

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



MARCADORES MICROSSATÉLITES COMO FERRAMENTAS ÚTEIS
PARA ESTIMAÇÃO DE DIVERSIDADE GENÉTICA E CERTIFICAÇÃO
DE PATERNIDADE EM HÍBRIDOS DE *Eucalyptus spp*

FERNANDA BARBOSA CUPERTINO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Abril de 2007

FERNANDA BARBOSA CUPERTINO

**MARCADORES MICROSSATÉLITES COMO FERRAMENTAS ÚTEIS PARA
ESTIMAÇÃO DE DIVERSIDADE GENÉTICA E CERTIFICAÇÃO DE
PATERNIDADE EM HÍBRIDOS DE *Eucalyptus spp***

**Dissertação apresentada à Universidade
Estadual de Santa Cruz, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Genética e Biologia Molecular.**

**Área de Concentração: Genética
Molecular**

**Orientadora: Dra. Fernanda Amato
Gaiotto**

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Abril de 2007

FERNANDA BARBOSA CUPERTINO

MARCADORES MICROSSATÉLITES COMO FERRAMENTAS ÚTEIS PARA
ESTIMAÇÃO DE DIVERSIDADE GENÉTICA E CERTIFICAÇÃO DE PATERNIDADE
EM HÍBRIDOS DE *Eucalyptus spp*

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual de Santa Cruz, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética Molecular

APROVADA: 30 de abril de 2007

Dra. Rosana Pereira Vianello Brondani
EMBRAPA-GO

Dra. Ioná Santos Araújo
UESC-BA

Dr. Leandro Lopes Loguercio
UESC-BA

Dra. Fernanda Amato Gaiotto
UESC-BA (orientadora)

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Daniel, ao meu esposo Anderson e aos meus pais, por todo suporte e apoio, os quais me fizeram ter sempre força de vontade, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, por sempre me agraciar com saúde, paz, fé e determinação.

Ao Departamento de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UESC, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

A Fernanda Amato Gaiotto, por ser mais do que minha orientadora: conselheira, amiga e uma profissional fascinantemente genial.

Aos professores Ronan Xavier Corrêa e Abelmon da Silva Gesteira, hoje, meus amigos, por todo suporte científico e incentivo nesta curta caminhada.

Aos meus colegas de pós-graduação, em especial Ana Cácia, Carlos Eduardo, Cristiano, Claudine, Jeiza, Heliana, Sônia e Stênio, por terem me ajudado tantas vezes na bancada do laboratório.

A todos os colegas dos laboratórios de Genética e Biologia Molecular e de Citogenética e Marcadores Moleculares da UESC, pela prazerosa convivência.

ÍNDICE

EXTRATO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. O gênero <i>Eucalyptus</i> e sua importância econômica	04
2.1.1 Principais espécies do gênero <i>Eucalyptus</i>	05
2.2. Hibridação em <i>Eucalyptus</i>	06
2.3. Melhoramento genético em <i>Eucalyptus</i>	07
2.3.1. Aplicações dos marcadores moleculares no melhoramento genético vegetal	08
2.3.1.1. Seleção assistida por marcadores	09
2.3.1.2. Mapas de ligação e QTL	10
2.3.1.3. Testes de paternidade	11
2.4. Marcadores microssatélites	11
2.4.1. Descrição dos microssatélites	12
2.4.2. Ocorrência e importância genômica dos microssatélites	13
2.4.3. Principais tipos de seqüências microssatélites	14
2.4.4. Mecanismos mutacionais dos microssatélites	15
2.4.5. Marcadores microssatélites: base genética	18
2.4.6. Vantagens e desvantagens dos marcadores microssatélites	19
2.4.7. Métodos de desenvolvimento de marcadores microssatélites	20
3. CAPÍTULO 1: Diversidade genética de microssatélites genômicos e de EST(<i>Expressed Sequence Tags</i>) em híbridos de <i>Eucalyptus spp.</i>	23
Resumo	23
1. Introdução	24
2. Material e Métodos	25
3. Resultados e Discussão	27

4. Conclusões	31
Referências Bibliográficas.....	31
4. CAPÍTULO 2: Parentage testing of hybrid full sib families of <i>Eucalyptus</i> with microsatellites	35
Abstract.....	35
1. Introduction	36
2. Material e Methods.....	37
3. Results	39
4. Discussion	40
Acknowledgments.....	41
References.....	42
Tables	45
Figure	47
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES	48

EXTRATO

CUPERTINO, Fernanda Barbosa, M.S. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, abril de 2007. **Marcadores microssatélites como ferramentas úteis para estimação de diversidade genética e certificação de paternidade em híbridos de *Eucalyptus spp.*** Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto. Co-orientador: Ronan Xavier Corrêa. Colaborador: Abelmon da Silva Gesteira.

Originário da Austrália, o *Eucalyptus* é uma arbórea de grande importância econômica para as indústrias de papel e celulose. Híbridos de espécies do gênero contribuem para a associação de características agronomicamente importantes. A utilização de marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) em estudos ligados aos programas de melhoramento genético vem crescendo surpreendentemente, representando uma poderosa ferramenta para solucionar questões pertinentes ao melhoramento de *Eucalyptus*. Com o objetivo de auxiliar melhoristas e pesquisadores, foram realizados dois estudos em híbridos de *Eucalyptus spp.* No primeiro capítulo, foi analisada a diversidade genética de 112 híbridos por meio da comparação de polimorfismos gerados por 10 marcadores SSR genômicos e 10 SSR-EST (*Expressed Sequence Tags*), uma vez que pouco se conhece sobre os impactos na silvicultura e, ou melhoramento genético destes dois tipos de ferramentas moleculares. Os resultados revelaram que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os dois tipos de marcadores quanto ao número médio de alelos por loco (A) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC), embora a maioria dos estudos com plantas reporte maior polimorfismo em regiões não-expressas do genoma. Tanto os marcadores SSR genômicos como os SSR-EST de *Eucalyptus* se mostraram altamente polimórficos e adequados para o mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*). No segundo capítulo, o objetivo foi a

certificação de maternidade e paternidade de famílias de irmãos completos geradas para o mapeamento genético de QTLs. Foi verificada a existência de descendentes ilegítimos em uma amostragem de 14 famílias de híbridos de *Eucalyptus*, utilizando-se seis locos SSR. Os resultados mostraram que das 305 plantas analisadas, não houve exclusões de paternidade e maternidade em 70,8%, embora tenham sido detectadas contaminações em 11 famílias, com taxas que variaram de 4,5 a 72,7%. Foram identificados outros pais (*polen-parents*) em 11,8% dos descendentes analisados, sugerindo-se contaminação nas famílias por mistura de pólen e, ou sementes. Concluiu-se que a polinização controlada em *Eucalyptus* está sujeita a erros, e que a certificação de paternidade em famílias sob mapeamento pode auxiliar pesquisadores e melhoristas na redução de custos em vista da genotipagem de número elevado de indivíduos possivelmente contaminantes.

Palavras-chave: *Eucalyptus*, SSR, polimorfismo, melhoramento genético, mapeamento, diversidade genética.

ABSTRACT

CUPERTINO, Fernanda Barbosa, M.S. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, April of 2007. **Microsatellite markers as helpful tools to estimation of genetic diversity and paternity certification in hybrids of *Eucalyptus spp.*** Adviser: Fernanda Amato Gaiotto. Advisor Committee Members: Ronan Xavier Corrêa and Abelmon da Silva Gesteira.

Native from Australia, trees of *Eucalyptus* have a great economical importance to the paper and cellulose industries. Hybrids of species of this genus contribute to the association of agronomically important characteristics. The use of microsatellite markers or SSR (Simple Sequence Repeats) in studies related to genetic breeding programs has been growing a lot, representing a powerful tool to solve relevant questions about *Eucalyptus* improvement. Aiming at helping breeders and researchers, we performed two studies on hybrids of *Eucalyptus spp.* In the first chapter, we analyzed the genetic diversity of 112 hybrids by comparison of polymorphisms generated from 10 genomic SSR and 10 EST-SSR (Expressed Sequence Tags) markers, since little is known about the impacts of these two kinds of molecular tools on the silviculture and/or on the genetic improvement of trees. The results showed there were not significant differences ($p > 0.05$) between these two kinds of markers regarding the average number per locus (A) and the polymorphic information content (PIC), although most of the studies with plants report greater polymorphism on the non-expressed regions of genomes. Either genomic SSR or EST-SSR markers of *Eucalyptus* are highly polymorphic and appropriated to QTL (Quantitative Trait Loci) mapping. In the second chapter, the objective was the certification of maternity and paternity of full sib families that are under QTL genetic mapping. We verified the existence of illegitimate descendents in a sample of 14

hybrid full sib families of *Eucalyptus*, using six SSR loci. The results showed that, out of 305 plants analyzed, 70.8% were correctly assigned to the alleged mother and father trees, although we detected contaminations in 11 families, with rates that varied from 4.5 to 72.7%. We identified other pollen-parents in 11.8% of descendents, suggesting pollen and/or seed mixture. We conclude that the controlled pollination in *Eucalyptus* is subject to errors, and the certification of paternity by SSR markers in families under mapping studies can help researchers and breeders reducing the costs generated by the great number of possible contaminant individuals that are also genotyped.

Key-words: *Eucalyptus*, SSR, polymorphism, genetic improvement, mapping, genetic diversity.

1. INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus* é uma arbórea originária da Austrália, das ilhas da Indonésia, Papua Nova Guiné e Filipinas, de grande importância econômica. Só no Brasil, suas plantações chegam a ocupar cerca de três milhões de hectares (CAMPINHOS, 1999), o que corresponde a 40% do total de áreas plantadas por todo o mundo (TURNBULL, 1999). A madeira de eucalipto é utilizada em diversos ramos da indústria, sendo a produção de polpa para papel e celulose a que mais cresce (TURNBULL, 1999). O melhoramento genético tem contribuído para este crescimento, mesmo sem um aumento significativo de área plantada no país nos últimos oito anos.

A produção de híbridos do gênero *Eucalyptus*, dentro dos programas de melhoramento genético, ganhou elevada importância por causa da possibilidade de reunir características desejáveis da madeira em exemplares comercialmente importantes (ASSIS et al., 1993). A hibridação, realizada por meio de polinização controlada, permite, por exemplo, a transferência de resistência a doenças a uma espécie, bem como maior produtividade florestal (ASSIS et al., 1993). A constituição de famílias e, ou populações de híbridos de *Eucalyptus* também tem sido feita para a realização de estudos sob o ponto de vista do mapeamento genético, os quais possibilitam a detecção e a caracterização de genes que afetem a expressão de caracteres de interesse agrônomo e econômico (QTL – *Quantitative Trait Loci*) (BRONDANI et al., 2002; CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

Os marcadores microssatélites, também chamados de SSR (*Simple Sequence Repeats*), fazem parte de uma classe de DNA repetitivo, presente em todos os organismos vivos eucarióticos (POWELL et al., 1996) e procarióticos (GURARIE et al., 2000). São constituídos por seqüências de DNA, formadas por um a seis

nucleotídeos de comprimento que se repetem lado a lado (*in tandem*) no genoma, onde estão distribuídos ao acaso (GUPTA et al., 1996).

O desenvolvimento e a utilização de marcadores microssatélites em análises genéticas cresceram muito nos últimos anos, dada a sua ampla aplicabilidade e facilidade de uso (ZANE et al., 2002). Os marcadores SSR são considerados ferramentas poderosas, por revelarem um altíssimo nível de polimorfismos, além de outras características que os tornam desejáveis para inúmeros estudos relacionados à genética e ao melhoramento (RAKOCZY-TROJANOWSKA; BOLIBOK, 2004).

Os marcadores microssatélites desenvolvidos para uma dada espécie podem ainda ser transferidos para outras espécies de mesmo gênero ou até mesmo entre espécies de gêneros relacionados, por causa da homologia de seqüências do genoma (BRONDANI et al., 1998; MARQUES et al., 2002). Dessa forma, os marcadores SSR podem ser compartilhados entre laboratórios e permitem a realização de estudos de diversas naturezas. Eles podem ser aplicados em análises de diversidade genética (SOUZA, 2001), análises de sistemas de cruzamento (GAIOTTO et al., 2003), genética de populações e avaliação de fluxo gênico (COLEVATTI et al., 2001; GAIOTTO et al., 2003), identificação de genótipos individuais e testes de paternidade (GAIOTTO et al., 2003), construção de mapas genéticos (BRONDANI et al., 1998) e no melhoramento genético vegetal (SOUZA, 2001).

Diante de tantas aplicabilidades destes tipos de marcadores, foram levantados questionamentos quanto ao comportamento de marcadores microssatélites em regiões expressas e não-expressas do genoma em híbridos de *Eucalyptus spp*, uma vez que os SSR possibilitam o conhecimento de locos quantitativos relacionados a uma determinada herança genética. Por outro lado, a existência de contaminações em famílias de híbridos de *Eucalyptus spp* sob estudo do mapeamento genético também foi levantada, uma vez que as estimativas dos parâmetros genéticos quantitativos podem ser enviesados se não forem calculadas a partir de famílias puras (ELDRIDGE et al., 1994).

Assim, no presente trabalho, objetivou-se realizar dois tipos de análises genéticas com marcadores microssatélites, visando auxiliar melhoristas e pesquisadores nas questões ligadas ao melhoramento genético em *Eucalyptus*. Os objetivos específicos, divididos em capítulos seqüenciais, foram:

1. Analisar a diversidade genética em híbridos de *Eucalyptus spp*, por meio da comparação de polimorfismos gerados por marcadores microssatélites genômicos e de EST (*Expressed Sequence Tags*).
2. Realizar a certificação de paternidade e maternidade em 14 famílias de híbridos de *Eucalyptus spp* sob mapeamento genético pelo projeto *Genolyptus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Eucalyptus* e sua importância econômica

Originária da Austrália e das ilhas da Indonésia, Papua Nova Guiné e Filipinas, a árvore de *Eucalyptus* tem sido propagada intensivamente por todo o mundo, ocorrendo em amplas condições ambientais (ELDRIDGE et al., 1994, TURNBULL, 1999). O *Eucalyptus* apresenta a peculiaridade de se adaptar facilmente em diferentes regiões e lugares de climas e solos variados, além de apresentar taxa de crescimento rápido e boa qualidade da madeira (ELDRIDGE et al., 1994).

