

ANÁLISE DE DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM CLONES DE *Eucalyptus* spp.**Rafael Simões Tomaz¹, Lívia Gracielle Oliveira Tomé², Caio César Salgado³, Eliel Alves Ferreira⁴, Rafael Mauri⁵, Cosme Damião Cruz⁶**¹Universidade Federal de Viçosa/ Departamento de Biologia Geral, BIOAGRO, rafaelst@gmail.com² Universidade Federal de Viçosa / Departamento de Biologia Geral, BIOAGRO, liviatome@yahoo.com.br³ Universidade Federal de Viçosa / Departamento de Biologia Geral, BIOAGRO, caiocesio@yahoo.com.br⁴ Universidade Federal de Viçosa / Departamento de Biologia Geral, BIOAGRO, elielaf2003@yahoo.com.br⁵ Universidade Federal de Viçosa / Departamento de Biologia Geral, BIOAGRO, rafael.mauri@hotmail.com⁶ Universidade Federal de Viçosa/ Departamento de Biologia Geral, cdacruz@ufv.br

Resumo - A avaliação da diversidade genética para promover o direcionamento dos cruzamentos, visando uma melhor combinação híbrida é de fundamental importância para os programas de melhoramento. Este estudo teve como objetivos, determinar a diversidade genética por meio de caracteres fenotípicos e por meio de dados obtidos com marcadores moleculares microssatélites. Foram consideradas duas características, diâmetro à altura do peito (DAP) e altura da planta, ambas obtidas em 26 clones de *Eucalyptus* spp com 36 meses de idade. Os coeficientes de variação para DAP e altura foram respectivamente 7,60% e 4,87%, indicando boa precisão experimental na obtenção e análise dos dados. Foi detectada variabilidade genética significativa, e os coeficientes de herdabilidade foram estimados, com valores de 66,76% e 73,75% para DAP e altura. As análises dos dados moleculares foram realizadas pela avaliação do padrão de bandas resultante da amplificação do DNA total utilizando 12 oligonucleotídeos microssatélites. Ambas as análises permitiram a detecção de variabilidade genética. A diversidade genética para os caracteres fenotípicos avaliados pode ser considerada para recomendação de cruzamentos.

Palavras-chave: Eucalipto, variabilidade genética, SSR.**Área do Conhecimento:** Melhoramento Vegetal, biotecnologia.**Introdução**

As espécies do gênero *Eucalyptus* são as mais utilizadas em reflorestamentos no país, sendo que o Brasil ocupa lugar de destaque como um dos países de maior área plantada com eucalipto. A produção de madeira para celulose e carvão é suportada por plantios de progênies e clones com alta produtividade por meio de técnicas de produção de mudas por propagação vegetativa. Assim, a silvicultura clonal tem permitido o aproveitamento de todo o valor genético do indivíduo e tem se destacado no setor florestal permitindo o desenvolvimento de populações homogêneas e de alta produtividade (RAMALHO, 1995). Neste contexto, a hibridação constitui uma importante ferramenta para associação de características de diferentes espécies, bem como para manifestação da heterose e desenvolvimento de progênies superiores (MARTINS, 2002).

Neste panorama, o direcionamento dos cruzamentos que produzirão a melhor combinação híbrida é de fundamental importância para os programas de melhoramento no setor. A alta diversidade genética associada a alta heterose, característica do gênero *Eucalyptus*, faz com que este direcionamento baseado na informação de diversidade genética entre os genitores, seja uma

estratégia bastante promissora para os programas de melhoramento (PEREIRA, 2001).

Desta forma, os padrões genéticos, obtidos por ferramentas de caracterização molecular, quando usados juntamente com dados de parentesco e dados de performance, representam informações valiosas para aumento na possibilidade de ganho em cruzamentos direcionados (MURO ABAD, 2003). Assim, os objetivos deste trabalho foram determinar a diversidade genética de 26 clones de *Eucalyptus* spp, por meio de caracteres fenotípicos e de dados obtidos com marcadores moleculares microssatélites.

