plantios. Esses materiais devem representar um genótipo único para possuir certificação de uso, porém sua discriminação morfológica não é possível. O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de discriminação da espectroscopia no espectro visível ao infravermelho próximo em 14 clones comerciais de *Hevea brasiliensis*. Espectros de infravermelho foram obtidos por meio da refletância e os dados foram transformados para absorvância. Os espectros de infravermelho brutos foram pré tratados pela técnica de espalhamento multiplicativo de sinal (MSC) e usando a quimiometria foi feita uma análise de componentes principais (PCA). Foram obtidas separações espectrais distintas na faixa VIS em folhas jovens e a faixa NIR em folhas maduras com presença de doença, sugerindo que essas combinações de estágio foliar e região espectral são as mais adequadas para diferenciação dos clones. A espectroscopia infravermelha se mostrou promissora para discriminação dos clones e apresenta facilidade em seu uso para realizar a discriminação com precisão.

Palavras-chave: Seringueira, Identificação, VIS-NIRS.

ABSTRACT

The rubber tree is native to the Amazon region and is considered one of the most important species of the genus *Hevea*, because of the superior properties of its latex. Commercial clones have been recommended for use in plantations. These materials must represent a unique genotype to be certified for use, but their morphological discrimination it's not possible. The objective of this work was to verify the potential of discrimination of spectroscopy in the spectrum visible to the near infrared in 14 commercial clones of *Hevea brasiliensis*. Infrared spectra were obtained through reflectance and the data were transformed to absorbance. The raw infrared spectra were pre-treated by the multiplicative signal spreading (MSC) technique and using chemometry a principal component analysis (PCA) was performed. Different spectral separations were obtained in the VIS range in young leaves and the NIR range in mature leaves with the presence of disease, suggesting that these combinations of leaf stage and spectral region are the most suitable for differentiating the clones. Infrared spectroscopy has shown promise for discriminating clones and is easy to use to accurately discriminate.

Keywords: Rubber tree, Identification, VIS-NIRS.

5.1 INTRODUÇÃO

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. Adr. De Juss) Muell-Arg] é uma espécie originária da Amazônia e considerada a mais importante do gênero (GONÇALVES et al., 1989a; PRIYADARSHAN; CLEMENT-DEMANGE, 2004; HOMMA, 2012). Seu produto de interesse econômico é a borracha natural que é superior aos polímeros sintéticos e das demais espécies produtoras de látex por possuir alto peso molecular, resistência a fricção, elasticidade, boa produtividade, alta concentração de polímeros de borracha e é impermeável (GONÇALVES et al., 1990a; GONÇALVES; FONTES, 2009; PRIYADARSHAN et al., 2009).

Entretanto, no Brasil a cultura vem sofrendo com ataques devastadores da doença foliar conhecida como “mal-das-folhas” [*Microcyclus ulei* (Henn.) Arx]. Clones comerciais oriundos do melhoramento genético têm sido desenvolvidos e são amplamente utilizados em plantios, entretanto, a discriminação morfológica é de difícil execução.

A espectroscopia infravermelha com destaque para a região do infravermelho próximo (*Near Infrared Spectroscopy* - NIRS) é um procedimento rápido, de baixo custo (SIRISOMBOON et al., 2013), e laboratorialmente simples que têm apresentado bons resultados na discriminação de plantas de interesse. Porém, exige conhecimento em quimiometria e calibração de um grande número de amostras para adequar uma rotina de análises.

A identificação de espécies (Bergo, 2014; Veras et al., 2010), de indivíduos em populações (Soares et al., 2017), de cultivares (Santos, 2015), e de contaminação por patógenos (Carneiro, 2008; Sirisomboon et al., 2009) já foram realizados utilizando a espectroscopia na faixa do VIS-NIR. Esses estudos mostram que o NIRS é uma poderosa ferramenta para detecção e certificação.

Apesar da eficiência da técnica, a espectroscopia NIRS ainda é pouco explorada em seringueira. O objetivo deste estudo foi usar a espectroscopia infravermelha e avaliar o potencial da técnica espectroscópica do visível ao infravermelho próximo (VIS-NIR) para discriminar clones comerciais de *H. brasiliensis*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Coleta do material

Foram utilizadas folhas de seringueiras em três estágios de desenvolvimento e infecção foliar, identificada macroscopicamente: i) Folhas jovens; ii) Folhas maduras; iii) Folhas maduras com sintomas de *Microcyclus ulei*. O material foi coletado no jardim clonal de seringueiras localizado na Embrapa Acre, Rio Branco/AC, a partir de 14 clones comerciais de *H. brasiliensis*.