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família *Myrtaceae*, apresenta um grande número de espécies, hoje estimado em cerca de 700 (BROOKER, 2000). A maioria delas faz parte do subgênero *Symphyomyrtus*, no qual estão inclusas as principais espécies de eucalipto mais plantadas no mundo, tais como *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e *E. globulus*, além de outras também importantes mundialmente como *E. urophylla*, *E. viminalis*, *E. saligna*, *E. deglupta*, *E. paniculata* e *E. citriodora*, esta última pertencente ao subgênero *Corymbia* (ELDRIDGE et al., 1994).

Estima-se que 12 milhões de hectares de terras sejam plantados por *Eucalyptus* no mundo (CAMPINHOS, 1999; TURNBULL, 1999), sendo 80% delas ocupadas por *E. grandis*, *E. globulus* e *E. camaldulensis* (POKE et al., 2005). Somente no Brasil, cerca de três milhões de hectares são plantados com os principais clones, em sua maioria por *E. grandis* (CAMPINHOS, 1999; TURNBULL, 1999; MORA; GARCIA, 2000). A Índia é o segundo maior país a plantar esta arbórea, principalmente *E. tereticornis*, totalizando cerca de 550.000 hectares (CAMPINHOS, 1999). Outros países como Espanha, Portugal e África do Sul possuem mais de 400.000 hectares de terras plantadas pelas principais espécies do subgênero *Symphyomyrtus* (CAMPINHOS, 1999).

A grande importância do *Eucalyptus* está na utilização de sua madeira para diversos fins, principalmente na indústria siderúrgica, de construção civil, de carvão, moveleira, cosmética, de produtos de limpeza e, em grande parte, de produção de polpa para as indústrias de papel e celulose (CAMPINHOS, 1999). Para a produção de polpa e madeira sólida, *E. grandis*, *E. urophylla* e seus híbridos são as espécies mais utilizadas pelas indústrias nas regiões tropicais e subtropicais, e, *E. globulus*, nas regiões temperadas (ELDRIDGE et al., 1994).

2.1.1 Principais espécies do gênero *Eucalyptus*

Cada espécie se desenvolve em um ambiente adequado e, portanto, a escolha para o plantio deve depender do objetivo do uso da madeira e das condições climáticas e do solo (ANGELI, 2005). Abaixo serão descritas as principais características das principais espécies comerciais de *Eucalyptus*:

Eucalyptus grandis tem a peculiaridade de crescer rapidamente em regiões subtropicais e de clima quente. As árvores costumam ser bastante altas, chegando a alcançar 75m. A madeira é relativamente leve e pouco densa, de boa forma, e suas propriedades permitem usos diversos, tais como a produção de polpa para papel, carvão e nas construções civis “leves” (ELDRIDGE et al. 1994). Entretanto, essa espécie não é muito tolerante ao frio, e nem a doenças fúngicas como ferrugem e cancro (ELDRIDGE et al. 1994).

Já *Eucalyptus urophylla* apresenta maior estabilidade genética em quase todas as áreas, por causa do seu bom crescimento em regiões de clima úmido e seco, embora a taxa de crescimento seja inferior a de *E. grandis* – de até 31m (ELDRIDGE et al., 1994; MOURA, 2004). A sua madeira apresenta densidade mediana, apropriada para a produção de celulose e carvão (MOURA, 2004). A árvore de *E. urophylla* é muito mais resistente ao cancro causado por *Cryphonectria cubensis* e à ferrugem causada por *Puccinia psidii* do que *E. grandis* (ELDRIDGE et al., 1994).

Eucalyptus globulus, também conhecida como “*Tasmanian blue gum*” é uma das árvores nativas mais cultivadas na Austrália (ELDRIDGE et al., 1994). Cresce bem em regiões temperadas e é largamente plantada em Portugal, Espanha e Califórnia (ELDRIDGE et al., 1994). *E. globulus* é a melhor árvore para a produção do melhor papel, uma vez que sua madeira apresenta propriedades químicas

excelentes: alto teor de celulose e baixo teor de lignina (MAGATON et al., 2006), o que favorece a produção de pasta branqueada, ideal para a qualidade papelreira.

A árvore de *Eucalyptus camaldulensis* está mais adaptada nas regiões do Mediterrâneo e em países tropicais. Apesar de ter baixo crescimento, possui diferentes estratégias para sua sobrevivência, dependendo de seus sítios de origem (MARTINS et al., 2002). Desenvolve-se em solos relativamente pobres e de salinidade alta, e é extremamente tolerante a longos períodos de seca, chuva e frio (ELDRIDGE et al., 1994; MARTINS et al., 2002). A madeira de *E. camaldulensis* é mais dura, pesada e escura por causa da presença de fibras longas (ELDRIDGE et al., 1994).

2.2 Hibridação em *Eucalyptus*

A crescente demanda dos produtos de *Eucalyptus* favoreceu a instalação de novas plantações e indústrias de produção de polpa nas últimas décadas, o que contribuiu para a evolução da ciência florestal nos campos da silvicultura, propagação, melhoramento e biotecnologia (CAMPINHOS, 1999). Programas de melhoramento tradicionais foram sendo adotados, visando explorar a variação genética natural em *Eucalyptus* e a sua habilidade em hibridizar-se (POKE et al., 2005). Os híbridos de *Eucalyptus* favorecem a combinação de características desejáveis num único indivíduo ou grupo de indivíduos, as quais não podem ser obtidas em espécies puras (ELDRIDGE et al., 1994). A melhoria das características economicamente importantes como taxa de crescimento, propriedades da madeira e resistência a doenças foram sendo obtidas graças à identificação de genótipos e fenótipos superiores (ELDRIDGE et al., 1994; CAMPINHOS, 1999; POKE et al., 2005).

O cruzamento de espécies com características superiores permite produzir árvores especialmente projetadas para determinada finalidade e em menor espaço de tempo quando comparado aos métodos tradicionais (COELHO, 2006). A manifestação da heterose ou “vigor híbrido” é um outro fator importante decorrente da hibridização, o que proporciona maior rapidez de crescimento nos indivíduos híbridos do que nos parentais (ELDRIDGE et al., 1994),

Segundo Potts e Dungey (2004), a hibridação pode aumentar a enorme diversidade genética já existente entre as espécies. Entretanto, não se deve gerar

grandes expectativas em relação à superioridade dos híbridos, por causa da possibilidade de pressões seletivas por endogamia e depressão (ELDRIDGE et al., 1994). Outro fator como a biologia floral de cada espécie deve ser conhecida, por causa da possibilidade de ocorrer incompatibilidade entre as espécies, principalmente em híbridos de *Eucalyptus* que possuem uma distância taxonômica muito grande (ELDRIDGE et al., 1994; POTTS; DUNGEY, 2004).

Um exemplo de hibridação bem sucedida é o cruzamento entre *E. grandis* x *E. urophylla*, que combina o rápido crescimento de *E. grandis* como a grande capacidade de resistência a doenças fúngicas de *E. urophylla*. Híbridos de *E. grandis* x *E. camaldulensis* podem ser prontamente obtidos e ocorrem bem em regiões que são muito secas para *E. grandis* (ELDRIDGE et al., 1994). A hibridação de qualquer espécie do gênero *Symphyomyrtus* com *E. globulus* certamente é desejada, por causa da grande capacidade de produção de polpa de celulose desta espécie.

2.3 Melhoramento genético em *Eucalyptus*

A pesquisa e o melhoramento genético de *Eucalyptus* avançaram muito nos últimos anos. O advento da tecnologia de marcadores moleculares aplicados ao melhoramento genético vegetal tem gerado grande expectativa em relação ao desenvolvimento de métodos rápidos de seleção precoce de árvores elite (GRATTAPAGLIA, 2001). A localização de locos controladores das principais características de interesse do *Eucalyptus* pôde ser realizada com a construção de mapas de ligação e de QTL em diferentes espécies do gênero (GRATTAPAGLIA, 2001). Grandes projetos que envolvem o mapeamento genético e de QTL em *Eucalyptus* foram iniciados, criando-se, cada vez mais, mapas informativos e de alta densidade, e com o maior número de espécies (POKE et al., 2005). Na Europa, uma grande parceria entre a França (CIRAD – *Centre de Coopération Internationale em Recherche Agronomique pour l'ê Développement*), Espanha (ENCE – *Empresa Nacional de Celulosa Española*) e Portugal (RAIZ – *Instituto de Investigação da Floresta e Papel*) busca a identificação de QTL responsáveis pela variação nas propriedades da madeira, crescimento, florescimento e resistência a doenças no *Eucalyptus* (POKE et al., 2005). No Brasil, iniciou-se em 2002 o projeto *Genolyptus*, que é baseado numa parceria entre o governo federal, MCT (Ministério da Ciência e

Tecnologia) – Fundo Verde Amarelo, a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), sete Universidades e 13 empresas produtoras de celulose, incluindo o grupo RAIZ, de Portugal. O projeto está organizado em nove subprojetos, os quais objetivam entender as bases moleculares da formação da madeira do eucalipto e a sua resistência a doenças (GRATTAPAGLIA, 2004). Vinte e quatro famílias de irmãos completos envolvendo várias espécies de *Eucalyptus* e seus híbridos estão sob estudo para o mapeamento genético e de QTL, por meio de marcadores moleculares.

2.3.1 Aplicações dos marcadores moleculares no melhoramento genético vegetal

A partir do século XX, a tecnologia de melhoramento de plantas cresceu consideravelmente, para atender a demanda crescente da população mundial em busca de alimentos (SOUZA, 2001). Não só o melhoramento de culturas agrícolas se intensificou, mas também, o de espécies florestais, uma vez que se estima que a expansão desse tipo de cultura seja limitada daqui a alguns anos por causa da restrição global de áreas com terras agricultáveis disponíveis (GRATTAPAGLIA, 2001). Sendo assim, a produção de plantas de interesse agrícola e econômico tem aumentado graças aos esforços de agrônomos e melhoristas, embora os caracteres poligênicos, responsáveis pelas principais características de produção, tais como ciclo, altura e resistência, sejam complexos e ainda pouco conhecidos (SOUZA, 2001; CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

Basicamente, os melhoristas procuram desenvolver materiais que preencham as necessidades atuais e futuras do mercado, em menor espaço de tempo e com o menor custo possível (NASS, 2001). O melhoramento tradicional de plantas envolve a busca por genótipos superiores por seleção e cruzamentos de indivíduos, a partir de populações segregantes com suficiente variabilidade genética. Embora seja efetiva, a produção de um novo cultivar ou variante é bastante lenta, por causa da necessidade de se realizar diversos ciclos de avaliação, seleção e recombinação dos melhores genótipos (SOUZA, 2001). Entretanto, a obtenção de genótipos desejáveis pode ser feita, em menor tempo, com o advento da tecnologia de marcadores de DNA, surgida nos últimos anos, os quais permitiram acessar

diretamente o genótipo dos indivíduos, sem a necessidade de vários ciclos de avaliação fenotípica da característica desejada (MILACH, 1998).

Os marcadores moleculares são ferramentas neutras, isto é, não sofrem influência do ambiente e, portanto, permitem a análise direta do genoma, possibilitando a obtenção de informações relativas à variabilidade existente, identificação de genótipos ou genes específicos e a associação entre marcas moleculares e características fenotípicas (SOUZA, 2001). Marcadores moleculares polimórficos permitem esses tipos de análise, podendo ser aplicados em estudos de diversidade genética e caracterização do germoplasma, construção de mapas genéticos, seleção assistida por marcadores, entre outros (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Ferreira e Grattapaglia (1998) classificam as aplicações dos marcadores moleculares como de curto e médio-longo prazo. As aplicações de curto prazo envolvem, basicamente, a identificação e a discriminação de genótipos em testes de paternidade, a proteção de variedades e, ou clones, estudos de variabilidade genética do germoplasma, monitoramento de cruzamentos entre indivíduos elite, dentre outros. Já as aplicações de médio a longo prazo quantificam a variabilidade genética existente ao nível de DNA e a correlacionam com a expressão de fenótipos em procedimentos de mapeamento genético e de QTL, além da seleção assistida por meio de marcadores (MAS – *Marker Assisted Selection*).

2.3.1.1 Seleção Assistida por Marcadores

Na seleção assistida por meio de marcadores (MAS) é possível selecionar os indivíduos com o marcador de interesse, acessando-se diretamente o seu genótipo, sem que haja a necessidade de se avaliar o fenótipo da característica em questão. O princípio da técnica está baseado na associação entre marcadores e a característica desejável (MILACH, 1998). O uso de marcadores moleculares pode facilitar bastante o estudo de espécies perenes ou de ciclos de seleção longos, e, ou que apresentem características fenotípicas de herança complexa e herdabilidade baixa (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SOUZA, 2001). A prática efetiva de aplicação de MAS em programas de melhoramento de plantas ainda constitui uma área em poucos testes foram efetuados e exemplos dessa tecnologia ainda são

escassos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Entretanto, acredita-se que esta tecnologia tenha potencial na redução de custos e tempo, principalmente quando a característica a ser avaliada é complexa (MILACH, 1998).

2.3.1.2 Mapas de ligação e de QTL

A tecnologia de marcadores moleculares em análises genéticas de plantas tem revolucionado a construção de mapas genéticos e o mapeamento de locos de características quantitativas de interesse (QTL), que têm sido bastante utilizados e associados ao melhoramento genético (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os mapas genéticos permitem a localização de locos e, ou genes, através da formação de grupos de ligação, o que permite a realização de estudos de controle genético de características complexas (POKE et al., 2005). Já os mapas de QTL possibilitam mensurar o número de locos quantitativos envolvidos na herança, bem como sua organização nos cromossomos e o modo como agem os genes envolvidos (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

Por meio de marcadores moleculares, pode-se realizar a seleção de genitores contrastantes potenciais para o cruzamento e a obtenção de uma população segregante, a qual também será genotipada com algumas centenas de marcadores para a construção dos mapas de ligação (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores do tipo microssatélite, por serem altamente polimórficos, inferem menor grau de distorção da frequência dos alelos genotipados (SOUZA, 2001) e têm se mostrado ideais para esse tipo de estudo (GRATTAPAGLIA, 2001).

