

Comunicado 180

Técnico

ISSN 9192-0099
Outubro, 2008
Brasília, DF

Diversidade nucleotídica e utilização de SNPs para o mapeamento de genes candidatos em *Eucalyptus* spp.

Leandro Gomide Neves¹

Danielle Assis de Faria²

Georgios Joannis Pappas Júnior³

Giancarlo Pasquali⁴

Dario Grattapaglia³

Resumo

Tendo em vista o declínio rápido do desequilíbrio de ligação no genoma de *Eucalyptus*, a abordagem de mapeamento de associação dependerá da análise direta de polimorfismos em genes candidatos.

O enriquecimento dos atuais mapas genéticos com genes que de alguma forma foram identificados como candidatos e a sua co-localização com QTLs é uma estratégia potencialmente interessante para a definição de candidatos posicionais a serem testados em experimentos de genética de associação. Neste contexto, um entendimento da diversidade nucleotídica nestes genes candidatos gera informações sobre polimorfismos de base única (SNPs), permitindo avaliar a possibilidade de

¹ Mestrando em Genética e Melhoramento – Universidade Federal de Viçosa e bolsista da CAPES.

² Doutoranda em Ciências Genômicas e Biotecnologia - Universidade Católica de Brasília e bolsista do CNPq.

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

mapeá-los bem como utilizá-los em estudos de associação. Buscando candidatos para este estudo, dois transcritos, identificados pelos números 5971 e 15398, foram selecionados em um grupo de genes diferencialmente expressos entre o xilema de *E. grandis* e *E. globulus* a partir de um experimento em microarranjo de oligonucleotídeos; além do gene que codifica para a enzima Ferulato-5-hidroxilase (F5H), candidato por participar diretamente da via de lignificação. Os transcritos 5971 e 15398 até o momento não possuem homólogo no Genbank. Foram desenhados *primers* para estes genes a partir de consensos de *ESTs* do projeto Genolytplus; resequenciados amplicons de oito indivíduos para cada uma das espécies *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla*; detectados SNPs intra e interespecíficos e estimada a diversidade nucleotídica. Numa segunda parte do estudo, uma população segregante derivada de um cruzamento entre *E. urophylla* e *E. grandis* foi utilizada para o mapeamento dos três genes alvo mais o gene Cinamoil-CoA-redutase (CCR). A análise da segregação de haplótipos de SNPs detectados nos amplicons gerados nos dois parentais permitiu posicionar os genes no mapa genético. No amplicon de 279 pb do transcrito 5971, foram encontrados 9, 3 e 5 SNPs em *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla*, respectivamente, com

estimativas de diversidade nucleotídica (π) de 0,01604, 0,00391 e 0,00305, respectivamente. No transcrito 15398, em um amplicon de 268 pb, foram identificados 3 SNPs para cada espécie e estimados valores de π de 0,00478; 0,00351 e 0,00411, respectivamente. Em 155 pb do gene F5H, foram observados 1, 2 e 3 SNPs nas três espécies respectivamente, e valores de π estimados em 0,00360; 0,00425 e 0,00809. A maior diversidade nucleotídica observada no transcrito 5971 ocorreu, provavelmente, devido à presença de um íntron que foi seqüenciado no amplicon deste gene, sendo essa região, geralmente, mais rica em SNPs. A análise de variância molecular revelou que 66% da variação está contida entre espécies e 34% dentro de espécies para o transcrito 5971; 46% e 54% para o 15398, e 34% e 66% para o gene F5H. A matriz de F_{ST} indica maior diferenciação nucleotídica entre *E. grandis* e *E. urophylla* no transcrito 5971, entre *E. grandis* e *E. globulus* no transcrito 15398 e maior entre *E. globulus* e *E. urophylla* no gene F5H. O transcrito 15398 foi mapeado no grupo de ligação seis e não foi co-localizado com QTLs previamente mapeados. Já os genes CCR e F5H foram mapeados na extremidade do mesmo grupo de ligação (10), co-localizando com QTLs mapeados por outros autores para rendimento depurado em celulose. O gene

5971 ancorado no grupo de ligação cinco co-localizou com um QTL para densidade também mapeado por outros autores. Tais resultados sugerem que estes genes podem ser alvos interessantes de testes de associação direta entre variabilidade de seqüência e variabilidade fenotípica para características de qualidade da madeira.

