



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



**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
ACESSOS DO BANCO DE GERMOPLASMA DE
SERINGUEIRA**

Clemeson Silva de Souza

RIO BRANCO, AC
2018

Clemeson Silva de Souza

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
ACESSOS DO BANCO DE GERMOPLASMA DE
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**.

Orientadora: Dr^a. Tatiana de Campos

Coorientadora: Dr^a. Livia Moura de Souza

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Anete Pereira de Souza

RIO BRANCO, AC
2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

- S729c Souza, Clemerson Silva, 1983-
Caracterização da diversidade genética de acessos do banco de
germoplasma de seringueira / Clemerson Silva de Souza. – 2018.
64 f. : il. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre,
Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia
para a Amazônia. Rio Branco, 2018.
Inclui Referências bibliográficas.
Orientador: Profª. Dra. Tatiana de Campos.
Co-orientador: Profª. Dra. Livia Moura de Souza.
Co-orientador: Profª. Dra. Anete Pereira de Souza.
1. Seringueira. 2. Diversidade genética. 3. Banco de
germoplasma. I. Título.

CDD: 509.09811

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

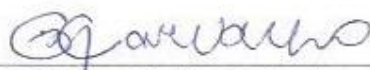
CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DO
BANCO DE GERMOPLASMA DE SERINGUEIRA

Clemeson Silva de Souza

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 04/04/18



Prof^a. Dr^a. Tatiana de Campos
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária



Prof^a. Dra. Clarice Maia Carvalho
Universidade Federal do Acre



Prof. Dr. João Ricardo Avelino Leão
Instituto Federal do Acre

À Deus que esteve presente em todos os momentos. A minha querida mãe Nazira Carneiro da Silva e aos meus irmãos Cleideson Silva de Souza e Jardeson Carneiro da Silva por sempre terem me apoiaram.

DEDICO

À Ana Sara, Nathan e Maria Leticia os tesouros que Deus colocou em meus cuidados.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar coragem, força e sempre me conduzir pelo melhor caminho.

À minha orientadora, Dra. Tatiana de Campos, pelos ensinamentos profissionais e pela paciente orientação e confiança. Obrigado por ter me motivado a conduzir esse trabalho e por me incentivar a conquistar novos objetivos.

À minha coorientadora Dra Livia Moura de Souza, pela disponibilidade em todos os momentos necessários.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo aporte financeiro e pela disponibilização do laboratório de Biologia Molecular (LabMol). Esse apoio foi essencial para a realização desse trabalho.

À Universidade Federal do Acre - UFAC, por fornecer o Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (CITA).

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

À Dr^a Anete Pereira de Souza por me coorientar e ceder o laboratório de Genética e Biologia Molecular da Unicamp para realização da genotipagem. Obrigado aos funcionários e bolsistas do laboratório pela presteza e gentileza nos momentos em que precisei.

Ao Dr. Fábio Alves pela disponibilidade e ensinamentos no período em que estive na Unicamp.

Aos Doutores Everton Rabelo Cordeiro da Embrapa Amazônia Ocidental, Maria do Pilar Henrique das Neves da Embrapa Amazônia Oriental e Josefino de Freitas Fialho da Embrapa Cerrados por coletarem e enviarem as amostras para a realização desse estudo.

Em especial minha mãe, pelos ensinamentos, conselhos, exemplo de vida e por sempre acreditar em mim.

Aos meus irmãos Cleideson e Jardeson por terem sempre me incentivado e por dividirem e compartilharem comigo essa jornada.

Aos meus amados filhos pela paciência e por entender minha ausência nos momentos em que precisei estudar. Vocês são a herança que Deus me deu.

Aos meus familiares, que são muitos, por me ajudarem nos momentos em que precisei.

Aos amigos do LabMol: Ana Claudia, João Ricardo, Jônatas Oliveira, Sabrina Oliveira, Susana Melo, Lúdia Cavalcante, Lucielio Manoel, pelos bons momentos de convivência e trocas de experiências.

À Hellen Azêvedo pela paciência de me ensinar às rotinas do laboratório e pelo auxílio na condução das análises estatísticas.

À todos os amigos que fizeram parte dessa conquista e aqueles que acreditaram que esse sonho se tornaria realidade. Não irei citar nomes porque certamente vou me esquecer de alguém. A todos o meu muito obrigado!

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Inovação e Tecnologia para a Amazônia, pelas excelentes disciplinas ministradas.

Aos colegas Pós-Graduandos, pelas trocas de experiências e convivência nas disciplinas.

E a todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente com essa conquista.

RESUMO

A seringueira (*Hevea brasiliensis*) é uma planta popularmente conhecida por ser a principal fonte de borracha natural. Assim, é fundamental que este recurso genético esteja devidamente avaliado e caracterizado. O objetivo desse trabalho foi caracterizar por meio de marcadores microssatélites a diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de seringueira da Embrapa Amazônia Ocidental, Embrapa Amazônia Oriental e Embrapa Cerrados. Foram amostrados 318 acessos, pertencentes às espécies *Hevea brasiliensis*, *Hevea pauciflora*, *Hevea rigidifolia* e híbridos interespecíficos. Foram testados 10 marcadores microssatélites. Os produtos amplificados foram genotipados em sequenciador automático. As estimativas genéticas estimadas foram: heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O), número de alelos por loco e conteúdo de informação polimórfica (PIC). Os dados genéticos foram utilizados para verificar a estruturação dos genótipos, agrupamento pelo método de *Neighbor-Joining*, dispersão por coordenadas principais e formação de uma coleção nuclear. Os dez locos microssatélites revelaram 348 alelos. As médias de H_E , H_O e PIC foram de 0,86, 0,63 e 0,86, respectivamente. Os marcadores microssatélites de *H. brasiliensis* foram potencialmente transferíveis para *H. pauciflora* e *H. rigidifolia*. As distâncias genéticas entre o acesso de *Hevea* spp. variaram de 0,16 a 0,94. A coleção nuclear formada por 59 genótipos representou 85% da diversidade alélica total. Conclui-se que o polimorfismo foi alto entre os genótipos avaliados. As espécies de *Hevea* compartilham homologias em regiões flanqueadoras de microssatélites. As distâncias genéticas demonstraram alta variabilidade entre os acessos amostrados. A coleção nuclear constituiu-se de 19% do número total de acessos.

Palavras-chave: Coleção nuclear. *Hevea* spp. Genótipo. Marcador SSR. Polimorfismo. Recursos genéticos.

ABSTRACT

The rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a plant popularly known for being the main source of natural rubber. It is therefore essential that this genetic resource is properly evaluated and characterized. The objective of this work was to evaluate by microsatellite markers the genetic diversity of accesses of the rubber germplasm bank of Embrapa Amazônia Ocidental, Embrapa Amazonia Oriental and Embrapa Cerrados. It was used 318 accessions, belonging to the species *Hevea brasiliensis*, *Hevea pauciflora*, *Hevea rigidifolia* and interspecific hybrids. Ten microsatellite markers were tested. The amplified products were genotyped in an automated sequencer. The estimated genetic estimates were: expected heterozygosity (H_E) and observed (H_O), number of alleles per locus and content of polymorphic information (PIC). Genetic data were used to verify the structure of the genotypes, grouping by the Neighbor-Joining method, dispersion by main coordinates and formation of a nuclear collection. The ten microsatellite loci revealed 348 alleles. The mean values of H_E , H_O and PIC were 0.86, 0.63 and 0.86, respectively. The microsatellites markers of *H. brasiliensis* were potentially transferable to *H. pauciflora* and *H. rigidifolia*. The genetic distances between the access of *Hevea* spp. ranged from 0.16 to 0.94. The nuclear collection of 59 genotypes represented 85% of the total allelic diversity. It was concluded that the polymorphism was high among the evaluated genotypes. *Hevea* species share homologies in microsatellite flanking regions. The genetic distances showed high variability among the accessions sampled. The nuclear collection constituted 19% of the total number of accesses.

Keywords: Core collection. *Hevea* spp. Genotype. SSR marker. Polymorphism. Genetic resources.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração das características morfológicas de <i>Hevea</i> spp. (A) galho com fruto deiscente; (B) extremidade de um ramo lateral de um racemo; (C) flor masculina (parte do perianto distinto); (D) flor feminina na seção longitudinal; (E1, E2), frutos; (F) semente. Fonte: Gonçalves (1990).	17
Figura 2 - Área de ocorrência natural das espécies de <i>Hevea</i>	19
Figura 3 - Esquema de montagem de multiplex para o procedimento de genotipagem.....	36
Figura 4 - 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 nos 318 acessos dos BAGs de <i>Hevea</i> spp. da Embrapa Amazônia Ocidental, Embrapa Amazônia Oriental e E Embrapa Cerrados.	45
Figura 5 - Representação dos 318 acessos de <i>Hevea</i> spp. de acordo com a análise bayesiana gerada pelo programa STRUCTURE. As colunas representam os indivíduos. Os acessos avaliados foram divididos em 2 grupos (K = 2). As cores vermelha e verde representam respectivamente os grupos 1 e 2.....	46
Figura 6 - Árvore não enraizada de <i>Neighbor-Joining</i> representando a relação genética entre os 318 acessos de <i>Hevea</i> spp. (A) A cor de cada acesso está de acordo com a formação dos grupos gerados pelo programa STRUCTURE, considerando o K=2. (B) Agrupamento baseado nas espécies.	48
Figura 7 - Árvore não enraizada de <i>Neighbor-Joining</i> representando a associação genética entre os 318 acessos de <i>Hevea</i> spp. com relação ao local de origem.....	49
Figura 8 - Representação gráfica entre os 318 acessos de <i>Hevea</i> reveladas pela análise de coordenadas principais PCoA com base na distância genética modificada de Rogers. (A) Dispersão dos acessos com relação à origem geográfica. (B) Dispersão com base nos grupos gerados pelo programa STRUCTURE, considerando o K=2.	51
Figura 9 - Número de alelos em percentagem em função do número de acessos incluídos na coleção nuclear de <i>Hevea</i> spp.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Acessos de <i>Hevea</i> spp. pertencentes aos Bancos Ativos de Germoplasma da Embrapa Cerrados, Embrapa Amazônia Ocidental e Embrapa Amazônia Oriental.....	32
Tabela 2 - Descrição dos microssatélites, incluindo o motivo repetitivo e a amplitude alélica.	35
Tabela 3 - Caracterização dos dez locos em número de alelos por loco (N); Heterozigosidade esperada (H_E); Heterozigosidade observada (H_O) e conteúdo de polimorfismo (PIC) para os 318 acessos estudados.	40
Tabela 4 - Caracterização da transferibilidade dos locos de <i>H. brasiliensis</i> para <i>H. pauciflora</i> e <i>H. rigidifolia</i>	43
Tabela 5 - Identificação dos acessos de <i>Hevea</i> spp. para formação da coleção nuclear dos bancos de germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental, Embrapa Amazônia Oriental e Embrapa Cerrados.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

BAG: Banco de germoplasma

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

H_E : Heterozigosidade esperada

EST-SSR: Sequências Expressas Simples Repetidas

H_O : Heterozigosidade observada

IAC: Instituto Agronômico de Campinas

NJ: *Neighbor Joining*

PIC: Conteúdo de informação polimórfica

PCoA: Coordenadas principais

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RRIM: *Rubber Research Institute of Malaysia*

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

SSR: Sequências simples repetida

UFLA: Universidade Federal de Lavras

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Gênero <i>Hevea</i>	16
2.1.1 Aspectos gerais e taxonômicos.....	16
2.1.2 Centro de diversidade genética e área de ocorrência.....	18
2.2 Importância econômica	21
2.3 Clones de seringueira	22
2.4 Uso e conservação de coleções ex situ no melhoramento de plantas.....	23
2.4.1 Banco de germoplasma do gênero <i>Hevea</i>	26
2.5 Estudos moleculares no gênero <i>Hevea</i>	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 Geral	30
3.2 Específicos.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Material Vegetal	30
4.2 Extração de DNA.....	35
4.3 Análises dos locos microssatélites.....	35
4.4 Análise da diversidade genética e transferibilidade	36
4.5 Análise de Agrupamento	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea brasiliensis*) pertence ao gênero *Hevea* e à família Euphorbiaceae. É uma importante cultura perene nativa da Amazônia, muito conhecida pela produção de látex, utilizada na fabricação de borracha natural (GONÇALVES et al., 1989a). Apesar da existência de cerca de 2500 espécies de plantas produtoras de látex, somente *H. brasiliensis* se estabeleceu como uma fonte de borracha para as indústrias desse seguimento (BACKHAUS, 1985).

Até o início do século passado, o Brasil foi o maior produtor e exportador de borracha natural, sendo os Estados situados na região Amazônica, os principais responsáveis pelo sucesso dessa produção. Entretanto, na atualidade, essa realidade está atribuída aos países do Sudeste Asiático, sendo eles os maiores produtores de borracha natural, cobrindo mais de 86% da produção mundial (IRSG, 2017).

Segundo Gonçalves et al. (1990b), a cultura da seringueira foi introduzida na região Asiática no final do século XIX onde encontrou condições ótimas para o seu estabelecimento. Os autores ainda relatam que o sucesso do cultivo de seringueira nesta região decorreu inicialmente da introdução de 22 mudas no Jardim Botânico de Cingapura. Essas mudas foram oriundas de sementes retiradas do Estado do Pará, Brasil, por Henry Wickham em 1876.

Além das coleções *ex situ* de seringueira surgidas a partir das chamadas árvores de Wickham muitas outras coleções foram montadas na intenção de conservar o inestimável recurso genético dessa cultura. Essas coleções foram estabelecidas a partir de várias prospecções realizadas na floresta Amazônica (PRIYADARSHAN; GONÇALVES, 2003). De acordo com os autores, os vários levantamentos foram realizados durante o século passado, objetivando coletar sementes e hastes de espécies selvagens de *Hevea*.

Nas últimas décadas, a seringueira tem sido uma fonte de renda apreciável devido à alta variedade de produtos oriundos de sua matéria prima (PRIYADARSHAN; GONÇALVES, 2003). Entretanto, alguns problemas, como o mal das folhas, doença causada pelo fungo *Microcyclus ulei*, tem limitado o desenvolvimento dessa cultura (LE GUEN, et al., 2011; PÁEZ, et al., 2015). Outra limitação é a estreita base genética encontrada nos sistemas de heveicultura. Na intenção de minimizar esses problemas, muitas plantas têm sido retiradas de suas populações naturais para serem inseridas em coleções *ex situ* (SOUZA et al., 2015). Essas coleções também funcionam como fonte de recursos genéticos, onde indivíduos

com alto potencial de rendimento de borracha são considerados promissores em programas de melhoramento genético (SILVA et al., 2014).

Muitas coleções *ex situ* (Banco Ativo de Germoplasma - BAG) são parcialmente redundantes entre países e entre centros de pesquisa no mesmo país, devido à duplicação dos acessos e partilha de materiais entre as instituições (SHAN et al., 2007). Assim, é crucial analisar um conjunto de dados sobre banco de germoplasma, tanto para obter resultados que possam diferenciar seus acessos e excluir possíveis duplicatas, quanto para localizar genótipos possuidores de genes que possam ser incorporados em programas de melhoramento. A caracterização molecular dos recursos genéticos de uma coleção contribui para a otimização de seus acessos, agrupando um número suficiente de genótipos que determinem com clareza a diversidade genética descrita (SOUZA et al., 2015).

Para a caracterização da diversidade, há vários marcadores moleculares disponíveis. Os marcadores microssatélites têm sido utilizados em estudos de diversidade genética de clones cultivados e em populações de seringueira (SAHA et al., 2005; LE GUEN et al., 2009; GOUVÊA et al., 2010). O crescente interesse do comércio nacional por borracha natural tem demandado novos estudos a fim de melhorar a produtividade e acelerar as pesquisas de melhoramento dessa cultura. Uma análise prévia em acessos de várias coleções *ex situ* de *Hevea* na América do Sul (SOUZA et al., 2015), identificou vários *pools* gênicos extremamente divergentes. No entanto, ainda restaram acessos da Embrapa Amazônia Ocidental, Embrapa Amazônia Oriental e Embrapa Cerrados que não tiveram seu perfil genético caracterizado.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a diversidade genética de acessos dos Bancos de germoplasma de *Hevea* spp. da Embrapa Amazônia Ocidental, Embrapa Amazônia Oriental e Embrapa Cerrados a fim de fornecer uma base de dados molecular que venha enriquecer o conhecimento do banco nacional de germoplasma de seringueira. Tal conhecimento contribuirá com a estruturação genética dos acessos amostrados, quantificação da diversidade alélica, identificação de genótipos divergentes, além de sugerir a formação de uma coleção nuclear que capture a máxima diversidade genética dentro de uma subamostra reduzida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Gênero *Hevea*

2.1.1 Aspectos gerais e taxonômicos

O gênero *Hevea* está dentro do grupo da família Euphorbiaceae, onde de acordo com Trindade e Lameira (2014) é composta por aproximadamente 334 gêneros, os quais apenas 72 ocorrem no território brasileiro. Tais autores revelam que além de *Hevea*, os gêneros *Manihot* (mandioca), *Ricinus* (mamona) e *Euphobia* (erva de leite) são muito importantes dentro da família Euphorbiaceae por incluírem espécies de destaque econômico, através da alimentação humana e uso medicinal.

A seringueira pertence ao gênero *Hevea* [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.DC.) Muell.Arg.] e é considerada a espécie mais importante desse gênero (GONÇALVES et al., 1989) por ser a principal planta cultivada e explorada para a produção de borracha natural.

Hevea pauciflora (Spruce ex Benth.) e *Hevea rigidifolia* (Spruce ex Benth.) são espécies que produzem látex com poucos polímeros de borracha, no entanto, sua importância está destinada aos programas de melhoramento por apresentarem imunidade a certas doenças foliares e vigor de crescimento vegetativo (GONÇALVES et al., 1989b; GONÇALVES et al., 1990a). Essas duas espécies já foram utilizadas em enxertia para a obtenção de clones de copa resistentes ao mal das folhas (MORAES; MORAES, 2008; MORAES et al., 2013).

As investigações taxonômicas do gênero *Hevea* datam inicialmente do ano 1775, no qual Aublet descreveu a espécie *Hevea guianensis* (PRIYADARSHAN et al., 2009). Pires et al. (2002) relatam que Richard propôs em 1791 a substituição do nome genérico *Hevea* por *Siphonia*, uma latinização de *Heve* e, em 1824, Jussieu publicou o binômio *Siphonia brasiliensis*, para seringueira verdadeira. Contudo em 1865 o gênero *Hevea* foi restabelecido por Müller, a qual propôs para seringueira a combinação *Hevea brasiliensis*, isso ocorreu porque a denominação *Siphonia* não se encaixava no código Internacional de Nomenclatura.

