

Diversidade genética em populações-núcleo de *Eucalyptus grandis*

Helenize Gabriela de Souza¹, Karolina Marie Alix Benedictte Van Sebroeck Doria¹, Marco Antonio Basseto¹, Daniel Dias Rosa^{2*}, Edson Luiz Furtado¹ e Celso Luis Marino³

¹Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rua José Barbosa de Barros, 1780, 18603-970, Botucatu, São Paulo, Brasil. ²Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas, Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil. ³Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: danielldr@hotmail.com

RESUMO. No melhoramento genético de espécies florestais, uma população base ou indivíduos superiores pré-selecionados tem importância fundamental para a manutenção do programa. Indivíduos de melhores procedências e de ampla base genética propiciam a obtenção de ganhos de forma contínua. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética em duas populações-núcleo de *Eucalyptus grandis*. Foram avaliados 39 indivíduos, sendo 19 pertencentes à população 1 e 20, à população 2, utilizando-se 14 *primers* microssatélite. Os fragmentos foram identificados e analisados a partir dos programas GeneScan e Genotyper, utilizando-se um sequenciador automático ABI Prism 3100. O número de alelos encontrados para cada *primer* variou de cinco a 15 para a população 1 e, de 8 a 18 para a população 2. A heterozigosidade estimada foi maior na população 2, 0,869, contra 0,843 na população 1. A média da distância genética entre os indivíduos da população 1 foi 0,6220 e na população 2 foi 0,6112. Com a caracterização molecular dos indivíduos destas populações foi construído um banco de dados que permitirá, a partir dos parâmetros de genética de populações, monitorar esses programas de melhoramento em diferentes ciclos de seleção.

Palavras-chave: populações-núcleo, *Eucalyptus*, melhoramento, microssatélites.

ABSTRACT. Genetic diversity of two *Eucalyptus grandis* nucleus populations. In genetic breeding of forest species, a base population or pre-selected higher individuals have a fundamental importance to program maintenance due to their better origins and large genetic basis, which continuously propitiates gains. The aim of this study was to verify the variability level in two *Eucalyptus grandis* nucleus populations. Thus, 39 individuals were evaluated – 19 in population 1, and 20 in population 2. Fourteen microsatellite primers were measured, identified and analyzed using GeneScan and Genotyper software through an ABI Prism 3100 automatic sequencer. The number of alleles in each primer varied between 5 and 15 in population 1, and from 8 to 18 in population 2. Heterozygosity was higher in population 2 – 0.869, versus 0.843 in population 1. Mean genetic distance among individuals was 0.6220 in population 1 and 0.6112 in population 2. After individual molecular characterization, a database was compiled to allow the control of these improvement programs in different selection cycles based on population genetic parameters.

Key words: nucleus populations, *Eucalyptus*, improvement, microsatellites.

Introdução

A busca pelo aumento da produtividade e redução do custo de produção em *Eucalyptus* tem conduzido os programas de melhoramento genético à seleção de genótipos mais adaptados. Neste contexto, enquadra-se o conceito de *nucleus breeding*, uma técnica de melhoramento modificada por Cotterill e Dean (1989), para o uso em espécies florestais.

Nesta técnica, a estrutura populacional é dividida em dois blocos, que consistem de uma população principal e de uma elite. A população principal é

formada por um grande número de indivíduos provenientes de uma polinização aberta, em processo de melhoramento.

Cotterill e Brindgers (1988) relatam que, a partir do uso de 300 parentais, foi possível obter 30.000 progênies com caracteres divergentes, demonstrando a possibilidade de grande variabilidade obtido pelo método de seleção. A partir desta população, os melhores indivíduos são selecionados para compor a população elite ou *nucleus*, que contém menor número de indivíduos. Estes indivíduos são cruzados entre si, obtendo-se todas as combinações

possíveis. Este fato de alto número de combinações possibilita a manutenção de alelos, conservando a variabilidade genética.

O ponto mais importante na escolha ou na formação de uma população é a sua base genética, a qual deverá ser ampla o bastante para sustentar pressão de seleção sucessiva, fornecendo ganho genético ao longo das gerações (PHILIPS et al., 1993; NEWBURY, 2003).

A alta intensidade de seleção nos programas de melhoramento pode comprometer os progressos esperados em longo prazo (ODA et al., 1989). No caso de *nucleus breeding*, a intensidade de seleção é alta, mas este fator é amenizado pelo intercâmbio entre a população principal e a elite. No caso de *open nucleus*, a metodologia de seleção permite que indivíduos inferiores participem no processo de seleção, ao contrário do *closed nucleus*, onde nenhum material, além do pré-selecionado, participa no processo de seleção, levando-se, assim, à alta intensidade de seleção.