Introdução

A cultura do eucalipto encontra-se em franca ascensão no Brasil. Atualmente o país apresenta as maiores produtividades florestais do mundo e a segunda maior área plantada (ABRAF, 2008), sendo parte desta competitividade consequência do melhoramento genético que é desenvolvido desde 1960. Dentre as diversas utilizações possíveis da madeira do eucalipto, a produção de celulose e de carvão representam a maior demanda, influenciando as características de interesse nos programas de melhoramento. No processo de produção de celulose, por exemplo, muito é gasto para separar a lignina da celulose, fazendo com que programas para melhoria da qualidade da madeira sejam de extrema importância. Estudos têm revelado que existe grande variação intra e interespecífica nestas características e que elas são controladas geneticamente, embora, em geral, sejam de controle genético quantitativo e

apresentem baixa herdabilidade (POT et al., 2002).

Usando-se de marcadores moleculares para acessar esta variabilidade natural, é possível chegar a regiões do genoma que são associadas ao controle genético de características quantitativas, definindo assim locos controladores de características quantitativas (QTLs).

Quando os marcadores que definem estes QTLs estão fortemente ligados com esta região, é teoricamente possível praticar a seleção assistida por marcadores (COLLARD et al., 2006).

Embora a seleção assistida por marcadores seja extremamente promissora para o setor florestal, o desconhecimento dos genes efetivamente responsáveis pelos QTLs e a magnitude do seu efeito na expressão fenotípica são ainda dificuldades a serem superadas.

Neste contexto, uma estratégia interessante é identificar e mapear genes que de alguma forma tenham sido identificados como candidatos ao controle desta característica quantitativa.

A co-localização de genes candidatos com QTLs previamente mapeados e validados, torna estes genes alvos para estudos de genética de associação, na tentativa de correlacionar o polimorfismo em nível de seqüência com a variação fenotípica observada.

Material e métodos

Material genético

Para as análises de diversidade nucleotídica foram utilizados oito indivíduos de populações naturais originadas da Austrália e ilhas adjacentes, das espécies: *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. globulus*. As procedências das três espécies foram respectivamente Pine Creek, Timor e Flinder Islands. Para o mapeamento dos genes candidatos foi utilizada uma família de irmãos completos derivada do cruzamento de *E. urophylla* x *E. grandis* e a progênie composta por 200 indivíduos. Esta família apresenta um mapa genético saturado com marcadores microssatélites (MAMANI e GRATTAPAGLIA, 2006; SENA et al., 2007), permitindo que dentro das 200 progênies disponíveis, 50 indivíduos ao acaso fossem utilizados. Este cruzamento foi realizado pela International Paper do Brasil Ltda. no âmbito do projeto Genolyptus. Na extração do DNA total foram utilizados tecidos foliares. A extração foi feita pelo método CTAB 2% (DOYLE e DOYLE, 1987).

Escolha dos genes candidatos

Quatro genes foram escolhidos para a realização deste trabalho, sendo dois diretamente envolvidos nas rotas de lignificação (Cinamoil-CoA-redutase - CCR e Ferulato-5-hidroxilase - F5H)

(ANTEROLA e LEWIS, 2002). Os outros genes selecionados tiveram origem entre um grupo de genes diferencialmente expressos para características de qualidade da madeira (5971 e 15398). Os genes foram identificados em um experimento utilizando microarranjo do projeto Genolyptus, onde foi utilizado o RNA total de xilema de plantas puras, com características contrastantes para qualidade da madeira, *E. grandis* e *E. globulus*.