Segundo a literatura (GONÇALVES et al., 1997; SECCO, 2008), o Brasil, possui 11 espécies reconhecidas: *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.DC.) Muell.-Arg.; *Hevea guianensis* Aublet; *Hevea benthamiana* Muell.-Arg.; *Hevea pauciflora* (Spruce ex Benth.); *Hevea nitida* Mart. ex Muell.-Arg.; *Hevea spruceana* (Benth.); *Hevea paludosa* Ule Jarb.; *Hevea rigidifolia* (Spruce ex Benth.) Muell.-Arg.; *Hevea camporum* Ducke; *Hevea microphylla* Ule e *Hevea camargoana* Pires.

Pires et al. (2002) relatam que as confusões, interpretações pouco precisas e desacordos entre autores sobre o número e a classificação das espécies do gênero *Hevea* é devido ao fato de que apesar desse gênero ser um táxon bem definido, bem limitado e de fácil reconhecimento, o mesmo não se pode dizer das suas espécies, que são dificilmente separáveis uma das outras. Isso ocorre principalmente pela inexistência de barreiras reprodutivas bem definidas (CLÉMENT-DEMANGE et al., 2001). Logo, pode-se considerar que as espécies do gênero *Hevea* formam um complexo de espécies em evolução para a especiação.

Segundo Secco (2008), as espécies do gênero *Hevea* pertencem ao grupo das dicotiledôneas. São plantas monoicas com flores unissexuadas, pequenas, dispostas em racimo, de coloração roxa avermelhada em *H. spruceana* e amarelada nas demais espécies. Possuem folhas compostas trifolioladas longamente pecioladas. Além disso, todas as espécies são lenhosas e arbóreas, com exceção de *H. camargoana* que é arbustiva.

Outro aspecto comum das espécies de *Hevea* é a inexistência de pétalas nas flores de ambos os sexos e a presença de um cálice com cinco lobos que surgem em um disco basal de cinco glândulas (GONÇALVES et al., 1990). Os autores ainda relatam que o fruto é composto por uma cápsula trilobular, normalmente contendo três sementes, a qual possui deiscência explosiva, exceto *H. spruceana* e *H. microphylla* (Figura 1).

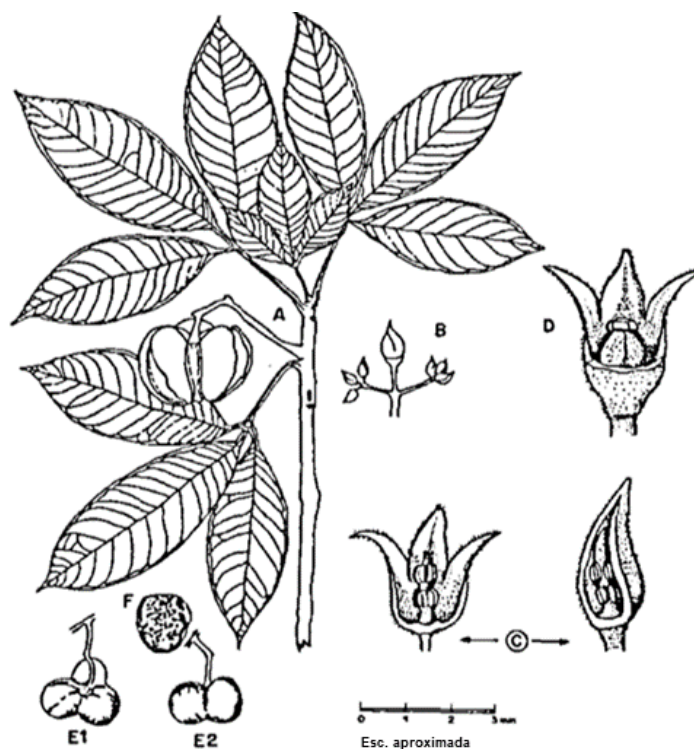


Figura 1 - Ilustração das características morfológicas de *Hevea* spp. (A) galho com fruto deiscente; (B) extremidade de um ramo lateral de um racemo; (C) flor masculina (parte do perianto distinto); (D) flor feminina na seção longitudinal; (E1, E2), frutos; (F) semente. Fonte: Gonçalves (1990).

Uma característica importante do gênero é a produção de látex, fornecida por células especializadas, denominadas laticíferas (SÁ, 2000). Mesquita e Oliveira (2010) ao avaliar clones de seringueira, relataram que o número e o diâmetro das células laticíferas, além da espessura da casca e o diâmetro do caule apresentam correlação positiva com a produção de látex.

Estudos citogenéticos apontaram que a seringueira poderia ser um anfidiplóide ($2n=4x=36$) estabilizado em seu curso evolutivo (PRIYADARSHAN et al., 2009). Ong (1975) analisou o paquíteno da prófase I de cinco clones de *H. brasiliensis* e reforçou em sua conclusão que o gênero *Hevea* ($2n=36$) possivelmente seria descendente do cruzamento entre duas espécies diplóides ($2n=18$), com número básico de cromossomos $x=9$ e não $x=18$. Essa mesma observação já havia sido feita por Perry (1943), em trabalho realizado com 22 gêneros da família Euphorbiaceae. Nesse estudo as espécies do gênero *Hevea* foram verificadas contendo número básico $x=9$ cromossomos.

Investigações feitas por Lespinnasse et al. (2000) indicaram que embora algumas observações fundamentam sua origem a partir de duas espécies ancestrais com conjunto genômico $2n=18$, nenhum ancestral diplóide foi encontrado e as análises feitas com marcadores moleculares revelam que *Hevea* comporta-se como um diplóide $2n=36$. Um estudo recente com base em homologia de genes parálogos, sugeriu que a seringueira passou a ser diplóide após ter passado por um evento de paleotetraploidização antes da especiação entre *Hevea* e *Manihot* (POOTAKHAM et al., 2017). Segundo Tayalé e Parisod (2013), a maioria das plantas paleopoliplóides restauraram um comportamento diplóide ao sofrerem alterações estruturais e funcionais, incluindo reorganização genômica, mutação diferencial, eliminação e inversão em cromossomos duplicados.

2.1.2 Centro de diversidade genética e área de ocorrência

As plantas do gênero *Hevea* ocorrem naturalmente na Região Amazônica, tendo como centro primário de diversidade genética o rio Negro, na confluência com o rio Amazonas. Já o centro secundário abrange uma vasta área nas proximidades do município de Borba, no baixo rio Madeira (WYCHERLEY, 1977). Ao redor do centro de origem, espécies de *Hevea* ocorrem naturalmente na Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela. Todas as espécies ocorrem no Brasil exceto *H. microphylla* (PRIYADARSHAN; CLEMENT-DEMANGE, 2004). A extensão da distribuição desse gênero pode chegar a seis milhões de quilômetros quadrados sendo mais da metade do

território brasileiro e tendo como extremos, na América do Sul, limites também na floresta amazônica (PIRES et al., 2002). A Figura 2 mostra a dimensão da ocorrência natural das espécies do gênero *Hevea*.



Figura 2 - Área de ocorrência natural das espécies de *Hevea*.

Fora de sua ocorrência natural à seringueira vem sendo cultivada em vários Estados, como Bahia (CECÍLIO et al., 2006), Espírito Santo (SILVA et al., 2013), Minas Gerais, São Paulo e Paraná (GONÇALVES; MARQUES, 2008). Isso retrata a excelente capacidade que a seringueira tem de se adaptar a diferentes condições ecológicas. A importância desta expansão está centrada principalmente na grande demanda do comércio por borracha natural e, também, pela busca por áreas não infestadas pelo *M. ulei*, que no passado dizimou grandes plantações instaladas em áreas de ocorrência natural da cultura e também do fungo (GONÇALVES; MARQUES, 2008).

O clima predominantemente seco com poucos meses de precipitação é um fator crucial para o bom desenvolvimento da seringueira fora de seu habitat natural. Isso reduz o período de troca de folhas e encurta a duração de molhamento dos folíolos, impedindo assim a proliferação do patógeno causador do mal das folhas da seringueira (ALVARENGA; CAMARGO, 2008).

Camargo et al. (2003) em trabalhos de zoneamento, relacionaram a temperatura média menor que 20 °C no mês mais frio como um fator determinante ao cultivo de clones de seringueira sem a manifestação de graves problemas fitossanitários. Os mesmos autores relatam que menores temperaturas associadas a longos períodos de seca e de baixa umidade impedem a esporulação do fungo. Assim, em função dos graves problemas fitossanitários enfrentados na região amazônica a heveicultura vem se expandido para as regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (PILAU et al., 2007).

O cultivo da seringueira em outras regiões não é oriundo apenas de problemas causados por infestações fúngicas. As excelentes propriedades do látex foi um atrativo para o bom desempenho das atividades econômicas de diversos heveicultores espalhados em muitos países. A domesticação da cultura em outras regiões do planeta deu início em 1876, a partir da coleta de cerca de 70.000 sementes por Henry Wickham no Município de Boim, no Estado do Pará (WEBSTER; BAULKWILL, 1989). Essas sementes foram levadas para o Jardim Botânico Real (*Royal Botanical Garden de Kew*) em Londres, onde foram plantadas e germinadas.

Apesar do grande número de sementes, poucas mudas foram obtidas, devido à alta recalcitrância da semente. Contudo, as remanescentes foram enviadas para a Malásia e outros países do Sudeste Asiático, originando todas as plantações de seringueiras existentes na região (WEBSTER; BAULKWILL, 1989). O sucesso propagativo dessas plantas foi devido principalmente à produção de sementes e ao uso de enxertos (DIJKMAN, 1951).

Além da retirada de suas condições ecológicas naturais e da propagação clonal para fins comerciais, as plantas de seringueira também passaram a ser distribuídas e mantidas em coleções distantes de seus locais de origem. Muitas hastes e sementes de árvores polinizadas abertamente em populações naturais foram coletadas e plantadas em diversas coleções *ex situ* (PRIYADARSHAN; GONÇALVES, 2003).

A retirada de plantas de sua distribuição natural objetiva-se principalmente em conservar genótipos evitando a erosão genética causada tanto pelas ações antrópicas como também pelas mudanças do clima (HAWKES et al., 2012). A maior parte das variedades clonais existentes nos dias atuais, assim como os genótipos que ainda estão sob seleção, são menos de 10 gerações distantes dos seus ancestrais selvagens retirados da floresta amazônica (SOUZA et al., 2015).

2.2 Importância econômica

A borracha é um polímero de hidrocarbonetos, constituída de unidades de poliisopreno (C₅H₈), e a borracha natural é um metabólito secundário (cis 1,4 poliisopreno) originado no floema secundário da planta (PRIYADARSHAN; CLEMENT–DEMANGE, 2004). Devido a sua estrutura e alto peso molecular ela constitui-se em um material estratégico, pois não é substituída por polímeros de borrachas sintéticas (PRIYADARSHAN et al., 2009).

As muitas aplicações apresentadas pela borracha natural se devem a fatores como elasticidade, flexibilidade, resiliência, resistência à abrasão, ao impacto e à corrosão, fácil adesão a tecidos e aço, propriedades isolantes de eletricidade, impermeabilidade a líquidos e gases e capacidade de dispersar calor (RIPPEL; BRAGANÇA, 2009).

Há uma ampla diversidade de produtos produzidos pelas indústrias a partir do látex da seringueira, tais como: manufatura de pneus, produtos para uso médico e paramédico, adesivos, calçados e outros. Tal matéria prima também é muito utilizada nas indústrias de transportes e de produtos bélicos por demonstrar excelentes propriedades isolantes e impermeabilidade tanto ao ar quanto água (MORENO et al., 2008). Mooibroek e Cornish (2000) descrevem a borracha natural como uma fonte estratégica para a fabricação de 40.000 produtos, incluindo 400 artefatos médicos. Já Chen (1983) apontou que mais de 50.000 artigos no mundo são feitos unicamente de borracha natural. Isso mostra a elevada importância econômica que a heveicultura vem exercendo sobre o comércio global.

Apesar de ser originária da bacia amazônica, a produção de borracha na América do Sul representa apenas 2% da produção mundial (LIEBEREI, 2007). O autor atribui essa baixa produção como um reflexo da devastadora disseminação da doença ferrugem foliar sul-americana (SALB), causada pelo ascomiceto *Microcyclus ulei* na década de 1930.

Os dados do IRSG (2017) revelaram que em 2016, a produção mundial de borracha natural atingiu 12,4 milhões de toneladas enquanto o consumo global de borracha foi de 12,6 milhões de toneladas, indicando uma diferença de 200.000 toneladas entre demanda e oferta. Mais de 86% de toda essa produção advém de países Asiáticos como Tailândia, Indonésia, Malásia, Índia, Vietnã e China. Sendo a Tailândia, classificada como a maior produtora de borracha natural, com uma produção total de 4,5 milhões de toneladas e uma participação de 36,3% do total global. Nesse mesmo período a China foi o maior consumidor mundial de borracha natural, sendo suas necessidades supridas com 4,9 milhões de toneladas, dos quais 77,9% foram demandas para as indústrias de pneus (IRSG, 2017).

Informações mostradas pelo IBGE (2016) revelaram que o Brasil produziu apenas 316 mil toneladas, cerca de 1% do total de toda a produção global. Para poder suprir as necessidades internas foi preciso importar cerca de dois terços da demanda exigida pela industrial. A produção nacional de borracha está concentrada principalmente nos estados de São Paulo (58%), Bahia (13%), Minas Gerais (8%), Mato Grosso (8%) e Goiás (6%) (EMBRAPA, 2016).

2.3 Clones de seringueira

O cultivo de seringueira na forma de clones vem sendo uma pratica cada vez mais comum. Isso, segundo Gonçalves e Marques (2008) ocorre devido às várias vantagens que os clones de seringueira desempenham na implantação de um seringal, sendo a uniformidade exibida pelos seus indivíduos uma das características desejáveis. Por outro lado, tais autores ainda ressaltam que árvores de um mesmo clone podem apresentar alta suscetibilidade às mudanças nas condições ambientais e infestação por patógenos devido à baixa variabilidade genética em diferentes caracteres.

A produção de clones geralmente é feita com base em critérios classificatórios. Gonçalves et al. (2001) explicam que, os clones costumam ser classificados em primários, secundários e terciários e outros. Clones primários são aqueles provenientes de parentais desconhecidos obtidos a partir da multiplicação vegetativa de árvores matrizes com caracteres desejáveis. Os clones secundários são obtidos a partir de árvores matrizes oriundas de cruzamentos controlados entre dois clones primários. Já os clones terciários são obtidos de cruzamentos em que pelo menos um dos parentais é secundário e assim por diante.

A nomenclatura dos clones de *Hevea* é feita de forma consensual pelas instituições que os selecionam, sendo estes clones nomeandos na forma de siglas, seguido, após um espaço, de um número da série designado pelo melhorista responsável (WEBSTER; BAULKWILL, 1989). Além disso, a sigla pode representar o nome da instituição ou do local onde o clone foi originado.

No Brasil existem diversos clones, que de acordo com Gonçalves e Marques (2008), são nomeados e abreviados com base em sua origem. Os autores descrevem os mais conhecidos, conforme pode ser visto a baixo:

AC: Acre;

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;
 Gl: 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, Malásia;
 SIAL: Seleção do Instituto Agronômico de Leste, Brasil;
 Tjir: Tjirandji, Indonésia

2.4 Uso e conservação de coleções *ex situ* no melhoramento de plantas

Devido às crescentes intervenções humanas e ao avanço do agronegócio, aliado a expansão da pecuária em áreas florestais, muitas florestas vêm sendo devastadas (PAULO et al., 2015). As induções desses eventos nas florestas levaram a uma ampla perda da biodiversidade em todo o planeta (NEWBOLD et al., 2015), acarretando na perda dos recursos genéticos vegetais e na redução populacional das espécies florestais (BILLINGTON,

1991). Diante desses problemas a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), promoveu em 1961, com o propósito de conservar os recursos genéticos, a primeira Conferência Internacional, com o tema “Perda de genes causada pela destruição acelerada da vegetação primária e o abandono das variedades primitivas pelo agricultor, devido à pressão das cultivares providas pelo melhoramento genético” (BUENO et al., 2006). A partir daí, várias conferências foram organizadas com a finalidade de construir estratégias para o manejo e a conservação dos recursos genéticos do mundo.

Uma das primeiras estratégias internacionais foi à criação do *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), hoje, *International Plant Genetic Resources* (IPGRI) durante a Conferência Técnica Internacional em Biologia realizada pela FAO, em 1974. Tendo como objetivo a elaboração de metas eficazes para a conservação dos recursos genéticos vegetais, principalmente os utilizados na alimentação e agricultura (FAO, 2010). A grande preocupação em conservar essa biodiversidade reflete no conjunto de políticas e programas criados para a manutenção e utilização desses recursos (CARVALHO et al., 2008).

A diversificação genética surge por meio das variações biológicas hereditárias acumuladas durante os processos evolutivos e adaptativos (ARNOLD; KUNTE, 2017), provocada fundamentalmente por eventos mutacionais (YUAN; HUANG, 2017). Essa fonte de diversidade genética precisa ser preservada tanto para combater as novas e emergentes pragas e doenças, como para produzir variedades melhor adaptadas às mudanças de ambientais e do clima, aliando a isso, bom rendimento e produtividade (FAO, 2010).

Assim, por formarem à base do melhoramento de plantas, a conservação e o uso dos recursos genéticos vegetais são essenciais ao desenvolvimento sustentável, sendo alvos para a manutenção e melhoria da produção agrícola e florestal (FRANKEL et al., 1995).

O elemento dos recursos genéticos que maneja a variabilidade genética intraespecífica, transmitida de forma sexual ou somática, de uma geração para outra, denomina-se “germoplasma” (OFFORD, 2017). Para a conservação e o uso sustentável desse recurso são utilizadas duas estratégias: proteção das populações em seu ambiente natural (*in situ*) e preservação de amostras fora de seu local de origem (*ex situ*) (COHEN et al., 1991; RIBEIRO et al., 2016).

Um modelo de coleção *ex situ* são os bancos de germoplasma, por meio de armazenamento de sementes, plantas propagadas vegetativamente e na forma de cultivo no campo (OFFORD, 2017). Segundo Pereira et al. (2010) a coleta destes materiais pode ser feita por meio de sementes ou hastes para a enxertia, sendo a clonagem um grande atalho no melhoramento genético destas espécies.

Os bancos de germoplasmas são definidos como coleções vivas de todo o patrimônio genético de uma espécie ou gênero, a qual deve conter uma variabilidade genética mínima, oriunda de acessos silvestres, nativos, cultivares obsoletas ou desenvolvidas pelo melhoramento genético, para fins de conservação e utilização a longo ou curto prazo (BORÉM; MIRANDA, 2009). Além disso, a inserção de novos materiais em bancos germoplasma *ex situ* possibilita a ampliação da base genética da espécie conservada (SCHREINEMACHERS et al., 2014).