Já no mapeamento de QTL, uma população segregante, de genitores contrastantes, também é genotipada com uma bateria de marcadores. Os dados fenotípicos são avaliados em cada indivíduo, buscando-se associações significativas e uma correlação estatística entre os genótipos e a expressão fenotípica da característica poligênica estudada (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SOUZA, 2001).

Marcadores dominantes do tipo RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) contribuíram significativamente para o rápido desenvolvimento dos primeiros mapas genéticos de *Eucalyptus* (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994; MARQUES et al., 1998). Marcadores SSR

desenvolvidos para *E. grandis* e *E. urophylla* permitiram gerar mapas de ligação (BRONDANI et al., 1998, 2002) que hoje são referência em estudos de análise genética em *Eucalyptus*, principalmente para os grupos de pesquisa empenhados em identificar regiões genômicas de características economicamente importantes (QTL), tais como altura, crescimento volumétrico, densidade básica da madeira, resistência a doenças, dentre outras (GRATTAPAGLIA, 2001).

2.3.1.3 Testes de paternidade

Nos anos 80, explodiu o advento do DNA *fingerprinting*, e inúmeros trabalhos envolvendo a análise de parentesco foram iniciados. Os mais recentes tiveram emprego de marcadores microssatélites (JONES; ARDREN, 2003). Não somente estudos com populações naturais são realizados, mas também aqueles que estão ligados diretamente ao melhoramento genético.

Os testes de paternidade podem ser realizados tanto para certificar a pureza genética de sementes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), bem como monitorar a qualidade dos programas de melhoramento, como por exemplo, por meio da identificação correta de irmãos completos de cruzamentos controlados (BELL et al., 2004); estimando-se a taxa de polinização e verificando o fluxo gênico dentro de campos experimentais (CHAIX et al., 2003); ou por meio da seleção retrospectiva de árvores elite (GRATTAPAGLIA et al., 2004).

Para qualquer finalidade, o teste de paternidade deve ser realizado com marcadores que tenham um poder discriminatório elevado, isto é, com alta variabilidade genética e baixa probabilidade de que dois indivíduos analisados tenham o mesmo genótipo. Este índice foi formulado por Paetkau et al. (1995) e é chamado de Probabilidade de Identidade ('I'). Por outro lado, a probabilidade de exclusão de paternidade ('Q'), formulada por Weir (1996) também é importante, pois revela a capacidade do marcador em excluir genótipos de ser parental de outros genótipos.

2.4 Marcadores Microssatélites

2.4.1 Descrição dos microssatélites

O termo “microssatélites” foi primeiramente introduzido por Litt e Luty (1989) ao serem descritas repetições de dinucleotídeos poli(CA) e poli(GT) em genes de actina de células cardíacas humanas. Entretanto, essas repetições foram documentadas há mais tempo por Hamada et al. (1982) ao analisarem o genoma de organismos eucarióticos. Os microssatélites são seqüências repetitivas, compostas de um a seis nucleotídeos de comprimento, distribuídas aleatoriamente pelo genoma (GUPTA et al., 1996), embora possam variar de acordo com o organismo estudado (CHAMBERS; MACAVOY, 2000).

As seqüências microssatélites também são conhecidas como SSR (*Simple Sequence Repeats*), STR (*Short Tandem Repeats*), SLP (*Simple Sequence Length Polymorphisms*), VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*), STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Sites*), dentre outras denominações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; CHAMBERS; MACAVOY, 2000). O termo VNTR pode ser tanto utilizado para descrever seqüências minissatélites como microssatélites (CHAMBERS; MACAVOY, 2000), embora eles possuam propriedades gerais diferentes (ARMOUR et al., 1999), como será visto a seguir.

As seqüências repetitivas podem ser divididas em três diferentes classes nos organismos de genoma complexo: (i) DNA satélite, que são seqüências simples e longas de DNA, constituindo uma percentagem alta do genoma total. Podem formar blocos de até 5 Mb, geralmente localizados na região centromérica dos cromossomos; (ii) DNA minissatélite, que são seqüências de 10 a 15 nucleotídeos de comprimento e que se repetem, formando “ilhas” de 0,5 a 30 Kb, as quais são encontrados, geralmente, na região telomérica dos cromossomos; e (iii) DNA microssatélite, que são repetições curtas de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento e que formam seqüências de 20 a 200 pb, extremamente abundantes em todo o genoma (ARMOUR et al., 1999; CHAMBERS; MACAVOY, 2000). A Figura 1 esquematiza a distribuição dessas três classes de DNA repetitivo nos cromossomos.

As classes de DNA repetitivo *in tandem* apresentam polimorfismos extensivos no comprimento de suas seqüências, o que permite o seu uso na genotipagem de indivíduos em análises genéticas. Embora os minissatélites tenham revolucionado a genética forense humana por serem hipervariáveis, os microssatélites chamam a atenção por sua abundância e sua ampla distribuição aleatória pelo genoma de

diversas espécies (ARMOUR et al., 1999). Assim, os microssatélites podem ser utilizados como marcadores moleculares, através da genotipagem de locos por meio da amplificação das suas seqüências por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (ARMOUR et al., 1999). Os marcadores microssatélites serão descritos com mais detalhe nos itens seguintes.

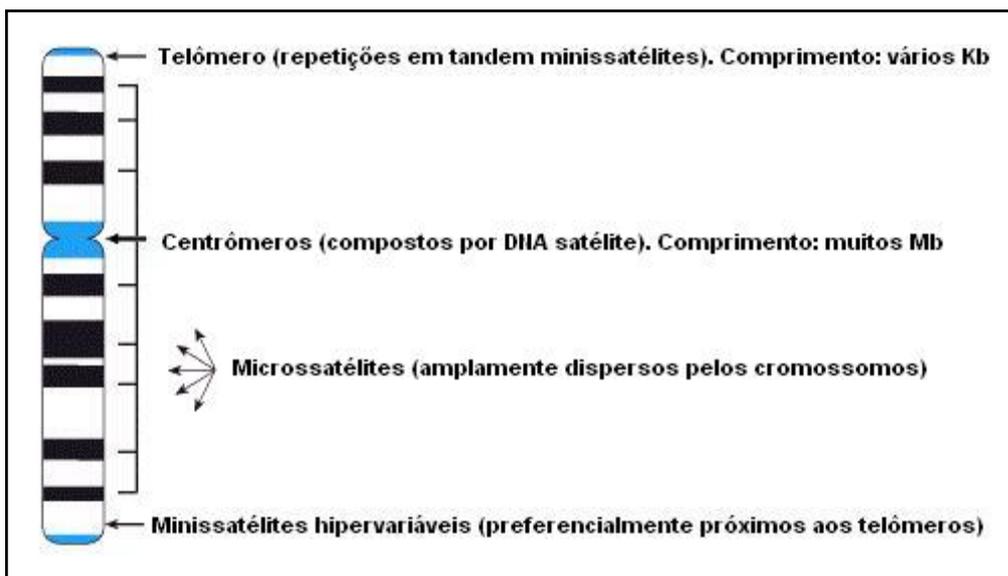


Figura 1 – Distribuição das classes de DNA repetitivo.
Fonte: Adaptado de Lodish et al. (1999).

2.4.2 Ocorrência e importância genômica dos microssatélites

Os microssatélites são encontrados em todos os organismos vivos analisados até então: humanos, mamíferos, aves, peixes, plantas, leveduras, bactérias e outros (HANCOCK, 1999). Acredita-se que os microssatélites estejam bem distribuídos no genoma de eucariotos e procariotos, tanto em regiões codificantes quanto não-codificantes, embora sejam predominantemente encontrados em regiões não-codificantes, onde a taxa mutacional por substituição de nucleotídeos é maior (HANCOCK, 1999; ZANE et al., 2002). Edwards et al. (1998) demonstraram que somente 11,6% das seqüências microssatélites estudadas em *Fugus rubripes* (baiacu) são encontradas dentro de regiões codificantes. Proporções similares também foram relatadas em outros organismos (LI et al., 2002). De acordo com Metzgar et al. (2000), a baixa freqüência de seqüências SSR em regiões

codificantes pode ser atribuída à seleção contra mutações que levem a efeitos deletérios no fenótipo dos indivíduos (*frameshift mutation*), o que reduz as chances de fixação da mutação no genoma.

Em contraste, estudos recentes em plantas têm demonstrado que a frequência de microssatélites é maior em regiões transcritas do que nas demais regiões genômicas (MORGANTE et al., 2002). De fato, por muito tempo os microssatélites foram considerados como DNA “lixo”, por fazer parte de seqüências de função desconhecida (RAKOCZY-TROJANOWSKA; BOLIBOK, 2004), podendo apenas ser utilizados como marcadores neutros de DNA em estudos evolutivos e de genética de populações. Entretanto, outros estudos vieram comprovando a importância funcional dessas seqüências, na organização dos cromossomos, no ciclo celular, em processos metabólicos do DNA, na atividade regulatória de genes, e nas desordens genéticas, principalmente aquelas que envolvem o câncer (KASCHI; SOLLER, 1999; LI et al., 2002).

2.4.3 Principais tipos de seqüências microssatélites

As repetições microssatélites podem ser formadas por unidades ou motivos (*motifs*) de mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos (POWELL et al., 1996). As repetições poli(A) e poli(T) são as mais comuns no genoma humano e de bactérias (HANCOCK, 1999). Dentre as repetições de dinucleotídeos, as formadas por (CA)_n e (GT)_n são as mais freqüentes em organismos eucarióticos, especialmente em mamíferos e humanos (TAUTZ; RENZ, 1984). Em contraste, as repetições de (AT)_n e (AG)_n são as mais abundantes no genoma de plantas, como demonstrado por Wang et al. (1994). Os motivos (CAG)_n e (AAT)_n são os mais comuns entre os trinucleotídeos (HANCOCK, 1999), sendo que o (ATA)_n é o mais freqüente em microssatélites de plantas (MORGANTE; OLIVIERI, 1993).

Os SSR podem ser mais abundantes em uns organismos do que em outros (CHAMBERS; MACAVOY, 2000), sendo encontrados com maior freqüência no genoma de mamíferos e humanos, e em menor quantidade no genoma de plantas e insetos. Em mamíferos, costuma ocorrer um microssatélite a cada 6 Kb de DNA, enquanto que em plantas, essa ocorrência se dá a cada 33 Kb (WANG et al., 1994). Em estudo realizado em 10 diferentes espécies de plantas, Cregan (1992) mostrou

que existem, em média, 0,224 microssatélites (di e tetranucleotídeos) a cada 100 Kb de DNA.

Os SSR podem, ainda, ser classificados de acordo com a “pureza” dos seus motivos: (i) perfeitos, constituídos por um único motivo; (ii) imperfeitos, constituídos por um tipo de motivo intercalado por uma ou algumas bases; (iii) compostos, constituídos por dois motivos puros; (iv) compostos imperfeitos, constituídos por dois ou mais diferentes motivos intercalados por uma ou algumas bases; e (v) complexos, constituídos por motivos de comprimentos diversos (GUPTA et al., 1996; CHAMBERS; MACAVOY, 2000). Na tabela 1, são dados os exemplos dos tipos de seqüências microssatélites, classificados acima.

Tabela 1 – Exemplos de tipos de seqüências microssatélites

Tipos	Exemplos
Perfeitas	- (CA) ₁₄ -
Imperfeitas	- TA (CA) ₄ TA (CA) ₇ -
Compostas	- (TA) ₃₁ (CA) ₄₂ -
Compostas imperfeitas	- (AC) ₁₄ AGAA (AG) ₁₂ -
Complexas	- (TTTC) ₃ (T) ₆ (CT) ₁₀ -

2.4.4 Mecanismos mutacionais dos microssatélites

O nível de polimorfismo dos microssatélites é dado pela variação que ocorre na sua unidade repetitiva. O tamanho do motivo, o número de vezes que ele se repete, a presença de um ou mais motivos e a região em que o microssatélite está localizado influenciam na hipervariabilidade dessas seqüências (EISEN, 1999). A instabilidade dos microssatélites está baseada nas altas taxas mutacionais, em que inserções e deleções levam à mudança no comprimento das seqüências (TAUTZ; SCHLOTTERER, 1994). Segundo Hancock (1999), a taxa mutacional nas seqüências dos SSR é da ordem de 10^{-2} a 10^{-6} , sendo considerada bastante elevada quando comparada com as taxas de mutação pontual ($\sim 10^{-8}$).

Alguns estudos vêm demonstrando a existência de uma correlação positiva entre taxas mutacionais e o número de repetições *in tandem* (GUPTA et al., 1996; SCHLOTTERER, 2000). Assim, quanto maior o número de repetições de um motivo

microssatélite, maior o polimorfismo encontrado. Locus que apresentam motivos que se repetem abaixo de 12 vezes, por exemplo, costumam mostrar baixos níveis polimórficos (GUPTA et al., 1996). É possível que haja, também, uma correlação negativa entre o comprimento de um motivo e o nível de polimorfismo. Assim, dinucleotídeos são mais variáveis que tetranucleotídeos (SCHLOTTERER, 2000).

Três modelos de mecanismos mutacionais explicam, em geral, a alta variação genética dos microssatélites: (i) o escorregamento da DNA polimerase durante a replicação do DNA, referida como *slippage* por muitos autores; (ii) o *crossing over* desigual, que pode ocorrer durante a recombinação homóloga dos cromossomos; e (iii) a conversão gênica, que também ocorre na recombinação (HANCOCK, 1999).

1. Escorregamento da DNA polimerase (*slippage*): durante a replicação do DNA repetitivo, a DNA polimerase pode alterar o número de repetições da fita nascente, através de um escorregamento, formando um *loop*, fazendo com que ambas as fitas molde e não-molde fiquem desalinhadas. Se não houver reparo, no próximo evento de replicação ter-se-á duas moléculas com o número de repetições alterado e, certamente, uma das fitas será mais longa que a outra (Figura 2).