Tabela 6. Acessos de *H. brasiliensis* presentes no jardim clonal da Embrapa Acre.

| | Clones Comerciais | Origem | Parentais |
|----|-------------------|-----------|-----------------------|
| 1 | CD 1174 | Guatemala | Avros 1581 x MDF 180 |
| 2 | FDR 5802 | Brasil | Harbel 67 x CD 47 |
| 3 | CDC 312 | Guatemala | Avros 308 x MDX 40 |
| 4 | CDC 56 | Guatemala | MDX 91 x RRIM 614 |
| 5 | FX 3864 | Brasil | PB 86 x FB 38 |
| 6 | PMB 01 | Brasil | Clone primário |
| 7 | FDR 5240 | Brasil | Harbel 68 x TU 42-525 |
| 8 | FDR 5597 | Brasil | Harbel 68 x TU 42-525 |
| 9 | FDR 5788 | Brasil | Harbel 8 x MDF180 |
| 10 | MDX 624 | Brasil | Avros 1581 x MDF* |
| 11 | FDR 5665 | Brasil | Harbel 62 x MDX 25 |
| 12 | MDF 180 | Peru | Clone primário |
| 13 | FDR 4575 | Brasil | Harbel 8 x IAN 3893 |
| 14 | MDX 607 | Brasil | Avros 1581 x MDF* |

* = genótipo desconhecido

Foram coletadas 15 folhas de cada clone para cada tratamento. As folhas foram armazenadas em sacos de papel e colocadas em estufa de ventilação forçada por três dias à 65 °C. Após a secagem, as folhas foram moídas em moinho de facas tipo Willy, modelo Macro Tn-650/1 em malha de 1 mm.

5.2.2 Análise dos dados

Os espectros foram obtidos em um equipamento da marca FOSS-NIRS, modelo DS2500. Cada amostra foi lida 30 vezes. Os espectros de cada amostra foram resultantes da média de 64 varreduras. O modo de leitura dos espectros foi obtido por refletância com

resolução espectral de 0,5 nm no intervalo de 400 a 2500 nm. Posteriormente convertidos em absorvância (A), sendo $A = \log [1/R]$. Em que R= é a refletância em cada comprimento de onda. Para corrigir possíveis erros decorrentes da manipulação das amostras durante a coleta das amostras e obtenção dos espectros, foi feito um pré-processamento dos dados através do programa Unscrambler 9.2 utilizando a técnica de correção de espalhamento multiplicativo de sinal (*Multiplicative signal correction – MSC*).

Em seguida, foi feita uma análise exploratória com a técnica estatística de reconhecimento não supervisionado usando análise de componentes principais (PCA) com validação cruzada.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 1260 espectros foram obtidos (Figura 7) no comprimento de onda de 400 a 2500 nm. Foi possível verificar possíveis comprimentos de onda de discriminação dos clones em duas regiões do espectro: a região do visível (400-700 nm) e a região do Infravermelho-Próximo (1100-2500 nm).