A técnica de *nucleus breeding* já foi empregada em programas de melhoramento com espécies como *Pinus radiata* (COTTERILL; CAMERON, 1988; WHITE et al., 1999) e *Eucalyptus globulus* (COTTERILL; BRINDGERS, 1988). Esta técnica é relativamente recente para *Eucalyptus grandis* e apresenta uma alternativa para o melhoramento convencional. Para caracterizar os indivíduos presentes no grupo elite, são utilizadas medidas fenotípicas como o diâmetro do tronco e a altura, aliadas às médias destas medidas obtidas pela família a que o indivíduo pertence, sendo selecionados os melhores indivíduos.

Existem dúvidas quanto à eficiência deste método já que o mesmo só leva em consideração as características morfológicas. Este trabalho vem sugerir que marcadores moleculares do tipo microssatélites sejam adicionados nesta avaliação, aumentando-se a confiança no processo de seleção, demonstrando-se, com seu uso, a existência de diversidade genética entre os indivíduos elites selecionados.

Em programas de melhoramento, os marcadores moleculares podem ser utilizados para se proporcionar aumento na eficiência de seleção, melhor caracterização do germoplasma e maximização dos ganhos genéticos.

Poucos marcadores moleculares têm uso tão amplo como os microssatélites. Os locos de microssatélites ou *Simple Sequence Repeat* (SSR) são sequências curtas compostas de 1 a 6 nucleotídeos repetidos de 10 a 60 vezes ao longo da molécula de DNA (RAFALSKI et al., 1996). Rápido e confiável, a grande vantagem do uso de marcadores

microssatélites está no fato de que este marcador, a cada reação de amplificação, revela um único loco, o qual é frequentemente multialélico. É uma técnica considerada ideal para construção de mapas genéticos (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994; BRONDANI et al., 2002; WU; TANKSLEY, 1999), planejamento de cruzamentos nos programas de melhoramento pela determinação da distância genética entre linhagens (LEITE et al., 2002; ROCHA et al., 2002) e identificação e discriminação de genótipos (KIRST et al., 2005; FANG; ROOSE, 1997; VIRK et al., 1999), entre outros.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e avaliar a diversidade genética de duas populações-núcleo de *Eucalyptus grandis*, pertencentes ao programa de melhoramento genético da empresa Votorantim Celulose e Papel S.A, utilizando-se *primers* microssatélites.

Material e métodos

As duas populações-elite de *nucleus breeding* foram compostas a partir da seleção de uma população principal de 260 indivíduos de *Eucalyptus grandis* introduzidos no Brasil, diretamente da Austrália, provenientes de Coff's Harbour, Mont Spec e Atherton, fazendo parte da população-núcleo. Com a seleção de indivíduos de alta performance (população- elite), formaram-se duas populações-núcleo: a 1 é composta por 19 indivíduos e está representada pelo município de Luís Antônio, Estado de São Paulo, e a população 2 possui 20 indivíduos, representando o município de Jacaré, Estado de São Paulo. A seleção foi realizada utilizando-se de diversos parâmetros como características dendrométricas (diâmetro à altura do peito – DAP, altura, volume e fator forma); silviculturais (forma das árvores, porcentagem de casca, quantidade e dimensão dos galhos); fitopatológicas (ausência de cancro e resistência à ferrugem) e qualidade da madeira (densidade básica e rendimento depurado). Estes critérios utilizados na seleção partiram dos objetivos do programa de melhoramento da empresa Votorantim Celulose e Papel S.A.

A extração do DNA genômico seguiu o protocolo de Doyle e Doyle (1987). Foram testados 20 *primers* Embra (BRONDANI et al., 1998), respeitando-se as diferentes categorias de marcações fluorescentes dos mesmos. As condições de reações e os ciclos de amplificação seguiram as recomendações descritas por Brondani et al. (1998). As amostras foram processadas em sequenciador automático 3.100 ABI Prism (Applied Biosystems) e os dados gerados foram identificados e analisados pelos softwares GeneScan e Genotyper (Applied Biosystems).

Para a análise estatística, foi empregado o software TFPGA (Tools for Population Genetics Analyses) versão 1.3 (MILLER, 1997). Por este programa foram determinados os valores de heteroziguidade, além da distância genética entre e dentro das populações estudadas, utilizando-se a distância de Rogers (1972) modificada por Wright (1978). Em seguida, foi realizado o agrupamento dos indivíduos pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages), que considera a média dos valores de distância, utilizando o coeficiente de Nei (1972).

Resultados e discussão

Dos 20 *primers* testados, seis não apresentaram resultados (30%) e 14 apresentaram-se consistentes (70%), com um padrão polimórfico, evidenciando diferença entre os indivíduos estudados. Foram encontrados 158 alelos para a população 1, com uma média de 11,28 alelos por loco analisado, e para os *primers* E16 e E5 foi observada variação alélica maior (18 e 15 alelos, respectivamente) enquanto que nos *primers* E19 e E20 o número de alelos foi menor (cinco alelos). Para a população 2, foi encontrado um número superior de alelos, totalizando 168, obtendo-se a média de 12 alelos loco⁻¹. Nesta população, o *primer* E5 também identificou maior variação alélica (17 alelos), enquanto que o menor número foi observado com os *primers* E11, E19 e E20 (oito alelos).

