

DESENVOLVIMENTO DE UM PAINEL DE MICROSSATÉLITES PARA ESTUDOS DE ESTRUTURA POPULACIONAL E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES E PROCEDÊNCIAS EM *EUCALYPTUS*

Leonardo Queiroz Correia¹
Danielle Assis de Faria²
Dario Grattapaglia³

O mapeamento de associação, i.e. a associação direta entre variabilidade alélica e variabilidade fenotípica, constitui uma abordagem interessante para a identificação de genes responsáveis pela variação quantitativa em características de importância econômica. A utilização eficaz de testes de associação em populações naturais de *Eucalyptus* depende, entretanto, do nível de sub-estruturação das populações. Se em uma população existirem subgrupos com distribuição desigual de alelos, é possível que uma falsa associação, sem função causal, seja detectada. Marcadores microssatélites têm sido amplamente utilizados para a detecção de possíveis sub-estruturações em populações de associação. No âmbito da montagem de experimentos de associação em *Eucalyptus*, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e avaliação de um painel de microssatélites úteis para estudos de estruturação em populações naturais e coleções de germoplasma, além da distinção das espécies e procedências mais amplamente utilizadas no melhoramento. Foram estudadas 212 árvores de quatro espécies de eucalipto (*E. camaldulensis*, *E. urophylla*, *E. dunnii* e *E. saligna*), oriundas de diferentes procedências da Austrália. Foram analisados 35 microssatélites, previamente selecionados com base em informação de mapeamento genético, visando cobrir o genoma como um todo. Oito desses locos são provenientes de regiões não traduzidas de ESTs (*Expressed Sequence Tags*). Os genótipos foram

¹ Graduando Biologia; Universidade Católica de Brasília-UCB; Bolsista CNPq

² Doutoranda; Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia - Universidade Católica de Brasília-UCB; Bolsista CNPq

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

obtidos pela detecção fluorescente em seqüenciador automático ABI 3100 e os dados analisados com o programa GenAIEx 6, Arlequin e Phyllip.

Todos os 35 locos foram altamente polimórficos em todas as procedências, com exceção de um loco que foi monomórfico na espécie *E. dunnii*. Para o loco EMBRA28 foi observada uma heterozigotidade de 100% em todas as procedências de todas as espécies. Todas as espécies apresentaram alelos privados, podendo destacar o alelo 141 bp do loco Embra186 presente com uma frequência de 0,52 em *E. urophylla*. A proporção de variância molecular dentro de espécies (80%) é maior do que entre espécies (20%), e analogamente maior dentro de procedências (79%) do que entre (21%). Valores significativos de F_{ST} foram estimados seja entre espécies bem como entre procedências com uma maior diferenciação genética observada entre espécies de seções distintas dentro do subgênero *Symphyomyrtus*. Na análise individual de cada loco, microssatélites derivados de EST revelaram uma maior diferenciação (maior F_{ST}) entre espécies e procedências indicando uma maior capacidade de detectar estruturação. Foram identificados ainda locos com maior capacidade de discriminação de procedências dentro de espécies, particularmente úteis para vir a compor uma bateria reduzida de microssatélites para a análise de estrutura em populações de associação.

INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca no cenário internacional por ter um dos maiores patrimônios florestais naturais, com elevada biodiversidade, e também pelas florestas comerciais. O setor florestal produtivo brasileiro é constituído primordialmente por plantios de eucaliptos e por florestas de coníferas. Espécies desses gêneros apresentam características extremamente favoráveis em termos de crescimento, forma, adaptabilidade e qualidade da madeira para fins industriais (GOMIDE e COLODETTE, 2007).

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, compreende cerca de 700 espécies (BROOKER, 2001). É originário da Austrália, porém é plantado em todo mundo, representando a espécie florestal de maior importância econômica. Os principais produtos obtidos a partir do gênero *Eucalyptus* são o papel, a celulose, carvão vegetal para a indústria siderúrgica, além de derivados da madeira utilizado na fabricação de móveis. Por ser de rápido crescimento e de fácil adaptação às mais diferentes condições de clima e solo, o eucalipto passou a ser uma alternativa contra a devastação das florestas nativas em diversas regiões do planeta, propiciando a preservação do meio ambiente (SANTOS, 2005). A utilização da madeira oriunda de florestas plantadas é uma forma de preservar as florestas naturais do planeta, no entanto as áreas disponíveis para florestas industriais serão limitadas nas próximas décadas, sendo o melhoramento genético uma estratégia para a

sustentabilidade de empreendimentos de base florestal, uma vez que ele possibilita o aumento na produtividade florestal e na qualidade dos produtos em uma mesma área plantada (GRATTAPAGLIA, 2007).