Metodologia**MATERIAL VEGETAL**

O material genético foi obtido de um teste clonal com 26 clones de *Eucalyptus* spp com 36 meses de idade, a partir de duas populações provenientes das localidades de Virgíópolis e Naque, no estado de Minas Gerais. Foram avaliadas duas características fenotípicas, altura da planta e diâmetro à altura do peito (DAP). O material genético foi cedido pela empresa Cenibra Nipo-brasileira.

Folhas sadias dos 26 clones Foram coletadas, acondicionadas em gelo (no local de coleta), e transportadas para o Laboratório de Genética

Molecular e de Microrganismos/BIOAGRO/UFV - Viçosa - MG, para estocagem a -20°C e extração de DNA total para análise molecular.

ANÁLISE DOS DADOS FENOTÍPICOS

Foi testada a hipótese de existência de variabilidade genética significativa entre as progênes amostradas da população. A média dos clones para as características métricas (altura e DAP), foram mensuradas considerando-se o delineamento para o qual foram feitas as análises de divergência genética.

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + b_j + \varepsilon_{ijk}$$

em que:

Y_{ijk} = observação na planta k, da progênie i no bloco j;

μ = média geral;

g_i = efeito do genótipo i (i = 1, 2, ..., g), $g_i \sim \text{NID}(0, \sigma_g^2)$;

b_j = efeito do bloco j (j = 1, 2, ..., b), $b_j \sim \text{NID}(0, \sigma_b^2)$;

ε_{ijk} = efeito do erro aleatório, em que $\varepsilon_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$;

Foi adotada a distância Euclidiana Média padronizada como medida de dissimilaridade para se estimar a divergência entre os 26 clones avaliados. O método de agrupamento de Tocher e o dendrograma construído pelo método UPGMA foram utilizados para agrupar os clones a partir da matriz de dissimilaridade (CRUZ E REGAZZI, 1997). O programa GENES (CRUZ, 1997) foi utilizado para o processamento dos dados.

EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

A extração do DNA total foi feita de acordo com a metodologia descrita por DOYLE e DOYLE (1990), utilizando CTAB. A quantificação do DNA total foi feita por meio de espectrofotometria.

REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO

As reações de amplificação foram feitas de acordo com a metodologia proposta por BRODANI et al., 1998. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida nativo a 10%, seguido da documentação por digitalização da imagem pelo sistema Eagle Eye™ (Stratagene®). Foram utilizados 12 oligonucleotídeos desenvolvidos por BRONDANI et al., (2002).

ANÁLISE DOS DADOS MOLECULARES

O padrão de bandas foi analisado de acordo com a presença ou ausência dos fragmentos de DNA amplificados. À presença de um fragmento é dado o valor 1 (um) e a ausência é dado o valor 0 (zero). Para marcadores codominantes como os microssatélites, locos em homozigose são

codificados com valor 2 (dois). A Tabela de dados foi confeccionada a partir dos dados microssatélites, para análise pelo programa GENES (CRUZ, 1997).

Para análise de agrupamento foi considerado o método de otimização de Tocher associado ao dendrograma, método UPGMA. Cada grupo formado é constituído de genótipos de maior semelhança genética.

Resultados

Os valores médios das duas características analisadas, DAP e altura, apresentaram uma grande amplitude de distribuição. O DAP entre os clones variou entre 8,64 e 22,48 m. A média para o DAP foi de 14,03 cm, e o coeficiente de variação (CV_{exp}) verificado foi de 7,60%, enquanto que para altura, a média foi de 19,96 m e o coeficiente de variação, 4,87%. Os valores do CV_{exp} são considerados baixos, o que indica boa precisão experimental na obtenção e na análise dos dados. Na Tabela 1, estão apresentados os quadrados médios das características avaliadas, bem como as respectivas médias e coeficientes de variação.

Tabela 1 - Valores e significâncias dos quadrados médios, médias e coeficientes de variação experimental (CV_{exp}).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrados médios	
		DAP	Altura
Genótipos	22	3,4200*	3,6065*
Resíduo	104	1,1367	0,9462
Média		14,0267	19,9574
CV_{exp} (%)		7,60	4,87

Os valores de herdabilidade no sentido amplo para DAP e altura foram 66,76% e 73,75%, respectivamente. A estimação das distâncias genéticas permitiu o agrupamento dos clones, pela Metodologia de Tocher, em cinco grupos (TABELA 2). A análise do dendrograma (Figura 1) permitiu verificar a variabilidade intragrupos e reforça a divisão proposta pela metodologia de Tocher.

