

## CONSTRUÇÃO de MAPA GENÉTICO de *Eucalyptus* UTILIZANDO MICROSSATÉLITES

CHEDIAK, Giselle Lara de Carvalho; COELHO, Alexandre Siqueira Guedes;  
 BRONDANI, Rosana Pereira Vianello.

**Palavras-chave: melhoramento genético; marcadores moleculares**

### 1. Introdução

O eucalipto pertence à família *Myrtaceae* e gênero *Eucalyptus*, é originário da Austrália englobando mais de 700 espécies descritas (REMADE, 2001), dentre elas estão *Eucalyptus grandis*, *E. globulus* e *E. urophylla*.

*E. grandis* é a espécie mais plantada fora da Austrália, possui madeira leve e fácil de ser trabalhada, a qual quando oriunda de plantações de ciclo longo é utilizada em construção e as de ciclos curtos é utilizada para caixotaria (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2004).

*E. Globulus* é originário da Austrália e Tasmânia. Prefere climas temperados úmidos. A sua principal utilização é a produção de madeira para pasta celulósica (NATURLINK, 2000).

Dentre as espécies de eucaliptos plantadas no Brasil, o *Eucalyptus urophylla* é uma das mais plantadas. É uma das poucas espécies de eucaliptos que ocorrem naturalmente fora da Austrália (FERREIRA, 1979). Apresenta boa produtividade e potencial de utilização para os mais diversos fins, como fabricação de papel e celulose, chapas duras, serraria e produção de carvão (SCANAVACA JUNIOR, 2001).

Atualmente, no Brasil, as áreas florestais plantadas com eucalipto ocupam mais de 3,7 milhões de hectares (ha). De 2005 a 2007 constatou-se um incremento na área plantada de 344.663 ha, com um acréscimo de 10,1% nas plantações de eucalipto (Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas, 2007).

O melhoramento florestal tem como meta o aumento da produtividade e a adequação da matéria prima ao produto final. No entanto, para a obtenção de ganhos genéticos em longo prazo é necessário um monitoramento da base genética, a fim de evitar perdas excessivas de variabilidade (MORI, 1993).

A área de melhoramento genético de plantas tem sido beneficiada com o desenvolvimento de métodos biotecnológicos, principalmente aqueles relacionados a marcadores moleculares. A disponibilidade de marcadores neutros, altamente polimórficos, aliada a procedimentos estatísticos, tem permitido a construção de mapas de localização para a maioria das espécies vegetais de interesse agrônômico (CARNEIRO & VIEIRA, 2002). Dentre estes marcadores estão os microssatélites (SSR), os quais se baseiam na amplificação individual através de PCR, de regiões contendo seqüências simples repetidas, utilizando um par de *primers* específicos e complementares as seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. Cada segmento amplificado equivale a um alelo dentro do loco gênico, sendo que os alelos

diferentes são detectados em função de diferenças em pares de bases dos fragmentos amplificados. Isso confere aos microssatélites a característica de co-dominância (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Em *Eucalyptus*, o desenvolvimento de marcadores baseados em microssatélites (BRONDANI *et al.*, 1998, BYRNE, *et al.* 1996, GLAUBTIZ *et al.*, 2001, OTTEWELL *et al.*, 2005, STEANE *et al.*, 2001) passaram a ser utilizados de um modo crescente como uma ferramenta útil em programas de melhoramento e produção florestal, além de representar um recurso experimental fundamental para iniciativas genômicas envolvendo mapeamento genético de QTL (quantitative trait loci) e ancoragem de mapas genéticos com mapas físicos (Falcão *et al.* 2004).

O melhoramento genético molecular emprega a informação genética derivada de mapas de ligação (utilizados para identificar no cromossomo a posição dos alelos de interesse) obtidos com marcadores moleculares em programas de retrocruzamento e métodos clássicos de melhoramento genético, com a finalidade de auxiliar na seleção dos indivíduos a serem recombinados em programas de seleção recorrente, ou ainda, piramidizar genes de interesse para resistência a diferentes doenças através da seleção assistida por marcadores (CHEN *et al.*, 2000).

Mapas de ligação são construídos com base no desequilíbrio de ligação entre dois *loci* a partir de dados obtidos de algum tipo de delineamento genético (cruzamento). Inicialmente, a análise de ligação usando marcadores moleculares em plantas foi aplicada em populações F1 provenientes do cruzamento de plantas diplóides homozigotas (MALIEPAARD *et al.*, 1997). Contudo, em espécies perenes, como o eucalipto, que são preferencialmente alógamas e apresentam alta depressão endogâmica e mecanismos de auto-incompatibilidade, a obtenção de genitores em completa homozigose é inviável. Assim, os mapas de ligação em *Eucalyptus* são construídos a partir de populações segregantes oriundas do cruzamento entre genitores heterozigotos (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994).