Marcadores moleculares vêm sendo utilizados em espécies florestais desde os anos 80. Os marcadores microssatélites, também identificados pela sigla SSR (Seqüências Simples Repetitivas), são regiões de DNA em que seqüências de um a seis nucleotídeos estão presentes em unidades repetitivas (SILVA et al., 1999). São os mais versáteis entre os marcadores e são utilizados em diversas aplicações biológicas (BUSCHIAZZO e GEMMELL, 2006). O advento da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) conferiu a esses marcadores alta aplicabilidade, uma vez que essas seqüências diferem em número de repetições entre indivíduos (SCHLÖTTERER, 2000) Os SSR são altamente informativos para programas de melhoramento florestal por possuírem características como multialelismo, herança co-dominante, ampla distribuição no genoma e transferíveis entre espécies taxonomicamente próximas, podendo ser utilizados em espécies florestais para resolver questões relacionadas ao gerenciamento da variabilidade genética, monitoramento genético ao longo dos ciclos de melhoramento, predição do desempenho da progênie com base na estimativa da distância genética, determinação de parentesco e identificação individual em populações de melhoramento (GRATTAPAGLIA, 2007).

Os SSR tem sido utilizados para a detecção de possíveis sub-estruturas em populações de associação. No âmbito da montagem de experimentos de associação em *Eucalyptus*, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e avaliação de um painel de microssatélites úteis para estudos de estruturação em populações naturais e coleções de germoplasma, além da distinção de espécies e procedências mais amplamente utilizadas no melhoramento.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Genético

Para realização deste experimento foram utilizadas 212 árvores originadas de populações naturais da Austrália pertencentes a quatro espécies puras: *E. camaldulensis*, *E. urophylla*, *E. dunnii* e *E. saligna*. As árvores são originadas de diferentes procedências dentro do continente Australiano e ilhas adjacentes. A espécie, a procedência, o número de indivíduos e latitude encontram-se na Tabela 1.

1. Extração e quantificação do DNA

Para a extração do DNA total foi utilizado tecido foliar de cada planta avaliada. A extração foi feita pelo método utilizando o detergente CTAB 2% (DOYLE e DOYLE, 1987). Para a maceração das folhas foi utilizado o equipamento TissueLyser da Qiagen com beads metálicas. Cada amostra foi macerada contendo o tampão de CTAB com Mercaptoetanol por 40 segundos. Após a extração, o pellet foi ressuspensionado em volumes variáveis (dependendo do tamanho observado do pellet) de Tris/EDTA (TE) pH 8,0 com Ribonuclease A (RNaseA) e

submetido a temperatura de 37°C por 20 minutos para ação da enzima.

O DNA foi quantificado em gel de agarose 1% em tampão SB (*Sodium boric acid*) (BRODY e KERN, 2004) corado com brometo de etídeo utilizando DNA do fago lambda de concentração conhecida como padrão de comparação.

Escolha dos locos de Microssatélites

Para as análises foram escolhidos 35 locos de microssatélites já mapeados por Mamani e Grattapaglia (2006) e Brondani et al. (2006). O mapa IP (MAMANI e GRATTAPAGLIA, 2006) foi o mais observado, pois contém um maior número de marcadores e grande parte dos locos mapeados por Brondani et al. (2006). Visando uma maior representatividade genética, os marcadores foram selecionados de forma a cobrir o genoma como um todo. Para cada grupo de ligação foram selecionados marcadores localizados na ponta, no meio e na ponta oposta do grupo de ligação. Para os grupos de ligação nove, quatro e cinco, foi escolhido um loco a mais em cada grupo por variações entre as versões de mapa genético que foram utilizados, totalizando assim 35 locos avaliados com três locos por grupo de ligação. Entre os locos selecionados, oito locos são provenientes de regiões não traduzidas de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) (Tabela 2), sendo que dois locos são tetranucleotídeo, um hexanucleotídeo, um trinucleotídeo e quatro dinucleotídeos. Os demais locos são provenientes de seqüências genômicas não transcritas desenvolvidos a partir de uma biblioteca

enriquecida e são em sua totalidade dinucleotídeos.