Desenho de primers e seqüenciamento

Os primers utilizados para os genes CCR e F5H foram obtidos a partir de estudos anteriores (MISSIAGGIA, 2005). Os primers para amplificação dos segmentos dos genes candidatos foram desenhados a partir das seqüências consenso de EST do projeto Genolyptus, que foram também utilizadas para montagem das sondas do microarranjo. O programa Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000) foi utilizado para o desenho dos primers, otimizando cada conjunto de acordo com parâmetros pré-selecionados pelo próprio programa. O seqüenciamento das amostras foi realizado por eletroforese capilar em seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

Descoberta de SNPs e análises estatísticas

Os eletroferogramas do re-sequenciamento dos fragmentos gênicos amplificados foram alinhados no programa SeqScape (Applied Biosystems) para descoberta e observação da segregação dos SNPs. Para as estimativas de diversidade todos os SNPs presentes na seqüência foram considerados, enquanto para o mapeamento, o haplótipo de cada indivíduo foi obtido pela análise de dois a três SNPs.

Os SNPs presentes nos oito indivíduos das populações naturais de *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. globulus* foram utilizados nas análises de diversidade genética, com os seguintes parâmetros populacionais das seqüências estimados: número total de SNPs por fragmento gênico seqüenciado; diversidade nucleotídica (π); análise de variância molecular (AMOVA); e, por fim, uma matriz par a par de estimativas de F_{ST} .

Mapas de ligação individuais para cada parental foram gerados a partir da segregação na progênie dados haplótipos gerados pela genotipagem de SNPs e foram ancorados aos marcadores microssatélites previamente mapeados para o cruzamento avaliado. O programa computacional Arlequin v3.1 (EXCOFFIER et al., 2005) foi utilizado para as análises de diversidade genética, e o MapMaker 2.0 para Macintosh (LANDERS et al., 1987) para o mapeamento dos genes candidatos.

Resultados e Discussão

Amplificação e seqüenciamento dos fragmentos gênicos

Após ajustes nas condições de PCR foi possível gerar amplicons dos genes candidatos com qualidade para o seqüenciamento. A estratégia de seqüenciamento direto a partir do fragmento amplificado pela PCR foi eficiente e permitiu identificar SNPs sem necessidade de clonagem.

Alinhando os fragmentos amplificados com as seqüências EST (caso dos transcritos 15398 e 5971) ou comparando com seqüências depositadas em bancos genéticos (para o CCR e F5H), foi possível verificar que para a EST 5971 e o gene CCR regiões intrônicas foram amplificadas. Nestes, 85 e 167 pb da seqüência total de 260 e 550 pb amplificados foram relativos a um íntron, respectivamente. Nos outros dois casos, 15398 e F5H, apenas um dos éxons que compõe o gene foram amplificados. Estas inferências são relevantes uma vez que diversos autores apontam para níveis superiores de SNPs em regiões intrônicas (BROOKES, 1999; RAFALSKI, 2002; GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2006). No caso específico do gene CCR, não foi possível a obtenção de amplicons satisfatórios via PCR nas três espécies estudadas, devido, provavelmente, à

presença de SNPs nos sítios de anelamento dos *primers*.

Diversidade nucleotídica

As análises de diversidade nucleotídica foram realizadas nos amplicons do gene F5H e ESTs 15398 e 5971. Os resultados do número total de SNPs, diversidade nucleotídica e tamanho do fragmento gênico amplificado para cada gene e espécie encontram-se na Tabela 1.

Pelos resultados demonstrados, para o gene F5H, como esperado, observa-se que o aumento no número de SNPs gerou, apesar de ténue, valores crescentes de π ao se considerar as três espécies *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla*, respectivamente. O transcrito 15398 apresenta o mesmo número de SNPs (3) para as três espécies o que, portanto, reflete em valores de diversidade nucleotídica similares. No gene 5971 foram observados 9, 3 e 5 SNPs para as espécies *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla*, respectivamente, conduzindo a valores de π iguais a 0,01604; 0,00391 e 0,00305, respectivamente. A maior diversidade nucleotídica observada no transcrito 5971 é provavelmente devido a amplificação de um íntron. Por exemplo, para *E. globulus*, dos nove SNPs presentes no fragmento amplificado para este transcrito, seis encontram-se

presentes nos 85 pb correspondentes ao íntron.