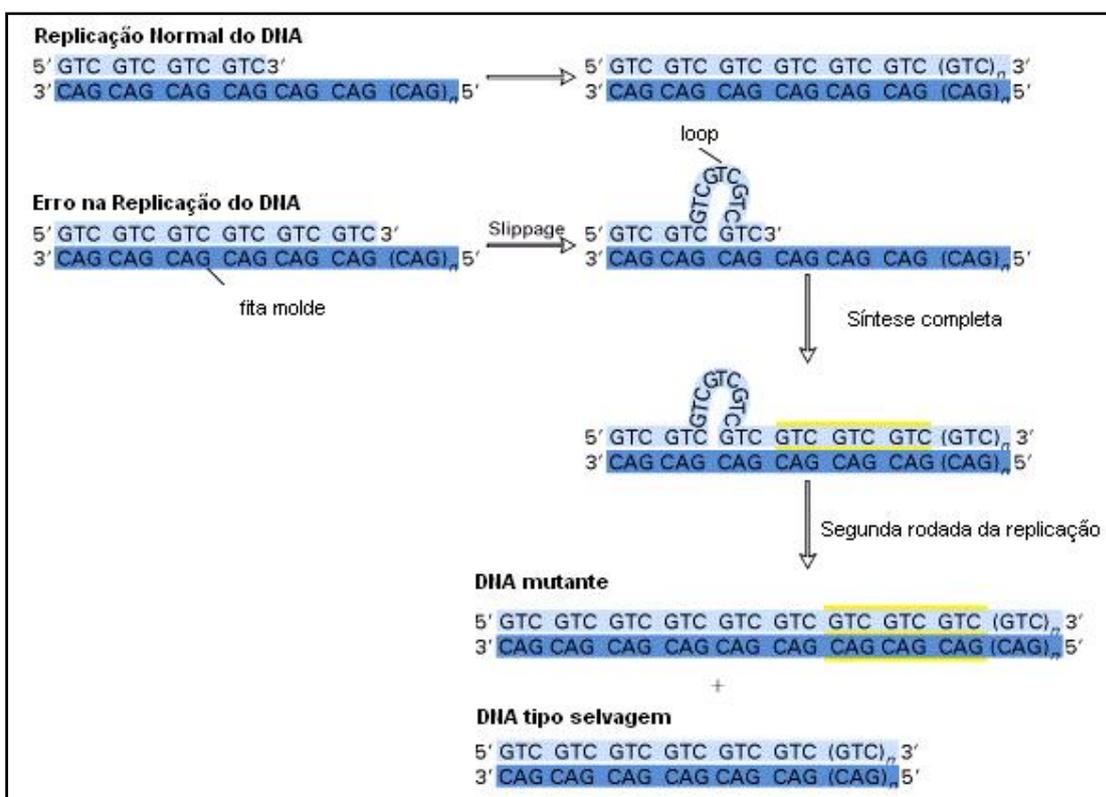


Figura 2 – Esquema do *slippage* em microssatélites.
 Fonte: Adaptado de Lodish et al. (1999).

2. Crossing over desigual: na recombinação homóloga, os cromossomos podem ficar desalinhados, pois a maquinaria atuante também pode “confundir” o número de repetições de seqüências muito longas, recombinaando-as erroneamente. Uma molécula de DNA sofre deleção e a outra, inserção de repetições (Figura 3).

3. Conversão gênica: ocorre também durante o processo de recombinação. Nesse caso, há transferência unidirecional de informação entre seqüências não alélicas ou alélicas. A seqüência que “doa” a informação não sofre mudanças. A outra seqüência de DNA receptora sofre modificações com a substituição pela seqüência copiada da seqüência doadora. Sendo assim, um alelo pode ser transformado em outro.

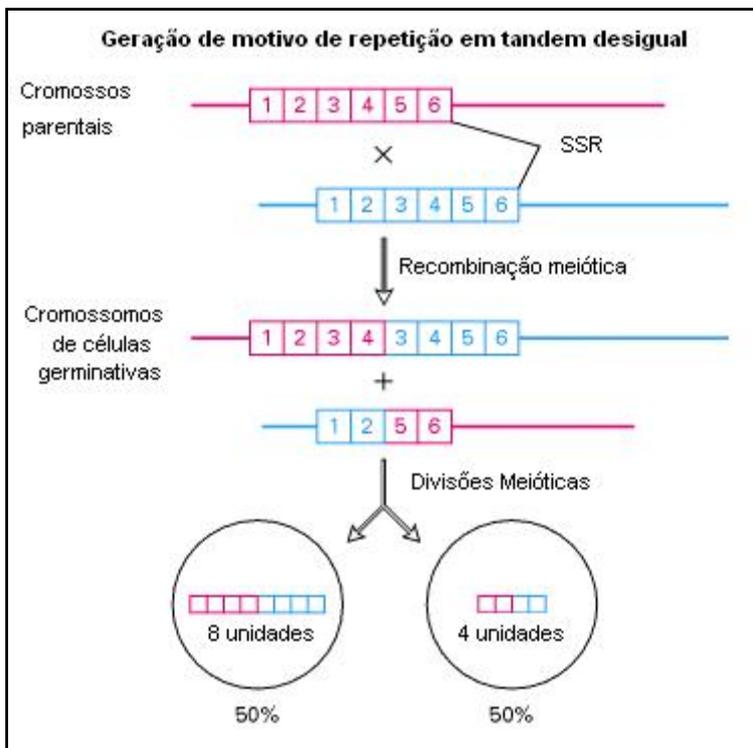


Figura 3 – Esquema do *crossing over* desigual nos microsatélites.
Fonte: Adaptado de Lodish et al. (1999).

Segundo Armour et al. (1999) e Hancock (1999), as chances de ocorrer uma mutação em microsatélites perfeitos é maior, por causa da dificuldade de se formar “*loops*” em seqüências repetitivas interrompidas. Por este motivo, microsatélites imperfeitos apresentam menor polimorfismo genético (WEBER, 1990).

2.4.5 Marcadores microssatélites: base genética

Os marcadores microssatélites têm sido referidos como marcadores preferenciais, por revelarem um altíssimo nível de polimorfismos quando comparados a outros tipos de marcadores (LIEWLAKSANEEYANAWIN et al., 2004). O número de trabalhos publicados envolvendo marcadores SSR aumentou consideravelmente nos últimos anos, segundo Zane et al. (2002), principalmente quanto ao isolamento desses marcadores em diversos organismos.

Por causa da conservação das seqüências adjacentes aos microssatélites, estes podem ser amplificados, em diferentes genótipos, por meio da PCR, utilizando-se pares de *primers* específicos, os quais geralmente são constituídos por 20 a 30 pares de base (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SOUZA, 2001). O número de unidades repetitivas dos microssatélites pode ser variável entre os diferentes genótipos e os segmentos amplificados apresentar polimorfismos extensivos, os quais podem ser detectados por meio de géis de eletroforese de alta resolução (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SOUZA, 2001). Assim, em uma herança codominante, os indivíduos heterozigotos, que apresentam alelos diferentes, podem ser diferenciados dos homozigotos (alelos iguais) para uma determinada região genômica (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), como demonstra a Figura 4.

A detecção de polimorfismos nas análises genéticas com marcadores microssatélites pode ser realizada por meio da eletroforese de três diferentes sistemas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SOUZA, 2001):

1. Géis de agarose de alta resolução: o manuseio é relativamente simples. Entretanto, não é possível distinguir claramente fragmentos que se diferenciam por poucos pares de base. A visualização das bandas no gel pode ser feita diretamente por coloração com brometo de etídio. Esta técnica pode ser empregada em análise de segregação.
2. Géis de poliacrilamida desnaturante: este sistema é o mais adequado para separar fragmentos que se diferenciam por pouquíssimos pares de base, e é o que mais vêm sendo utilizado em análises genéticas. A visualização das bandas pode ser feita por meio da coloração do gel com nitrato de prata, brometo de etídio ou por

autoradiografia, quando os *primers* utilizados são marcados com radioisótopos. Entretanto, ambas as maneiras são trabalhosas e demandam mais tempo do pesquisador.

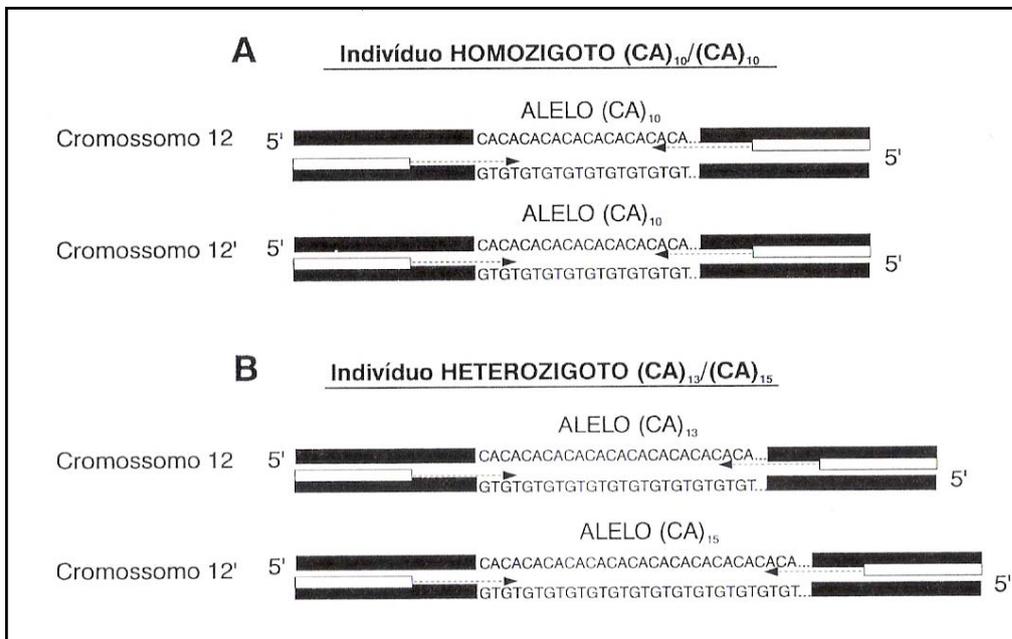


Figura 4 - Base genética de microssatélite. As setas indicam o sentido de anelamento dos *primers*.

Fonte: (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

3. Sistemas multiplex: neste sistema, dois ou mais pares de *primers* marcados com fluorescência podem ser amplificados juntos em uma mesma PCR, levando-se em consideração os tamanhos dos alelos dos locos conjuntamente analisados. Os diferentes tamanhos dos fragmentos amplificados são detectados com precisão em sequenciadores automáticos de géis de poliacrilamida desnaturante, os quais interpretam o tempo de migração da fluorescência emitida como o tamanho de fragmento amplificado. Este sistema permite a rápida automatização da genotipagem.

2.4.6 Vantagens e desvantagens dos marcadores microssatélites

Os marcadores microssatélites podem ser utilizados como marcadores genotípicos em estudos de diversas naturezas. As principais vantagens relacionadas a eles são: (i) a sua fácil utilização, uma vez que são baseados na amplificação simples de seqüências e ainda permite o uso de sistemas multiplex; (ii) possuem

herança co-dominante, isto é, distinguem indivíduos heterozigotos de homozigotos; (iii) são multialélicos, onde um número elevado de alelos pode ser detectado quando são analisados em um grande número de indivíduos; (iv) apresentam um elevado nível de informação polimórfica (PIC – *Polymorphism Information Content*), o que permite que toda e qualquer população possa ser analisada (i.e., populações naturais, de melhoramento, de híbridos, etc.); e (v) são transferíveis entre espécies relacionadas por causa da conservação das seqüências que flanqueiam a “ilha” microssatélite (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SOUZA, 2001).

A grande limitação dos marcadores microssatélites está relacionada ao desenvolvimento e desenho de pares de *primers* específicos, os quais demandam etapas que envolvem um trabalho árduo e laborioso na construção de bibliotecas enriquecidas (SOUZA, 2001). Além do custo elevado, o desenvolvimento de marcadores SSR exige que o laboratório a ser trabalhado seja bem equipado e permita a manipulação de organismos geneticamente modificados (OGMs) para a construção de bibliotecas genômicas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; ZANE et al., 2002).

2.4.7 Métodos de Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites

Diversos métodos para o isolamento de marcadores microssatélites foram testados nos últimos anos. Os protocolos tradicionais geralmente são trabalhosos por envolverem a construção de bibliotecas genômicas de DNA para a espécie a ser analisada. Entretanto, outros protocolos com modificações surgiram na tentativa de minimizar custo e tempo (ZANE et al. 2002). Os principais métodos são:

1. Pesquisa em banco de dados: Esta estratégia é limitada para as espécies mais estudadas, geralmente de importância econômica ou científica. Através de seqüências de DNA depositadas em banco de dados, como por exemplo, no GenBank ou EMBL, pode-se fazer a busca pelas seqüências microssatélites e pelas regiões que as flanqueiam para o desenho de *primers*. Esse método é simples, barato e relativamente rápido. Entretanto, seqüências originadas de bibliotecas de EST, por exemplo, podem conter baixo número de polimorfismos, uma vez que os microssatélites são predominantemente encontrados em regiões não transcritas

(RAKOCZY-TROJANOWSKA E BOLIBOK, 2004), exceto em plantas (MORGANTE et al., 2002).

2. Biblioteca genômica não enriquecida: Por este método, uma grande quantidade de DNA deve ser digerida com uma enzima de restrição de corte freqüente. Fragmentos de aproximadamente 200 a 800 pb são selecionados, ligados a adaptadores e inseridos em plasmídeos. Fazem-se a transformação de bactérias, o plaqueamento e a transferência das colônias para uma membrana de nylon. Os clones positivos, contendo fragmentos microssatélites, são selecionados por meio da hibridização da membrana com sondas de repetição. O DNA das colônias positivas é extraído e o sequenciamento dos fragmentos realizado. Os *primers* são desenhados para se anelarem nas regiões que flanqueiam os microssatélites. Este método, considerado tradicional, é mais demorado por causa da dificuldade em se encontrar os SSR em milhares de clones a serem analisados, particularmente em espécies que apresentem baixa freqüência de regiões microssatélites no genoma (ZANE et al. 2002).