Amplificação dos locos microssatélites via PCR

A amplificação dos microssatélites via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi realizada utilizando o kit Multiplex PCR da QIAGEN®. A reação possuía um volume final de 5µl contendo 1X do QUIAGEN Multiplex PCR Master Mix 2X; 0,3µM de cada primer; 0,5X de Q-solution; 2ng de DNA; e água RNase-free para completar o volume.

A PCR foi realizada utilizando um programa que apresenta uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 15 minutos para ativar a enzima, seguidos de 35 ciclos envolvendo uma etapa inicial de desnaturação (95°C por 30 segundos), uma de anelamento dos primers (57°C por 90 segundos) e uma de extensão (72°C por 1 minuto), finalizando com uma etapa única de extensão final a 72°C por 30 minutos.

Os locos foram amplificados em sistemas de triplex, duplex e até primers isolados, sendo que cada loco do multiplex estava marcado com uma fluorescência diferente: HEX, FAM e NED (Tabela 2). Como o trabalho foi realizado com diferentes espécies puras, não era previsível o tamanho dos locos em pares de base (pb) e por isso optou-se a montagem dos multiplex com somente um loco para cada fluorescência. Para a amplificação dos 35 locos foram utilizados 12 multiplexes, sendo nove triplex, três duplex e apenas dois locos, embra38 e embra 2014, foram amplificados isoladamente (Tabela 3). A montagem dos

multiplex foi feita utilizando parâmetros implementados no software Multiplexer, gentilmente cedido pelo professor Alexandre Coelho – UFG.

Eletroforese Capilar

Após a PCR as amostras foram submetidas à eletroforese capilar em seqüenciador automático ABI3100 (Applied Biosystems).

De cada amostra foram reunidos 1 µl da PCR, 1 µl do size standart marcado com fluorescência ROX, desenvolvido por Brondani et al. (2001), e 8 µl de formamida Hi-Di. A placa contendo as amostras foi então desnaturada a 95°C por 5 minutos e colocada imediatamente em gelo.

As corridas foram feitas usando protocolo padrão do ABI3100 para fragmentos e a análise dos picos foram feitas utilizando os softwares GenScan e Genotyper (Applied Biosystems). Para obtenção dos valores em pares de base para cada alelo e com a intenção de diminuir o número de erros foi utilizado o software Allelobin (Idury & Cardon, 2007).

Análises estatísticas

Utilizando os programas GenAlex 6 (PEAKALL e SMOUSE, 2006) e Arlequin versão 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005) foram estimados valores de frequência alélica, número e frequência de alelos privados, heterozigotidade, F_{IS} e F_{ST} . Foi ainda testada hipótese de Equilíbrio de Hardy-Weinberg e estimadas as distâncias genéticas entre populações além da distribuição de variabilidade entre e dentro populações e espécies com base em uma análise de variância molecular (AMOVA). Além disso, foram construídos dendogramas entre as

procedências e espécies estudadas utilizando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) implementado no programa PHYLLIP (FELSENSTEIN, 1993-2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As procedências estudadas apresentaram elevados níveis de variabilidade em todos os locos microssatélites utilizados. Timor e Flores (*E. urophylla*) apresentaram 100% de polimorfismo, ou seja, todos os 35 locos apresentaram mais de um alelo. A procedência com menor porcentagem de polimorfismo foi 612 (*E. dunnii*) com 91,43%. A média para todas as procedências foi de 96,26%. O elevado nível de polimorfismo detectado pelos locos de microssatélites era esperado uma vez que a maior parte dos locos são dinucleotídeos e as análises foram feitas em quatro espécies diferentes. A alta proporção de locos polimórficos revela a elevada heterogeneidade genética presente no gênero *Eucalyptus* e reforça a utilidade de microssatélites para estudos genéticos em espécies deste gênero.