A caracterização da diversidade genética permite identificar e separar geneticamente os acessos que integram a coleção de germoplasma, fomentar o catálogo de descritores dos acessos com informes biológicos essenciais ao manejo e gestão da coleção e estimular a utilização desses acessos no melhoramento genético de plantas (FERREIRA et al., 2007).

No Brasil muitos bancos de germoplasma são conservados atualmente. Köpp et al. (2001) relatam que as atividades de coleta e conservação da biodiversidade dessas coleções começaram a partir do ano de 1970 com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos – CENARGEN, em Brasília, que hoje é reconhecido como sendo um dos maiores centros de conservação do mundo.

As coleções *ex situ* dispõem de um número muito elevado de acessos, no entanto, suas quantidades de amostras não representam fielmente a diversidade genética que está sendo conservada, para tanto, a fim de preencher com precisão essa lacuna, a diversidade genética dessas coleções precisa ser devidamente caracterizada (OFFORD, 2017). Nesse sentido, foram realizados estudos a fim de caracterizar a diversidade genética dos bancos de germoplasmas de muitas culturas: açaí (OLIVEIRA et al., 2010); cacau (GUARÍN et al., 2017); cerejeira (CAMPOY et al., 2016); feijão (CHEN et al., 2015); maracujá (CERQUEIRA-SILVA, et al., 2014); milho (SILVA et al., 2015); oliveira (HAOUANE et al., 2011); seringueira (SOUZA et al., 2015).

A conservação *ex situ* de germoplasma contribui com a segurança global na preservação dos recursos genéticos, proporcionando diversos benefícios para a população mundial. No entanto, o custo operacional para a manutenção e gerenciamento de espécies fora de seu habitat natural é consideravelmente oneroso (SCHREINEMACHERS et al., 2014). O motivo desse alto custo é que a conservação *ex situ* vai além do armazenamento de espécies. Envolve estudos desde a coleta, identificação taxonômica, caracterização morfológica e molecular, avaliação agronômica preliminar e monitoramento dos acessos. Outras atividades que envolvem a conservação *ex situ* é a partilha de materiais entre instituições por meio de intercâmbio, regeneração periódica dos acessos armazenados, multiplicação do germoplasma

finalizando com a disponibilização do germoplasma e de todas as informações sobre o acesso estudado. Portanto manter espécies fora de seu habitat natural justifica-se apenas se houver uso ou expectativas futuras de uso dos recursos genéticos (SACKVILLE et al., 2002).

2.4.1 Banco de germoplasma do gênero *Hevea*

Devido ao intenso desmatamento da floresta amazônica, muitas populações de seringueira deixaram de existir (LE GUEN et al., 2009). Para atenuar esse quadro, muitas tentativas de prospecção foram realizadas nas últimas décadas, objetivando a constituição de bancos de germoplasma de seringueira conjuntamente com outras espécies do gênero *Hevea*.

Os primeiros esforços para conhecer a distribuição natural e a base genética de *Hevea* iniciaram-se durante o século XX, onde vários levantamentos foram realizados com o objetivo de coletar sementes e hastes de árvores selvagens de seringueira para aumentar o *pool* genético da espécie. Uma das primeiras expedições coletivas foi conduzida sob a liderança do ministério da agricultura peruana em 1940 na região de Madre de Dios (PRIYADARSHAN; GONÇALVES, 2003). As mudas obtidas nessa coleta foram multiplicadas por enxertos, (sendo os clones resultantes nomeados MDF) sendo introduzidas e estudadas na Libéria, na Guatemala e no Estado brasileiro da Bahia (BOS; MCINDOE, 1965).

Em 1974, o IRCA (*Institut de Recherche sur le Caoutchouc*, França) e a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) realizaram uma pesquisa conjunta para coletar novas plantas de seringueira nos Estados do Acre e Rondônia (HALLE; COMBE 1974). As plantas silvestres coletadas nesta pesquisa foram propagadas por enxerto, sendo então conhecidas como clones Embrapa/IRCA.

Devido à estreita diversidade genética nos clones de seringueira em muitos seringais da Malásia, estabelecidos a partir das sementes coletadas em 1876 por Henry Wickham, surgiu à necessidade de ampliar a base genética dessa espécie por meio da inserção de novos exemplares em coleção *ex situ*. Deste modo, em 1981, o IRRDB (*International Rubber Research and Development Board*), com apoio do Governo brasileiro realizou uma das maiores expedições de coleta de hastes e sementes de seringueira, a qual reuniu numerosos genótipos provenientes dos Estados do Acre, Mato Grosso e Rondônia (GONÇALVES, 1981; LINS et al., 1981; PAIVA, 1981). As mais de 64.000 sementes e as quase 1.500 hastes colhidas de 194 árvores de alta produção foram divididas entre o Brasil, Malásia e a Costa do Marfim em 50%, 35%, 15%, respectivamente (ONOKPISE, 2004).

A fim de fortalecer os programas de melhoramento no sentido de acrescentar maior resistência ao fungo *Microcyclus ulei*, Santos (1982) deu ênfase a coleta de genótipos da espécie *H. benthamiana*, tida como resistente ao fungo. As onze matrizes destas espécies foram coletadas no município de Barcelos, no Estado do Amazonas.

A fim de aumentar o *pool* de genes nos bancos de germoplasma da Malásia o RRIM (*Rubber Research Institute of Malaysia*) organizou em 1995 uma pesquisa com o apoio da Embrapa, nos Estados do Amazonas e Pará, uma pesquisa para coletar sementes de várias espécies selvagens do gênero *Hevea* (WEI; AR, 2014). Das dez espécies do gênero *Hevea* encontradas no território brasileiro oito tiveram sementes amostradas nessa prospecção: *H. brasiliensis*, *H. benthamiana*, *H. camargoana*, *H. guianensis*, *H. nitida*, *H. pauciflora*, *H. rigidifolia* e *H. spruceana*. As numerosas sementes resultantes dessa coleta foram divididas entre o Brasil e a Malásia.

Os materiais selvagens que permaneceram no Brasil foram úteis para o estabelecimento de uma coleção *ex situ* localizada em uma área experimental da Embrapa Cerrados. Atualmente essa coleção conta com 868 acessos pertencentes às espécies *H. brasiliensis*, *H. benthamiana*, *H. guianensis* e *H. pauciflora*, além dos híbridos resultantes dos cruzamentos interespecíficos e intraespecífico.

A Embrapa Amazônia Ocidental e a Embrapa Amazônia Oriental também mantêm banco ativo de germoplasma de *Hevea* spp. desde de 1974 (GONÇALVES, 1980). Atualmente estas duas coleções conservam respectivamente, 103 e 68 acessos.

2.5 Estudos moleculares no gênero *Hevea*

A variabilidade inter e intraespecífica de genótipos das espécies do gênero *Hevea* vem sendo bastante estudada. Besse et al. (1994) avaliaram 164 indivíduos de populações selvagens e cultivadas de *H. brasiliensis* com marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Os autores encontraram níveis de polimorfismo relativamente altos nos clones cultivados. Com base nisso, sugeriram a incorporação de materiais selvagens em esquemas de melhoramento genético pelo fato dos acessos selvagens terem sido separados em grupos distintos de acordo com sua origem geográfica.

Mais tarde, a natureza dominante dos marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) foi eficientemente utilizada na identificação de polimorfismo em coleções

ex situ. Esses marcadores foram utilizados em acessos das coleções de Wickham e do IRRDB (*International Rubber Research and Development Board*) de 1981 a fim verificar as relações genéticas entre essas duas coleções. Os resultados mostraram que as populações de Wickham e IRRDB foram separadas em dois grupos com valor de similaridade genética de 0,64 (OKTAVIA; KUSWANHADI, 2011). Mesmo em grupos diferentes, esses resultados indicam que essas populações possuem relações genéticas próximas pela similaridade encontrada.

Dezessete genótipos provenientes das coleções do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC e da Universidade Federal de Lavras - UFLA tiveram a similaridade genética estimada por meio de marcadores RAPD. Os valores de similaridade entre esses clones variaram de 0,56 a 1,00, indicando existência de variabilidade genética. O estudo sugeriu que os clones avaliados na UFLA são os mesmos implantados no IAC, exceto o RRIM 701 formado por dois grupos distintos (BICALHO et al., 2008).

Além dos marcadores dominantes, os marcadores codominantes, como os microssatélites vêm contribuindo eficientemente com os estudos genéticos no gênero *Hevea*. LOW et al. (1996), através de pesquisas em bancos de dados identificaram alto nível de polimorfismo nas espécies *H. pauciflora*, *H. guinensis*, *H. camargoana*, *H. benthamiana* e *H. brasiliensis*. Bibliotecas enriquecidas foram produzidas por Atan et al. (1996), Bindu-Roy et al. (2004) e Saha et al. (2005), conduzindo à identificação de um grande número de marcadores microssatélites.

O desenvolvimento desses microssatélites foram úteis na construção do primeiro mapa genético por Lespinasse et al. (2000) e em estudos sobre diversidade genética por Lekawipat et al. (2003) e Saha et al. (2005). Souza et al. (2009) a partir do desenvolvimento de biblioteca enriquecida, desenvolveram 27 marcadores microssatélites para *H. brasiliensis* e avaliaram a transferibilidade em seis outras espécies do gênero. Le Guen et al. (2010), também desenvolveram marcadores microssatélites a partir de biblioteca enriquecida. No trabalho foram descritos 296 novos marcadores microssatélites.

Outro trabalho relacionado ao desenvolvimento de marcadores microssatélites foi realizado por Yu et al. (2011), a partir de DNA genômico de *H. brasiliensis*. A transferibilidade desses marcadores foi testada em *H. spruceana*, *H. nitida*, *H. benthamiana* e *H. pauciflora* e em três espécies da família Euphorbiaceae (*Ricinus communis*, *Manihot utilissima* e *Phyllanthus emblica*).

Por meio de busca no *GenBank*, Gouvêa et al. (2010) desenvolveram e caracterizaram 80 microssatélites. A grande diversidade total ($H_T = 0,58$) e alta diferenciação genética ($G_{st} =$

0,61) verificada nesse trabalho indicou a existência de variação genética entre os 60 genótipos analisados.

Feng et al. (2009) além de desenvolverem marcadores EST-SSR a partir de bases de dados de domínio público, detectaram transferibilidade e analisaram a diversidade genética em 12 genótipos de *H. brasiliensis* e de outras quatro espécies do mesmo gênero (*H. spruceana*, *H. nitida*, *H. benthamiana* e *H. pauciflora*). Perseguini et al. (2012) testaram a eficiência e a transferibilidade de 30 marcadores EST-SSR desenvolvidos por Feng et al. (2009) em 45 acessos do IAC e em outras seis espécies. Triwitayakorn et al. (2011) utilizaram dados de sequências expressas para desenvolver marcadores microssatélites e construir um mapa de ligação.

Le Guen et al. (2009) utilizaram 18 locos microssatélites em 307 acessos de *Hevea* coletados de 19 pontos distintos das bacias hidrográficas amazônicas. Foi verificado diferenciação entre as populações. Segundo os autores essa diferenciação é decorrente da localização geográfica dentro das redes hidrográficas amazônicas e pelo isolamento entre as populações. Posteriormente 13 dos 18 marcadores microssatélites utilizados no estudo de Le Guen et al. (2009) foram empregados por Souza et al. (2015) em um estudo de diversidade genética. A partir dos 1.117 acessos foi identificada uma coleção nuclear com 99 acessos.

Polimorfismo de nucleotídeo único – SNP também foram verificados em regiões informativas e não informativas do genoma de *H. brasiliensis*. Um estudo para identificação de SNPs realizado por Souza et al. (2016) disponibilizaram marcadores adicionais e revelou genes candidatos nos mecanismos de defesa.

Marcadores SNPs também foram desenvolvidos em análises de transcriptoma. Dos 32.018 resultados positivos encontrados por Mantello et al. (2014) no genoma de células do câmbio, 78 SNPs foram validados como sendo sequências pertencentes às vias mevalonato (MVA) e 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), envolvidas na biossíntese de borracha. Do conjunto de marcadores SNPs identificados por Salgado et al. (2014) em uma análise abrangente de transcriptoma em células de vários tecidos e órgãos de *Hevea*, 172 mostraram-se polimórficos entre os 23 genótipos testados.

Shearman et al. (2015) realizaram um estudo com RNA-seq para a identificação de SNPs, utilizados para construir um mapa de ligação em uma população de clones de RRIM 600 e RRII 105. O estudo de transcritos tem revelado muitas informações sobre o complexo mecanismo de biossíntese da borracha (CHOW et al., 2007; LIU et al., 2016, LIU et al., 2015; CHAO et al., 2015; LI et al., 2016; WEI et al., 2015; ZOU et al., 2017).

Essas pesquisas demonstram os recentes avanços dos estudos moleculares na cultura. No entanto, a caracterização da diversidade genética ainda é fundamental para o conhecimento e para avanços no programa de melhoramento de seringueira. Por isso há a necessidade de desenvolver estudos na área de caracterização de acessos do banco de germoplasma de seringueira.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar por meio de marcadores microssatélites a diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de seringueira da Embrapa Amazônia Ocidental, Embrapa Amazônia Oriental e Embrapa Cerrados.

3.2 Específicos

- a) Avaliar a diversidade e a estrutura genética dos acessos amostrados com dez locos microssatélites;
- b) Testar a transferibilidade dos locos microssatélites de *H. brasiliensis* para *H. pauciflora* e *H. rigidifolia*;
- c) Verificar por meio das distâncias genéticas o grau de variabilidade existente entre acessos analisados.
- d) Estabelecer uma coleção nuclear com 100% da diversidade genética em um número mínimo de amostras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

O estudo foi realizado com 318 acessos, sendo 51 acessos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental, 63 da Embrapa Amazônia Oriental e 204 acessos da Embrapa Cerrados (Tabela 1). Dentre os acessos, 223 são de *H. brasiliensis*, 28 de *H. pauciflora*, 1 de *H. rigidifolia*, 38 híbridos interespecíficos e 28 sem informação da espécie. A seleção do material foi baseada nos genótipos não avaliados em estudos moleculares anteriores e disponíveis nos BAGs da Embrapa.

A origem de cada acesso avaliado nesse estudo está descrita na Tabela 1. Os clones provenientes do Ceilão/Sri Lanka, Indonésia, Malásia (Ásia), Costa do Marfim (África) e Guatemala (América do Norte) foram coletados na floresta Amazônica. Desse modo, a descrição de origem desses genótipos está relacionada à região onde foram inicialmente conservados e não ao local de coleta.

Tabela 1 - Acessos de *Hevea* spp. pertencentes aos Bancos Ativos de Germoplasma da Embrapa Cerrados, Embrapa Amazônia Ocidental e Embrapa Amazônia Oriental.

BAG da Embrapa Cerrados															
Nº	Clones	*CA	**O	Nº	Clones	*CA	**O	Nº	Clones	*CA	**O	Nº	Clones	*CA	**O
1	1/33	Hb1	MA	31	PB 259	Hb31	MA	61	RRIM 805	Hb61	MA	91	AM 95-334	Hb91	AM
2	1/3/56/77	Hb2	MA	32	PB 291	Hb32	MA	62	AM 95-256	Hb62	AM	92	AM 95-367	Hb92	AM
3	4/101/79	Hb3	MA	33	PB 294	Hb33	MA	63	AM 95-335	Hb63	AM	93	AM 95-535	Hb93	AM
4	93/144	Hb4	MA	34	PB 306	Hb34	MA	64	5B/17/3	Hb64	MA	94	AM 95-538	Hb94	AM
5	RRIM 806	Hb5	MA	35	PB 311	Hb35	MA	65	A/7/6/491	Hb65	MA	95	AM 95-540	Hb95	AM
6	AC/1/25	Hb6	AC	36	PB 314	Hb36	MA	66	CLAN 8	Hb66	MA	96	5/4/91	Hb96	MA
7	AC/B/9/46	Hb7	AC	37	PB 324	Hb37	MA	67	CNS G 211	Hb67	AM	97	3/2	Hb97	MA
8	CNS AM 7672	Hb8	AM	38	RRIM 922	Hb38	MA	68	CNS RO 7826	Hb68	RO	98	1/10/56/77	Hb98	MA
9	CNS TO 7813	Hb9	RO	39	PC 119	Hb39	MA	69	CNS RO 7921	Hb69	RO	99	1/552/77	Hb99	MA
10	CPAC 1	Hb10	AM	40	PC 140	Hb40	MA	70	GU 47	Hb70	GT	100	12/00/78	Hb100	MA
11	CPAC 2	Hb11	AM	41	PC 141	Hb41	MA	71	IAC 35	Hb71	AM	101	22/8/56/77	Hb101	MA
12	Fx 2261	Hb12	PA	42	PC 96	Hb42	MA	72	IR 22	Hb72	MA	102	62/2/225	Hb102	MA
13	Fx 25	Hb13	PA	43	RRIM 919	Hb43	MA	73	IRCA 111	Hb73	CM	103	64/B/120	Hb103	MA
14	Fx 3864	Hb14	PA	44	PR 255	Hb44	IN	74	IRCA 1159	Hb74	CM	104	AC 37	Hb104	AC
15	FX 4098	Hb15	PA	45	RO 57	Hb45	RO	75	IRCA 515	Hb75	CM	105	AC 40	Hb105	AC
16	Fx 985	Hb16	PA	46	RO/C/9/15	Hb46	RO	76	PB 285	Hb76	MA	106	AVROS 1518	Hb106	IN
17	IAC 41	Hb17	AC	47	RO/C/9/42	Hb47	RO	77	PM 10	Hb77	MA	107	CD 38	Hb107	PA
18	RRIM 809	Hb18	MA	48	RRIM 938	Hb48	MA	78	PS 01	Hb78	MA	108	CNS RO 7926	Hb108	RO
19	RRIM 901	Hb19	MA	49	RV 01	Hb49	MA	79	RO/I/109	Hb79	RO	109	CNS RO 8313	Hb109	RO
20	RRIM 913	Hb20	MA	50	RO/PB/1/30	Hb50	RO	80	RO/I/56	Hb80	RO	110	CNS RO 8329	Hb110	RO
21	IAN 873	Hb21	PA	51	RO/S/11/12	Hb51	RO	81	RO/I/60	Hb81	RO	111	GA 1326	Hb111	IN
22	IRCA 130	Hb22	CM	52	RRIC 132	Hb52	C/SL	82	RRIC 42	Hb82	C/SL	112	GT 711	Hb112	IN
23	IRCA 18	Hb23	CM	53	RRIM 512	Hb53	MA	83	TP 13	Hb83	PA	113	IAC 15	Hb113	AC
24	RRIM 915	Hb24	MA	54	RRIM 926	Hb54	MA	84	RRIM 526	Hb84	MA	114	IAC 204	Hb114	PA
25	IRCA 427	Hb25	CM	55	RRIM 623	Hb55	MA	85	RRIM 605	Hb85	MA	115	IAC 302	Hb115	PA
26	OS 22	Hb26	MA	56	RRIM 728	Hb56	MA	86	RRIM 908	Hb86	MA	116	PB 346	Hb116	MA
27	PB 230	Hb27	MA	57	RRIM 729	Hb57	MA	87	RRIM 921	Hb87	MA	117	PF 9/518	Hb117	PA
28	PB 233	Hb28	MA	58	RRIM 801	Hb58	MA	88	RRIM 937	Hb88	MA	118	RO/C/9/79	Hb118	RO
29	PB 243	Hb29	MA	59	RRIM 802	Hb59	MA	89	SCATC 7/20/56	Hb89	CN	119	RO/I/01	Hb119	RO
30	PB 252	Hb30	MA	60	RRIM 803	Hb60	MA	90	TR 1	Hb90	MT	120	RO/I/10	Hb120	RO

*CA = códigos do acessos: Hb (*H. brasiliensis*); Hp (*H. pauciflora*); Hr (*H. rigidifolia*); Hg (*H. guianensis*); HbxHbe (*H. brasiliensis* x *H. benthamiana*); HbxHp (*H. brasiliensis* x *H. pauciflora*); Hx (sem informação) pertencem as espécies estudadas. **O = Origem: AC = Acre; AM = Amazonas; CM = Costa do Marfim; C/SL = Ceilão/Sri Lanka; DS = Desconhecida; IN = Indonésia; GT = Guatemala; MA = Malásia; MT = Mato Grosso; PA = Pará; RO = Rondônia, são referentes aos locais de origem dos acessos.