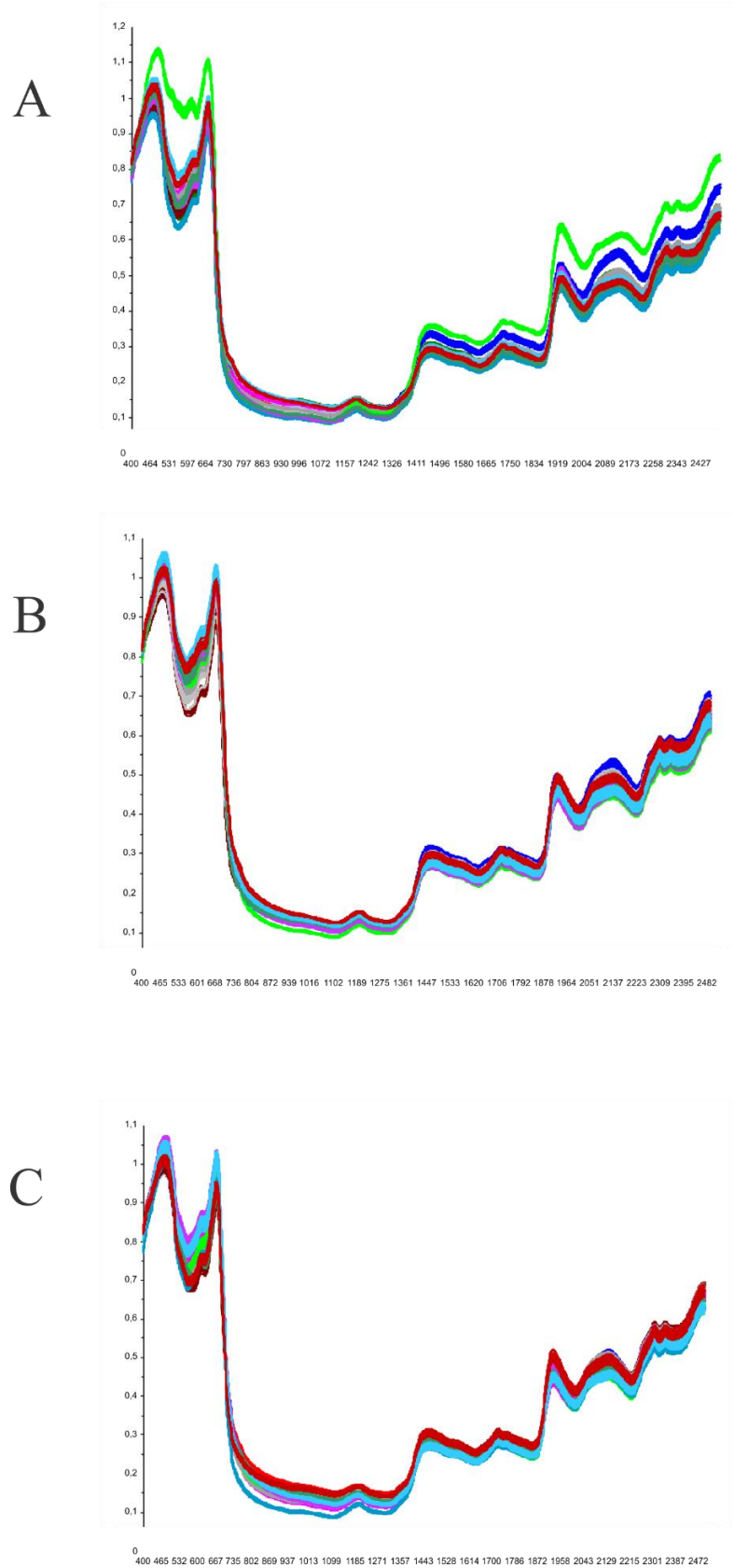
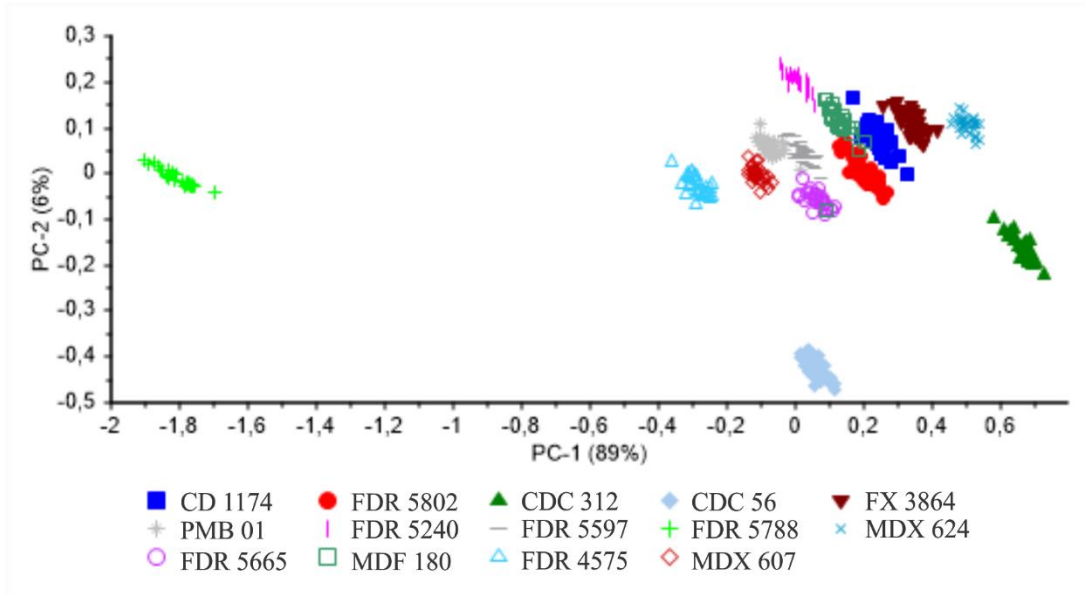


Figura 7. Espectros pré-tratados inteiros (A, B e C) pelo método MSC em folhas de diferentes estádios fenológicos para os 14 clones: Folhas jovens (A); Folhas maduras (B) e Folhas maduras com presença de doenças (C). Eixo X: comprimento de ondas; Eixo Y: Absorbância.