Todas as procedências apresentaram alelos privados, podendo destacar o alelo 73 pb do loco Embra4 presente na procedência Kennedy (*E. urophylla*) com uma frequência 0,143. O loco com o maior número de alelos (36 alelos) foi Embra681, derivado de seqüência genômica e o loco com menor número (3 alelos) foi Embra1829, derivado de EST. Alelos fixados com frequência igual a 1,00 foram encontrados em duas espécies

para os locos de EST Embra1829 e 1139. No loco Embra1829 o alelo 177pb encontra-se fixado para a espécie *E. dunnii*, já o loco Embra1139 possui o alelo 203pb fixado nas espécies *E. dunnii* e *E. camaldulensis*. Três locos derivados de seqüências 5' de EST se destacaram com o menor número de alelos: Embra1139, Embra1829 e Embra2014 com 4, 3 e 7 alelos, respectivamente. Esses menores valores em relação ao número de alelos em locos de EST sugerem a existência de alguma restrição na taxa de mutação do microssatélite em regiões transcritas do genoma. A presença de alelos privados e de locos com baixo número de alelos é de grande relevância, uma vez que esses são os locos que nos permitem uma maior distinção entre espécies/procedências.

Irvinebank (*E. Camaldulensis*) foi a procedência com a maior heterozigosidade observada (0,845) e 612 (*E. dunnii*) com a menor (0,719). Timor (*E. urophylla*) foi a procedência com a maior amplitude alélica, porém com o maior número de locos (8) fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Todas as procedências apresentaram locos com desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4).

As estimativas de diferenciação genética (F_{ST}) foram significativas entre a maior parte das procedências tomadas duas a duas, com exceção de Sheas Nob e Wild Creek da espécie *E. saligna*, com um valor de 0,009 (Tabela 5). Há, portanto, uma diferenciação genética consolidada entre as procedências estudadas, apenas Sheas Nob e Wild Creek podem ser consideradas uma mesma população a partir dos dados gerados pelos 35 locos de microssatélites. Esse resultado

foi encontrado provavelmente devido à proximidade geográfica existente entre essas duas procedências. O valor de distância genética entre Sheas Nob e Wild Creek foi um dos menores (0,208), porém o menor valor encontrado foi 0,174 entre as procedências Moleton e 612, da espécie *E. dunnii*. Conforme esperado, nota-se que os menores valores de distância genética correspondem a procedências pertencentes à mesma espécie, assim como os maiores valores são entre procedências de espécies diferentes. Da mesma forma, observa-se uma relação diretamente proporcional entre distância geográfica e distância genética. Quanto menor a distância geográfica entre as procedências em análise, menor é a distância genética entre as mesmas. Esse resultado é esperado, uma vez que procedências mais próximas geograficamente tendem a fazer trocas e fluxo gênico com mais facilidade do que procedências distantes geograficamente. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Figura 1) demonstra que a variação entre espécies é maior (12%) que a variação entre as procedências dentro de cada espécie (4%). Ou seja, quando cada conjunto de procedências é agrupado dentro das respectivas espécies encontramos o menor valor de variação. A porcentagem de variação entre espécies foi menor que a porcentagem de variação entre indivíduos dentro das procedências (84%), mostrando que a variação genética é sempre maior entre indivíduos do que entre todos os níveis populacionais possíveis considerados. O resultado finalmente evidencia a grande

variabilidade genética dos indivíduos do gênero *Eucalyptus*.

Além dos dados de F_{ST} e distância genética, foram desenhados dendogramas, mostrando a relação de proximidade filogenética entre as procedências e as espécies (Figura 2 e 3). No primeiro, observa-se um maior agrupamento entre procedências da mesma espécie. Wild Creek e Sheas Nob ficaram agrupadas em um mesmo ramo, corroborando os resultados de F_{ST} . Já no dendograma formado pelas espécies, *E. saligna* e *E. camaldulensis* ficaram agrupadas entre si e mais próximas de *E. dunnii* do que de *E. urophylla*. Apesar de *E. camaldulensis* e *E. urophylla* pertencerem à mesma seção taxonômica (Exertaria), elas não ficaram agrupadas no dendograma. Isso ocorreu provavelmente devido à distância geográfica existente entre essas espécies.