Tabela 1- Continuação

BAG da Embrapa Cerrados												BAG da Embrapa Amazônia Ocidental			
Nº	Clones	*CA	**O	Nº	Clones	*CA	**O	Nº	Clones	*CA	**O	Nº	Clones	*CA	**O
121	RO/I/72	Hb121	RO	265	IAN 2903	HbxHbe13	PA	295	IAN 6545	Hx5	PA	134	IPA 1	Hb134	DS
122	RO/I/75	Hb122	RO	266	IAN 3087	HbxHbe14	PA	296	IRCA 109	Hx6	CM	135	CNSAM7905	Hb135	DS
123	RO/I/94	Hb123	RO	267	IAN 3156	HbxHbe15	PA	297	IRCA 209	Hx7	CM	136	FX3864	Hb136	DS
124	RO/JP/3/99	Hb124	RO	268	IAN 7340	HbxHbe16	PA	298	PB 326	Hx8	MA	137	FX4098	Hb137	DS
125	RRIM 501	Hb125	MA	269	IAN 8297	HbxHbe17	PA	299	RRIM 710	Hx9	MA	138	PB314	Hb138	DS
126	RRIM 513	Hb126	MA	270	IAN 6544	HbxHp1	PA	300	RRIM 711	Hx10	MA	139	IRCA111	Hb139	DS
127	RRIM 607	Hb127	MA	271	IAN 7526	HbxHp2	PA	301	RRIM 713	Hx11	MA	140	MDX607	Hb140	DS
128	RRIM 614	Hb128	MA	272	IAN 7530	HbxHp3	PA	302	RRIM 714	Hx12	MA	141	TP749	Hb141	DS
129	RRIM 911	Hb129	MA	273	IAN 7555	HbxHp4	PA	303	CNS AM 8026	Hx13	AM	142	FDR5953	Hb142	DS
130	RV 02	Hb130	MA	274	IAN 7585	HbxHp5	PA	304	CNS AM 8228	Hx14	AM	143	FDR1057	Hb143	DS
131	TP 2	Hb131	PA	275	IAN 7626	HbxHp6	PA	305	CNS AM 8349	Hx15	AM	144	CPAAOC81	Hb144	DS
132	TP 65	Hb132	PA	276	IAN 7639	HbxHp7	PA	306	CNS BT 7836	Hx16	PA	145	CPAAOC80	Hb145	DS
133	IPA 1	Hb133	AC	277	IAN 8059	HbxHp8	PA	307	CNS AM 7663	Hx17	AM	146	CPAAOC79	Hb146	DS
224	P 10	Hp1	PA	278	IAN 8072	HbxHp9	PA	308	CNS AM 8007	Hx18	AM	147	CPAAOC78	Hb147	DS
225	CNSAM 7725	Hp2	AM	279	IAN 8081	HbxHp10	PA	309	CNS AM 8019	Hx19	AM	148	CPAAOC77	Hb148	DS
226	CNSAM 7729	Hp3	AM	280	IAN 8121	HbxHp11	PA	310	CNS AM 8020	Hx20	AM	149	CPAAOC76	Hb149	DS
227	P 146	Hp4	PA	281	IAN 8194	HbxHp12	PA	311	CNS AM 8050	Hx21	AM	150	CPAAOC72	Hb150	DS
251	CNS AM 7724	Hp28	AM	282	IAN 8514	HbxHp13	PA	312	CNS AM 8257	Hx22	AM	151	CPAAOC71	Hb151	DS
253	Fx 3899	HbxHbe1	PA	283	IAN 8530	HbxHp14	PA	313	CNS AM 8342	Hx23	AM	152	CPAAOC70	Hb152	DS
254	IAN 3528	HbxHbe2	PA	284	IAN 6484	HbxHp15	PA	314	CNS AM 8401	Hx24	AM	153	CPAAOC69	Hb153	DS
255	7/15	HbxHbe3	MA	285	IAN 8079	HbxHp16	PA	315	CNS BT 7804	Hx25	PA	154	CPAAOC68	Hb154	DS
256	IAN 6158	HbxHbe4	PA	286	IAN 8549	HbxHp17	PA	316	CNS BT 7813	Hx26	PA	155	CPAAOC65	Hb155	DS
257	IAN 6897	HbxHbe5	PA	287	IAN 7647	HbxHp18	PA	317	CNS BT 7817	Hx27	PA	156	CPAAOC64	Hb156	DS
258	IAN 717	HbxHbe6	PA	288	IAN 7647 P2	HbxHp19	PA	318	CNS BT 7827	Hx28	PA	157	CPAAOC45	Hb157	DS
259	IAN 7357	HbxHbe7	PA	289	IAN 8528	HbxHp20	PA					158	CNSPB03	Hb158	DS
260	AM 95-503	HbxHbe8	AM	290	AM 95-299	HbxHg1	AM					159	CNSPB16	Hb159	DS
261	AM 95-507	HbxHbe9	AM	291	CNS BT 7808	Hx1	PA					160	CNSAM8214	Hb160	DS
262	IAN 6742	HbxHbe10	PA	292	CNS BT 7815	Hx2	PA					161	PA31	Hb161	DS
263	AM 95-501	HbxHbe11	AM	293	IAN 6486	Hx3	PA					162	CNSAM8203	Hb162	DS
264	IAN 2880	HbxHbe12	PA	294	IAN 6543	Hx4	PA					163	CPAAOC58	Hb163	DS

*CA = códigos do acessos: Hb (*H. brasiliensis*); Hp (*H. pauciflora*); Hr (*H. rigidifolia*); Hg (*H. guianensis*); HbxHbe (*H. brasiliensis* x *H. benthamiana*); HbxHp (*H. brasiliensis* x *H. pauciflora*); Hx (sem informação) pertencem as espécies estudadas. **O = Origem: AC = Acre; AM = Amazonas; CM = Costa do Marfim; C/SL = Ceilão/Sri Lanka; DS = Desconhecida; IN = Indonésia; GT = Guatemala; MA = Malásia; MT = Mato Grosso; PA = Pará; RO = Rondônia, são referentes aos locais de origem dos acessos.

Tabela 1 - Continuação

BAG da Embrapa Amazônia Ocidental				BAG da Embrapa Amazônia Oriental											
Nº	Clones	*CA	**O	Nº	Clones	*CA	**O	Nº	Clones	*CA	**O	Nº	Clones	*CA	**O
164	CSNG116	Hb164	DS	184	CNSAM 7714	Hb184	DS	202	CPAAC 45	Hb202	DS	229	PB 28/59	Hp6	DS
165	CPAAOC83	Hb165	DS	185	CNSAM 7804	Hb185	DS	203	CPAAC 48	Hb203	DS	230	PB 294	Hp7	DS
166	CPAAOC18	Hb166	DS	186	CNSAM 7905	Hb186	DS	204	CPAAC 50	Hb204	DS	231	PB 312	Hp8	DS
167	CNSAM8205	Hb167	DS	187	CNSAM 8203	Hb187	DS	205	CPAAC 51	Hb205	DS	232	PB 314	Hp9	DS
168	CPAAOC38	Hb168	DS	188	CNSAM 8205	Hb188	DS	206	CPAAC 60	Hb206	DS	233	PB 324	Hp10	DS
169	CPAAOC20	Hb169	DS	189	CNSRO 7905	Hb189	DS	207	CPAAC 89	Hb207	DS	234	PB 330	Hp11	DS
170	CPAAOC07	Hb170	DS	184	CNSAM 7714	Hb184	DS	208	CPAAC 91	Hb208	DS	235	PB 346	Hp12	DS
171	CPAAOC16	Hb171	DS	185	CNSAM 7804	Hb185	DS	209	CPAAC 92	Hb209	DS	236	PB 355	Hp13	DS
172	CPAAOC15	Hb172	DS	186	CNSAM 7905	Hb186	DS	210	CPAAC 93	Hb210	DS	237	PB 394	Hp14	DS
173	CPAAOC13	Hb173	DS	187	CNSAM 8203	Hb187	DS	211	FX 2201	Hb211	DS	238	PC 96	Hp15	DS
174	CPAAOC06	Hb174	DS	188	CNSAM 8205	Hb188	DS	212	FX 3703	Hb212	DS	239	PC 119	Hp16	DS
175	CPAAOC01	Hb175	DS	189	CNSRO 7905	Hb189	DS	213	FX 3810	Hb213	DS	240	PC 141	Hp17	DS
176	Hgm17 80c97	Hb176	DS	184	CNSAM 7714	Hb184	DS	214	FX 3844	Hb214	DS	241	PFCAP 1	Hp18	DS
177	C65\F4512 2c99	Hb177	DS	185	CNSAM 7804	Hb185	DS	215	FX 6590	Hb215	DS	242	PFCAP 2	Hp19	DS
178	C80 F4512 1C102	Hb178	DS	186	CNSAM 7905	Hb186	DS	216	FX 4512	Hb216	DS	243	PFCAP 4	Hp20	DS
179	C81 F4512 2C103	Hb179	DS	187	CNSAM 8203	Hb187	DS	217	IAC 222	Hb217	DS				
180	Hgm17xC79 1C106	Hb180	DS	188	CNSAM 8205	Hb188	DS	218	IAN 2363	Hb218	DS				
181	C80xHgm17\2 C107	Hb181	DS	189	CNSRO 7905	Hb189	DS	219	IAN 3044	Hb219	DS				
182	C15xF4512\C108	Hb182	DS	190	CNSRO 7913	Hb190	DS	220	IAN 6159	Hb220	DS				
183	C01xC65\C109	Hb183	DS	191	COD 1	Hb191	DS	221	IAN 6323	Hb221	DS				
252	H.rigidifolia	Hr1	DS	192	CPAAC 01	Hb192	DS	222	IAN 6590	Hb222	DS				
				193	CPAAC 6	Hb193	DS	223	RRIM 937	Hb223	DS				
				194	CPAAC12	Hb194	DS	244	PL 46	Hp21	DS				
				195	CPAAC 13	Hb195	DS	245	PR 255	Hp22	DS				
				196	CPAAC 15	Hb196	DS	246	PR 261	Hp23	DS				
				197	CPAAC 16	Hb197	DS	247	PUA 1	Hp24	DS				
				198	CPAAC 18	Hb198	DS	248	PUA 3	Hp25	DS				
				199	CPAAC 20	Hb199	DS	249	PUA 4	Hp26	DS				
				200	CPAAC 33	Hb200	DS	250	PUA 8	Hp27	DS				
				201	CPAAC 44	Hb201	DS	228	PA 31	Hp5	DS				

*CA = códigos do acessos: Hb (*H. brasiliensis*); Hp (*H. pauciflora*); Hr (*H. rigidifolia*); Hg (*H. guianensis*); HbxHbe (*H. brasiliensis* x *H. benthamiana*); HbxHp (*H. brasiliensis* x *H. pauciflora*); Hx (sem informação) pertencem as espécies estudadas. **O = Origem: AC = Acre; AM = Amazonas; CM = Costa do Marfim; C/SL = Ceilão/Sri Lanka; DS = Desconhecida; IN = Indonésia; GT = Guatemala; MA = Malásia; MT = Mato Grosso; PA = Pará; RO = Rondônia, são referentes aos locais de origem dos acessos.

4.2 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990) com modificações. Para fins de conservação do material vegetal (folíolos totalmente expandidos), antes da extração as folhas foram liofilizadas e trituradas em moinho no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LabMol) da Embrapa Acre. Os fragmentos foliares resultantes da trituração foram armazenados em microtubos de 3 mL e acondicionado em freezer a -20 °C.

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose a 1%. A intensidade das bandas foi comparada à de padrões com peso molecular e concentração conhecida de DNA do fago λ (20, 40, 100, 200 ng).

4.3 Análises dos locos microssatélites

Os dez marcadores microssatélites utilizados nesse trabalho foram selecionados no estudo de Le Guen et al. (2009). As descrições desses marcadores estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos microssatélites, incluindo o motivo repetitivo e a amplitude alélica.

Loco	Motivo repetitivo	Amplitude alélica (pb)
A2365	CT	190–228
A2368	CT	229–271
A2389	CT	188–228
A2406	CT	113–171
A2413	CT	286–322
A2684	CT	258–300
A2736	CT	102–148
BAC55B02	CT	153–177
TA2163	(CT) (CA)	194–242
TAs2558	(CT) (CA)	218–256

pb = pares de base

As reações de amplificações foram realizadas seguindo o protocolo de Schuelke (2000). As reações foram preparadas contendo 20 ng de DNA, 1 U de Taq-DNA polimerase, 2 mM de cloreto de magnésio, 200 μ M de cada dNTP, 0,16 μ M de *primer* direto, 0,2 μ M de *primer reverse*, 0,2 μ M de *primer* M13 marcado com fluorescências 6-carboxy-fluoresceine (FAM) ou hexachloro-6-carboxy-fluoresceine (HEX) e 1X de tampão, num volume final de 15 μ L. As condições de amplificação foram realizadas em termociclador (Analytikjena), onde foram realizadas as seguintes etapas: desnaturação inicial do DNA a 95 °C por 5 minutos, seguida de 15 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão a 95 °C por 45 segundos, 59 °C por 1 minuto (-0,5 °C por ciclo) e 72 °C por 1,5 minutos respectivamente, e 25 ciclos adicionais de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento 52 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1,5 minutos, finalizando com uma extensão final de 5 minutos à 72 °C. Os produtos das amplificações foram visualizados em gel de agarose (3%), comparados a um marcador de peso molecular padrão 1 Kb plus (Invitrogen®).

Após a desnaturação com formamida os fragmentos foram genotipados em sequenciador automático AB 3500xL (Applied Biosystems) no laboratório de Análise Genética e Molecular da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, coordenado pela prof. Dra Anete Pereira de Souza. As reações foram organizadas com base no tamanho dos fragmentos e no tipo de fluoróforo utilizado para as realizações de aplicações multiplex com até quatro *amplicons* por reação (Figura 3). A leitura das amostras foi realizada com o padrão GeneScan-600 LIZ® no programa GeneMarker versão 2.7.0.

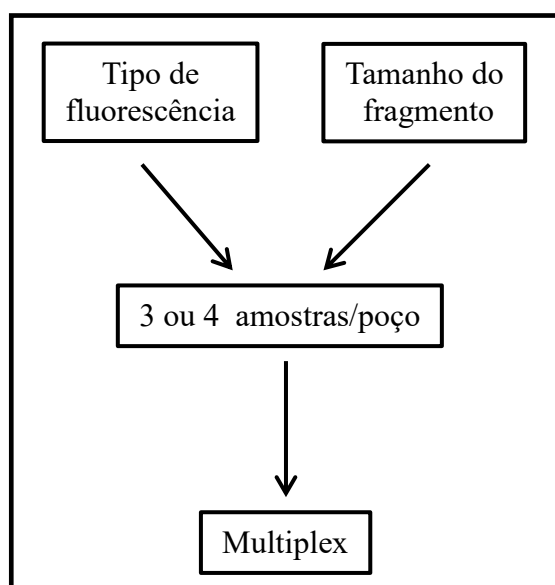


Figura 3 - Esquema de montagem de multiplex para o procedimento de genotipagem.

4.4 Análise da diversidade genética e transferibilidade

O programa *Tools for Population Genetic Analyses* - TFPGA versão 1.3 (MILLER-, 1997) foi utilizado para realizar as estimativas dos parâmetros genéticos. O número médio de alelos (N) por loco foi obtido pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos. O valor da heterozigosidade observada (H_O) foi obtido pela expressão a baixo:

$$H_O = \frac{NH}{NI}$$

Em que NH é o número de heterozigotos e NI o número de indivíduos amostrados.

A heterozigosidade esperada (H_E) ou diversidade genética difere da H_O , por ser uma previsão baseada na frequência alélica, sendo que o desvio observado entre a H_E e H_O pode ser um indicativo da dinâmica populacional, o que permite avaliar a estrutura genética das populações (NEI, 1987). A heterozigosidade média esperada de um loco foi calculada pela fórmula proposta por NEI (1973):

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

Onde: f_i é a frequência do alelo i e n é o número de alelos.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi quantificado para estimar o valor da informatividade do loco, a qual foi calculada pela fórmula descrita a baixo:

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

Onde: f_i e f_j são frequência do i -ésimo e do j -ésimo alelos em um loco com n alelos em um acesso, respectivamente (BOTSTEIN et al., 1980). Essa estimativa é um parâmetro que considera a dependência do número de alelos e de suas frequências por locos.

A avaliação da transferibilidade foi realizada com base na amplificação dos locos, nitidez dos picos e ausência de amplificações inespecíficas. A taxa de locos transferíveis (T) foi obtida pela expressão descrita por Fontes et al. (2016):

$$T = \frac{NLT}{NLA} \times 100$$

Onde: NLT é o número de locos transferíveis e NLA é o número de locos analisados.

O número de locos polimórficos (NLP) de cada espécie foi utilizado para calcular o percentil de locos polimórficos (PLP) pela expressão:

$$PLP = \frac{NLP}{NLT} \times 100$$

Onde: NLP é o número de locos polimórficos e NLT o número de locos testados. O loco foi considerado polimórfico quando o alelo mais comum apresentou frequência inferior a 95%. De acordo com Hartl e Clark (1997) o polimorfismo de um loco é determinado pela frequência de seus alelos, sendo que os locos que tenham alelos com frequência acima 95% são considerados não polimórficos. O número de alelos (*N*) foi calculado separadamente para cada espécie.