O valor médio de π obtido considerando os dados dos três genes foi de 0,00814 para *E. globulus*; 0,00389 para *E. grandis* e 0,00508 para *E. urophylla* (Tabela 1).

Avaliando a diversidade nucleotídica em oito genes candidatos envolvidos na formação da madeira, Pot et al. (2006) encontraram valores médios de 0,00241 para *Pinus pinaster* e 0,00186 para *P. radiata*, sugerindo que os valores encontrados em nosso grupo para *Eucalyptus* spp possam ser superiores aos de outras espécies florestais.

Em linhas gerais, devido à polinização cruzada, elevada heterozigosidade, baixo nível de domesticação e incipiente seleção artificial, espécies florestais tendem a apresentar elevada diversidade nucleotídica e baixo desequilíbrio de ligação quando comparadas com outras espécies (SAVOLAINEN e PYHAJARVI, 2007). Poucos trabalhos, entretanto, estimaram diversidade nucleotídica em genes de *Eucalyptus*. Estudos preliminares com os genes CAD e SAMS em *E. globulus* realizados por Kirst et al. (2004), indicam que os valores seriam comparáveis aos de coníferas, mas inferiores aos de culturas agrícolas como o milho. Por serem ainda iniciais e apresentados de forma resumida, os resultados propostos por esses autores (KIRST et al., 2004) devem ser analisados

com cautela, principalmente por serem realizados em uma espécie não muito representativa do gênero e ter sido amostrado um número reduzido de genes. Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para os genes F5H, 15398 e 5971 encontram-se na Figura 1. Para o gene F5H, 66% da variação é encontrada entre e 34% dentro de espécies. Uma maior variação entre espécies (54%) do que dentro de espécies (46%) também foi obtida para o gene 15398, mas o oposto ocorre com o gene 5971, que apresenta maior variação dentro de espécies (66%) do que entre espécies (34%).

A diferença do padrão observado no transcrito 5971 para os genes F5H e 15398 é possivelmente atribuída ao fato de *E. globulus* ter apresentado um número de SNPs (9) proporcionalmente maior que o observado para as outras duas espécies (3 e 5, respectivamente) no transcrito 5971, aumentando a variação molecular dentro de espécies.

A porcentagem de variação entre espécies nos indica que SNPs em genes específicos ou regiões transcritas podem ser utilizados para diferenciá-las duas a duas. As estimativas do nível de diferenciação (F_{ST}) para cada gene entre as espécies estudadas (Tabela 2), demonstra que determinados SNPs em genes ou transcritos específicos elevam os índices de F_{ST} . Baseando-se em uma análise

descritiva, os SNPs encontrados no gene F5H melhor diferenciam *E. globulus* de *E. urophylla* (0,42121), enquanto para o transcrito 15398 a diferenciação é maior entre as espécies *E. globulus* e *E. grandis* (0,5833) e, por último, há maior diferenciação entre as espécies *E. grandis* e *E. urophylla* (0,76190) no transcrito 5971. Entretanto, é importante ressaltar que na verdade todos os valores estimados de F_{ST} são suficientemente altos para separar as espécies uma das outras.

Mapeamento de genes candidatos

Os genes CCR, F5H, e as ESTs 5971 e 15398 foram posicionados no mapa genético derivado do cruzamento de dois indivíduos das espécies *E. urophylla* e *E. grandis*. O mapeamento dos genes foi realizado através do seqüenciamento de fragmentos gênicos e identificação de SNPs que, por apresentarem alelos diferentes entre os genitores U15 (*E. urophylla*) e G38 (*E. grandis*), segregavam na progênie. A obtenção de haplótipos para cada indivíduo, ao invés da adoção de um único SNP, mostrou-se eficaz para o mapeamento de genes candidatos, sendo que desta forma é analisado a segregação dos gametas recebidos por cada indivíduo de seus genitores.