O conjunto de microssatélites utilizado foi capaz de detectar estruturação nas populações das diferentes espécies puras estudadas. Além disso, as procedências apresentaram, em geral, valores significativos de F_{ST} quando comparadas par a par, indicando que a sub-estruturação não está apenas no nível de espécies, mas também de procedências. Esse resultado é de grande importância uma vez que a utilização eficaz de testes de associação em populações naturais de *Eucalyptus* depende do nível de sub-estruturação das populações. Se em uma população existirem subgrupos com distribuição desigual de alelos, é possível que uma falsa associação, sem função causal, seja detectada. A presença de locos com maior poder de discriminação nos permite ainda a

montagem de um painel composto por uma bateria reduzida de microssatélites, porém com alta capacidade de detectar estruturação. Locos com baixo número de alelos e com presença de alelos privativos são os mais indicados para tal, uma vez que estes possuem um menor grau de polimorfismo, facilitando a distinção entre espécies/procedências. Kirst *et al.* (2005) utilizou apenas três marcadores microssatélites para discriminação de 192 indivíduos de uma população de *E. grandis*.

CONCLUSÕES

Os dados revelam que um painel de microssatélites pode ser utilizado com eficiência para discriminar espécies e procedências de *Eucalyptus* em programa de conservação de recursos genéticos e montagem de populações de melhoramento. Existe ampla diferenciação entre espécies e procedências em termos da distribuição de frequências alélicas e alelos privativos são encontrados sugerindo que baterias reduzidas de microssatélites com maior capacidade de discriminação entre populações podem ser selecionadas. Microssatélites derivados de EST tendem, em geral, a apresentar um número de alelos mais reduzido em comparação com microssatélites derivados de sequências genômicas. O menor número de alelos e alelos fixados, facilitam a distinção de espécies/procedências. De acordo com os resultados, um pequeno conjunto de locos microssatélite com alto valor de F_{ST} e alto poder discriminativo (Embra1829, Embra1810, Embra1139, Embra2014) podem vir a compor um painel útil para a

análise de estrutura em populações de associação. Os resultados demonstram a existência de níveis de sub-estruturação

dentro de espécies e que este fato deve ser considerado com cautela na montagem de experimentos de associação.

Tabela 1 – Espécie, procedência, número de indivíduos e latitude aproximada para as amostras puras provenientes de populações naturais da Austrália utilizadas para genotipagem.

Espécie	Procedência	Nº de indivíduos	Latitude
<i>E. camaldulensis</i>	Irvinebank	16	17°25'
	Walsh River	16	16°38'
	Kennedy River	13	18°11'
<i>E. urophylla</i>	Flores	24	8°40'
	Timor	24	9°20'
<i>E. dunnii</i>	Moleton	14	30°10'
	612*	16	*
	613*	10	*
	614*	16	*
<i>E. saligna</i>	Clouds Creek	16	30°3'
	Chaelundi	15	30°4'
	Sheas Nob	16	30°2'
	Wild Creek	16	30°6'

* Não possui informação disponível sobre a localização exata da procedência.

Tabela 2– Nome dos locos, fluorescência, tamanho esperado em pb e cromossomo para cada loco utilizado nas análises.

Loco	Fluorescência	Tamanho em pb	Cromossomo
Embra 11	FAM	89 – 169	1
Embra 12	NED	115 – 169	1
Embra 219	HEX	224 – 286	1
Embra 63	HEX	163 – 223	2
Embra 333	NED	210 – 254	2
Embra 1810 ¹	HEX	82 – 121	2
Embra 115	FAM	81 – 135	3
Embra 286	FAM	127 – 185	3
Embra 1139 ¹	FAM	191 – 211	3
Embra 186	HEX	133 – 209	4
Embra 04	NED	63 – 121	4
Embra 1944 ¹	NED	205 – 262	4
Embra 213	HEX	201 – 307	4
Embra 120	FAM	119 – 167	5
Embra 41	HEX	160 – 218	5
Embra 1990 ¹	NED	77 – 119	5
Embra 1770 ¹	HEX	102 – 130	5
Embra 28	FAM	175 – 247	6
Embra 08	NED	123 – 215	6
Embra 345	NED	214 – 270	6
Embra 128	FAM	62 – 154	7
Embra 1761 ¹	NED	169 – 203	7
Embra 157	FAM	124 – 170	8
Embra 03	NED	91 – 175	8
Embra 668	FAM	146 – 258	8
Embra 2014 ¹	NED	111 – 135	9
Embra 18	FAM	95 – 161	9
Embra 204	HEX	119 – 181	9
Embra 210	HEX	188 – 248	9
Embra 10	HEX	111 – 157	10
Embra 38	HEX	85 – 153	10
Embra 1829 ¹	HEX	165 – 189	10
Embra 21	NED	115 – 169	11
Embra 39	NED	109 – 151	11
Embra 681	NED	175 – 279	11