Tabela 2 - Análise de agrupamento pelo método de Tocher, a partir dos dados fenotípicos dos clones de *Eucalyptus spp.*

Grupo	Clones
-------	--------

1	1 2 3 4 5 7 8 9 10 11 12 13 14	20 21 22 23 24 25 26
2	15 16 17 18 24	2 2 10
3	19 23 25	3 5 13
4	20 22 26	4 4
5	21	5 14
6	6	6 6

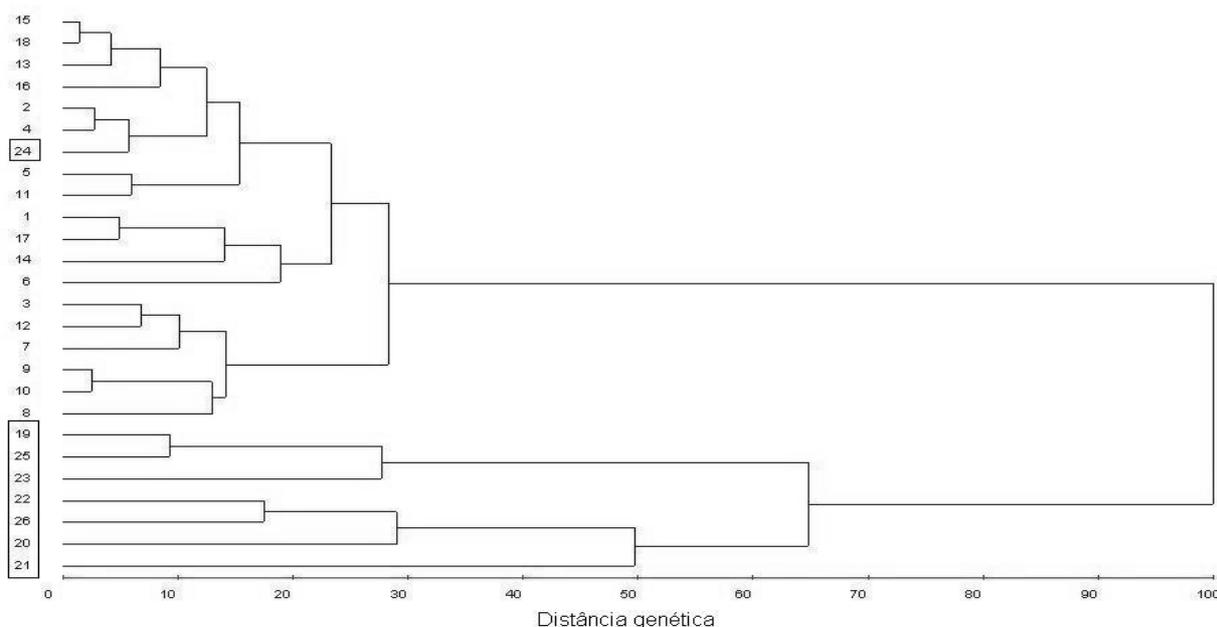


Figura 1- Análise de agrupamento hierárquico pelo método UPGMA de 26 clones de *Eucalyptus* spp com base na matriz de distâncias Euclidianas médias. Os clones envolvidos por retângulos correspondem aos da população de Naque.

Os oligonucleotídeos utilizados apresentaram entre 7 e 11 formas alélicas, detectadas a partir de um total de 107 formas alélicas distintas.

A estimação das distâncias genéticas permitiu o agrupamento dos clones, pela Metodologia de Tocher, em seis grupos (Tabela 3). O dendrograma gerado a partir da referida matriz de distâncias permitiu verificar a existência da variabilidade intragrupos; o que reforça a divisão de grupos proposta pela metodologia de Tocher.

Tabela 3 - Análise de agrupamento pelo método de Tocher, a partir dos dados moleculares dos clones de *Eucalyptus* spp.