Os genes CCR e F5H foram ancorados na extremidade do grupo de ligação 10 em ambos os mapas do genitor feminino e

masculino (Figura 2). Em estudo correlato, Thamarus et al. (2002) posicionaram o gene CCR na extremidade do grupo de ligação 10 do mapa genético desenvolvido por estes autores para *E. globulus*. Posteriormente, Brondani et al. (2006) constataram que seu grupo de ligação 10 era o mesmo gerado por Thamarus et al. (2002) e, por conseqüência, o mesmo utilizado em nosso estudo. A localização do CCR no mesmo grupo de ligação em estudos distintos, em espécies distintas, aliado à também posição extrema deste gene dentro do grupo de ligação, valida os resultados encontrados no presente trabalho.

Nenhum QTL mapeado para o cruzamento U15 x G38 co-localizou com os genes CCR e F5H (dados não mostrados), até porque ainda são poucos os levantamentos fenotípicos realizados nesta família. No entanto, comparando com outros trabalhos da literatura, dois QTLs foram mapeados em *E. globulus* por Thamarus et al. (2004) no grupo de ligação 10, sendo um para rendimento depurado (*pulp yield*) e outro para teor de celulose. Estes QTLs se sobrepõem e co-localizam com o gene candidato CCR. Apesar destes autores não terem mapeado o gene F5H, é também possível que ele co-localize com tal QTL, tendo em vista sua função e proximidade física com o CCR.

A ancoragem do transcrito 5971 ocorreu na extremidade superior do grupo de ligação 5 (Figura 2). Apesar do transcrito 5971 não co-localizar com nenhum QTL mapeado para este cruzamento, na literatura há uma possível co-localização com QTL para densidade da madeira em Thamarus et al. (2004).

O transcrito 15398 foi mapeado na porção mediana inferior do grupo de ligação 6, um dos mais densos em marcadores microssatélites deste mapa genético (Figura 2). Não houve co-localização deste gene com nenhum QTL publicado até o momento para o gênero *Eucalyptus*.

Finalmente, cabe mencionar que as co-localizações entre os genes mapeados e QTLs conhecidos propostas neste estudo são hipóteses a serem testadas em outros cruzamentos e mapas genéticos de maior resolução. A resolução do mapa genético sobre o qual foram posicionados os QTLs é da ordem de 20 cM o que corresponde a 8 Mpb em média, podendo conter dezenas ou mesmo centenas de genes. O posicionamento dos genes candidatos foi realizado com resolução menor ainda, pois apenas 50 indivíduos foram analisados. Os resultados descritos são relevantes na medida em que demonstram a possibilidade técnica de se mapear genes via desenho de iniciadores a partir de consensos de ESTs, geração de amplicons, seqüenciamento e detecção de

haplótipos de SNPs segregantes diretamente da PCR. Entretanto, para se formular hipóteses testáveis do papel de genes específicos no controle de características quantitativas, uma resolução significativamente maior será necessária, o que poderá ser alcançado em breve com o desenvolvimento de um mapa físico de alta cobertura, geração e incorporação de novos marcadores no mapa e um rascunho da seqüência completa do genoma de *E. grandis*. Esse processo de obtenção do rascunho do genoma no momento da sua montagem é favorecido com um maior número de “marcas” adicionadas ao mapa genético, sendo que os genes e ESTs posicionados via SNPs são marcas robustas que podem ser utilizadas.

Conclusão

O gene CCR e o transcrito 5971 apresentaram seqüência intrônica em seus fragmentos amplificados.

Nos fragmentos gênicos avaliados observou-se que a diversidade nucleotídica é elevada e compatível com outras espécies florestais, sendo em média maior para a espécie *E. globulus*.

Os genes CCR, F5H, 15398 e 5971 foram ancorados no mapa genético de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* pela análise da segregação de haplótipos obtidos com a utilização de SNPs nos

grupos de ligação 10, 10, 6 e 5, respectivamente.

A proximidade entre os genes CCR e F5H no mesmo grupo de ligação, somado ao papel bioquímico desempenhado por estes, sugerem que eles possam apresentar uma contribuição relativa importante no controle de características de qualidade da madeira.