¹Marcadores derivados de seqüências de ESTs

Tabela 3 – Multiplexes formados com os 35 locos utilizados para análise

Número do Multiplex	Locos Utilizados
M1	Embra1829/Embra157/Embra333
M2	Embra219/Embra21/Embra11
M3	Embra03/Embra204/Embra286
M4	Embra1810/Embra04/Embra128
M5	Embra120/Embra186/Embra1944
M6	Embra12/Embra210/Embra115
M7	Embra18/Embra39/Embra63
M8	Embra1990/Embra668/Embra213
M9	Embra1770/Embra681
M10	Embra1761/Embra41/Embra28
M11	Embra08/Embra10
M12	Embra1139/Embra345
M13	Embra38
M14	Embra2014

Tabela 4 – Parâmetros genéticos populacionais nas procedências avaliadas baseado em 35 locos de microssatélites. N – número de indivíduos; Nm – número efetivo médio de alelos; Amplitude alélica – diferença em pares de base entre o menor e o maior alelo encontrado; He – heterozigiosidade esperada; Ho – heterozigiosidade observada; EHW – número de locos que apresentaram desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg; Fis – Coeficiente de endocruzamento; p value: P valor do teste da hipótese de EHW na população.

Procedência	Espécie	N	Nm	Amplitude Alélica	He	Ho	EHW ¹	Fis	p-value
Irvinebank	<i>Camaldulensis</i>	16	10,171	33,697	0,76	0,845	2	0,104	0,0000*
Walsh River	<i>Camaldulensis</i>	16	9,429	31,5	0,642	0,813	6	0,218	0,0000*
Kennedy	<i>Camaldulensis</i>	13	9,229	33,235	0,711	0,837	2	0,159	0,0000*
Flores	<i>Urophylla</i>	24	9,086	29,4	0,672	0,738	2	0,092	0,0000*
Timor	<i>Urophylla</i>	56	13,086	35,314	0,677	0,765	8	0,116	0,0000*
Moleton	<i>Dunnii</i>	14	5,886	22,455	0,7	0,723	2	0,033	0,0973
612	<i>Dunnii</i>	16	6,4	24,156	0,698	0,719	3	0,031	0,0904
613	<i>Dunnii</i>	10	6,429	25,212	0,711	0,752	4	0,058	0,0166*
614	<i>Dunnii</i>	16	6,886	24,606	0,694	0,721	2	0,045	0,0624
Clouds Creek	<i>Saligna</i>	16	7,943	28	0,734	0,776	3	0,057	0,0030*
Chaelundi	<i>Saligna</i>	15	7,886	27,882	0,676	0,766	4	0,122	0,0000*
Sheas Nob	<i>Saligna</i>	16	8,971	29,441	0,694	0,808	3	0,146	0,0000*
Wild Creek	<i>Saligna</i>	16	8,543	28,5	0,717	0,802	3	0,107	0,0000*

*Valores significativos ($p \leq 0,05$).

Tabela 5 – Estimativas par a par de diferenciação genética (valores de F_{ST} – diagonal superior) e distância genética (distância de Nei – diagonal inferior) entre as procedências estudadas.