3. Biblioteca genômica enriquecida: Este método surgiu como uma alternativa ao tradicional, sendo mais rápido e eficiente na seleção dos clones positivos (KIJAS et al., 1994). O primeiro passo é idêntico ao descrito anteriormente. Depois que o DNA é ligado aos adaptadores, os fragmentos são desnaturados e hibridizados com oligos contendo repetições e marcados com biotina. Os fragmentos hibridizados são capturados utilizando-se contas magnéticas (*beads*) ligadas a estreptavidina e um ímã. Algumas lavagens são feitas para a remoção dos fragmentos não hibridizados e o DNA capturado é amplificado com *primers* que se anelam nos adaptadores. Finalmente os fragmentos enriquecidos são clonados e selecionados por meio de outra hibridização das colônias com sondas microssatélites. O sequenciamento e o desenho dos *primers* são, então, realizados.

4. Via amplificação com primers RAPD: Para evitar a construção de bibliotecas genômicas, uma alternativa é amplificar o DNA com *primers* RAPD, correr géis de agarose e fazer a transferência e hibridização de Southern dos fragmentos amplificados com sondas microssatélites. Os marcadores com bandas positivas devem ser corridos novamente, excisados do gel e purificados para a clonagem dos

fragmentos e sequenciamento. Segundo Cifarelli et al. (1995), os fragmentos RAPD parecem conter grande quantidade de repetições microssatélites. Entretanto, esta técnica apresenta limitações, pois se deve amplificar o DNA com um grande número de *primers* e fazer Southernns seqüenciais para se obter uma elevada quantidade de bandas positivas para o sequenciamento.

3. CAPÍTULO 1

DIVERSIDADE GENÉTICA DE MICROSSATÉLITES GENÔMICOS E DE EST (*Expressed Sequence Tags*) EM HÍBRIDOS DE *Eucalyptus spp.*

Fernanda Barbosa Cupertino, Jeiza Botelho Leal, Ronan Xavier Corrêa e
Fernanda Amato Gaiotto.

*Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus,
BA. Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, Salobrinho, Ilhéus/BA, Brasil. CEP 045650-000.*

Resumo

De uma grande importância econômica, a árvore do gênero *Eucalyptus* é hoje a mais plantada em todo o mundo. Diante de tantas aplicabilidades no setor industrial, o *Eucalyptus* é largamente submetido a programas de melhoramento genético, no qual híbridos podem ser produzidos para reunir as melhores características de qualidade da madeira, produção, resistência a doenças, dentre outras. Entretanto, o conhecimento do impacto do melhoramento sobre a diversidade genética dos híbridos de *Eucalyptus* é crucial para a exploração de recursos genéticos. Dessa forma, neste trabalho foram estimados parâmetros de polimorfismo genético por meio de 10 marcadores SSR genômicos e de 10 SSR-EST (*Expressed Sequence Tags*), com o objetivo de conhecer o perfil da variabilidade genética em 112 híbridos de *Eucalyptus spp* e comparar a diversidade genética gerada entre esses dois tipos de marcadores. Os resultados mostraram que, de acordo com o teste t-student, não há diferenças significativas entre marcadores SSR genômicos e SSR-EST, os quais revelaram número médio de alelos por loco igual a 14,9 e 19,7, e PIC médio de 0,8721 e 0,8481, respectivamente, mostrando que existe um grande nível de polimorfismos nos híbridos analisados. O elevado poder discriminatório dos marcadores microsatélites foi medido pelos valores combinados dos parâmetros “I” ($2,4153 \times 10^{-14}$ e $5,2652 \times 10^{-15}$, respectivamente) e “Q” (99,99% em ambos os marcadores), indicando que eles são apropriados para serem utilizados em diversos estudos inseridos em programas de melhoramento genético, principalmente os SSR-EST para o mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*).

Palavras-chave: *Eucalyptus*, SSR, melhoramento, diversidade alélica.

1. Introdução

O eucalipto é uma árvore nativa da Austrália e a mais plantada por todo o mundo, chegando a ocupar cerca de 12 milhões de hectares (TURNBULL, 1999). Pertencente à família *Myrtaceae*, o subgênero *Symphyomyrtus* inclui as espécies de *Eucalyptus* mais importantes comercialmente, entre elas, *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis* e *E. globulus* (ELDRIDGE et al., 1994). A madeira de eucalipto apresenta uma elevada demanda por causa da sua grande utilização em diversos ramos industriais, dentre os quais estão a produção de papel e celulose, carvão, resina, látex, cosméticos e essências (CAMPINHOS, 1999; GRATTAPAGLIA, 2004).

As principais espécies de *Eucalyptus* vêm sendo submetidas a programas de melhoramento genético tradicionais, os quais visam a exploração de recursos genéticos e a seleção de fenótipos favoráveis para a melhoria ou aumento da produtividade dos caracteres de interesse (POKE et al., 2005). A hibridação é muito utilizada para a combinação de características desejáveis que não podem ser obtidas em espécies puras, além de proporcionar heterose ou “vigor híbrido” (ELDRIDGE et al., 1994). Entretanto, pouco se conhece sobre os impactos do melhoramento genético e, ou da silvicultura sobre a diversidade genética de plantas, os quais podem ser resultar em depressão por endogamia (ELDRIDGE et al., 1994).

Diversos tipos de marcadores moleculares são amplamente empregados em estudos de diversidade genética (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) têm sido utilizados na caracterização da variabilidade genética em espécies arbóreas (YAZDANI et al., 2003), e são considerados ferramentas moleculares poderosas por revelarem um altíssimo nível de polimorfismos, além de apresentarem alelismo múltiplo, reprodutibilidade, codominância (POWELL et al., 1996) e ampla distribuição no genoma, podendo ser encontrados abundantemente em regiões não-codificantes, embora também estejam presentes em regiões transcritas (VARSHNEY et al., 2005). Também podem ser rapidamente amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e genotipados por meio de reações multiplex, utilizando-se *primers* marcados com fluorescência (BRONDANI et al., 1998).

Microssatélites presentes em regiões expressas do genoma (*Expressed Sequence Tags*) ou SSR-EST podem ser facilmente obtidos por causa da

disponibilidade de seqüências diversas depositadas em bancos de dados *online* (GenBank). Os SSR-EST apresentam algumas vantagens sobre os SSR genômicos, pois podem ser facilmente transferidos entre espécies de mesmo gênero, uma vez que as regiões gênicas são mais conservadas do que outras do genoma (VARSHNEY et al., 2005). Além disso, os SSR-EST produzem bandas de maior qualidade e intensidade, sem a presença de *stuttering* (VARSHNEY et al., 2005), que é uma série de bandas inespecíficas e indistintas, comuns em locos SSR genômicos (HOSBINO et al., 2002).

O conhecimento da variabilidade genética em populações submetidas ao melhoramento pode ser crucial para a exploração dos recursos genéticos e para a identificação do padrão molecular (*fingerprinting*) de genótipos de interesse, os quais levam à maior eficiência dos próprios programas de melhoramento genético (MILACH, 1998). Tendo em vista tal necessidade e com a disponibilidade de marcadores SSR genômicos e SSR-EST, o objetivo desse trabalho foi estudar a diversidade alélica em híbridos de *Eucalyptus spp*, com marcadores microsatélites genômicos e de EST, estabelecendo uma comparação entre eles através de parâmetros genéticos populacionais e indicadores de poder discriminatório entre indivíduos relacionados.

2. Materiais e Métodos

Material Vegetal e Extração de DNA

Amostras de folhas de um total de 112 indivíduos híbridos de *Eucalyptus spp* foram coletadas aleatoriamente em um campo, onde foram plantados homoganeamente progênies de 14 famílias intra e interespecíficas, sendo que cinco espécies estão envolvidas (*E. grandis*, *E. urophylla*, *E. dunnii*, *E. globulus* e *E. camaldulensis*). O DNA genômico foi extraído das folhas de acordo com o protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998).

Obtenção de dados genéticos

Um total de 20 pares de *primers* microssatélites (10 SSR genômicos e 10 SSR-EST) previamente desenvolvidos para *E. grandis* e *E. urophylla* (Mamani, E.; Tristan, R., dados não publicados), foram amplificados. As reações de PCR continham 7,5 ng de DNA genômico, 0,25 mM de dNTPs, 0,75 mM de MgCl₂, tampão 1X (Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM pH 8,3), 0,25 mg/ml de BSA, 0.2 µM de cada *primer*, sendo um deles marcado com fluorocromo (6-FAM, HEX, ou NED), e 1 U de Taq DNA polymerase, totalizando o volume final de 13 µl. As amplificações foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR System 9600, usando as seguintes etapas: 1 ciclo de 96 °C por 2 min; 30 ciclos de 94 °C por 1 min; a temperatura específica do *primer* por 1 min; 72 °C por 1 min; e a extensão final com 72 °C por 7 min. Alguns locos foram amplificados juntos, em sistemas multiplex, de acordo com o programa Multiplexer (COELHO, 2005). Para os locos amplificados separadamente, iguais volumes dos produtos de PCR foram diluídos e 2 µl deles foram misturados em 3 µl de solução de LB-ROX (2,5 µl de tampão de carregamento 1:5 formamida deionizada e 0,5 µl de DNA interno padrão marcado com fluorescência) (BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001), os quais 2 µl dessa mistura foram carregados em gel de poliacrilamida desnaturante a 4%. As eletroforeses dos fragmentos foram realizadas no sequenciador automático ABI 377-XL (Applied Biosystems) utilizando-se filtro virtual D, e os programas computacionais Genescan® v3.1 e Genotyper® v2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA) para a leitura dos picos respectivos aos genótipos de cada indivíduo analisado.

Análises Genéticas

O número de alelos por loco “A” foi estimado com o auxílio do programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2000). Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram estimados de acordo com Anderson et al. (1993) para cada loco e a média foi comparada entre marcadores SSR genômicos e de EST, utilizando-se o teste t-student (Programa SPSS v. 10). Para mostrar o poder de discriminação desses dois tipos de marcadores, foram calculadas a probabilidade de identidade “I” e a probabilidade de exclusão de paternidade “Q”, com base nos modelos de Paetkau et al. (1995) e Weir (1996), respectivamente. O desequilíbrio de ligação dos locos foi testado para as duas baterias de marcadores microssatélites, segundo o teste Exato

($p < 0,05$), utilizando-se o programa GDA. Todos os locos foram avaliados quanto a transferibilidade nos híbridos estudados.

3. Resultados e Discussão

Os 20 locos microssatélites amplificados em uma população de híbridos de *Eucalyptus spp*, geraram ao todo 346 alelos, com um número médio de 17,3 alelos por loco. Comparando-se os parâmetros gerados pelos marcadores SSR genômicos e de EST (Tabela 1), observa-se que o número médio de alelos foi evidentemente maior nesses últimos (14,9 contra 19,7, respectivamente), embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa, segundo o teste t ($p > 0,05$) (Tabela 2). Todos os 10 microssatélites genômicos mostraram-se altamente polimórficos, com valores de PIC maiores que 0,84. Os marcadores microssatélites de EST apresentaram-se bastante polimórficos, sendo que somente dois deles apresentaram PIC menor que 0,80 (Embra945 e Embra949) (Tabela 1). Também não houve diferenças significativas entre esses dois tipos de marcadores para a média deste parâmetro, sendo de 0,87 nos SSR genômicos e de 0,84 nos SSR-EST (Tabela 2).

Alguns estudos comparativos anteriores demonstraram que as medidas de variabilidade genética em plantas são, em geral, maiores em microssatélites genômicos do que em EST, como por exemplo, em arroz (CHO et al., 2000), pinho (LIEWLAKSANEEYANAWIN et al., 2004) e trigo (EUJAYL et al., 2001). Este fato é explicado por causa da grande conservação das seqüências codificantes e, ou expressas do genoma. Assim, os marcadores SSR-EST tendem a apresentar menor polimorfismo genético quando comparados com o SSR genômicos (VARSHNEY et al., 2005). Já as regiões não codificantes são mais suscetíveis às taxas mutacionais, as quais podem variar em cerca de 10^{-2} a 10^{-6} (HANCOCK, 1999). Em nosso estudo, percebemos que não houve diferenças significativas nos parâmetros que revelam diversidade alélica para os dois tipos de marcadores microssatélites estudados. Os SSR-EST foram tão polimórficos quantos os SSR genômicos, confirmando a potencialidade desses marcadores na distinção de indivíduos aparentados, testes de parentesco e diversidade genética.

Tabela 1 – Parâmetros genéticos de microssatélites genômicos e de EST. A = número médio de alelos. PIC= Conteúdo de Informação Polimórfica.

Locus	Motivo	Tamanho do fragmento (pb)	A	PIC
<i>SSR genômicos</i>				
Embra604	(GAAA) ₁₆	215-259	17	0,8830
Embra623	(GAG) ₉	205-237	14	0,9217
Embra627	(CT) ₁₈	225-255	15	0,8488
Embra632	(CTT) ₁₀ (CT) ₁₅	216-260	20	0,9139
Embra645	(AG) ₁₁	190-228	15	0,8866
Embra646	(GA) ₁₇	140-164	12	0,8679
Embra648	(TC) ₁₃	149-196	12	0,8531
Embra651	(AG) ₁₇	92-118	12	0,8544
Embra665	(GA) ₁₃	128-156	14	0,8443
Embra679	(AG) ₁₁	257-296	18	0,8477
<i>Média</i>			<i>14,9</i>	<i>0,8721</i>
<i>SSR-EST</i>				
Embra844	(TC) ₂₀	192-237	27	0,9253
Embra915	(CCCT) ₅	201-235	20	0,9065
Embra941	(CT) ₁₆	231-256	16	0,8839
Embra945	(AG) ₁₁	90-109	9	0,5344
Embra949	(CT) ₁₆	265-286	9	0,7709
Embra950	(CTCG) ₄	156-199	30	0,9397
Embra954	(CTGC) ₄	128-191	26	0,8968
Embra979	(CT) ₁₇	375-409	19	0,8498
Embra1213	(CT) ₉	82-109	10	0,8607
Embra1445	(AG) ₆	99-147	31	0,9131
<i>Média</i>			<i>19,7</i>	<i>0,8481</i>

Tabela 2 – Teste de comparação de médias dos parâmetros A (número médio de alelos por loco) e PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) dos dois tipos de marcadores SSR.