O objetivo principal deste trabalho é a construção de mapas genéticos baseados em locos microssatélites e identificação de regiões genômicas associadas a características físico-químicas da madeira utilizando um cruzamento entre a espécie *E. grandis* e um híbrido *E. Urophylla* x *E. Globulus*.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Coleta do material vegetal

Foram coletadas 243 amostras de xilema da família G1xUGL, em um campo experimental da ARACRUZ em Barra do Ribeiro-RS, o material coletado foi armazenado em tubos falcon com tampão CTAB 2% e transportado a temperatura ambiente até o Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão, situado em Santo Antônio de Goiás – GO.

### 2.2 Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo de extração descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998), com modificação na etapa da maceração: o xilema foi macerado utilizando um macerador automático (FastPrep FP120).

### 2.3 Seleção dos primers microssatélites polimórficos

Foram utilizados ao todo 373 pares de *primers* específicos de locos SSR, previamente selecionados em estudos de mapeamento genético anteriores, visando maximizar a cobertura genômica e o grau de polimorfismo entre os dois genitores.

Para a seleção dos primers microssatélites informativos para a progênie em estudo, procedeu-se as reações de PCR (Polimerase chain reaction) com amostras de DNA de um dos genitores (UGL) e sete indivíduos da progênie.

Utilizou-se o Kit Qiagen para amplificação dos primers em multiplex, utilizando-se 1x do QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5X de Q-Solution, 0,1 a 0,3 μM de cada primer, 1,6 ng/ μl de DNA e água livre de RNase para um volume final de reação de 5 μl.

As reações de PCR feitas com o Kit Qiagen foram conduzidas a partir de uma etapa de desnaturação a 95°C por 15', envolvendo uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 30", seguida por uma fase de anelamento utilizando-se uma temperatura de 56° para todos os primers por 90" e uma fase de extensão a 72°C por 90", concluindo com uma etapa final de extensão a 72°C por 10'.

### 2.4 Genotipagem semi-automatizada dos marcadores microssatélites

Os fragmentos amplificados, derivados da PCR utilizando marcadores microssatélites, foram separados via eletroforese em sequenciador automático de DNA, modelo ABI 3100 (Applied Biosystems). O tamanho dos fragmentos foi determinado utilizando um marcador de massa molecular interno para cada amostra. Após a eletroforese, os dados gerados foram analisados individualmente para cada loco utilizando o programa GenMapper 3.5 (Applied Biosystems).

### 2.5 Análise de segregação

A primeira etapa do mapeamento genético utilizando marcadores moleculares é a certificação de que eles segregam de acordo com o esperado, para a manipulação de mapeamento empregada. Para a verificação da razão de segregação esperada dos locos individuais, realizou-se uma comparação do número de indivíduos observados em cada classe com o esperado, através do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

A estatística qui-quadrado é dada por:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \left[ \frac{(\text{Obs}_i - \text{Esp}_i)^2}{\text{Esp}_i} \right]$$

em que  $\chi^2$  é valor de qui-quadrado calculado; e **Obs<sub>i</sub>** e **Esp<sub>i</sub>**, são os valores observado e esperado, para a i-ésima classe fenotípica (i= 1, 2,..., n), respectivamente.

Os valores de  $\chi^2$  foram estimados pelo programa Prelim (Alexandre Coelho, programa não publicado)

## 3. Resultados e Discussão

No *screening* realizado com os 373 primers microssatélites foram encontrados 139 locos monomórficos e 54 locos que não amplificaram.

Foram genotipados 177 locos microssatélites, sendo que destes, 120 apresentaram polimorfismo para o parental G1 e 140 para o parental UGL. Dos SSRs polimórficos, 83 apresentaram polimorfismo para ambos parentais.

Para verificar se os locos estavam segregando como o esperado foi realizado o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Dos 177 locos testados, 45 (25,42%) sofreram distorções da proporção esperada com valores abaixo do nível crítico estabelecido (5%). Segundo Xu et al. (1992), a distorção de segregação tem sido relatada em diversos organismos, incluindo plantas, nas quais espécies ou raças híbridas exibem preferencialmente disfunção de gametas. Esses resultados também podem ser associados à alta frequência de alelos recessivos letais (Verhaegen e Plomion, 1996).

Quanto ao que deve ser feito em relação aos marcadores que apresentam distorção de segregação é discutível. Kao et al (1999), recomendam, preferencialmente, o descarte dos locos que apresentam distorções de segregação, para que a qualidade do mapa não seja comprometida. De acordo com Oliveira et al (2004), é preciso ter cautela no uso dos locos que apresentam distorções da segregação mendeliana, pois apesar deles poderem mostrar informações genéticas importantes, também podem alterar as distâncias e ordens lineares de outros marcadores no grupo de ligação.