	Irvinebank	Walsh River	Kennedy	Flores	Timor	Moleton	612	613	614	Clouds Creek	Chaelundi	Sheas Nob	Wild Creek
Irvinebank		0.027	0.019	0.135	0.134	0.140	0.156	0.120	0.116	0.108	0.092	0.084	0.088
Walsh River	0,263		0.027	0.134	0.144	0.155	0.161	0.122	0.141	0.116	0.116	0.092	0.095
Kennedy	0,285	0,273		0.125	0.134	0.151	0.169	0.126	0.125	0.096	0.099	0.071	0.080
Flores	0,899	0,847	0,864		0.040	0.176	0.197	0.161	0.165	0.175	0.167	0.160	0.156
Timor	0,929	1,006	0,972	0,187		0.188	0.207	0.177	0.170	0.171	0.157	0.152	0.144
Moleton	0,768	0,835	0,852	0,831	0,951		0.046	0.075	0.069	0.162	0.167	0.145	0.150
612	0,821	0,831	0,926	0,927	1,038	0,174		0.069	0.064	0.198	0.203	0.175	0.175
613	0,724	0,689	0,766	0,822	0,976	0,31	0,267		0.037	0.167	0.162	0.138	0.149
614	0,761	0,805	0,76	0,895	0,953	0,298	0,272	0,23		0.171	0.172	0.125	0.147
Clouds Creek	0,675	0,685	0,619	1,062	1,05	0,786	0,988	0,895	0,915		0.047	0.023	0.023
Chaelundi	0,643	0,739	0,661	0,99	0,904	0,824	1,036	0,841	0,827	0,295		0.027	0.038
Sheas Nob	0,589	0,63	0,556	1,061	1,002	0,729	0,888	0,78	0,74	0,202	0,263		0.009 *
Wild Creek	0,652	0,665	0,621	1,063	0,95	0,804	0,965	0,855	0,883	0,248	0,316	0,208	

* Valores de F_{ST} não significativos

AMOVA

- Entre espécies
- Entre procedências dentro de espécies
- Entre indivíduos dentro de procedências

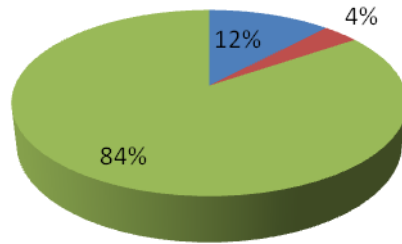


Figura 1 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) em diferentes níveis de estruturação entre e dentro de procedências e espécies de *Eucalyptus* estudadas.

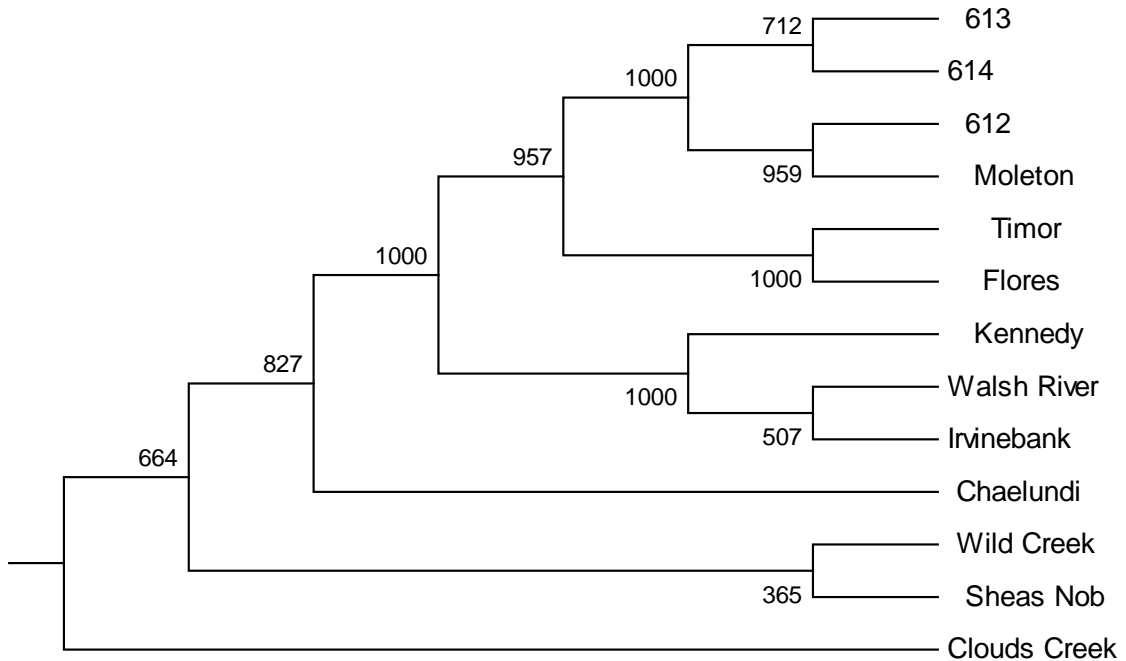


Figura 2 – Dendrograma da relação genética entre as procedências, obtido pela metodologia de agrupamento UPGMA a partir da matriz de distância genética de Nei (NEI, 1978).