4.5 Análise de Agrupamento

As análises de distâncias genéticas foram calculadas utilizando-se a distância de Rogers (1972) modificada, obtida pelo programa TFGA, utilizando o critério de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). A estabilidade dos agrupamentos foi testada pelo procedimento de *bootstrap* com base em 10.000 re-amostragens utilizando o *software* BOOD (COELHO, 2002).

Para verificar o número de grupos (*k*) foi utilizado o *software* STRUCTURE versão 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000), baseado em estatística bayesiana. Esses grupos representam o número de *pools* gênicos diferentes, assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados dentro de cada população. Assim os grupos de indivíduos que compartilham o mesmo *pool* gênico são agrupados conjuntamente, sem a necessidade da informação prévia sobre sua origem.

O programa foi executado com número de total dos acessos estabelecidos, com *K* variando de *K*=1 a *K*=10. Foram executadas 20 simulações independentes para cada *K*, usando 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.

A matriz de distância genética Rogers (1972) modificada, obtida pelo programa TFPGA, foi utilizada para verificar a relação entre os acessos por meio de análises de Coordenadas Principais (PCoA), no *software* Darwin versão 5.0.158 (PERRIER; JACQUEMOUND-COLLET, 2006). Nesse mesmo *software* foi realizada a análise de cluster usando o método de *Neighbor-Joining* (NJ).

Para identificar a coleção nuclear, o *software* CoreFinder 1.0 (POLICRITI; SGARRO; 2011) foi utilizado. A análise foi feita com base na estratégia M, mantendo 100% dos alelos. Tal estratégia consiste em selecionar um grupo de genótipos a partir da máxima diversidade genética encontrada (BROWN; SCHOEN 1994).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dez microssatélite testados nos 318 acessos foram altamente polimórficos (Tabela 3). O número de alelos variou de 27 (BAC55-B02) a 41 (A2389), com valor total de 348 e média de 34,8 alelos por loco. Souza et al. (2015) caracterizaram 1117 de acessos *Hevea* spp. e identificaram 408 alelos, com média de 31,4 alelos por loco. Apesar do maior número de alelos encontrados pelos autores a média por loco foi bastante próxima ao desse estudo. Isso mostra que a amostragem utilizada no presente trabalho representa a variabilidade da espécie, mesmo quando se compara com trabalhos com grande tamanho amostral.

Tabela 3 - Caracterização dos dez locos em número de alelos por loco (N); Heterozigosidade esperada (H_E); Heterozigosidade observada (H_O) e conteúdo de polimorfismo (PIC) para os 318 acessos estudados.

Loco	N	H_E	H_O	PIC
A2365	32	0,86	0,51	0,86
A2368	35	0,85	0,50	0,85
A2389	41	0,89	0,67	0,89
A2406	32	0,81	0,64	0,81
A2413	36	0,88	0,58	0,87
A2684	35	0,81	0,64	0,81
A2736	33	0,89	0,75	0,89
BAC55-B02	27	0,85	0,66	0,85
TA2163	37	0,85	0,68	0,85
TAs2558	40	0,93	0,70	0,93
Total	348			
Média	34,8	0,86	0,63	0,86

A maioria dos acessos analisados nesse estudo são genótipos selvagens ainda não usados nos programas de melhoramento. Por outro lado, os materiais estudados por Souza et al. (2015) contemplaram genótipos selvagens e também os clones comumente utilizados no melhoramento da seringueira. Os autores encontraram maior diversidade genética no grupo formado pelos genótipos selvagens, sendo estes os responsáveis por conservar a maioria dos

alelos privados. Isso mostra que os genótipos selvagens apresentam maior variabilidade genética, conseqüentemente é de se esperar uma maior quantidade de alelos. Isso explica o porquê dos genótipos amostrados nesse estudo terem revelado um número médio de alelos ligeiramente maior que o de Souza et al. (2015).

A diversidade genética encontrada nos acessos pode contribuir com o melhoramento da seringueira, já que essa característica é um dos requisitos para a escolha de parentais a serem usados em programas de melhoramento. No entanto, Clément-Demange et al. (2001) relataram que nem sempre os genótipos selvagens de seringueira utilizados na ampliação da base genética e em cruzamentos promoveram caracteres desejados no melhoramento genético. Portanto, para que essa variabilidade seja eficientemente utilizada deve-se também considerar o desempenho agrônômico do genótipo (GONÇALVES et al., 2006).

A heterozigosidade esperada (H_E) foi alta, variando de 0,81 (A2406 e A2684) a 0,93 (TAs2558). Saha et al. (2005) utilizaram quatro locos microssatélites para detectar a diversidade em 13 clones primários de Wickham e em 14 híbridos de clones primários desenvolvidos no Sudeste Asiático. Os autores encontraram valores de H_E variando entre 0,46 e 0,76, considerado moderadamente baixo quando comparados aos obtidos neste estudo. Lam et al. (2009) estudaram genótipos conservados no Vietnã e identificaram baixo valor de diversidade genética (0,20). Os valores mais baixos desse índice de diversidade pode estar associada à quantidade de genótipos testados, bem como ao tipo de germoplasma que foi analisado.

Outros trabalhos relataram valores de diversidade genética semelhantes ao identificado nesse estudo (LE GUEN et al., 2009; SOUZA et al., 2015). Em ambos os estudos foram analisados genótipos selvagens e domesticados. Isso mostra a grande contribuição que os materiais selvagens desempenham na diversidade dentro do gênero *Hevea*. Outro aspecto verificado é que na presença de genótipos selvagens as espécies do gênero *Hevea* conservam alto padrão de diversidade genética.

A heterozigosidade observada (H_O) variou de 0,50 (A2368) a 0,75 (A2736). Em todos os locos os valores de H_O foram inferiores aos de H_E , indicando um déficit de heterozigotos. Essa deficiência também foi encontrada no trabalho de Le Guen et al. (2009) e de Souza et al. (2015), sugerindo que apesar da alta diversidade genética exibida pelos genótipos de *Hevea* a biologia das espécies condiciona proporções menores de indivíduos heterozigotos em relação aos homozigotos.

Embora dentro do gênero *Hevea* seja comum a presença de autoincompatibilidade, eventos de autopolinização podem ocorrer (CLÉMENT-DEMANGE et al., 2001). Tal fato

pode contribuir para maiores proporções de genótipos homozigotos dentro de populações. Outro aspecto seria a longevidade de plantas de *H. brasiliensis* em populações naturais (LAURANCE et al., 2004), o que permite a sobreposição geracional e, consequentemente, o cruzamentos entre indivíduos aparentados.

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (*PIC*) em todos os locos estudados foram altos. O loco TAs2558 (0,93) foi identificado com o maior valor e os locos A2604 e A2684 (0,81) com os menores, com valor médio de 0,86. Tal resultado indica que todos os microssatélites usados nesse estudo apresentaram alta informatividade. Segundo a classificação definida por Botstein et al. (1980), marcadores com valores de *PIC* superiores a 0,5 são definidos como altamente informativos. Foi observado que apenas o loco A2413 não apresentou o mesmo valor nos parâmetros de *PIC* e de H_E . Esses dois parâmetros utilizam a frequência alélica para quantificar a diversidade genética. Assim, tanto o *PIC* como H_E são considerados medidas de diversidade genética. Além disso, em estudos genéticos, o *PIC* também é utilizado para determinar a probabilidade de um dado genótipo de uma progênie, deduzir o genótipo parental para o marcador avaliado (BOTSTEIN et al., 1980). Assim, pode-se determinar a probabilidade de um pai ser heterozigoto, bem com a probabilidade que os seus filhos sejam informativos. Com isso, essa análise apresenta um papel relevante não apenas na quantificação da diversidade genética, mas também no conhecimento dos genitores por meio dos genótipos apresentados pelos filhos.

Feng et al. (2009) utilizaram 30 EST-SSR e encontraram valores entre 0 a 0,68, com média de 0,38. Essa baixa informatividade dos locos de EST-SSRs comparados aos SSRs genômicos está relacionada à grande conservação dessas sequências de DNA em regiões transcritas (SCOTT et al., 2000; EUJAYL et al., 2001). Contudo, tanto marcadores microssatélites genômicos quanto microssatélites gênicos são ferramentas importantes para estudos moleculares.

Os dez SSRs de *H. brasiliensis* utilizados no presente estudos amplificaram com eficiência nos acessos pertencentes às espécies *H. pauciflora* e *H. rigidifolia*, além dos híbridos obtidos entre essas espécies. Alguns estudos já testaram a transferibilidade de microssatélites entre espécies de *Hevea* (PERSEGUINI et al., 2012; MANTELLO et al., 2012).

Os microssatélites de *H. brasiliensis* foram 100% transferíveis para *H. pauciflora*, onde foram todos polimórficos (Tabela 4). No entanto, o loco TA2163 não amplificou em três dos 28 acessos dessa espécie. Para *H. rigidifolia* apenas o loco TA2163 não amplificou. Com isso verificou-se que 90% dos microssatélites foram transferíveis. Esse loco foi o único que apresentou falhas nas duas espécies avaliadas, sendo considerado o menos eficiente. Sete

locos amplificados em *H. rigidifolia* apresentaram dois alelos, sendo estes heterozigotos. O número de alelos verificado em *H. pauciflora* foi 105 e em *H. rigidifolia* 16. Essa diferença é resultante do número superior de acessos de *H. pauciflora*.

Tabela 4 - Caracterização da transferibilidade dos locos de *H. brasiliensis* para *H. pauciflora* e *H. rigidifolia*.

Espécies	NA	T	NLP	PLP	N
<i>H. pauciflora</i>	28	100%	10	100%	105
<i>H. rigidifolia</i>	1	90%	*	*	16

NA = Número de acessos; T = Taxa de locos transferíveis; NLP = Número de locos polimórficos; PLP = Porcentagem de locos polimórficos; NA = Número de Alelos. *Esses parâmetros não foram calculados devido ao tamanho amostral.

Souza et al. (2009) desenvolveram 27 microssatélites para *H. brasiliensis* e encontraram alto grau de homologia com sequências de microssatélites em incluindo *H. benthamiana*, *H. camargoana*, *H. guianensis*, *H. nitida*, *H. pauciflora* e *H. rigidifolia*. Os microssatélites desenvolvidos para *H. brasiliensis* por Gouvêa et al. (2010) foram eficientemente transferíveis para *H. pauciflora*.

Feng et al. (2009) verificaram que EST-SSR desenvolvidos para *H. brasiliensis*, além de mostrarem transferibilidade para *H. spruceana*, *H. nitida*, *H. benthamiana* e *H. pauciflora*, mostraram também transferibilidade para outro gênero e amplificaram em mamona (*Ricinus communis*) e mandioca (*Manihot utilissima*). Isso mostra que apesar das sucessivas adaptações as diferentes condições ambientais e das modificações evolutivas, essas espécies ainda conservam muitas homologias de seu ancestral comum. Tal informação revela que as espécies de *Hevea* ainda estão em processo de diferenciação, com isso é possível sugerir que se tratam de espécies incipientes conduzindo um processo evolutivo de especiação. Pires et al. (2002), chegaram a afirmar que o gênero *Hevea* não pode ser dividido em espécies naturais por causa das variações ecológicas, das formas de transição e dos muitos híbridos naturais encontrados.

A utilização desses marcadores entre espécies relacionadas é possível devido à conservação de sítios microssatélites entre espécies ou mesmo entre gêneros. No caso das espécies do gênero *Hevea*, isso ocorre sem maiores dificuldades devido à falta de barreiras reprodutivas bem definidas. Priyadarshan e Gonçalves (2003) ressaltam que o potencial de fertilidade cruzada e a alta transferência de locos microssatélites observada em espécies de *Hevea* indicam que o gênero é um complexo de espécies com diferenciação moderada. Essa

condição também foi observada por Saha et al. (2005). A hibridação entre espécies de *Hevea* já foi observada tanto em populações naturais (PIRES, 1981) como em polinização manual em análises de progênies (GONÇALVES et al., 1992).

A conservação dos microssatélites entre as espécies do gênero também pode estar relacionada com a proximidade onde elas ocorrem. Souza et al. (2015) relatam que as populações amazônicas de *H. brasiliensis* não são compostas exclusivamente por esta espécie, mas sim por um complexo de espécies do gênero. Lam et al. (2009) sugerem que essa condição possibilita o fluxo de genes devido ao modo de reprodução e a existência de cruzamento entre as espécies.

Os valores de distância genética entre os 318 acessos foram altamente variáveis, indo de 0,16 a 0,94, com distância genética média de 0,73. O maior valor de dissimilaridade foi entre quatro pares de acessos (Hb44 e Hb80; Hb44 e Hb126; Hb44 e Hx10; Hb80 e Hb94).

O acesso Hb44 (clone PR 255) destacou-se dos demais por aparecer na maioria dos pares mais divergentes. Silva et al. (2007) observaram destaque em produtividade e rentabilidade para o clone PR 255. Assim esse material possui características interessantes para ser utilizado em programas de melhoramento.

O menor valor de distância genética foi verificado entre três pares de acessos, sendo dois pares de *H. brasiliensis* (Hb14 e Hb15; Hb15 e Hb107) e um entre *H. brasiliensis* com um acesso sem informação da espécie (Hb39 e Hx11). Devido à baixa distância genética, possivelmente o acesso sem descrição de origem seja um exemplar de *H. brasiliensis*. Os valores de distância genética indicam estreita relação entre esses acessos, porém não foi encontrada nenhuma redundância.

Outros estudos em clones seringueira relataram valores moderados de distância genética. Oktavia e Kuswanhadi (2011) estudaram a diversidade genética com marcadores RAPD em clones da população de Wickham e RRIM e verificaram valores de similaridade genética variando entre 0,37 a 0,98. Yu et al. (2011) analisaram 19 acessos com 36 locos microssatélites e identificaram similaridade entre 0,59 a 0,98. Os valores de distância genética encontrados por esses autores comparados ao desse estudo reforçam que os acessos dos bancos de germoplasma da Embrapa representam a variabilidade da espécie.

A análise bayesiana gerada pelo programa STRUCTURE e a estatística de Evanno et al. (2005) sugeriu que o maior valor de delta K indica a presença de dois grupos distintos (K=2) (Figura 4 e 5). Os grupos formados estão representados pelas cores vermelha com 169 acessos (grupo 1) e verde com 146 (grupo 2).

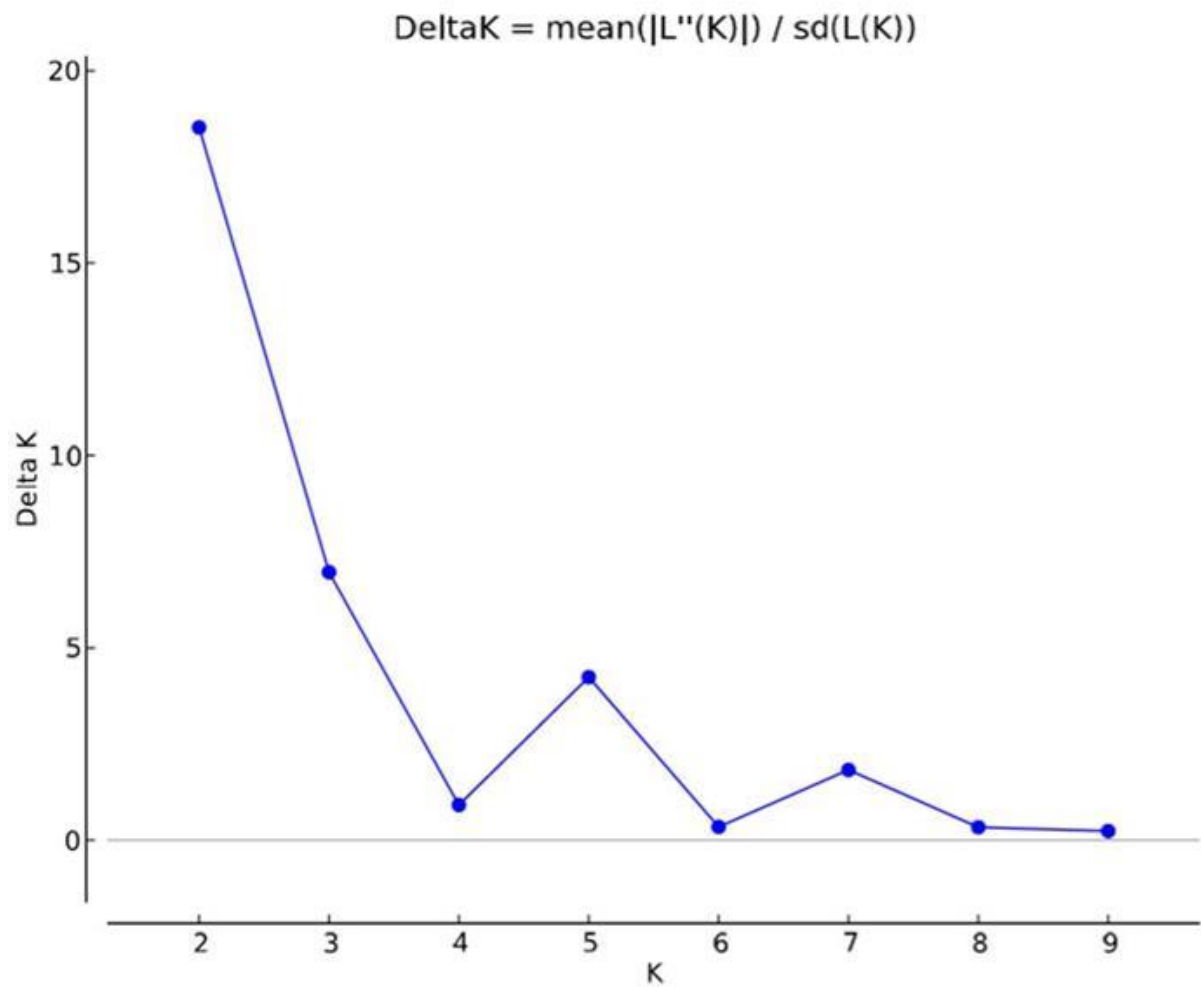


Figura 4 - Gráfico de delta (K) com K = 2, obtido pela aplicação do modelo estatístico de Evanno et al. (2005) no programa STRUCTURE a partir da análise nos 318 acessos dos BAGs de *Hevea* spp. da Embrapa Amazônia Ocidental, Embrapa Amazônia Oriental e E Embrapa Cerrados.