As PCAs nos diferentes estádios fenológicos apresentaram diferentes níveis de separação e as duas primeiras componentes (PC1 e PC2) explicaram mais de 90% da variação nos casos das folhas jovens e folhas maduras.

Para as folhas jovens, a PCA da região do visível apresentou uma separação dos clones de forma mais nítida com agrupamento entre os clones CD 1174, FDR 5802, FDR 5665 e MDF 180 (Figura 8A). Na região do NIR, houve sobreposição entre os indivíduos FDR 5802 com FDR 5240, FX 3864 com MDF 180 e PMB 01 com FDR 5665 e MDF 180 (Figura 8B). Os clones CD 1174, FDR 5788, MDX 624 e FDR 4575 apresentaram diferenciação nos dois intervalos espectrais das PCAs em folhas jovens (Figura 8). Os parentais utilizados no cruzamento destes clones são da variedade clonal Avros, Harbel, MDF e IAN (Tabela 6), e mostram que há ampla base de diversidade genética na composição desses cruzamentos. As terminações MDF e IAN são de genótipos oriundos da região nativa da espécie, o centro de origem. O uso desses materiais no melhoramento genético resgata a diversidade de populações naturais da região amazônica (WEBSTER; BAULKWILL, 1989).

A



B

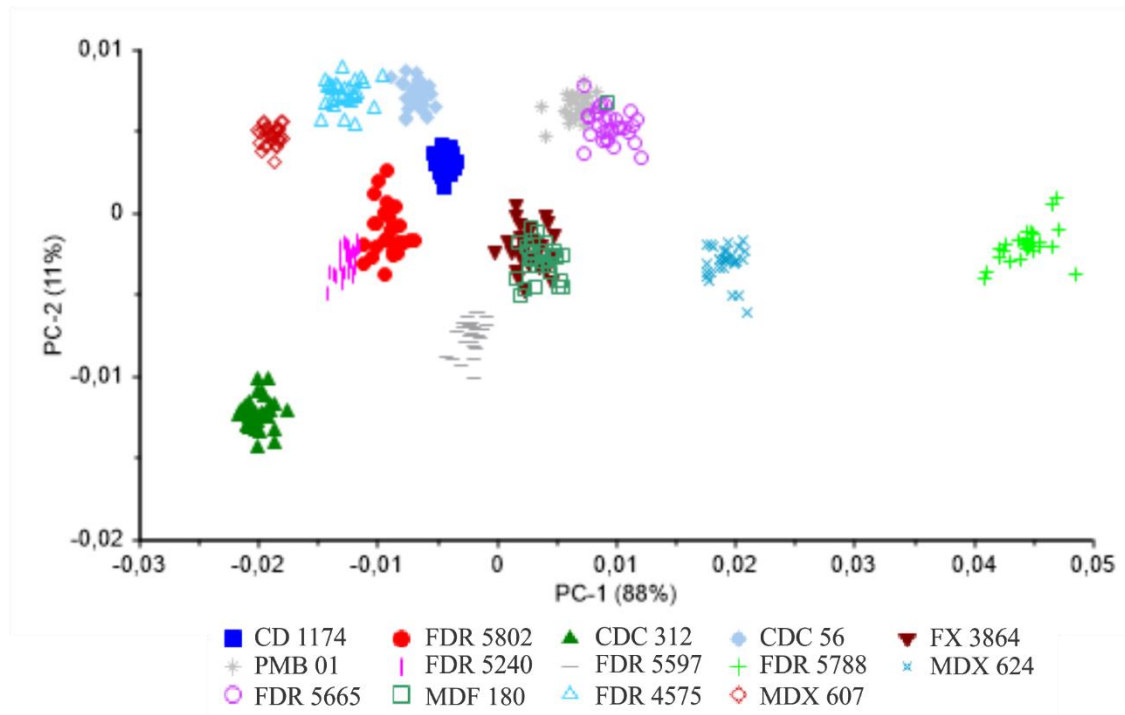


Figura 8. Análise de componentes principais de folhas jovens. Espectro visível (A) e Espectro NIR (B).

As PCAs de folhas maduras também apresentaram diferentes perfis de separação, porém, com muitas sobreposições (Figura 9). Os compostos presentes nesse estágio fenológico também podem explicar essas relações. Os clones CD 1174 e MDX 624 foram os únicos plotados sem sobreposição nas duas regiões analisadas, ambos possuem os mesmos parentais (Tabela 6). A sobreposição dos demais clones pode estar relacionada com outlines ou o pré-

tratamento utilizado não tenha sido eficiente, sendo necessário explorar outros métodos de pré-tratamentos e o uso de análises supervisionadas.