Valores apresentados entre os nós representam os valores de bootstrap com 1000 replicações.

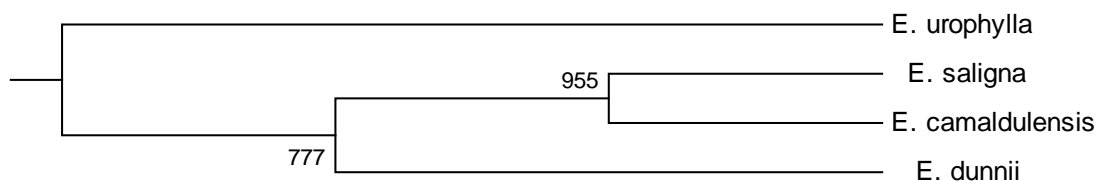


Figura 3 – Dendrograma da relação genética entre as espécies, obtido pela metodologia de agrupamento UPGMA a partir da matriz de distância genética de Nei (NEI, 1978). Valores apresentados entre os nós representam os valores de bootstrap com 1000 replicações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRONDANI, R. P. V.; WILLIAMS, E. R.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. A microsatellite-based consensus linkage map for species of Eucalyptus and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. **BMC Plant Biology**, v. 6, n. 20, 2006.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: a Tris-free cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **Biotechniques**, Natick, Mass., v. 36, n. 2, p. 214-216, 2004.

BROOKER, M. I. H. A new classification of genus Eucalyptus L´Her. (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, Melbourne, Australia, v. 13, n. 79, p. 79-148, 2001.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N. J. The rise, fall and renaissance of micro satellites in

eukaryotic genomes. **BioEssays**, Cambridge, Inglaterra, v. 28, p.1040–1050, 2006.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP**: phylogeny Inference Package. Seattle, WA: University of Washington. Disponível em: < <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html> > .

Grattapaglia, D. Aplicações operacionais de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.

(Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa, MG: UFG, 2007. p.174 – 200.

GOMIDE, J. L.; COLODETTE, J. L.

Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. (Ed).

Biotecnologia Florestal. Viçosa, MG: UFG, 2007. p. 27-54.

INDURY, R. M.; CARDON, L. R. A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, NY, v. 7, p. 1104-1109, 1997.

KIRST, M.; CORDEIRO, C. M.; REZENDE, G. D.; GRATTAPAGLIA, D. Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. **Journal of Heredity**, Washington, US, v. 96, p. 161–166, 2005.

MAMMANI, E. C. M.; GRATTAPAGLIA, D. Integração de locos ESTs-SSR e localização de QTLs para qualidade da madeira em um mapa genético de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 52.; CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE GENÉTICA, 12., 2006, Foz do Iguaçu. Resumos... Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2006.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, **Genetics**, v.89, p.583-590, 1978.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, Inglaterra, v. 6, p. 288-295, 2006.

SANTOS, S. N. Genes de lignificação em *Eucalyptus*: estrutura e diversidade genética dos genes *4cl* e *ccoamt*. 2005. 208 p. (Tese de mestrado) – Universidade Católica de Brasília.

SCHLOTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromossoma**, v. 109, p. 365-371, 2000.

SILVA, W. A., BORTOLINI, M. C., MEYER, D., SALZANO, F. M., LION, J., KRISHNAMOORTHY, R., SCHNEIDER, M. P. C., GUERRA, D. C., LAYRISSE, Z., CASTELLANO, H. M., WEIMER, T. A., ZAGO, M. A. Genetic diversity of two African and sixteen South American populations determine don the basis of six hypervariable loci. **American Journal of Physical Anthropology**, Washington, US, v. 109, p. 425-437, 1999.

**Comunicado
Técnico, 175**

**Ministério da
Agricultura,
Pecuária
e
Abastecimento**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Serviço de Atendimento ao Cidadão Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3448-4673 Fax: (61) 3340-3624 <http://www.cenargen.embrapa.br> e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2008):

**Comitê de
Publicações**

Presidente: Sergio Mauro Folle
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: Arthur da Silva Mariante
Maria da Graça S. P. Negrão
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi
Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos
Carneiro

Expediente

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Lígia Sardinha Fortes*
Editoração eletrônica: *Daniele Alves de Loiola*