Parâmetros	Média	Desvio padrão	t₍₉₎*	p-valor
<i>A</i>				
SSR genômicos	14,9	2,73	- 1,593	0,146
SSR-EST	19,7	8,59		
<i>PIC</i>				
SSR genômicos	0,8721	0,0282	0,559	0,590
SSR-EST	0,8481	0,1202		

* Teste t-student, $\alpha = 0,05$.

Não foi encontrada nenhuma relação do número de repetições de nucleotídeos *in tandem* e do número de alelos com o nível de polimorfismo nos híbridos de *Eucalyptus* estudados. Os maiores valores de PIC encontrados nos marcadores microssatélites genômicos foi o de repetição perfeita de trinucleotídeo (GAG)₉ (Embra 623) e o de repetição composta (CTT)₁₀(CT)₁₅ (Embra632) (Tabela 1), enquanto que para os SSR-EST, os maiores valores de conteúdo de informação genética foram revelados por repetições de di- (TC)₂₀ (Embra844) e tetranucleotídeos (CTCG)₄ (Embra950) (Tabela 1). Muitos estudos em plantas já relataram uma correlação positiva entre diversidade genética e o número de repetições em tandem (CHO et al., 2001; LIEWLAKSANEEYANAWIN et al., 2004). O número de alelos detectados e o comprimento do motivo de um SSR também são correlacionados (GUPTA et al., 1996).

Outros dois parâmetros genéticos também foram estimados para avaliar a capacidade discriminatória entre indivíduos relacionados com dois tipos de marcadores microssatélites (Tabela 3). A probabilidade de identidade (I) variou de 0,014 (Embra632) a 0,35 (Embra679) nos locos SSR genômicos, enquanto que nos SSR-EST, o I variou de 0,007 (Embra950) a 0,28 (Embra844). De acordo com o teste exato ($p < 0,05$), tanto os locos SSR genômicos e de EST são independentes e, portanto, estão em equilíbrio de ligação. Dessa forma, o valor de I combinado de 10 locos revelou que a probabilidade de se encontrar dois indivíduos com o mesmo genótipo em uma população é praticamente nula ($I < 0,00$), utilizando-se uma das duas baterias de marcadores microssatélites (Tabela 3). A probabilidade de exclusão de paternidade (Q) variou de 0,66 (Embra623) a 0,83 (Embra632) nos SSR genômicos, e de 0,34 (Embra945) a 0,88 (Embra 950) nos SSR-EST (Tabela 3). O valor de Q combinado de 10 locos foi maior que 99,99% para ambas as baterias microssatélites, confirmando que elas são ferramentas eficientes e apropriadas para serem utilizadas em testes de paternidade e maternidade e discriminação de indivíduos de *Eucalyptus*.

O alto poder discriminatório dos marcadores microssatélites foi similar aos estudados por Kirst et al. (2005) em uma população de melhoramento de *E. grandis*, onde 6 SSR genômicos apresentaram valores combinados de $I = 2 \times 10^{-9}$ e $Q = 99,99\%$; e aos estudados por Ottewell et al. (2005) em duas populações naturais de *E. leucoxyton*, com 9 SSR genômicos (I combinado igual a 7×10^{-11} e Q combinado

igual a 99,99%). Em nosso estudo, pudemos visualizar a potencialidade das duas baterias de marcadores SSR, mesmo em indivíduos altamente relacionados como nesta população de híbridos, onde estão envolvidas cinco espécies (*E. grandis*, *E. urophylla*, *E. dunni*, *E. camaldulensis*, *E. globulus*).

Tabela 3 – Parâmetros de informação genética. I= probabilidade de identidade genética. Q= probabilidade de exclusão de paternidade

SSR Genômicos	I	Q	SSR-EST	I	Q
Embra604	0,0235	0,7775	Embra844	0,2793	0,8552
Embra623	0,0315	0,6611	Embra915	0,0157	0,7751
Embra627	0,0381	0,7179	Embra941	0,0235	0,7785
Embra632	0,0137	0,8318	Embra945	0,2501	0,3399
Embra645	0,0236	0,7807	Embra949	0,0858	0,5855
Embra646	0,1391	0,7459	Embra950	0,0067	0,8819
Embra648	0,0368	0,7231	Embra954	0,0191	0,8059
Embra651	0,0359	0,7262	Embra979	0,0383	0,7182
Embra665	0,0412	0,7082	Embra1213	0,0356	0,7298
Embra679	0,3514	0,7177	Embra1445	0,0136	0,8321
Valor Combinado	$2,4153 \times 10^{-14}$	0,9999	Valor Combinado	$5,2652 \times 10^{-15}$	0,9999

Todos os 20 marcadores microssatélites previamente desenvolvidos para *E. grandis* e *E. urophylla* (Mamani, E.; Tristan, R.; dados não publicados) amplificaram muito bem nos híbridos estudados, mostrando o sucesso da transferibilidade desses marcadores em espécies híbridas de *Eucalyptus*, principalmente nestas pertencentes ao subgênero *Symphyomyrtus*. Byrne et al. (1996) e Marques et al. (2002) relataram alta taxa de transferibilidade de marcadores microssatélites em espécies de *Eucalyptus* do mesmo subgênero, e em menor proporção em espécies de subgêneros diferentes, como *Corymbia* (JONES et al., 2001). A alta transferibilidade de marcadores SSR entre espécies pode ocorrer por causa da grande conservação das seqüências que flanqueiam as repetições microssatélites, principalmente em espécies de mesmo subgênero, embora isto possa ocorrer também entre subgêneros (POKE et al., 2005).

Enfim, foi observada alta diversidade genética entre os híbridos de *Eucalyptus spp* estudados, tanto em regiões microssatélites genômicas, como em EST.

Espécies híbridas, além de apresentarem maior diversidade genética (POTTS; DUNGEY, 2004), proporcionam vantagens no melhoramento genético, por reunirem as melhores características de interesse. Os 20 marcadores microssatélites analisados foram altamente polimórficos, principalmente os SSR-EST, e são considerados adequados para serem utilizados no mapeamento de QTL, pois possibilitam a mensuração do número de locos quantitativos envolvidos em uma determinada herança genética (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A existência de polimorfismos que flanqueiam os locos responsáveis pelas características de interesse pode contribuir sobremaneira para os estudos de mapeamento de QTL e para os programas de melhoramento genético.

4. Conclusões

Não houve diferenças significativas entre marcadores SSR genômicos e SSR-EST para os parâmetros de diversidade analisados, os quais apresentaram excelente nível de polimorfismos. Ambas as baterias analisadas revelaram grande poder discriminatório entre os indivíduos, podendo ser utilizados em quaisquer estudos que envolvam o mapeamento genético de QTL.

Referências Bibliográficas

ANDERSON, J.A.; CHURCHILL, G.A.; SUTRIQUE, J.E.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**, 36, p.181-186, 1993.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; THARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, 97, p.816-827, 1998.

BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Cost-Effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. **BioTechniques**, 31, p.793-800, 2001.

BYRNE, M.; MARQUES-GARCIA, M.I.; UREN, T.; SMITH, D.S.; MORAN, G.F. Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. **Australian Journal Botany**, 44, p.331-341, 1996.

CAMPINHOS, E. Sustainable plantations of high-yield shape *Eucalyptus* trees for production of fiber: the Aracruz case. **New Forests**, 17, p.129-143, 1999.

CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, 61, n.2, p.89-100, 2002.

CHO, Y.G.; ISHII, T.; TEMNYKH, S.; CHEN, X.; LIPOVICH, L.; MCCOUCH, S.R.; PARK, W.D.; AYRES, N.; CARTINHO, S. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 100, p.713-722, 2000.

COELHO, A.S.G.. **Multiplexer v. 4.0**: A software for the design of multiplex SSR reactions. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil. 2005.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; WYK, G.V. **Eucalypt domestication and breeding**. New York: Oxford University Press Inc, 1994. 288p.

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**, 119, p.39-43, 2001.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª edição. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

GLAUBITZ, J.C.; WU, H.X.; MORAN, G.F. Impacts of silviculture on genetic diversity in the native forest species *Eucalyptus sieberi*. **Conservation Genetics**, 4, p.275-287, 2003.

GRATTAPAGLIA, D. Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. **Genetics and Molecular Research**, 3, p.369-379, 2004.

GUPTA, P.K.; BALYAN, H.S.; SHARMA, P.C.; RAMESH, B. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Science**, 70, 1, p.45-54, 1996.

HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In GOLDESTINE, D.B.; SCHLOTTERER, C. (Eds) **Microsatellites, Evolution and Applications**. Oxford, NY: Oxford University Press, 1999. p.1-9.

HOSBINO, A.A.; PALMIERI, D.A.; BRAVO, J.P.; PEREIRA, T.E.B.; LOPES, C.R., GIMENES, M.A. Marcador microssatélite na conservação do germoplasma vegetal. **Biociência**, 29, p.146-150, 2002.

JONES, M.E.; STOKOE, R.L.; CROSS, M.J.; SCOTT, L.J.; MAGUIRE, T.L.; SHEPHERD, M. Isolation of microsatellite loci from spotted gum (*Corymbia variegata*), and cross-species amplification in *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Molecular Ecology Notes**, 1, n.4, p.276-278, 2001.

KIRST, M.; CORDEIRO, C.M.; REZENDE, G.D.S.P.; GRATTAPAGLIA, D. Power of microsatellite markers for fingerprint and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. **Journal of Heredity**, 96, p.161-166, 2005.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis**: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). 2000. Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>

LIEWLAKSANEEYANAWIN, C.; RITLAND, C.R.; EL-KASSABY, Y.A.; RITLAND, K. Single-copy, species transferable microsatellite markers developed from loblolly pine. **Theoretical and Applied Genetics**, 109, p.361-369, 2004.

MARQUES, C.M.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Conservation and synteny of SSR loci and QTLs for vegetative propagation in four *Eucalyptus* species. **Theoretical and Applied Genetics**, 105, p.474-478, 2002.

MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA: Aplicações no melhoramento de plantas. **Biociência**, 5, p.14-17, 1998.

OTEWELL, K.M.; DONNELLAN, S.C.; MORAN, G.F.; PATON, D.C. Multiplexed Microsatellite markers for the genetic analysis of *Eucalyptus leucoxylon* (Myrtaceae) and their utility for ecological and breeding studies in other *Eucalyptus* species. **Journal of Heredity**, 96, p.445-451, 2005.

PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLINGT, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, 4, p.347-354, 1995.

POKE, F.S.; VAILLANCOURT, R.E.; POTTS, B.M.; REID, J.B. Genomic Research in *Eucalyptus*. **Genomics**, 125, p.79-101, 2005.

POTTS, B.M.; DUNGEY, H.S. Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. **New Forests**, 27, p.115-138, 2004.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeat. **Trends in Plant Science**, 1, 7, p.215-222, 1996.

TURNBULL, J.W. Eucalypt plantations. **New Forests**, 17, p.37-52, 1999.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, 23, 1, p.48-55, 2005.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1996. 445p.

YAZDANI, R., SCOTTI, I., JANSSON, G., PLOMION, C. and MATHUR, G. Inheritance and diversity of simple sequence repeat (SSR) microsatellite markers in various families of *Picea abies*. **Hereditas**, 138, p.219-227, 2003.

4. CAPÍTULO 2

PARENTAGE TESTING OF HYBRID FULL SIB FAMILIES OF *Eucalyptus* WITH MICROSATELLITES**

Cupertino, F. B., Leal, J. B., Vidal, P. O. and Gaiotto, F. A.*

Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Santa Cruz.

*Corresponding author: *Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Santa Cruz. Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, Salobrinho, Ilhéus/BA, Brasil. CEP 045662-000. (phone: 55-73-3680-5055; fax: 55-73-3680-5226. E-mail: gaiotto@uesc.br).*

Running Title: Parentage testing with microsatellites

Abstract

We report a parentage verification study carried out on 14 full sib families of *Eucalyptus* species. Certification of the correct paternity and maternity is a key step in correctly estimating quantitative genetics parameters as well as efficiently genotyping for map construction and phenotype assessment. We used six microsatellite markers for this certification. Out of 305 progeny individuals, 78.03% were correctly assigned to the alleged mother/father trees. Variable levels of contamination were detected in 10 of the 14 families. Alternative pollen parents could be identified among the parent trees tested for 4.5% of the offspring, revealing possible mislabeling in controlled crosses. The identification of several participating pollen-parents in some families suggests pollen and/or seed mixture. This study showed that the current controlled pollination methods employed in *Eucalyptus* are subject to errors. Parentage certification should be used on a routine basis in controlled crossing operations, especially when families are to be used for QTL mapping.

Key-words: *Eucalyptus*/ SSR markers/ paternity/ maternity/ contamination/
pollination

** Article submitted to Annals of Forest Science

1. Introduction

Trees of the genus *Eucalyptus* are the most widely planted in the world, according to Turnbull [23]. Wood is the main raw material in cellulose and paper production, in addition to its being used for civil construction, steelworks, firewood, resin and latex industries, and cosmetics and cleaning products, among other uses [6, 14]. It is estimated that there are 12 million hectares of planted eucalypt forests in the world [6, 23]. In Brazil alone, three million hectares of the main *Eucalyptus* clones are planted by the forestry companies and industries [18].

Controlled crosses have been successfully applied to produce *Eucalyptus* hybrids, through the 'one stop pollination' method [16] and its efficiency has been supported by previous studies [22]. This method has revolutionized *Eucalyptus* breeding programs because controlled crosses and hybrid seed production can be performed effectively by paper and cellulose companies. Before 'one stop pollination', many *Eucalyptus* breeding programs used open-pollination methods, which did not permit the precise estimation of genetic parameters. Often heritability was overestimated and selection was not accurate [11].

Since controlled pollination has been used on a large scale in the *Eucalyptus* breeding program, we questioned if there are faults in the production of true full sib families. The production of contaminant descendants can result in biased quantitative genetic parameters estimates such as the proportions of additive and non-additive genetic variances, heritability, genetic and phenotypic correlation. These are crucial estimates to obtain a realistic appraisal of the rate and magnitude of the improvement achieved by selection and to compare possible alternative strategies in breeding programs [11].