Grupo	Clones
1	1 3 7 8 9 11 12 15 16 17 18 19

A correlação entre as matrizes de divergência genética, baseadas em características fenotípicas e em dados moleculares foi de 1,90% constatando a pequena coincidência entre os agrupamentos. Segundo CHARCOSSET et al. (1991) a baixa correlação pode ser devida à avaliação de marcas moleculares que não estejam ligadas aos genes que codificam as características em estudo.

Discussão

Segundo BARBOSA-NETO (1996), a baixa correspondência dos resultados da análise com marcadores moleculares se deve ao fato de os marcadores utilizados na análise molecular considerarem todo o genoma, incluindo regiões que não contribuem para expressão do fenótipo avaliado. Ainda, segundo CHARCOSSET et al. (1991), a baixa correlação entre a distância genética baseada em marcador molecular pode ser devida ao fato de que as marcas utilizadas não estão ligadas aos genes que codificam as características em estudo. Quanto maior o número de marcas não ligadas, menor é a correlação. Portanto, existe a necessidade de selecionar ou mesmo desenvolver marcas moleculares

eficientes na seleção das características de interesse, bem como, estudar a herança dessas características.

Como um dos objetivos práticos dos estudos de divergência em espécies florestais é recomendar cruzamentos, os resultados da análise de divergência fenotípicas se prestam muito bem. Para a recomendação, deve ser considerado mérito silvicultural dos clones no programa de melhoramento. Os clones avaliados constituem material genético de grande interesse para o programa de melhoramento florestal da Cenibra, sendo que muitos deles estão sendo utilizados e multiplicados em larga escala. Quaisquer cruzamentos entre indivíduos de cada um dos grandes grupos formado no dendrograma apresentado na Figura 1 poderiam ser realizados.

Conclusão

A análise de divergência genética com base nas características fenotípicas foi eficiente em acessar a variabilidade na população para as características em questão. Os marcadores moleculares microssatélites também foram eficientes em acessar a diversidade genética na população de clones avaliados, devido a suas características intrínsecas; embora esta tenha apresentada baixa correlação com a diversidade genética fenotípica. Faz-se necessário um estudo detalhado da herança das características de interesse, para que possam ser selecionados ou mesmo desenvolvidos marcadores capazes de acessar a variabilidade das características em questão, sem interferência de outros locos. A divergência fenotípica deve ser preferencialmente utilizada para recomendar cruzamentos, buscando vigor híbrido.

Agradecimentos

À Cenibra Nipo-brasileira, e aos órgãos de fomento à pesquisa, CNPq e FAPEMIG.

Referências

- BARBOSA-NETO, J.F., SORRELLS, M.E., CISAR, G. Prediction of heterosis in wheat using coefficient of parentage and RFLP-based estimates of genetics relationship. *Genome*, v. 39, p. 1142-1149, 1996.
- BRONDANI, R.P.V, BRONDANI, C., GRATTAPLAGLIA, D. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based

exclusively on highly informative markers. *Mol. Genet. Genomics*, v.267, p.338-347, 2002.

- CHARCOSSET, A; LEFORT-BUSON, M., GALLAIS, A. Relationship between heterosis and heterosigosity at marker loci: A theoretical computation. *Theor Appl Genet*, v. 81, p. 571-575, 1991.
- CRUZ, C.D. Programa GENES - aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 1997. 442 p.
- CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento Genético. 2ª Edição Revisada. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1997.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, n.27:p.13-15, 1990.
- MURO ABAD, J.I. Diversidade Genética por marcadores moleculares e predição de ganhos em *Eucalyptus* spp. Viçosa, MG: UFV 2003. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa.
- PEREIRA, R.C. Alternativas para melhorar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento de EUCALYPTUS. Lavras, MG: UFLA 2001. Dissertação (Mestrado em Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Lavras.
- RAMALHO, R.S. Dendrologia Tropical (terminologia). 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 1995. 52 p.
- MARTINS, I.S., PIRES, I.E., OLIVEIRA, M.C. Divergência genética em progênies de uma população de *Eucalyptus camaldulensis* DEHNH. *Floresta e Ambiente*, V. 9, n.1, p.81 - 89. 2002.