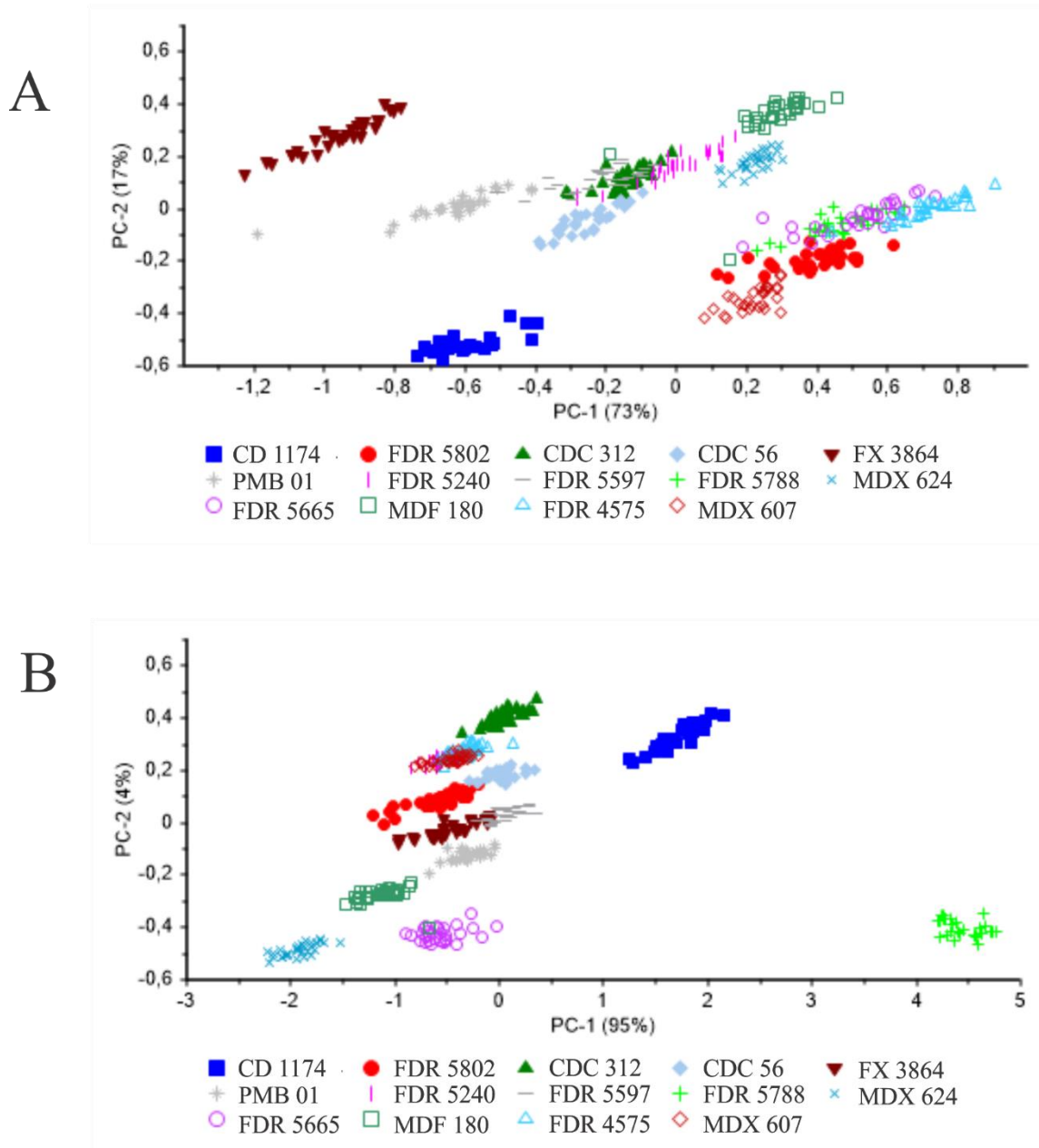


Figura 9. Análise de componentes principais de folhas maduras. Espectro na faixa Visível (A) e Espectro na faixa NIR (B).

As PCAs de folhas maduras com presença de doença apresentaram sobreposição das amostras CDC 312, CDC 56, FX 3864, PMB 01, FDR 5597, FDR 5788, FDR 5665, FDR 4575 e MDX 607 no espectro visível (Figura 10 A). No intervalo do NIR houve boa separação dos genótipos, com sobreposição apenas nos indivíduos CDC 56 com MDF 180, MDF 180 com

FDR 5665 e FDR 5788 com FDR 4575 (Figura 10 B). Sirisomboon et al. (2009) detectaram presença de doenças em vagens de soja utilizando a espectroscopia na faixa do VISNIR, sugerindo que a técnica possui sensibilidade para realizar a discriminação das amostras.