The increasing demand of eucalypt wood has made breeders and researchers adopt breeding strategies that improve wood quality and its production. Among these strategies, great research projects in *Eucalyptus* have been outstanding in determining the molecular bases of wood growth and disease resistance. Aiming to further expand this molecular knowledge, QTL mapping were begun, to the identification of loci for agronomic and economically important traits in many hybrid *Eucalyptus* breeding families [14, 19].

The construction of high-resolution QTL maps is a laborious activity. The choice of parents and mapping populations is one of the most important steps in the

process, because it depends on recombination estimates and strategies, selection of the number of individuals to be mapped and field maintenance [21]. In general, a large number of offspring is genotyped with a few hundred highly polymorphic molecular markers, for example microsatellites. This procedure requires a lot of effort and specialized professionals in a well-equipped laboratory. Because of increased genotyping costs – about US\$ 3 per microsatellite genotype [9] and growing it is important to certify paternity and maternity in offspring that will be used for linkage mapping, avoiding extra genotyping costs due to illegitimate and/or contaminating progeny.

The appropriate number of offspring used to construct a linkage map depends on the costs of the genotyping and phenotyping of individuals and varies from 15 to 25% of the total progeny produced by a maternal tree in the reproductive field [9]. If there is a significant contamination percentage within the total of progeny due to pollination, planting or collecting errors, it could mean increased mapping costs, as well as unnecessary effort and time spent. Moreover, the estimates of contamination with 'one stop pollination' method can help breeders and researchers to collect a large number of plants, guaranteeing the appropriate number of progeny to be genotyped for linkage maps construction. This study aimed to verify parentage in a set of taken 14 interspecific hybrid *Eucalyptus* families, in order to estimate rates of illegitimate paternity and maternity.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and DNA Isolation

Leaves of 21 or 22 offspring from each 14 *Eucalyptus* breeding families were collected, in progeny tests, totalizing 305 individuals. Interspecific families, parental species and the number of progeny for each family are described in Table 1. The genomic DNA of nine parents (Table 1) and their progenies was extracted from the leaves according to the protocol described by Ferreira and Grattapaglia [12].

2.2. Microsatellite Genotyping

Six microsatellite markers previously developed for *E. grandis* and *E. urophylla* (EMBRA604, EMBRA623, EMBRA627, EMBRA645, EMBRA646 and EMBRA665) were amplified in the nine parents and in the 305 offspring sampled. The sequences of the primers are available on GenBank (Tristan, R., 2007). The PCR cocktail (13 μ l) contained 7.5 ng of genomic DNA, 250 μ mol.L⁻¹ dNTPs, 1 X PCR buffer (10 mmol.L⁻¹ Tris-HCl, 50 mmol.L⁻¹ KCl, 2.25 mmol.L⁻¹ MgCl₂ pH 8.3), 2.5 μ g/ μ l BSA, 0.2 μ mol.L⁻¹ of each primer, one of them dye-labeled (6-FAM, HEX, or NED dyes), and 1 U of Taq DNA polymerase. Amplifications were performed using the GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems) thermal controller, using the following protocol: 96 °C for 2 minutes; 30 cycles at 94 °C for 1 minute, the primer-specific annealing temperature for 1 minute, 72 °C for 1 minute, and a final extension at 72 °C for 7 minutes. Loci were amplified in single and duplex systems, according to the Multiplexer Program [8], and were carried out in duplex and tetraplex systems in electrophoresis gel. For each multiplex, equal quantities of PCR product were diluted and 2 μ l of each was mixed with 3 μ l of LB-ROX mix (2.5 μ l of loading buffer 1:5 deionized formamide and 0.5 μ l of an internal fluorescent labeled DNA standard) [3]. Electrophoresis and fragment sizing was carried out with an automated DNA Sequencer ABI 377 (Applied Biosystems) with the virtual filter D, using the software Genescan® v3.1 and Genotyper® v2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA) for reading the peaks of each individual genotype analyzed.

2.3. Paternity and maternity testing

Determination of maternity and paternity in each family was made using the comparison of offspring and parent genotypes. Exclusion was declared only when the obligatory paternal or maternal allele in the progeny tree was not present at two or more loci, in order to avoid false exclusions due to mutation of the microsatellite alleles. Because of the small number of parents, a deterministic approach was used and no probability calculation for declaration of the paternity exclusion was carried out. Offspring that did not share the obligatory paternal or maternal allele at two or more loci was declared as a contaminant. For these individuals, we tried to identify another pollen-parent among the nine parents studied, using the same genotypic

data obtained with the six microsatellite markers. We calculated the percentage of the legitimate and illegitimate progeny individuals found in the analyzed families.

3. Results

The paternity and maternity exclusion criterion is represented in Figure 1. Figures 1a and 1b show the alleles of the DG and UGL parents, respectively. Figure 1c shows the alleles of a legitimate offspring, which were inherited from both parents (DG and UGL). An illegitimate individual that did not carry any alleles corresponding to the parental alleles at this locus is displayed in Figure 1d. This individual was characterized as a “contaminant” within its family. According to this criterion, out of 305 individuals tested, 238 (78%) had their correct paternity and maternity confirmed, therefore, they are legitimate offspring. Sixty-seven individuals (22%) were considered contaminants because they exhibited mismatches with the seed or pollen parent of the families to which they belong. Among the illegitimate individuals, 14 (4.5%) were derived from another parent that was identified among the nine parents used in this study and 53 (17.4%) had undetermined parentage due to pollen contamination.

In Table 2, maternity and paternity determinations of each family are specified. Almost all the maternities of individuals were confirmed, with few exceptions. The number of individuals that had paternity confirmed is showed in Table 2 and, in most of cases, represents a large percentage of the sampled families. Only four families (DG x C1, DG x U2, U2 x C1 and C1 x C2) were composed exclusively by legitimate offsprings; 10 of the 14 families studied here showed some level of contamination. Alternative pollen parents were identified in some families and others could not be determined in our sample. Only 4.6% of the illegitimate offsprings did not have both the maternal and paternal parent identified and the number of individuals in this situation was the largest in the U1 x GL2 family.

For most of the families that exhibited contamination, we identified alternative pollen parents for the progenies (Table 3). Except GL1, all parents were determined, at least once, as being pollen parents of progeny in families where they were not originally used as parents. The U1 x UGL cross had the greatest number of

contaminant individuals and the U1 x GL2 family showed the largest number of alternative pollen-parents (Table 3).

4. Discussion

Biased genetic parameters estimations obtained during selection process can be reduced with the certification of contamination in families under an improvement program. The identification of contaminants in full sib families can also help to reduce wastes and costs of basic research that involves genetic linkage mapping and QTL maps construction [14], beyond monitoring how controlled crosses are being done. Paternity and maternity testing with this propose has never been reported before and this may just be the first time that this process is reported separately as a previous study to the linkage mapping.

Other studies confirmed the efficiency of microsatellite markers in similar studies related to breeding programs. Kirst et al. [17] tested the power of six SSR markers in a breeding population of *E. grandis* for parentage analysis. In the same way, Bell et al. [1] monitored the genetic quality of breeding program of *Pinus radiata* analyzing the fidelity of clones and families by paternity testing with ten SSR markers. Microsatellite markers have ever been used in large scale for linkage maps in species of *Eucalyptus* [2, 4].

The paternity exclusion criterion used here is the same used by Grattapaglia et al. [15] in the analysis of samples from *E. grandis* x *E. urophylla* progenies. They used 14 microsatellite markers, and emphasized that a small number of informative microsatellite loci can be used for this kind of analysis depending on the number of parents involved. Generally, more parents demand more markers. Dow and Ashley [10] used four microsatellite markers in a paternity study to verify the gene flow in oak. In our study we used six high informative microsatellite markers to perform the paternity tests. We also used few markers because the limited number of possible parents of families permits the use of a small number of microsatellite markers. For example, a highly informative triplex could be used in a “pre-map” of a breeding family compounded of a great number of individuals.

The paternity exclusion criterion was considered effective because of the high percentage of identified parents (78%). In four crosses (DG x C1, DG x U2, U2 x C1

and C1 x C2) the alleged maternity and paternity was confirmed because we did not find any illegitimate offsprings in the samples, showing that the controlled pollination practice was done correctly in these families (Table 2). For most of the illegitimate individuals, only pollen parent exclusions were seen, since almost all tested maternities were correct.

For some of the families that had illegitimate individuals we detected up to four alternative pollen parents (Table 3), suggesting contamination due to pollen mixture, or failure to isolate flowers from external pollen sources. Contaminations by outside pollen probably occurred given that we did not identify the paternity of some individuals. In only a small number of individuals (4.6%) from four families (DG x GL2, U1 x UGL, U1 x C2 and U1 x GL2), both mothers and fathers were excluded (Table 2). This situation could have occurred because of wrongful tree identification or seed mixture.

The identification of illegitimate offspring in controlled crosses has been reported in other studies, for example, in pine crosses [24]. Bell et al. [1] found 8.4% of incorrect progeny of ten *Pinus* families. Contamination was also described in *E. urophylla* [15] and *E. grandis* populations [7] by paternity tests with microsatellite markers and showed that the isolation of seed orchards is inefficient, a fact that confirms the great capacity of pollen dispersion and the high outcrossing rates of the *Eucalyptus* species [5, 13].

In conclusion, controlled cross contamination estimates of economically important species, by paternity tests, can be useful to breeders and researches to evaluate the efficiency of pollination strategies and monitor the quality of controlled crosses programs. Moreover, the knowledge of the number of illegitimate individuals in breeding families can allow the precise estimation of genetic parameters. Beyond this, we suggest a recalculation of the number of offspring that should be genotyped for mapping, considering the low contamination percentage found in some families.

Acknowledgments: We acknowledge the support given by the Brazilian Ministry of Science and Technology, the Brazilian National Research Council, CNPq, for the M.Sc. fellowship for F.B.C., the Bahia State Foundation for Research Support, FAPESB, for financial support. Special thanks to Dario Grattapaglia from Cenargen/Embrapa for suggestions on the manuscript. We also thank Alexandre

Coelho from the Universidade Federal de Goiás and Eva Mamani from the Universidade de Brasília.

References

[1] Bell, J.C., Powell, M., Devey, M.E., Moran, G. F., DNA profiling, pedigree lineage analysis and monitoring in the Australian breeding program of radiata pine, *Silvae Genetica*, 53, 3 (2004) 130-134.

[2] Brondani, R.P.V., Brondani, C., Tharchini, R., Grattapaglia, D., Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*, *Theor. Appl. Genet.* 97 (1998) 816-827.

[3] Brondani, R.P.V., Grattapaglia, D., Cost-Effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing, *BioTechniques* 31 (2001) 793-800.

[4] Brondani, R.P.V., Brondani, C., Grattapaglia, D., Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers, *Mol. Gen. Genom.* 267 (2002) 338-347.

[5] Butcher, P.A., Williams, E.R., Variation in outcrossing rates and growth in *Eucalyptus camaldulensis* from the Petford region, Queensland; evidence of outbreeding depression, *Silvae Genetica* 51(2002.) 6-12.

[6] Campinhos, E., Sustainable plantations of high-yield shape Eucalyptus trees for production of fiber: the Aracruz case, *New Forests* 17 (1999) 129-143.

[7] Chaix, G., Gerber, S., Rezafimaharo, V., Vigneron, P., Verhaegen, D., Hamon, S., Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*, *Theor. Appl. Genet.* 107 (2003) 705-712.

- [8] Coelho, A.S.G. Multiplexer v. 4.0 - A software for the design of multiplex SSR reactions. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil. 2005.
- [9] Crawford, A.M., Dodds, K.G., Mcewan, J.C., DNA markers, genetic maps and the identification of QTL: general principles, in Axford, R.F.E., Bishop, S.C., Nicholas, F.W. and Owen J.B. (eds), Breeding for Disease Resistance in Farm Animals, 2nd edition, CAB International, Wallingford, UK, 1999, pp.3-26.
- [10] Dow, B.D., Ashley, M.V., High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites, *J Heredity* 89 (1998) 62-70.
- [11] Eldridge, K., Davidson, J., Harwood, C., Wyk, G.V., Eucalypt domestication and breeding, Oxford University Press Inc, New York, 1994.
- [12] Ferreira, M.E., Grattapaglia, D., Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição. Embrapa-Cenargen, Brasília, DF, Brazil, 1998.
- [13] Gaiotto, F.A., Bramucci, M., Grattapaglia, D., Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers, *Theor. Appl. Genet.* 95 (1997) 842-849.
- [14] Grattapaglia, D., Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. *Gen. Mol. Res.* 3 (2004) 369-379.
- [15] Grattapaglia, D., Ribeiro, V.J., Rezende, G.D.S.P., Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for *Eucalyptus*, *Theor. Appl. Genet.* 109 (2004) 192-199.
- [16] Harvard, J.L., Griffin, A.R., Espejo, J., Mass controlled pollination of *Eucalyptus globulus*: a practical reality, *Can. J. For. Res.* 29 (1999) 1457-1463.

- [17] Kirst, M., Cordeiro, C.M., Rezende, G.D.S.P., Grattapaglia, D., Power of microsatellite markers for fingerprint and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations, *J Heredity* 96 (2005) 161-166.
- [18] Mora, A.L., Garcia, C.H., A Cultura do Eucalipto no Brasil, Sociedade Brasileira de Silvicultura, São Paulo/SP, Brazil, 2000.
- [19] Poke, F.S.; Vaillancourt, R.E.; Potts, B.M.; Reid, J.B. Genomic Research in *Eucalyptus*. *Genomics* 125 (2005) 79-101.
- [20] Potts, B.M., Dungey, H.S., Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists, *New Forests* 27 (2004) 115-138.
- [21] Rocha, R.B., Pereira, J.F., Cruz, C.D., Queiroz, M.V., Araújo, E.F., O mapeamento genético no melhoramento de plantas, *Biotec. Cienc. Desen.* 30 (2003) 27-32.
- [22] Trindade, H., Boavida, L.C., Borralho, N., Feijó, J.A., Successful fertilization and seed set from pollination on immature non-dehisced flowers of *Eucalyptus globulus*, *Ann Bot.* 87 (2001) 469-475.
- [23] Turnbull, J.W., Eucalypt plantations, *New Forests* 17 (1999) 37-52.
- [24] Yazdani, R., Scotti, I., Jansson, G., Plomion, C., Mathur, G. Inheritance and diversity of simple sequence repeat (SSR) microsatellite markers in various families of *Picea abies*, *Hereditas* 138 (2003) 219-227.