Os genes ancorados não co-localizaram com nenhum QTL mapeado para este cruzamento, talvez por ainda serem poucos os estudos fenotípicos realizados. Entretanto, avaliando QTLs publicados para *E. globulus* por Thamarus *et al.* (2004), os genes CCR, F5H e 5971 possivelmente se co-localizam com QTLs para rendimento depurado (CCR e F5H), teor de celulose (CCR e F5H) e densidade básica (5971).

Os resultados corroboram a hipótese de uma contribuição maior destes genes no controle de características relativas à qualidade da madeira, fazendo deles candidatos a futuros estudos de genética de associação em *Eucalyptus* spp.

Referências Bibliográficas

ANTEROLA, A. M.; LEWIS, N. G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, New York, US, v. 61, p. 221-294, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE
PRODUTORES DE FLORESTA PLANTADA

- (ABRAF). **ABRAF statistical yearbook 2008**: base year 2007. Disponível em <<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF08-EN.pdf>> Acesso em: 03 ago. 2008.
- 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, set. 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/6/20>> Acesso em: 28 jan. 2008.
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, [s. l.], v. 234, p. 177-186, 1999.
- COLLARD, B. C. Y.; JAHUFER, M. Z. Z.; BROUWER, J. B.; PANG, E. C. K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica**, Berlin, v. 142, p. 169-196, 2006.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochem. bull. bot. soc. amer.** [S.l.], v. 19, p. 11-15, 1987.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online** 1, 47-50, 2005.
- GONZALEZ-MARTINEZ, S. C.; ERSOZ, E.; BROWN, G. R.; WHEELER, N. C.; NEALE, D. B. DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphism at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. **Genetics**, Austin, Tex., US, v. 172, p. 1915-1926, 2006.
- KIRST, M.; MARQUES, C. M.; SEDEROFF, R. SNP discovery, diversity and association studies in *Eucalyptus*. In: IUFRO CONFERENCE – EUCALYPTUS IN A CHANGING WORLD, 2004b, Aveiro, Portugal. **Proceedings...** Aveiro, Portugal, 11-15 out. 2004.
- LANDERS, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBURG, L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, Austin, Tex., US, n.1, p. 174- 181, 1987.
- MAMANI, E. 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, 2006, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Foz do Iguaçu: SBG, 2006.
- MISSIAGGIA, A. A. **Mapeamento genético de QTL para qualidade da madeira e florescimento precoce e estudos de expressão gênica alelo específica em *Eucalyptus* spp.** 2005. 249 p. Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- POT, D.; CHANTRE, G.; ROZENBERG, P.; RODRIGUES, J-C.; JONES, G. L.; PEREIRA, H.; HANNRUP, B.; CAHALAN, C.; PLOMION, C. Genetic control of pulp and timber properties in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). **Annual of forest science**, [S.l.], v. 59, p. 563-575, 2002.
- POT, D.; RODRIGUES, J-C.; ROZENBERG, P.; CHANTRE, G.; TIBBITS, J.; CAHALAN, C.; PICHAVANT, F.; PLOMION, C. QTLs and candidate genes for wood properties in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). **Tree genetics and genomes**, Berlin, v. 2, p. 10-24, 2006.
- RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current opinion in plant biology**, [S.l.], v. 5, p. 94-100, 2002.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S. MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa, NJ, EUA: Humana Press, 2000. p. 365-386.

SAVOLAINEN, O.; PYHAJARVI, T. Genomic diversity in forest trees. **Current opinion in plant biology**, [S.l.], v. 10, p. 162-167, 2007.

SENA, J. S.; MAMANI, E. M.; PAPPAS JUNIOR, G. J.; GRATTAPAGLIA, D. **Mapeamento e caracterização genética de novos microssatélites derivados de EST em *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla***. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 53, 2007, Águas de

Lindóia. Resumos... Águas de Lindóia: SBG, 2007. p. 65.

THAMARUS, K. A.; GROOM, K.; MURRELL, J.; BYRNE, M.; MORAN, G. F. A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre, and floral traits. **Theoretical and applied genetics**, Berlin, v. 104, p. 379-387, 2002.