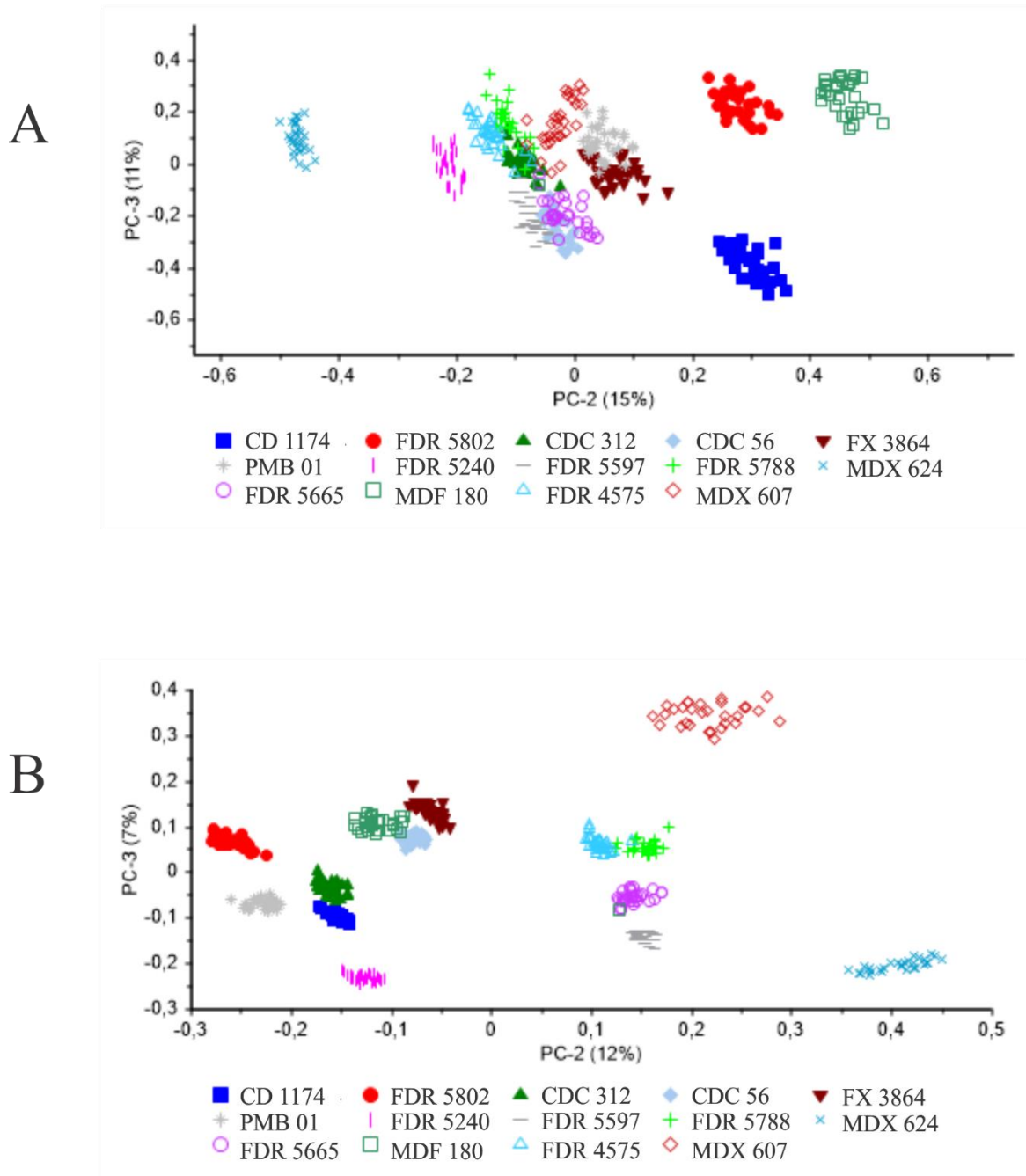


Figura 10. Análise de componentes principais de folhas maduras com presença de doença. Espectro visível (A) e Espectro NIR (B).

Dentre as regiões analisadas, houve boa diferenciação dos clones na região do visível para folhas jovens (Figura 8 A) e a região NIR de folha madura com presença de doença (Figura

10 B), tornando a combinação de região do espectro e estágio fenológico, as mais adequadas para identificação dos clones comerciais de seringueira.