Tables

Table 1 – Description of crosses available, species and number of sample individuals collected (n).

Cross	Species	n
DG x C1	Hybrid <i>E. dunni-grandis</i> x <i>E. camaldulensis</i>	22
DG x GL2	<i>E. dunni-grandis</i> x <i>E. globulus</i>	22
DG x U2	Hybrid <i>E. dunni-grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	22
DG x UGL	Hybrid <i>E. dunni-grandis</i> x hybrid <i>E. urophylla-globulus</i>	22
G1 x GL2	<i>E. grandis</i> x <i>E. globulus</i>	22
G1 x UGL	<i>E. grandis</i> x hybrid <i>E. urophylla-globulus</i>	21
U1 x U2	<i>E. urophylla</i> x <i>E. urophylla</i>	22
U1 x UGL	<i>E. urophylla</i> x hybrid <i>E. urophylla-globulus</i>	22
U2 x C1	<i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i>	21
C1 x C2	<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. camaldulensis</i>	21
C1 x UGL	<i>E. camaldulensis</i> x hybrid <i>E. urophylla-globulus</i>	22
U1 x C2	<i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i>	22
U1 x GL2	<i>E. urophylla</i> x <i>E. globulus</i>	22
U2 x GL1	<i>E. urophylla</i> x <i>E. globulus</i>	22
<i>Total</i>		305

Table 2 – Parentage determination in each analyzed family.

Family	Number of individuals	Confirmed maternity	Confirmed paternity	Another pollen-parent identified	Another unidentified pollen-parent	Another unidentified maternity and paternity
DG x C1	22	22	22	0	0	0
DG x GL2	22	20	17	1	2	2
DG x U2	22	22	22	0	0	0
DG x UGL	22	22	21	0	1	0
G1 x GL2	22	22	16	1	5	0
G1 x UGL	21	21	18	2	1	0
U1 x U2	22	22	13	1	8	0
U1 x UGL	22	19	6	0	13	3
U2 x C1	21	21	21	0	0	0
C1 x C2	21	21	21	0	0	0
C1 x UGL	22	22	20	1	1	0
U1 x C2	22	21	12	2	7	1
U1 x GL2	22	14	8	5	1	8
U2 x GL1	22	22	21	1	0	0
<i>Total</i>	305	291 (95.4%)	238 (78.03%)	14 (4.5%)	39 (12.8%)	14 (4.6%)

Table 3 – Percentage of illegitimate individuals in the 10 contaminated families and alternative paternity identified.

Family	% Contamination	Alternative pollen parent
DG x GL2	22.7	C2/undefined
DG x UGL	4.5	Undefined
G1 x GL2	27.3	U1/undefined
G1 x UGL	14.3	U2/undefined
U1 x U2	40.9	C1/undefined
U1 x UGL	72.7	Undefined
C1 x UGL	9.1	GL2/undefined
U1 x C2	45.5	G1/C2/undefined
U1 x GL2	63.6	UGL/C2/GL2/G1/undefined
U2 x GL1	4.5	DG

Figure

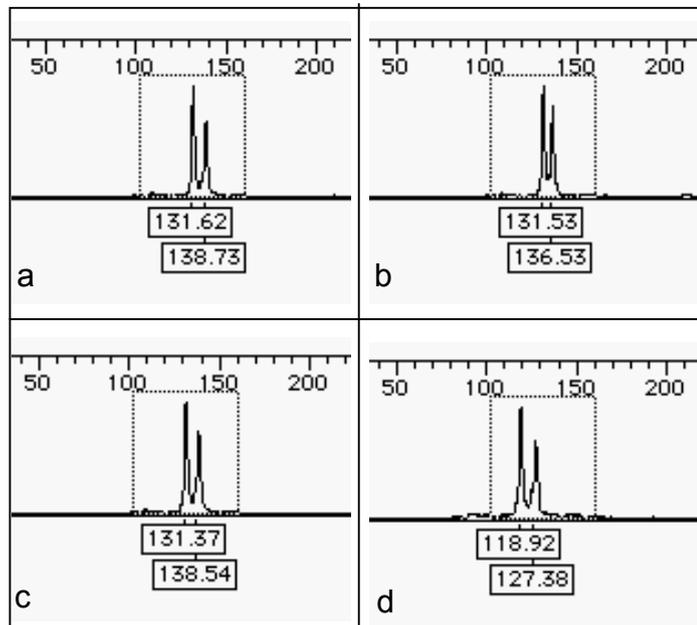


Figure 1 – Example of the exclusion criterion used. In a and b the DG and UGL genotypes at the Embra665 locus are shown. In c, a legitimate offspring genotype and in d, an illegitimate offspring in an excluding locus are shown.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos dois trabalhos apresentados conclui-se que:

- Para os parâmetros genéticos “A”, PIC, “I” e “Q”, não há diferenças significativas entre marcadores microssatélites genômicos e de EST de *Eucalyptus*.
- Ambos os tipos de marcadores SSR apresentaram excelentes níveis de diversidade genética. Dessa forma, o uso de SSR-EST para o mapeamento de QTL é expressamente recomendado, uma vez que eles se encontram em regiões expressas e se mostraram bastante polimórficos.
- Na certificação de paternidade e maternidade, foram encontradas contaminações em 11 famílias das 14 analisadas. Níveis variados de contaminações foram revelados, sugerindo mistura de pólen e, ou sementes.
- As taxas de contaminação nas famílias podem ser utilizadas para recalcular o número de amostras a serem coletadas para estudos de mapeamento, exceto aquelas que revelaram altíssimos níveis de contaminantes.
- É confirmada a eficiência dos marcadores microssatélites em análises genéticas diversas, principalmente aquelas que requerem uma capacidade discriminatória elevada dessas ferramentas moleculares. Acredita-se, também, que esses estudos possam levar alguma contribuição a melhoristas e pesquisadores, auxiliando-os a encontrar soluções para as questões e os problemas gerados nos programas de melhoramento genético de *Eucalyptus*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

ANGELI, A. Indicações para escolha de espécies de *Eucalyptus*: **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, dez. 2005. Disponível em <<http://www.ipef.br/identificacao/eucalyptus/indicacoes.asp>>. Acesso em 22 maio 2007.

ARMOUR, J.A.L.; ALEGRE, S.A.; MILES, S.; WILLIAMS, L.J.; BADGE, R.M. Minisatellites and mutation process in tandemly repetitive DNA. *In*: GOLDESTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. **Microsatellites, Evolution and Applications**. Oxford, NY: Oxford University Press, 1999. p.24-33.

ASSIS, T.F.; BAUER, J.S.; TAFAREL, G. Sintetização de híbridos de *Eucalyptus* por cruzamentos controlados. **Ciência Florestal**, 3, 1, p.161-170, 1993.

BELL, J.C.; POWELL, M.; DEVEY, M.E.; MORAN, G.F. DNA profiling, pedigree lineage analysis and monitoring in the Australian Breeding Program of Radiata Pine. **Silvae Genetica**, 53, 3, p.130-134, 2004.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; THARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, 97, p.816-827, 1998.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. **Molecular Genetics and Genomics**, 267, p. 338-347, 2002.

BROOKER, M.I.H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, 13, p.79-148, 2000.

CAMPINHOS, E. Sustainable plantations of high-yield shape *Eucalyptus* trees for production of fiber: the Aracruz case. **New Forests**, 17, p.129-143, 1999.

CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, 61, 2, p.89-100, 2002.

CHAIX, G.; GERBER, S.; REZAFIMAHARO, V.; VIGNERON, P.; VERHAEGEN, D.; HAMON, S. Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*. **Theoretical Applied Genetics**, 107, p. 705-712, 2003.

CHAMBERS, G.K; MACAVOY, E.S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 126, p.455-476, 2000.

CIFARELLI, R.A.; GALLITELLI, M.; CELLINI, F. Random amplified hybridization microsatellites (RAHM) -containing DNA clones. **Nucleic Acids Research**, 23, p.3802-3803, 1995.

COELHO, K. Hibridação. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, 2005. Disponível em <<http://sbrt.ibict.br/upload/sbrt945-18.html>>. Acesso em 08 maio 2007.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, 10, p.349-356, 2001.

CREGAN, P.B. Simple Sequence Repeat DNA length polymorphisms. **Probe**, 2, p.18-22, 1992.

EDWARDS, Y.J.; ELGAR, G.; CLARK, M.S.; BISHOP, M.J. The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analyses. **Journal of Molecular Biology**, 278, p.843-854, 1998.

EISEN, J. A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: In GOLDESTINEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. (Eds). **Microsatellites, Evolution and Applications**. Oxford, NY: Oxford University Press, 1999. p.34-48.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; WYK, G.V. **Eucalypt domestication and breeding**. New York: Oxford University Press Inc, 1994. 288 p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª edição. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

GAIOTTO, F.A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOVSKY, R. Genetic structure, mating system and long-distance gene flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mart). **Journal of Heredity**, 94, 5, p.399-406, 2003.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, 137, p.1121-1137, 1994.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores Moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis, MT: Fundação MT, 2001. p.967-1010.

GRATTAPAGLIA, D. Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. **Genetics and Molecular Research**, 3, p.369-379, 2004.

GRATTAPAGLIA, D., RIBEIRO, V.J., REZENDE, G.D.S.P., Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for *Eucalyptus*. *Theoretical Applied Genetics*, 109, p.192-199, 2004.

GUPTA, P.K.; BALYAN, H.S.; SHARMA, P.C.; RAMESH, B. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Science**, 70, 1, p.45-54, 1996.

GUR-ARIE, R.; COHEN, C.J.; EITAN, Y.; SHELEF, L.; HALLERMAN, E.M.; KASHI, Y. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition and polymorphism. **Genome Research**, 10, p.62-71, 2000.

HAMADA, H.; PETRINO, M.C.; TAKUGANA, T. A novel repeated element with Z-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings in the National Academy Science**, 79, p.6465-6469, 1982.

HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDESTINEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. **Microsatellites, Evolution and Applications**. Oxford: Oxford University Press, 1999. p.1-9.

JONES A.G.; ARDREN, W.R. Methods of parentage analysis in natural populations. **Molecular Ecology**, 12, p.2511-2523, 2003.

KASHI, Y.; SOLLER, M. Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: GOLDESTINEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. **Microsatellites, Evolution and Applications**. Oxford: Oxford University Press, 1999. p.10-23.

KIJAS, J.M.; FOWLWER, J.C.; GARBETT, C.A.; THOMAS, M.R. Enrichment of microsatellites from *Citrus* genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidina-coated magnetic particles. **BioTechniques**, 16, p.656-662, 1994.

LI, Y-C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, 11, p.2453-2465, 2002.

LIEWLAKSANEEYANAWIN, C.; RITLAND, C.R.; EL-KASSABY, Y.A.; RITLAND, K. Single-copy, species transferable microsatellite markers developed from loblolly pine. **Theoretical and Applied Genetics**, 109, p.361-369, 2004.

LITT, M.; LUTTY J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, 44, p.397-401, 1989.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J.E.. **Molecular Cell Biology**. New York: W.H. Freeman & Co. 1999.

MAGATON, A.S.; OLIVEIRA, R.; LOPES, O.R.; MILAGRES, F.R.; PILÓ-VELOSO, D.; COLODETTE, J.L. Composição química da madeira de espécies de Eucalipto. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29, 2006, Águas de Lindóia. **Resumo**. Disponível em <<http://sec.sbg.org.br/cd29ra/resumos/T1908-1.pdf>>. Acesso em 22 maio 2007.

MARQUES, C.M.; ARAUJO, J.A.; FERREIRA, J.G.; WHETTEN, R.; O'MALLEY, D.M.; LIU, B.H.; SEDEROFF, R. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. **Theoretical and Applied Genetics**, 96, p.727-737, 1998.

MARQUES, C.M.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Conservation and synteny of SSR loci and QTLs for vegetative propagation in four *Eucalyptus* species. **Theoretical and Applied Genetics**, 105, p.474-478, 2002.

MARTINS, I.S.; PIRES, I.E.; OLIVEIRA, M.C. Divergência genética em progênes em uma população de *Eucalyptus camaldulensis* DEHNH. **Floresta e Ambiente**, 9, 1, p.81-89, 2002.

METZGAR, D.; BITOF, J.; WILLS, C. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. **Genome Research**, 10, p.72-80, 2000.

MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA: aplicações no melhoramento de plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 5, p.14-17, 1998.

MORA, A.L.; GARCIA, C.H. **A Cultura do Eucalipto no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000. 112 p.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant Journal**, 3, p.175-182, 1993.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, 30, p.194-200, 2002.

MOURA, V.P.G. O germoplasma de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake no Brasil. **Comunicado Técnico 111**: Empraba-Cenargen, Brasília, dez. 2004.

NASS, LL. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis, MT: Fundação MT, 2001. p.

PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLINGT, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, 4, p.347-354, 1995.

POKE, F.S.; VAILLANCOURT, R.E.; POTTS, B.M.; REID, J.B. Genomic Research in *Eucalyptus*. **Genomics**, 125, p.79-101, 2005.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeat. **Trends in Plant Science**, 1, 7, p.215-222, 1996.

POTTS, B.M.; DUNGEY, H.S. Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. **New Forests**, 27, p.115-138, 2004.

RACKOCZI-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cellular and Molecular Biology Letters**, 9, p.221-238, 2004.

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

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis, MT: Fundação MT, 2001. p.939-966.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple Sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, 12, p.4127-4138, 1984.

TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. **Current Opinion in Genetics and Development**, 4, p.832-837, 1994.

TURNBULL, J.W. Eucalypt plantations. **New Forests**, 17, p.37-52. 1999.

WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, 88, p.1-6, 1994.

WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n·(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, 7, p.524-530, 1990.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1996. 445p.

ZANE, L; BARGELLONI, L; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, 11, p.1-16, 2002.
, p.1-16, 2002.