THAMARUS, K.; GROOM, K.; BRADLEY, A.; RAYMOND C. A.; SCHIMLECK, L. R.; WILLIAMS, E. R.; MORAN, G. F. Identification of quantitative trait loci for wood and fibre properties in two full-sib pedigrees of *Eucalyptus globules*. **Theoretical and applied genetics**, Berlin, v. 109, p. 856-864, 2004.

Tabela 1. Tamanho do fragmento, número de SNPs e diversidade nucleotídica (π) obtidos intraespecificamente para o gene F5H, e ESTs 15398 e 5971.

Gene	Fragmento (pb)	Número de SNPs			Diversidade nucleotídica (π)		
		<i>E. globulus</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>E. globulus</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophylla</i>
F5H	155	1	2	3	0,00360	0,00425	0,00809
15398	268	3	3	3	0,00478	0,00351	0,00411
5971	279	9	3	5	0,01604	0,00391	0,00305
Total		13	8	11	0,00814	0,00389	0,00508

Tabela 2. Matrizes das estimativas de F_{ST} entre as espécies par a par nos genes F5H, 15398 e 5971.

Gene		Matriz F_{ST}		
		<i>E. globulus</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophylla</i>
F5H	<i>E. globulus</i>	0	—	—
	<i>E. grandis</i>	0,30769	0	—
	<i>E. urophylla</i>	0,42121	0,27956	0
15398	<i>E. globulus</i>	0	—	—
	<i>E. grandis</i>	0,5833	0	—
	<i>E. urophylla</i>	0,49744	0,06667	0
5971	<i>E. globulus</i>	0	—	—
	<i>E. grandis</i>	0,64038	0	—
	<i>E. urophylla</i>	0,61604	0,76190	0

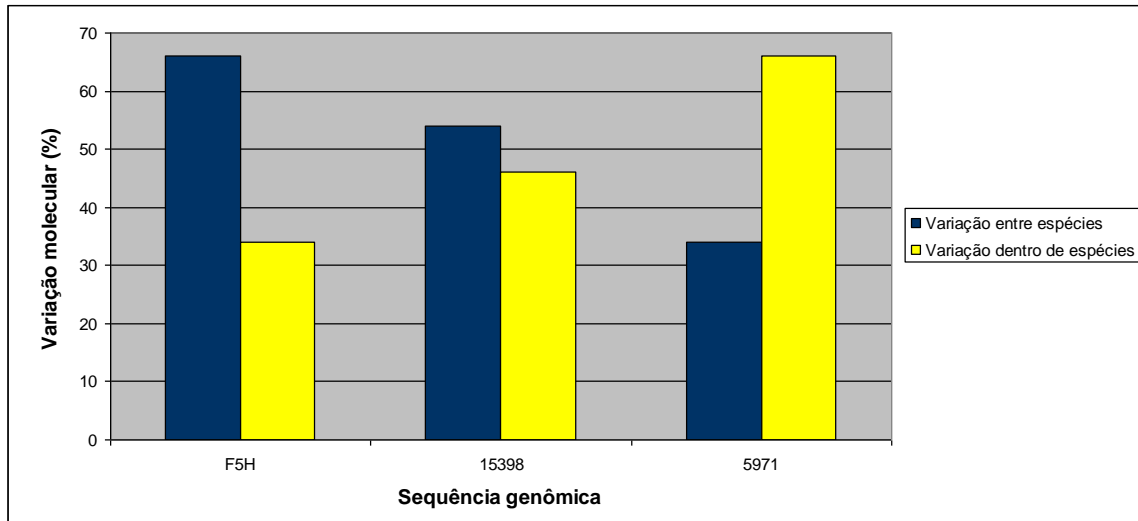


Figura 1. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para o gene F5H e ESTs 15398 e 5971.