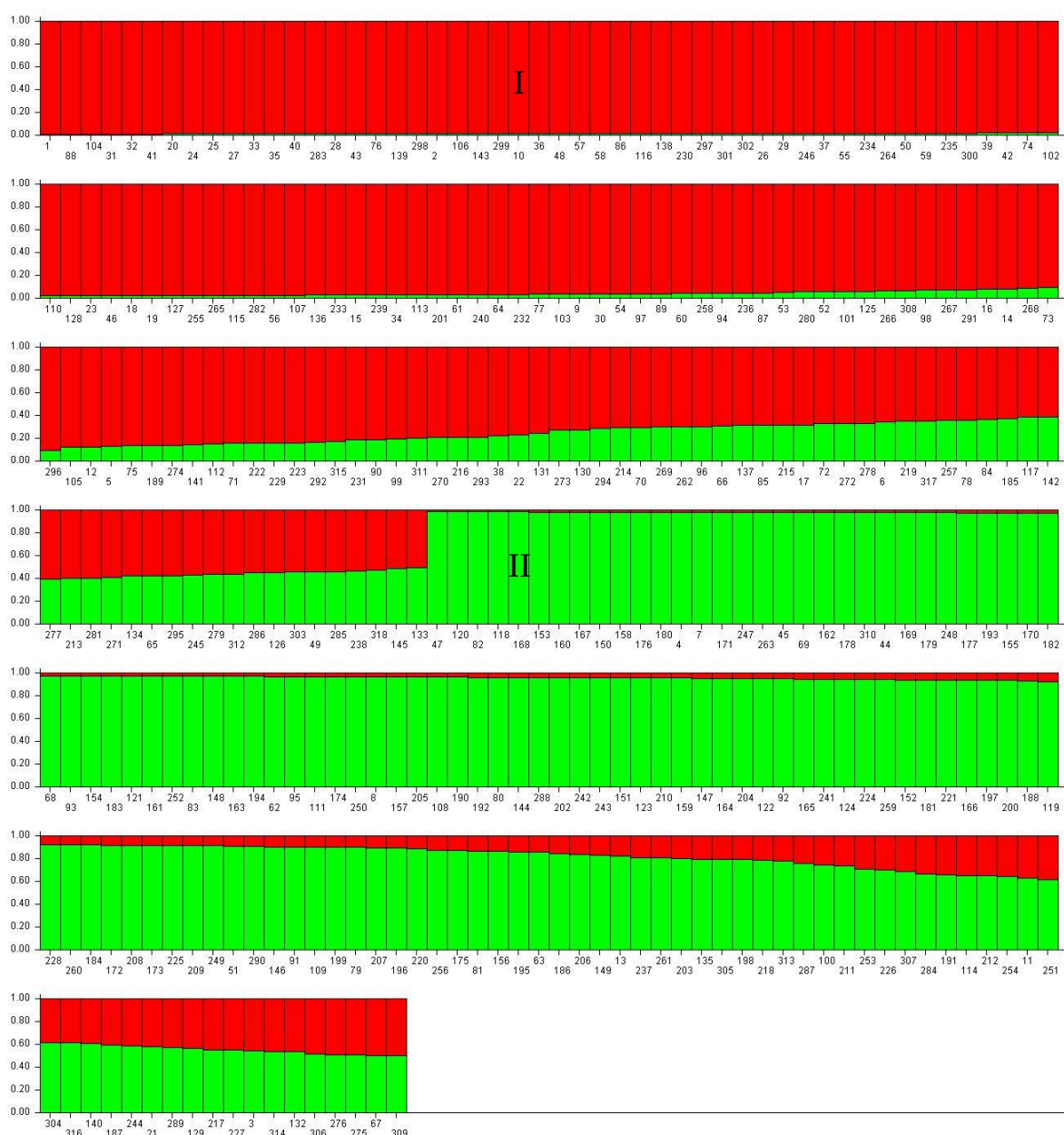


Figura 5 - Representação dos 318 acessos de *Hevea* spp. de acordo com a análise bayesiana gerada pelo programa STRUCTURE. As colunas representam os indivíduos. Os acessos avaliados foram divididos em 2 grupos ($K = 2$). As cores vermelha e verde representam respectivamente os grupos 1 e 2.

A comparação entre os dados da análise bayesiana apontado pelo STRUCTURE com método baseado em distância genética, demonstra que houve grande correspondência entre os grupos formados. Os acessos do *pool* gênico representados pela cor vermelha em conjunto com outros 11 acessos do *pool* gênico designados pela cor verde correspondem ao grupo 2 na árvore de *Neighbor Joining* – NJ. Já o grupo 1 da árvore de NJ está composto por 80,7% dos acessos alocados no *pool* gênico representado pela cor verde (Figura 6A).

Dos 28 acessos sem a informação das espécies, 19 estão representados no *pool* gênico em vermelho e nove no verde. Na árvore de NJ eles estão dispostos, respectivamente, no grupo 2 e no grupo 1. Os acessos Hx3 (293), Hx4 (294), Hx5 (295) e Hx16 (316) agruparam junto aos híbridos de *H. brasiliensis* x *H. pauciflora* (Figura 6B). Esse agrupamento indica que esses acessos podem ser híbridos oriundos do cruzamento entre essas duas espécies ou pertencer particularmente a uma das duas espécies. Os demais acessos agruparam junto aos acessos de *H. brasiliensis*. No entanto, não foi observado um padrão claro de agrupamento que forneça com segurança a atribuição das possíveis espécies a esses acessos. Vale salientar que deve-se fazer um estudo mais detalhado visando conferir corretamente a qual ou quais espécies tais acessos são pertencentes.

Dos 169 acessos ilustrados no *pool* gênico representado pela cor vermelha, 66,6% são de *H. brasiliensis*, 7,6% de *H. pauciflora*, 14,7% de híbridos interespecíficos e 11,1% de acessos sem informação de espécie. O *pool* gênico verde constituiu-se de 74% acessos de *H. brasiliensis*, 10,3% de *H. pauciflora*, 0,7% de *H. rigidifolia*, 9% de híbridos interespecíficos e 6% acessos sem informação da espécie. O intervalo intermediário entre os dois *pools* é extenso. Os acessos Hb65 (65) e HbxHp17 (286), por exemplo, tiveram alta probabilidade de ficar em qualquer um dos dois grupos por apresentarem mistura elevada de ambos os *pools* gênicos (Figura 5). Os híbridos de *H. brasiliensis* x *H. pauciflora* apresentaram mais ou menos 50% de mistura de ambos os *pools*, com exceção do HbxHp19. Já os híbridos de *H. brasiliensis* x *H. benthamiana* e de *H. brasiliensis* x *H. guianensis* apresentaram uma porcentagem baixa de mistura. A combinação de *pools* em híbridos interespecíficos é esperada, em virtude da união de alelos de duas espécies diferentes em um único indivíduo. Isso explica a ocorrência de acessos pertencentes ao *pool* gênico designado pela cor vermelha terem agrupado no grupo 1 da árvore de NJ. A mesma observação vale para o outro grupo.

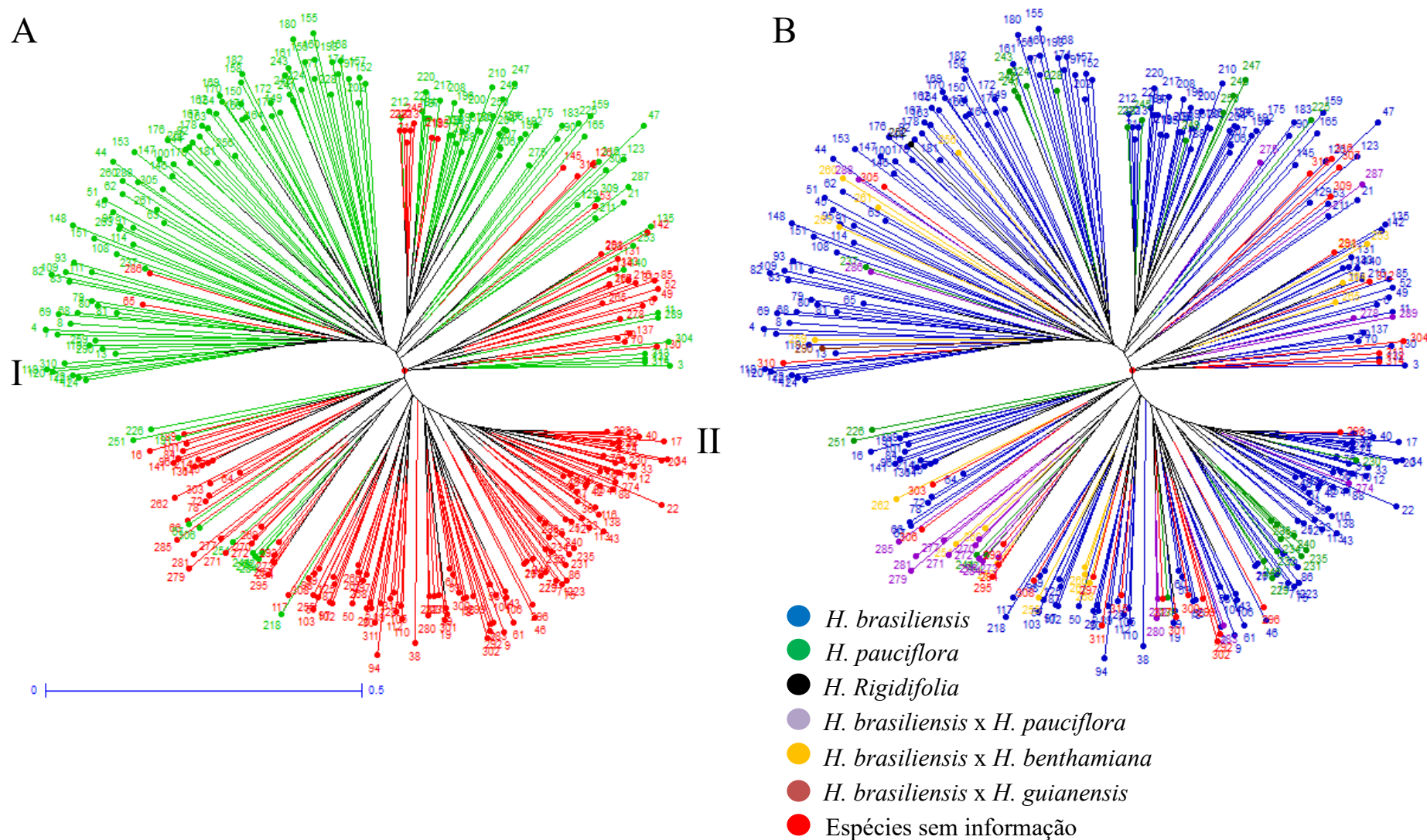


Figura 6 - Árvore não enraizada de *Neighbor-Joining* representando a relação genética entre os 318 acessos de *Hevea* spp. (A) A cor de cada acesso está de acordo com a formação dos grupos gerados pelo programa STRUSTRUCTURE, considerando o K=2. (B) Agrupamento baseado nas espécies.

Dos 113 acessos de origem desconhecida 76,10% foram inseridos no *pool* gênico ilustrado em verde. Na árvore de NJ esses acessos foram classificados dentro do grupo 1, porém com um percentil de 87,61% (Figura 7). O agrupamento desses indivíduos indica uma possível relação de associação genética ocasionada, possivelmente, pela interação entre populações coexistentes ou entre populações de uma mesma bacia hidrográfica. Le Guen et al. (2009) atribuíram a localização geográfica dentro da bacia hidrográfica amazônica e o isolamento causado pela distância entre as populações pertencentes a diferentes bacias hidrográficas como um fator predominante na diferenciação entre populações de seringueira. Como no grupo 1 da árvore de NJ incluiu acessos do Acre, Amazonas, Pará e Rondônia, provavelmente os acessos sem informação quanto ao local de origem tenham sido prospectados em alguma das regiões das bacias hidrográficas desses estados.

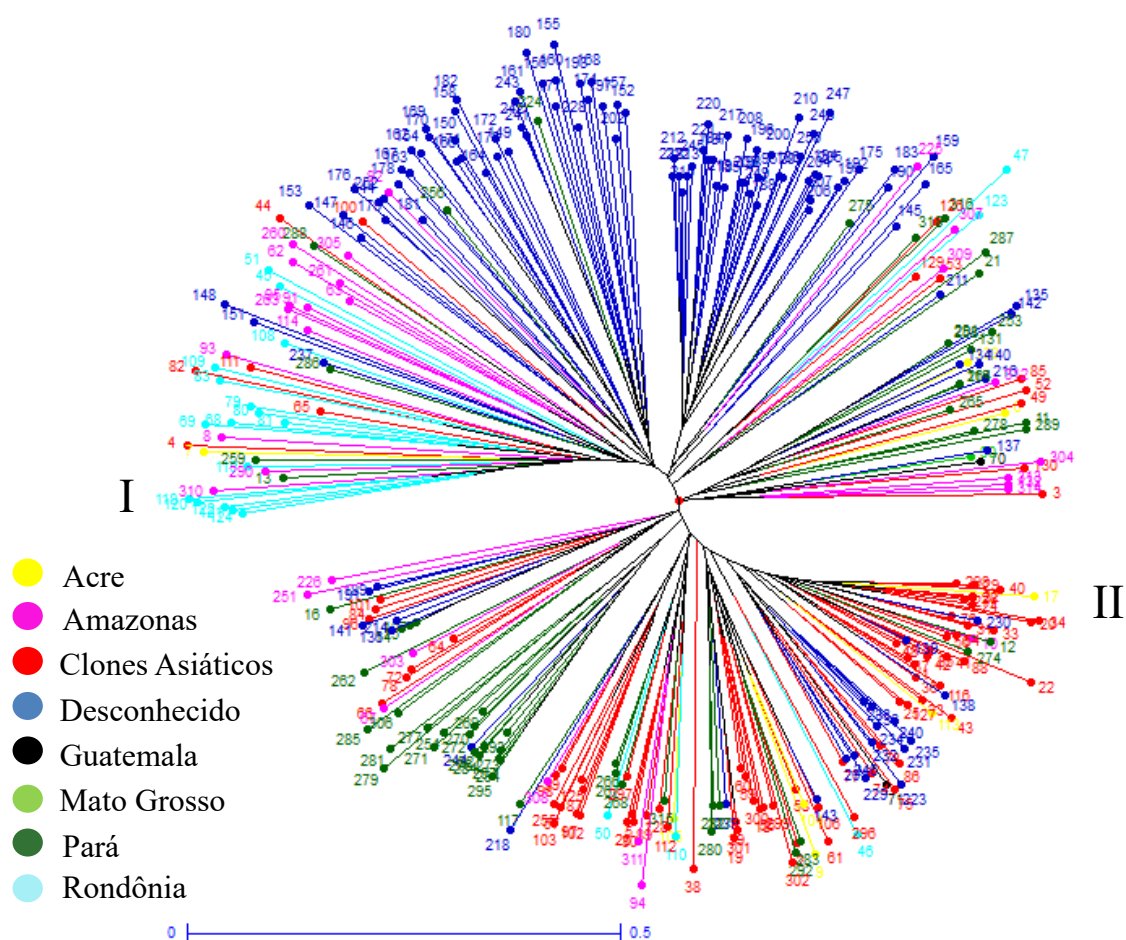


Figura 7 - Árvore não enraizada de *Neighbor-Joining* representando a associação genética entre os 318 acessos de *Hevea* spp. com relação ao local de origem.

A maioria dos acessos Asiáticos foram incluídos no *pool* gênico vermelho e agrupados no grupo 2 da árvore de NJ (Figuras 5 e 7). Esses acessos apresentaram-se relacionados com quatro acessos do Acre, seis do Amazonas, três de Rondônia, 33 do Pará e 27 de origem desconhecida. O agrupamento dos acessos Asiáticos no mesmo conjunto evidência a similaridade entre esses genótipos. É importante ressaltar que a base genética da maioria dos clones Asiáticos é estreita, uma vez que grande parte desses genótipos são resultante, das sementes coletadas por Wickham, na região do Estado do Pará. Já a falta de definição de agrupamento dos acessos com relação ao local de origem, indica haver divergência genética entre eles, causada possivelmente pelo fluxo de genes, decorrente da dispersão de sementes pelas redes hidrográficas entre as populações. Gouvêa et al. (2010) também evidenciaram tanto o agrupamento entre genótipos Asiáticos, quanto a falta de sincronia no agrupamento entre clones Amazônicos. Os autores relatam que os genótipos amazônicos apresentam maior variabilidade por serem um material selvagem, sendo por esta razão, introduzidos na criação de clones Asiáticos a fim de aumentar a base genética.

A Figura 8A mostra a dispersão gráfica dos acessos com relação as suas origens em um espaço multidimensional. Já a Figura 8B revela a consistência da formação dos grupos desvendados pelo programa STRUCTURE com Análise de Coordenadas Principais – PCoA.

A maior parte da variação entre indivíduos é explicada pela primeira coordenada principal (12,09%), que em conjunto com segunda (4,9) e a terceira (4,69) coordenadas principais, representam 21,68% da variação total. Isto implica que apenas 21,68% da variância total pôde ser vista em três dimensões. Essa variância é considerada baixa para marcadores moleculares, que geralmente explicam acima de 30% da variabilidade dos dados (SILVA et al., 2016; MOUHADDAB et al., 2017).

Em seringueira a variação molecular já foi explicada tanto por coordenadas principais como por componentes principais. Souza et al. (2015) verificaram que 35% da variação dos seus dados foram explicados pela primeira coordenada principal. Gouvêa et al. (2010) analisaram a dispersão em acessos de seringueira por meio de componentes principais e assim como nesse estudo, também verificaram que as três primeiras coordenadas foram baixas para explicar a variação total de seus dados.