Segundo Coelho (2000), a influência do número de marcadores genéticos está relacionada até quanto a resolução pré-estabelecida pelo número de genótipos identificados será, de fato, satisfeita. Tanto o grau de cobertura do genoma como a densidade do mapa a serem construídos são funções diretas do número de marcadores.

#### 4. Conclusão

- No melhoramento de plantas, o desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto, pois possibilita a cobertura completa de genomas; a localização das regiões que controlam caracteres de importância; e a quantificação do efeito destas regiões na característica.
- Após a conclusão de todas as etapas do trabalho, os marcadores SSR contribuirão para o desenvolvimento de um mapa genético informativo onde genes de interesse poderão ser identificados e mapeados.

#### 5. Referências

ABRAF – **Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas**. Anuário Estatístico da Abraf: Ano base 2007/Abraf. Brasília, 2008.

BRONDANI, R.P.V., C. BRONDANI Brondani RPV, TARCHINI R, GRATTAPAGLIA, D. **Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. uriphylla***. *Theor Appl Genet*, v.97: p. 816-827, 1998.

BYRNE, M., MARQUEZ-GARCIA, M.I., UREN, T., SMITH, D.S., MORAN, G.F.: **Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus***. *Aust J Botany*, **44**:331-341, 1996.

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

CHEN, S.; LIN, X.H.; XU, C.G. ZHANG, Q. **Improvement of bacterial blight resistance of "Minghui 63", an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection**. *Crop Science*, v. 40: p. 239–244, 2000.

COELHO, A.S.G. Considerações gerais sobre a análise de QTL's. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F. (Eds.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, p.1-36, 2000.

FALCÃO, C.L.; PAPPAS, M.C.R.; LOURENÇO, R.T.; ALENCAR, M.M.; BATISTA, A. R.S.; PAPPAS JUNIOR, G.J.; GRATTAPAGLIA, D. **Desenvolvimento e mapeamento de microssatélites derivados de ESTs em *Eucalyptus***. Embrapa - *Circular Técnica*. Brasília, DF, 2004.

FERREIRA, M. **Escolha de Espécies de Eucalipto**. *Circular Técnica IPEF*, v. 47, p. 1-30, 1979.

FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 p, 1998

GLAUBITZ J.C., EMBERIBI L.C., MORAN G.F. **Dinucleotide microsatellites from *Eucalyptus sieberi*: inheritance, diversity, and improved scoring of single-base differences**. *Genome*. **44** :1041-1045, 2001.

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

IPEF – Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. **Chave de Identificação de Espécies Florestais**. Piracicaba-SP, 2004. Disponível em <http://www.ipef.br/identificacao/cief/especies/grandis.asp>. Acesso em 05 de maio de 2008.

KAO, C.H.; ZENG, Z.B.; TEASDALE, R. **Multiple interval mapping for quantitative trait loci**. *Genetics*. v.152, p.1023-1216. 1999.

MALIEPAARD, C.; JANSEN J.; VAN OOIJEN, J.W. **Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications**. *Genetic Research*, Cambridge, n. 70, p. 237-250, jul. 1997.

MORI, E.S. **Variabilidade isoenzimática em uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção.** Piracicaba, 1993. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo.

NATURLINK, 2000. Disponível em <http://www.naturlink>. Acesso em: 13 de maio de 2008.

OLIVEIRA, R.P. de; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. **Skewed RAPD markers in linkage maps of *Citrus*.** Genet. Mol. Biol. v.27, n.3. 2004.

OTTEWELL K.M., DONNELLAN S.C., MORAN G.F., PATON D.C. **Multiplexed microsatellite markers for the genetic analysis of *Eucalyptus leucoxylo* (Myrtaceae) and their utility for ecological and breeding studies in other eucalyptus species.** *J Hered*, **96** :445-451, 2005.

REMADE – Revista da madeira, 2001. Disponível em: <http://www.remade.com.br>. Acesso em: 07 de maio de 2008.

SCANAVACA JUNIOR, L. **Caracterização silvicultural, botânica e tecnológica do *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake e de seu potencial para utilização em serraria.** Piracicaba, 2001. 108 p. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.

STEANE D.A., VAILLANCOURT R.E., RUSSELL J., POWELL W., MARSHALL D., POTTS B.M. **Development and characterisation of microsatellite loci in *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae).** *Silvae Genetica*. v.50: 89-91, 2001.

VERHAEGEN, D, PLOMION, C. **Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers.** *Genome*.39: 1051-1061, 1996.

XU, Y.B.; SHEN, Z.T. **Distorted segregation of waxy gene and its characterization in *indica-japonica* hybrids.** *J Rice Sci*. v.6, p.89-92. 1992.