Na região do visível são, normalmente, identificados pigmentos de clorofila α , β e carotenoides (JENSEN, 2009). A clorofila está diretamente relacionada com o desempenho da planta como crescimento e produção de metabólitos. Cada variedade clonal foi resultante de cruzamentos direcionados a condições como resistência ao frio, seca e ataques fitopatológicos. Assim, a composição foliar das variedades apresentam diferentes características, que interferem desempenho de cada clone, revelando um potencial parâmetro de diferenciação.

Na região do espectro visível, os clones CDC 312, CDC 56 e FDR 5788 foram agrupados separadamente dos demais indivíduos (Figura 8B), sugerindo uma composição foliar, possivelmente de pigmentos, diferente para estes. Entretanto ainda não existem informações sobre quais elementos estão associados a essa diferenciação. Os demais clones foram plotados próximos e tem origem no Brasil (local de ocorrência natural), exceto pelo clone CD 1174 que possui origem na Guatemala e o MDF 180 que é do Peru (Tabela 6).

A diferenciação dos clones na região do NIR (Figura 10B), apresentou os indivíduos FDR 5597, FDR 5788, FDR 5665 e FDR 4575 plotados próximos indicando similaridade entre essas variedades, entretanto, os clones FDR 5802 e FDR 5240 foram agrupados separadamente. Os clones da linhagem FDR possuem parentais da linhagem clonal HARBEL, assim, compartilham do mesmo pool gênico ancestral.

Os clones MDX 624 e MDX 607 ficaram dispersos do grupo central na PCA, e possuem um genitor comum (Avros 1581). O outro parental é da série MDF, porém de origem desconhecida para ambos. São genótipos que em todos os tratamentos permaneceram distantes na dispersão de PCAs. Isso indica que existe uma elevada divergência genética entre os dois, apesar do ancestral comum.

Os clones CD 1174, FDR 5802, CDC 312, CDC 56, FX 3864, PMB 01, FDR 5240, e MDF 180 foram plotados próximo (Figura 10B). Estes clones possuem origem no Brasil (FDR 5802, FX 3864, PMB 01 e FDR 5240) e Peru (MDF 180), ambos locais de ocorrência natural da espécie, exceto as variedades clonais CD 1174, CDC 312 e CDC 56 que são da Guatemala, mas foram obtidas em processos de domesticação da espécie e possuem relação forte com locais de ocorrência natural verificada em trabalhos de diversidade genética (Souza et al., 2015; Souza, 2018).

A discriminação dos clones de seringueira utilizando NIRS se mostrou promissora sendo possível realizar a discriminação de diferentes estádios fenológicos. As folhas jovens na região da faixa VIS e maduras com presença de doença na faixa do espectro NIR apresentaram

os melhores agrupamentos das amostras, com pouca ou quase nenhuma sobreposição. Recomenda-se realizar análises supervisionadas mais profundas para identificar os compostos que estão envolvidos na diferenciação nestes estádios fenológicos e a criação de um modelo de predição que possa ser utilizado em campo para agilizar as coletas de dados.

5.4 CONCLUSÃO

A técnica espectroscópica de infravermelha mostrou grande potencial para discriminar clones comerciais de seringueira. Porém os dados precisam ser mais explorados quimiometricamente para seleccionar intervalos de faixas espectral mais informativas e testar outros modelos, inclusive modelos estatísticos supervisionados. Em base de nosso trabalho podemos afirmar que se pode aplicar na agricultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERGO, M. C. J. **Transferência de calibração na discriminação de mogno e espécies semelhantes utilizando NIRS e PLS-DA.** 2014. 152 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, 2014.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas.** 5. ed. Viçosa: UFV, 2009. 529 p.
- CARNEIRO, M. E. **Classificação de lâminas de madeira de pinus spp por espectroscopia óptica.** 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- CASTILLO R. et al. Supervised pattern recognition techniques for classification of Eucalyptus species from leaves NIR spectra. **Journal of Chilean. Chemistry Society**, v. 53, n. 4, p. 1709-1713, 2008.
- DELMADI, L. C. et al. Avaliação do potencial de uso da hiperparasita *Dicyma pulvinata* (Berk. & MA Curtis) sem controle biológico de mal-folhas [*Microcyclus ulei* (Henn.) Arx]] de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Wild. Ex A. Juss.) Muell. Arg.] Em São José do Rio Claro, MT. **Ciência Florestal**, v. 19, n. 2, p. 183-193, 2009.
- DOURADO, C. L. **Melhoramento em progênies de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex A. 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, 2016.
- GONÇALVES, P. S. et al. Biologia, citogenética e ploidia de espécies do gênero *Hevea*. **O Agrônomo**, v. 41, n. 1, p. 40-64, 1989a.
- GONÇALVES, P.S. et al. Variabilidade genética da produção anual da seringueira: estimativas de parâmetros genético e estudo de interação genótipo x ambiente. **Bragantia**, v. 49, n. 2, p. 305-320, 1990a.
- GONÇALVES, P S. et al. **Manual de heveicultura para o Estado de São Paulo, Série Tecnologia APTA**, Campinas: Instituto Agronomico, 2001. 78 p.
- GONÇALVES, P. S.; MARQUES, J. R. B. Melhoramento Genético da Seringueira: passado, presente e futuro. In: ALVARENGA, A. P. et al. **Seringueira**. Viçosa: Epamig, 2008. p. 401-407.
- GONÇALVES, P. de S.; FONTES, J. R. A. Domesticação e melhoramento da seringueira. **Domesticação e Melhoramento: Espécies Amazônicas**. Viçosa, UFV, p. 395, 2009.
- HOMMA, A. K. O. Extrativismo vegetal ou plantio: qual a opção para a Amazônia?. **Estudos Avançados**, v. 26, n. 74, p. 167-186, 2012.