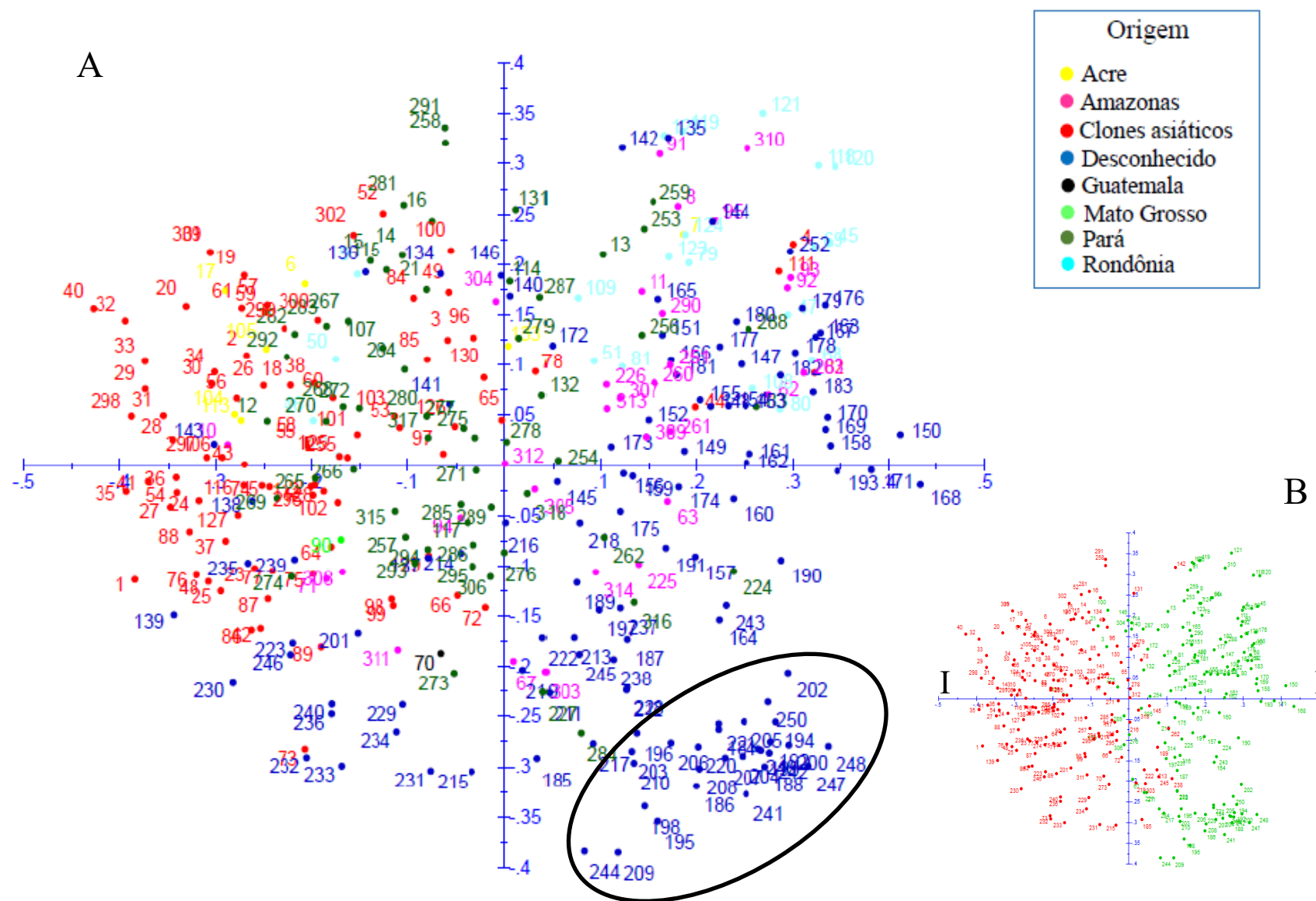


Figura 8 - Representação gráfica entre os 318 acessos de *Hevea* reveladas pela análise de coordenadas principais PCoA com base na distância genética modificada de Rogers. (A) Dispersão dos acessos com relação à origem geográfica. (B) Dispersão com base nos grupos gerados pelo programa STRUcTURE, considerando o K=2.

Muitos acessos de origem desconhecida, destacados em azul na PCoA, apresentaram-se dispersos juntos aos acessos de outras origens. Tal comportamento mostra que esse grupo de genótipos não foram provenientes apenas uma localidade, mas sim coletados em populações diferentes. No entanto, foi identificado um grupo formado exclusivamente por alguns desses acessos. Esse grupo está especificado na parte inferior da Figura 8A. O distanciamento desses genótipos indica que eles foram coletados em localidades afastadas das outras aqui estudadas. Tendo em vista que as populações de *Hevea* ocorrem naturalmente em toda a Amazônia é possível que o aglomerado formado pelos acessos sem informação de coleta tenha sido prospectado em localidades fora das dimensões da Amazônia brasileira. Expedições de coletas internacionais já foram conduzidas na região de Madre de Dios sob a liderança do ministério da agricultura peruana (PRIYADARSHAN; GONÇALVES, 2003). No entanto, não há indícios de que os materiais sem informação de coleta aqui estudados façam parte dos germoplasma coletados em Madre de Dios.

Foi verificado que os clones Asiáticos (coletados na região amazônica), destacado em vermelho, formaram um grupo grande junto com clones do Pará, do Acre e alguns clones do Amazonas, Rondônia e de origem desconhecida (Figura 8A). A grande maioria dos clones conservados nos países Asiáticos avaliados nesse estudo são clones de sigla RRIM ou híbridos com pelo menos um dos parentais desses genótipos (Tabela 1). Esses clones são resultados de uma expedição de coleta de sementes e hastes de seringueira realizada nos estados do Amazonas e Pará em 1995. Portanto, a atribuição de similaridade entre esses materiais está diretamente relacionada com a região geográfica onde esses genótipos foram coletados.

Os acessos Hb7 (7) e Hb133 (133) de origem Acreana, coloridos em amarelo, foram plotados próximos aos acessos de Rondônia (em azul claro), essa mesma observação foi feita com relação aos acessos Hb9 (9), Hb46 (46) e Hb50 (50) de Rondônia, junto aos do Acre. Alguns acessos do Amazonas, plotados na cor rosa, formaram um grupo próximo aos de Rondônia, porém, outros acessos amazonenses foram identificados em pontos distantes do seu aglomerado. De uma maneira geral os acessos amostrados não apresentaram um padrão de agrupamento unificado com relação à origem. Isso pode ter acontecido devido aos *poos* gênicos compartilhados entre a maioria dos acessos (Figura 5).

A distribuição geográfica dos acessos amostrados no presente trabalho proporciona a ocorrência de fluxo de genes entre as populações, já que a rede hidrográfica Amazônica comporta todos os Estados em questão. Lam et al. (2009) sugerem que o fluxo de genes pode existir entre os distritos, possivelmente devido ao modo de reprodução e cruzamento entre as

espécie, além da dispersão de sementes pelas redes de rios da bacia Amazônica. A proximidade genética de populações pertencentes à mesma bacia hidrográfica foi atribuída por Le Guen et al. (2009) como uma característica predominante para afetar a estrutura genética das populações de seringueira. Assim, pode-se considerar que a dispersão de sementes pelas bacias hidrográficas amazônicas explica o fato das populações de seringueira não apresentarem diferenças exclusivas.

Os 318 acessos provenientes de três bancos de germoplasma da Embrapa, mostraram-se altamente polimórficos. Os 348 alelos encontrados foram totalmente representados por 119 indivíduos na formação da coleção nuclear, constituindo 37% do total de acessos estudados. Esse percentil é considerado alto para o estabelecimento de uma coleção nuclear. É provável que o elevado número de indivíduos necessários para representar a diversidade total, seja devido à ampla base genética dos materiais selvagens. No estudo de Souza et al. (2015) os acessos selvagens preservaram grande parte dos alelos particulares e raros, mostrando que esses genótipos são um reservatório importante da variabilidade genética.

Segundo Brown e Spillane (1999), o subconjunto de uma coleção ativa tem por finalidade representar entre 70% a 80% da variabilidade da coleção base com 10% a 15% dos acessos. Já para Araújo (2008), na prática a coleção nuclear pode apresentar proporções variando de 5% a 20% das subamostras e 70% a 90% da diversidade. A redução drástica da diversidade pode levar a perda de alelos raros, causando sérios danos, já que esses alelos podem conferir ou regular características agronômicas importantes (GARKAVA-GUSTAVSSON et al., 2005). É importante conservar os genótipos portadores desses alelos, já que a segregação dos alelos e a seleção natural tendem a diminuir a frequência dos indivíduos possuidores desses alelos nas populações naturais, podendo levar a total extinção da característica.

A retenção de menos de 20% do número total de acessos em uma coleção básica é mais facilmente alcançada em coleções maiores devido à presença de plantas geneticamente similares em grandes coleções (MARTÍNEZ et al., 2017). Por isso, destaca-se a importância de pesquisas com elevado tamanho amostral, associada à análise conjunta dos dados. Por exemplo, a coleção nuclear de *Vitis vinifera* estabelecida por Le Cunff et al. (2008) derivou de 2262 acessos, dos quais 326 capturaram 100% dos alelos, refletido em apenas 14,41% dos acessos estudados. Os 408 alelos encontrados nos 1117 acessos de seringueira por Souza et al. (2015) foram totalmente amostrados em 99 indivíduos (8,86%).

Para conservar 85% da diversidade genética total são necessários 59 acessos, o que representa um subconjunto de 19% de todos os indivíduos amostrados nesse estudo (Figura 9).

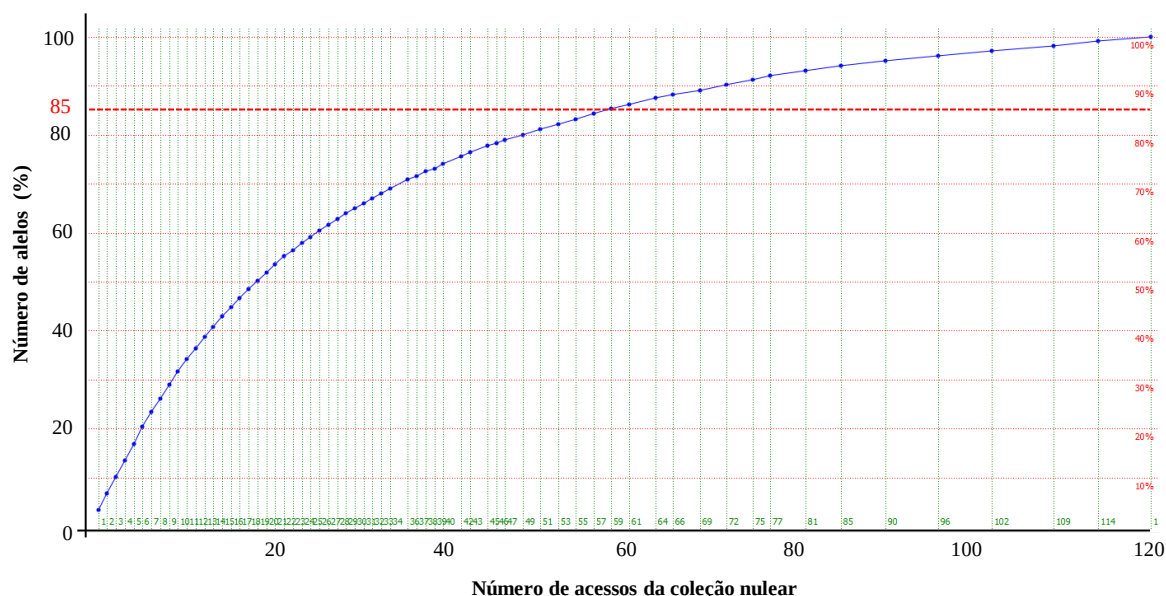


Figura 9 - Número de alelos em percentagem em função do número de acessos incluídos na coleção nuclear de *Hevea* spp.

A coleção nuclear formada compreende 44 acessos de *H. brasiliensis*, seis de *H. pauciflora*, um híbrido de *H. brasiliensis* x *H. benthamiana*, quatro de *H. brasiliensis* x *H. pauciflora*, um de *H. brasiliensis* x *H. guianensis* e três acessos sem informação da espécie (Tabela 5). Tais acessos são do Acre (1,70%), Amazonas (18,64%), Costa do Marfim (1,70%), Indonésia (5,08%), Malásia (10,17%), Pará (11,87%), Rondônia (8,47) e de origem desconhecida (42,37%).

Com relação aos *pools* gênicos revelados pela análise de estrutura e aos grupos formados pela árvore de NJ, foi verificado que 80% da coleção nuclear foi identificada no *pool* gênico verde e 20% no *pool* vermelho. Tal observação indica que o *pool* verde comportou maior variabilidade, sendo os acessos de origem desconhecida os principais responsáveis pelo acúmulo dessa variação.

A coleção nuclear gerada no presente estudo pode auxiliar um programa de melhoramento na escolha de materiais para conservação. Outro aspecto relevante é a redução dos custos operacionais. Portanto, tais resultados fornecem uma base de dados moleculares que pode facilitar o gerenciamento dos bancos de germoplasma de *Hevea* spp.

Os dados genéticos gerados no presente estudo contribuirão eficientemente para o planejamento e conservação adequado dos acessos amostrados, além de fornecer informações úteis aos programas de melhoramento da seringueira. Sugere-se que a coleção nuclear indicada nesse trabalho seja analisada junto a coleção nuclear gerada por Souza et al. (2015) para verificar se tais coleções contemplam diferenças na diversidade alélica e, por fim agrupar essa diversidade em um único nucleou amostral.

Tabela 5 - Identificação dos acessos de *Hevea* spp. para formação da coleção nuclear dos bancos de germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental, Embrapa Amazônia Oriental e Embrapa Cerrados.

Código	Espécie	**Origem	Código	Espécie	**Origem
Hb2	<i>H. brasiliensis</i>	MA	Hb153	<i>H. brasiliensis</i>	DS
Hb4	<i>H. brasiliensis</i>	MA	Hb154	<i>H. brasiliensis</i>	DS
Hb7	<i>H. brasiliensis</i>	AC	Hb155	<i>H. brasiliensis</i>	DS
Hb8	<i>H. brasiliensis</i>	AM	Hb160	<i>H. brasiliensis</i>	DS
Hb44	<i>H. brasiliensis</i>	IN	Hb161	<i>H. brasiliensis</i>	DS
Hb45	<i>H. brasiliensis</i>	RO	Hb162	<i>H. brasiliensis</i>	DS
Hb51	<i>H. brasiliensis</i>	RO	Hb168	<i>H. brasiliensis</i>	DS
Hb62	<i>H. brasiliensis</i>	AM	Hb174	<i>H. brasiliensis</i>	DS
Hb69	<i>H. brasiliensis</i>	RO	Hb175	<i>H. brasiliensis</i>	DS
Hb75	<i>H. brasiliensis</i>	CM	Hb178	<i>H. brasiliensis</i>	DS
Hb80	<i>H. brasiliensis</i>	RO	Hb184	<i>H. brasiliensis</i>	DS
Hb83	<i>H. brasiliensis</i>	PA	Hb205	<i>H. brasiliensis</i>	DS
Hb84	<i>H. brasiliensis</i>	MA	Hb210	<i>H. brasiliensis</i>	DS
Hb92	<i>H. brasiliensis</i>	AM	Hb212	<i>H. brasiliensis</i>	DS
Hb93	<i>H. brasiliensis</i>	AM	Hp2	<i>H. pauciflora</i>	AM
Hb95	<i>H. brasiliensis</i>	AM	Hp3	<i>H. pauciflora</i>	AM
Hb96	<i>H. brasiliensis</i>	MA	Hp5	<i>H. pauciflora</i>	DS
Hb100	<i>H. brasiliensis</i>	MA	Hp8	<i>H. pauciflora</i>	DS
Hb101	<i>H. brasiliensis</i>	MA	Hp24	<i>H. pauciflora</i>	DS
Hb106	<i>H. brasiliensis</i>	IN	Hp27	<i>H. pauciflora</i>	DS
Hb109	<i>H. brasiliensis</i>	RO	HbxHbe8	<i>H. brasiliensis</i> x <i>H. benthamiana</i>	AM
Hb111	<i>H. brasiliensis</i>	IN	HbxHp10	<i>H. brasiliensis</i> x <i>H. pauciflora</i>	PA
Hb117	<i>H. brasiliensis</i>	PA	HbxHp16	<i>H. brasiliensis</i> x <i>H. pauciflora</i>	PA
Hb141	<i>H. brasiliensis</i>	DS	HbxHp19	<i>H. brasiliensis</i> x <i>H. pauciflora</i>	PA
Hb145	<i>H. brasiliensis</i>	DS	HbxHp20	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. brasiliensis</i>	PA
Hb146	<i>H. brasiliensis</i>	DS	HbxHg1	<i>H. brasiliensis</i> x <i>H. guianensis</i>	AM
Hb147	<i>H. brasiliensis</i>	DS	Hx15	Sem informação	AM
Hb148	<i>H. brasiliensis</i>	DS	Hx20	Sem informação	AM
Hb151	<i>H. brasiliensis</i>	DS	Hx26	Sem informação	PA
Hb152	<i>H. brasiliensis</i>	DS			

*As siglas AC = Acre; AM = Amazonas; BA = Bahia; CM = Costa do Marfim; DS = Desconhecida; IN = Indonésia; MA = Malásia; PA = Pará; RO = Rondônia, são referentes aos locais de origem dos acessos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados permitem concluir que:

- Os dez microssatélites testados são ferramentas eficientes para identificar a diversidade genética entre acessos de *Hevea* spp., uma vez que detectaram alto polimorfismo entre os genótipos avaliados;
- As distâncias genéticas encontradas demonstram alta variabilidade entre os acessos de *Hevea*;
- Em virtude do compartilhamento de *pools* gênicos, não houve estruturação suficiente para separação das espécies estudadas;
- As espécies do gênero *Hevea* compartilham homologia em regiões flanqueadoras de microssatélites, já que os SSRs de *H. brasiliensis* são potencialmente transferíveis para as espécies *H. pauciflora* e *H. rigidifolia*;
- Os 59 acessos da coleção nuclear representam uma subamostra de 19% dos acessos analisados e 85% da diversidade genética total.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, A. P.; CAMARGO, C. A. F. S. Implantação e condução de Seringal. In: _____. **Seringueira**. Viçosa: EPAMIG, 2008. p. 311-342.
- ARAÚJO, M. C. Uma coleção nuclear de pupunha na Amazônia. 2008. 94f. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.
- ARNOLD, M. L.; KUNTE K. Adaptive Genetic Exchange: A Tangled History of Admixture and Evolutionary Innovation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 32, n. 8, p. 601-611, 2017.
- ATAN, S.; LOW, F. C.; SALEH, N. M. Construction of a microsatellite enriched library from *Hevea brasiliensis*. **Journal Natural Rubber Research**, v.11, p. n. 1, 247-255, 1996.
- BACKHAUS, R A. Rubber formation in plants-a mini-review. *Israel Journal of Botany*, v. 34, n. 2-4, p. 283-293, 1985.
- 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.
- BICALHO, K. C. 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.
- BILLINGTON, H. L. Effect of population size on genetic variation in a dioecious conifer, **Conservation Biology**, v. 5, n. 1, p. 115-119, 1991.
- BINDU-ROY, C.B.; NAZZER, M.A.; SAHA, T. Identification of simple sequence repeats in rubber (*Hevea brasiliensis*). **Current Science**, v.87, n. 6, p.807-811, 2004.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 5. ed. Viçosa: UFV, 2009. 529 p.
- BOS, H.; MCINDOE, K. G. Breeding of *Hevea* for resistance against *Dothidella ulei* P. Henn. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaya**, v. 19, n. 2, p. 98-107, 1965.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal Human Genetics**, v. 32, n. 3, p.314-331,1980.
- BROWN, A. H. D.; SPILLANE, C. Implementing core collections principles procedures, progress, problems and promise. In: JOHNSON, R. C.; HODGKIN, T. (Ed.) **Core collections for today and tomorrow**. Rome: IPGRI, 1999. p. 1-9.
- BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento de plantas: princípios e procedimentos**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 319 p.
- CAMARGO, A. P.; MARIN, F. R.; CAMARGO, M. B. P. Zoneamento climático da Heveicultura no Brasil, Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, p. 19 (Documentos, 24). 2003.
- CAMPOY, J. A. et al. Genetic Diversity, Linkage Disequilibrium, Population Structure and Construction of a Core Collection of *Prunus Avium* L. Landraces and Bred Cultivars. **BMC Plant Biology**. v. 16, n. 1, p. 49, 2016.
- CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. S.; SILVA, M. A. Preservação e Intercâmbio de Germoplasma, Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 24 (Documentos, 196) 2008.