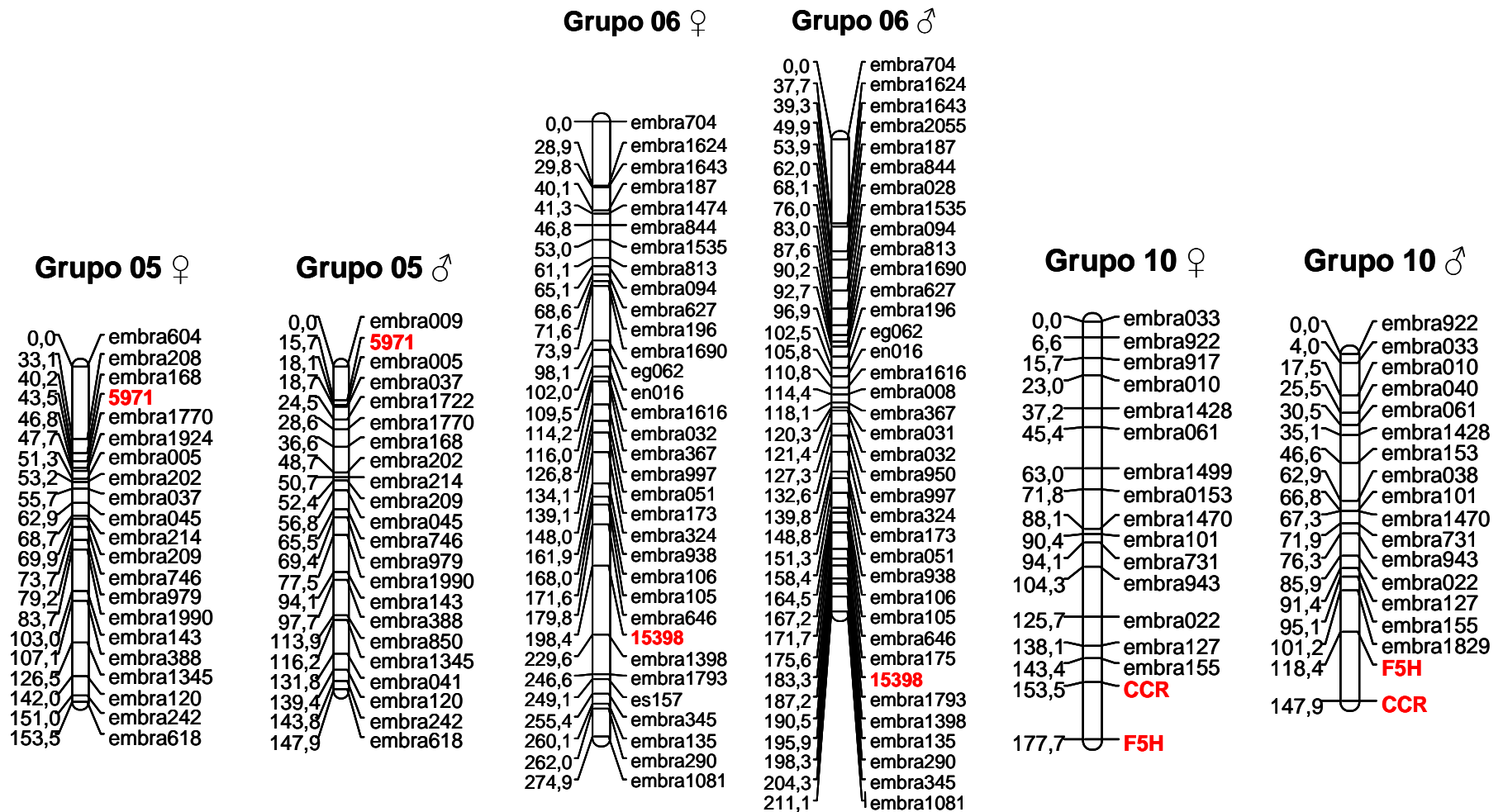


Figura 2. Ancoragem dos genes CCR (grupo 10), F5H (grupo 10), 5971 (grupo 5) e 15398 (grupo 6) no mapa genético de *E. urophylla* x *E. grandis* (MAMANI e GRATTAPAGLIA, 2006). Marcadores microssatélites representados em preto e genes em vermelho.

**Comunicado
Técnico, 180**

**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 (2007):

**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: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica: *Daniele Alves de Loiola*