JENSEN, J. R. **Sensoriamento remoto do Ambiente: uma perspectiva em recursos terrestres**. 2 ed. Trad. José Carlos Neves Epiphânio. São José dos Campos, SP: Parêntese, 2 ed., 2009. 598 p.

MORENO, R. M. B. Propriedades físicas e propriedades tecnológicas da borracha natural. In: Alvarenga, A. P.; CARMO, C. A. F. S. (Ed.) **Seringueira**. Viçosa: Epamig, 2008. p. 805-851.

OFFORD, C.A. Germplasm Conservation. In: Thomas, B.; Murphy, D. J.; Murray B. G. (Ed.). **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. Elsevier, 2017. p. 281-288.

PRIYADARSHAN, P. M.; CLEMENT-DEMANGE, A. Breeding *Hevea* Rubber: Formal and Molecular Genetics. **Advances in Genetics**, v. 52, n. 1, p. 51-115, 2004.

PRIYADARSHAN, P. M. et al. Breeding *Hevea* Rubber. In: JAIN, S.M.; PRIYADARSHAN, P. M. (Ed.). **Breeding Plantation Crops**. Tropical Species, New York: Springer Science, 2009. p. 469-524.

SANTOS, Maria Betania Hermenegildo dos. **Fenotipagem não destrutiva usando espectroscopia no infravermelho próximo e quimiometria em sementes de mamona**. 2015. 95 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

SIMÕES NETO, D. E. et al. Desempenho de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) em diferentes ambientes do Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 7, 1999. Londrina, **Anais...** Londrina, 1999. p. 29-33.

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

SIRISOMBOON, P. et al. Study on non-destructive evaluation methods for defect pods for green soybean processing by near-infrared spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 4, p. 502-512, 2009.

SIRISOMBOON, P. et al. Shortwave near infrared spectroscopy for determination of dry rubber content and total solids content of Para rubber (*Hevea brasiliensis*) latex. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 21, n. 4, p. 269-279, 2013.

SOARES, L. F. et al. Avaliação de espectrômetro nir portátil e pls-da para a discriminação de seis espécies similares de madeiras amazônicas. **Química Nova**, v. 40, n. 4, p. 418-426, 2017.

SOUZA, L. M. et al. 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. **Caracterização da diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de seringueira**. 2018. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologias para a Amazônia) – Centro de Ciências Biológicas e das Naturezas, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2018.

VERAS, Germano et al. Classification of biodiesel using NIR spectrometry and multivariate techniques. **Talanta**, v. 83, n. 2, p. 565-568, 2010.

WEBSTER, C. C.; BAULKWILL, W. E. J. Rubber Tropical Agricultural Series. **Singapura: Longman Scientific and Technical**, v. 12, n. p. 614, 1989.

XIE, L. et al. Discrimination of transgenic tomatoes based on visible/near-infrared spectra. **Analytica Chimica Acta**, v. 584, n. 2, p. 379-384, 2007.

CONCLUSÕES GERAIS

Os métodos de discriminação utilizados foram eficientes para discriminar os clones comerciais de seringueira. As análises em genética molecular devem ser empregadas por garantir a autenticidade de um clone, permitindo atribuir um certificado clonal para as variedades analisadas, e a otimização de coleções e jardins clonais nas unidades de pesquisa e dos produtores.

A espectroscopia infravermelha na região VIS-NIR apresentou grande potencial na discriminação dos clones, indicando a necessidade de analisar quais compostos estão envolvidos nessa diferenciação, utilizando de ferramentas como análises supervisionadas e estabelecendo um modelo de predição para identificação dos clones, facilitando o acompanhamento e fiscalização dos mesmos em campo utilizando foto espectrômetro portátil.