CECÍLIO, R. A. et al. Zoneamento agroclimático para a heveicultura na parte leste do Estado da Bahia. **Bahia Agrícola**, v.7, n.1, p.14-17, 2006.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. et al. Molecular Genetic Variability of Commercial and Wild Accessions of Passion Fruit (*Passiflora* spp.) Targeting ex Situ Conservation and Breeding, **International Journal Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 22933-22959, 2014.

CHAO, J. et al. Comparative transcriptome analysis of latex from rubber tree clone CATAS8-79 and PR107 reveals new cues for the regulation of latex regeneration and duration of latex flow. **BMC plant biology**. v. 15, n. 1 p. 104, 2015.

CHEN, H. et al. Assessment of genetic diversity and population structure of mung bean (*Vigna radiata*) germplasm using EST-based and genomic SSR markers, **Gene**, v. 566, n. 2, p. 175-183, 2015.

CHEN, Z. Rubber (*Hevea*) In: EVANS, D. A. SHARP, W.R; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.), **Handbook of Plant Cell Culture**. Macmillan: New York, 1983. p. 546-571.

CHOW, K. S. et al. Insights into rubber biosynthesis from transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* látex. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 10, p. 2429-2440, 2007.

CLÉMENT-DEMANGE, A. et al. Rubber tree. In: CHARRIER, A.; JACQUOT, M.; HAMON, S; NICOLAS, D. (Ed.). **Tropical Plant Breeding**. Plymouth: Science Publishers Inc, 2001, 576 p.

COELHO, A. S. G. **BooD: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variado de marcadores (software)**. Goiânia: UFG, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal, 2002.

COHEN, J. I. et al. *Ex Situ* Conservation of Plant Genetic Resources: Global Development and Environmental Concerns. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 866-872, 1991.

DIJKMAN, M. J. **Hevea: thirty years of research in the Far East**. The chronica botanica co, Waltham, mass: USA; 1951, 348 p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n. 1, p.13- 15, 1990.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361. 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, 2016. Produção Agrícola. Disponível em: <www.embrapa.br/agropensa/bases-de-dados>, Acesso em: 18/02/2018.

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**, v. 119, n. 1-2, p. 39–43, 2001.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611- 2620. 2005.

FAO. **The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture**, Rome, 2010, 399 p.

FENG, S. P. et al. Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree. **Molecular Breeding**, v. 23, n. 1, p. 85-97, 2009

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, 2007. p. 377-420.

FORTES, A. C. R. et al. Transferibilidade de locos microssatélites desenvolvidos em outras espécies de palmeiras para *Astrocaryum vulgare* Mart. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 59, n. 1, p. 80-86, 2016.

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D; BURDON, J. J. **Conservation of plant biodiversity**. Cambridge University Press. Reino Unido, 1995, 299 p.

GARKAVA-GUSTAVSSON, L. et al. RAPD-based analysis of genetic diversity and selection of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) material for ex situ conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 52, n. 6, p. 723-735, 2005.

GONÇALVES P.S.; CARDOSO, M.; IGUE, T.; MARTINS, A.L.M.; LAVORENTI, C. 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. das. Manual de heveicultura para o Estado de São Paulo, Série Tecnologia APTA, Instituto Agrônômico (IAC), Campinas, 2001. 78 p.

GONÇALVES, P. de S. **Expedição internacional à Amazônia no Território Federal de Rondônia para coleta de material botânico de seringueira (*Hevea brasiliensis*); relatório de viagem**. EMBRAPA-CNPDS, Manaus, 1981. 59 p.

GONÇALVES, P. de S.; AGUIAR, A. T. E.; GOUVÊA, L. R. L. Expressão fenotípica de clones de seringueira na região Noroeste do Estado de São Paulo, **Bragantia**, v. 65, n. 3, p. 389-398, 2006.

GONÇALVES, P. S. Banco ativo de germoplasma de seringueira. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS: SESSÃO 1-BANCOS ATIVOS DE GERMOPLASMA, 1979, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1980. 105-111 p.

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. Variação genética dos componentes do crescimento em progênes jovens de uma população de clones de *Hevea*. **Bragantia**, v. 51, n. 2, p. 161-171, 1992.

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.; MARQUES, J. R. B. Melhoramento Genético da Seringueira: passado, presente e futuro. In: ALVARENGA, A. P.; CARMO, C. A. F. S. (Ed.). **Seringueira**. Viçosa: Epamig, 2008. p. 401-407.

- GONÇALVES, P. S.; ORTOLANI, A. A; CARDOSO, M. Melhoramento Genético da Seringueira: Uma revisão, 55 p. (Documentos IAC 54), 1997.
- GONÇALVES, P.S.; CARDOSO, M.; COLOMBO, C.A.; ORTOLANI, A.A.; MARTINS, A.L.M.; SANTOS, I.C.I. dos. 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.
- GOUVÊA, L. R. L. et al. Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33 n. 2 p. 308-318, 2010.
- GUARÍN, J. A. O. et al. Colombia a Source of Cacao Genetic Diversity As Revealed by the Population Structure Analysis of Germplasm Bank of Theobroma Cacao L. **Frontiers in Plant Science**. V. 8, n. 1, p. 1-13, 2017.
- HALLE, F.; COMBE, J. C. **Mission en Amazonie brésilienne pour la récolte de matériel génétique nouveau destiné à l'amélioration de l'hévéa**. Rapport de mission., IRCA, Paris, 1974. 19 p.
- HAOUANE, H. et al. Genetic Structure and Core Collection of the World Olive Germplasm Bank of Marrakech: Towards the Optimised Management and Use of Mediterranean Olive Genetic Resources. **Genetica**. v. 139, n. 9 p. 1083-1094, 2011.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 3. ed. Sunderland: Sinauer associates, 1997. 541 p.
- HAWKES, J. G.; MAXTED, N.; FORD-LLOYD, B. V. **The ex situ conservation of plant genetic resources**. Springer Science & Business Média, 2012. 250 p.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2016. Levantamento Sistemático sobre Pesquisas Agrícolas. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br>, Acesso em: 18/02/2018.
- INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP – IRSG, 2017. Rubber Statistical Bulletin. Disponível em: <<http://www.rubberstudy.com/pub-stats-bulletin.aspx>>, Acesso em: 18/02/2018.
- KÖPP, M. M. et al. **Banco Ativo de Germoplasma de Alfafa da Embrapa Pecuária Sul**. Bagé : Embrapa Pecuária Sul, p. 30 (Documentos 126). 2011.
- LAM, L. V. et al. Genetic diversity of *Hevea* IRRDB'81 collection assessed by RAPD markers. **Molecular biotechnology**. v. 42, n. 3, p. 292-298, 2009.
- 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**, v. 190, n. 2, p. 131-143, 2004.
- LE CUNFF, L. et al. Construction of nested genetic core collections to optimize the exploitation of natural diversity in *Vitis vinifera* L. subsp. sativa. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 31, 2008.
- LE GUEN, V. et al. A rubber tree's durable resistance to *Microcyclus ulei* is conferred by a qualitative gene and a major quantitative resistance factor. **Tree Genet Genome**, v. 7, n. 5, p. 877–889, 2011.
- 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.

- LE GUEN, V. et al. Genetic structure of Amazonian populations of *Hevea brasiliensis* is shaped by hydrographical network and isolation by distance. **Tree Genet Genomes**. v. 5, n. 4, p. 673–683, 2009.
- 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.
- 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.
- LI, D. et al. Transcriptome Analyses Reveal Molecular Mechanism Underlying Tapping Panel Dryness of Rubber Tree (*Hevea Brasiliensis*). **Scientific Reports**. v. 6, p. 23540, 2016.
- 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.
- LINS, A. C. R. et al. **Report of the Acre collection team in the 1981 Joint IRRDB/Brazil Hevea Germplasm Expedition**. Embrapa/CNPDS, Manaus, 1981. 24 p.
- LIU, J. P. et al. Molecular mechanism of ethylene stimulation of latex yield in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) revealed by de novo sequencing and transcriptome analysis. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 257, 2016.
- LIU, J. P. et al. Transcriptome sequencing and analysis of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell.) to discover putative genes associated with tapping panel dryness (TPD). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 398, 2015.
- 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. De novo assembly and transcriptome analysis of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) and SNP markers development for rubber biosynthesis pathways. **Plos one**, v. 9, n. 7, p. e102665. 2014.
- MANTELO, C. C.; SUZUKI, F. I.; SOUZA, L. M.; GONÇALVES P. S.; SOUZA, A. P. Microsatellite marker development for the rubber tree (*Hevea brasiliensis*): characterization and cross-amplification in wild *Hevea* species. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2012.
- MARTÍNEZ, I. B. et al. Establishment of a core collection of traditional Cuban Theobroma cacao plants for conservation and utilization purposes. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 35, n. 1, p. 47-60, 2017.
- MESQUITA, A. C.; OLIVEIRA, L. E. M. Características anatômicas da casca e produção de látex em plantas de seringueira não enxertadas. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 2, p. 241-246, 2010.
- MILLER, M. P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA): A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, version 1.3**. Northern Arizona University, Arizona, 1997.

- MORAES, L. A. C. et al. Clones de copa de seringueira resistentes ao mal-das-folhas para o cultivo na Amazônia tropical úmida. **Bragantia**, v. 72, n. 3, 2013.
- MORAES, V. H. F.; MORAES, L. A. C. Desempenho de clones de copa de seringueira resistentes ao mal-das-folhas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 11, p. 852-858, 2008.
- 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.
- MOUHADDAB, J. et al. Using microsatellite markers to map genetic diversity and population structure of an endangered Moroccan endemic tree (*Argania spinosa* L. Skeels) and development of a core collection. **Plant Gene**, v. n. 2, 10, p. 51-59, 2017.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 12 p. 3321-3323, 1973.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia university press. 1987 512 p.
- NEWBOLD, T. et al. Global effects of land use on local terrestrial biodiversity, **Nature**, v. 520, n. 7545, p. 45-50, 2015.
- 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.
- OKTAVIA, F.; KUSWANHADI, M. L. Genetic Relationship of Wickham and IRRDB 1981 Rubber Population Based on RAPD Markers Analysis. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 18, n. 1, p. 27-32, 2011.
- OLIVEIRA, M. S. P. et al. Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites. **Ciência agrotecnologia**, v. 34, n. 5, p. 1253-1260, 2010.
- ONG, S. H. Chromosome morphology at the pachytene stage in *Hevea brasiliensis* – a preliminary report. In: International Rubber Conference, Kuala Lumpur, Proceedings, 1975. 1-19 p.
- ONOKPISE, O. U. Natural rubber, *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg., germplasm collection in the Amazon basin, Brazil: a retrospective. **Economic botany**, v. 58, n. 4, p. 544-555, 2004.
- PÁEZ, H. U. A. et al. Assembly and Analysis of Differential Transcriptome Responses of *Hevea brasiliensis* on Interaction with *Microcyclus ulei*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1-21, 2015.
- PAIVA, J. R. **I coleta de material sexuado e assexuado nos seringais nativos do Estado do Mato Grosso**. EMBRAPA-CNPDS, Manaus, 1981. 26 p.
- PAULO, C. M. et al. Expansão da fronteira agropecuária e desmatamento na região de alta floresta/MT: alternativas para o desenvolvimento sustentável. **Revista Gestão & Políticas Públicas**, v. 5, n. 1, p. 108-130, 2015.
- PEREIRA, A. V. et al. Mangaba. In: VIEIRA, R. F. et al. (Ed.). **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 188-213.
- PERRIER, X.; JACQUEMOUND-COLLET, J. P. 2006. **DARwin software**. Disponível em: <<http://www.darwin.cirad.fr/darwin>>. Acesso em: 18 de fevereiro, 2018.

- PERRY, B. A. Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae. **American Journal of Botany**, v. 30, n. 7, p. 527-543, 1943.
- PERSEGUINI, J. M. K. C. et al. Genetic diversity of cultivated accessions and wild species of rubber tree using EST-SSR markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 8, p. 1087-1094. 2012.
- PILAU, G. F. et al. Zoneamento agroclimático da heveicultura para as regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 15, n. 2, p. 161-168, 2007.
- PIRES, J. M. Notas de Flerbário 1. (*Hevea camorgoana* n. sp.). **B. Mus. Paraense Emilio Goeldi, Série - Botânica**, Belém, v. 52; 1981. 1-11 p.
- PIRES, J. M.; SECCO, R. S.; GOMES, J. I. **Taxonomia e Fitogeografia das seringueiras**. Belém: Embrapa-Amazônia Oriental, 2002, 103 p.
- POLICRITI, A.; SGARRO, A. **CoreFinder v.1.0**. 2011.
- POOTAKHAM, W. et al. De novo hybrid assembly of the rubber tree genome reveals evidence of paleotetraploidy in *Hevea* species. **Scientific Reports**, v. 7. p. 41457. 2017.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959. 2000.
- PRIYADARSHAN, P. M; GONÇALVES, P. S. *Hevea* gene pool for breeding. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, n. 1, p. 101-114, 2003.
- PRIYADARSHAN, P.M.; CLEMENT-DEMANGE, A. Breeding *Hevea* Rubber: Formal and Molecular Genetics. **Advances in Genetics**, v. 52, p. n.1, 51-115, 2004.
- PRIYADARSHAN. P. M.; GONÇALVES, P. S.; OMOKHAFFE, K. O. Breeding *Hevea* Rubber. In: JAIN, S.M.; PRIYADARSHAN, P. M. (Ed.). **Breeding Plantation Crops**. Tropical Species, New York: Springer Science, 2009. p. 469-524.
- RIBEIRO, N. P. et al. Biodiversidade e conservação de recursos genéticos de espécies arbóreas. **Multitemas**, v. 21, n. 50, p. 31-49, 2016.
- RIPPEL, M. M.; BRAGANÇA, F. D. C. Borracha natural e nanocompósitos com argila. **Química nova**, v. 32, n. 3, p. 818-826, 2009.
- ROGERS, J. S. **Measures of genetic similarity and genetic distance: studies in genetics**. Austin: University of Texas, 1972. 145-154 p.
- SÁ, T. D. A. Aspectos ecofisiológicos da sangria da seringueira. In: BERNARDES M. S. (Ed.) **Sangria da seringueira**. Piracicaba: ESALQ, 2000, p. 21-44.
- SACKVILLE, H. N. R. et al. **Accession management: combining or splitting accessions as a tool to improve germplasm management efficiency**. Roma: IPGRI, 66 p. (boletim técnico, 5). 2002.
- 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. et al. De novo transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* tissues by RNA-seq and screening for molecular markers. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 236, 2014
- SANTOS, M. M. Relatório da prospecção em seringal nativo de *Hevea benthamiana* na região de Barcelos – AM. Manaus: EMBRAPA-CNPDS, 1982. 21 p.
- SCHREINEMACHERS, P.; EBERT, EMAIL A. W.; WU, M-H. Costing the ex situ conservation of plant genetic resources at AVRDC – The World Vegetable Center, **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 61, n. 4, p. 757-773, 2014.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.
- 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**, v. 100, n. 5, p. 723-726, 2000.
- SECCO, R. S. A botânica da seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell-Arg.] In: Alvarenga, A.P.; Carmo, C.A.F.S. (Ed.). **Seringueira**. Viçosa: Epamig, 2008. p. 01-24.
- SHAN, F. et al. Identification of duplicates and fingerprinting of primary and secondary wild annual Cicer gene *pools* using AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 3, p. 519-527, 2007.
- SHEARMAN, J. R. et al. Identificação de SNP da Sequenciamento de RNA e Construção de Mapa de Ligação de Árvore de Borracha para ancorar o Genoma de Rascunho. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0121961, 2015.
- SILVA, B. M. et al. Diversidade genética estimada com marcadores entre sequências simples repetidas em cultivos comerciais de Cupuaçuzeiro. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 108-113, 2016.
- SILVA, G. A. P. et al. Genetic parameters in a rubber tree population: heritabilities, genotype-by-environment interactions and multi-trait correlations. **Tree Genetics & Genomes**, v. 10, n. 6, p. 1511-1518, 2014.
- SILVA, J. Q. et al. Viabilidade econômica de diferentes sistemas de sangria em clones de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 3, p. 349-356, 2007.
- SILVA, K. R. et al. Zoneamento dafoclimático para a cultura da seringueira no Espírito Santo. **Irriga**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2013.
- SILVA, T. A. C. et al. Population structure and genetic diversity of Brazilian popcorn germplasm inferred by microsatellite markers, **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 181-187, 2015.
- SOUZA, L. M. et al. Development of single nucleotide polymorphism markers in the large and complex rubber tree genome using next-generation sequence data. **Molecular Breeding**, v. 36, n. 8, p. 1-10, 2016.
- 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, L. M. et al. Microsatellites from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) for genetic diversity analysis and cross-amplification in six *Hevea* wild species. **Conservation Genet Resour**, v. 1, n. 1, p. 75-79, 2009.
- TAYALÉ, A.; PARISOD, C. Natural Pathways to Polyploidy in Plants and Consequences for Genome Reorganization. **Cytogenet Genome Research**, v. 140, n. 2-3, p. 79-96, 2013.
- 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.
- TRIWITAYAKORN, K. et al. Transcriptome sequencing of *Hevea brasiliensis* for development of microsatellite markers and construction of a genetic linkage map. **DNA Research**, v. 18, n. 6, p. 471-482, 2011.
- WEBSTER, C. C.; BAULKWILL W. E. J. **Rubber Tropical Agricultural Series**. Singapura: Longman Scientific and Technical, 1989. 614 p.
- WEI, F. et al. Transcriptome sequencing and comparative analysis reveal long-term flowing mechanisms in *Hevea brasiliensis* látex. **Gene**, v. 556, n. 2, p. 153-162, 2015.
- WEI, O. C.; AR, S. B. The selection for high rubberwood yielding genotypes in 1995 *Hevea* germplasm, Rantau Panjang Forest Reserve. **Journal of Biology Agriculture and Healthcare**. v. 4, n. 7, p. 132-135, 2014.
- WYCHERLEY, P.R. The genus *Hevea*. In: **Workshop on international collaboration Hevea breeding and the selection and establishment of materials from the neo-tropic**, Kuala Lumpur, 1977. 12p.
- YU, F. et al. Development, characterization, and cross-species/genera transferability of SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 3, p. 335-344, 2011.
- YUAN, D.; HUANG, S. Genetic equidistance at nucleotide level. **Genomics** v. 109, n. 4, p. 192-195, 2017.
- ZOU Z, et al. Survey of the rubber tree genome reveals a high number of cysteine protease-encoding genes homologous to *Arabidopsis* SAG12. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171725, 2017.