Esses valores encontrados confirmam o elevado conteúdo de informação genética esperado para este tipo de marcador, assim como o já observado por Furlan et al. (2007) para *Pinus caribaea*. Nos 14 locos analisados, ocorreu grande variação de alelos dentro das populações (Figura 1). Resultado semelhante foi encontrado por Byrne et al. (1996) que estudaram quatro locos em populações de *Eucalyptus niten* e observaram uma variação de cinco a 16 alelos.

Os indivíduos analisados no presente trabalho apresentaram polimorfismo relativamente elevado, o que é extremamente importante para o início do programa de melhoramento. A intensidade seletiva deve ser um parâmetro a ser considerado, pois, se esta for muito severa, poderá ocasionar a eliminação ou a perda precoce de alelos favoráveis de locos responsáveis por outros caracteres.

Van Der Nest et al. (2000) propuseram o uso de *primers* SSR em larga escala em estudos de diversidade de populações de *Eucalyptus* e o monitoramento de programas de melhoramento para assegurar a existência de diversidade genética significativa dentro de populações altamente selecionadas, sugerindo que os microsatélites são

mais sensíveis para se mensurar a diferenciação entre as populações. A variabilidade observada com o uso de marcadores SSR em plantas é geralmente muito elevada.

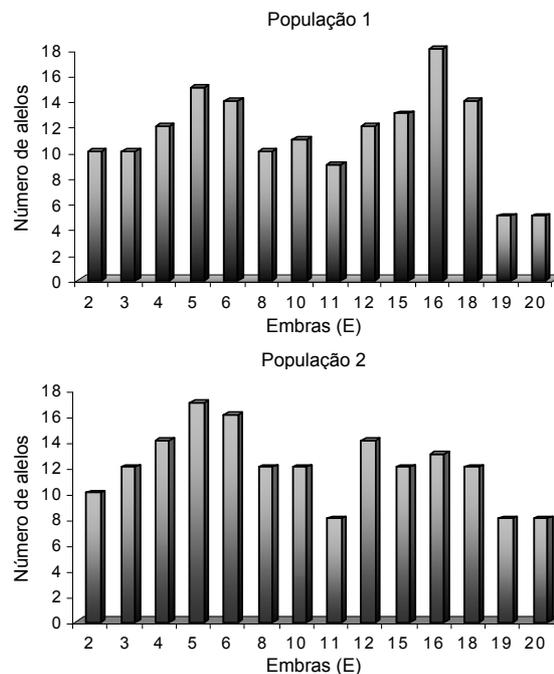


Figura 1. Número de alelos encontrados na análise das populações 1 e 2 para com cada *primer* microsatélite – Embra (E).

Além da variação alélica, outra informação obtida, de grande importância, é a distância genética que, além de auxiliar no enriquecimento da base genética durante o desenvolvimento de um programa de melhoramento, permite avaliar a redundância e a deficiência das coleções de germoplasma. A partir da análise dos dados moleculares neste trabalho, foram geradas matrizes de distância genética, utilizando-se o coeficiente de distância de Rogers (1972), modificado por Wright (1978). Estas matrizes foram usadas para se agrupar os indivíduos por meio da construção de dendrogramas pelo método UPGMA, usando-se o coeficiente de Nei (1972) para ajuste na construção do dendrograma, para as populações 1 e 2. Observa-se, nas Figuras 2 e 3, que os dendrogramas construídos apresentaram diferentes agrupamentos das populações 1 e 2. Embora as maiores distâncias genéticas tenham sido similares entre os dois dendrogramas, os grupos foram diferentes entre si.

A distância genética média encontrada para a população 1 foi de 0,6220, apresentando-se uma superioridade de 1,74% em relação à população 2 que obteve a distância média de 0,6112. Muro-Abad

et al. (2005), trabalhando com marcadores microssatélites, encontraram ampla variação nos valores de distância, que foram de 0,01 a 0,10. Estudos com população de *Eucalyptus urophylla* apresentaram uma média de 0,683 de distância genética (LEITE et al., 2002).

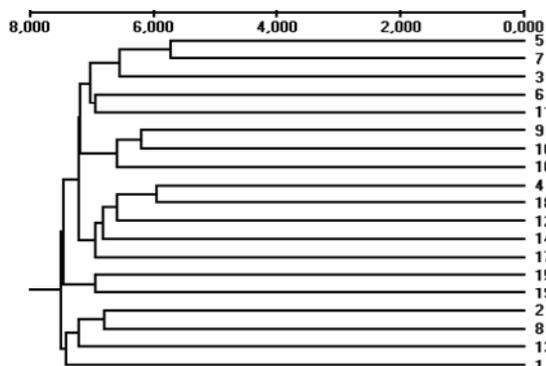


Figura 2. Dendrograma UPGMA para a representação de 19 genótipos da população 1 de *Eucalyptus* em função das distâncias genéticas, obtidas pelo coeficiente de Nei (1972).

Os indivíduos 5 e 7 da população 1 foram os mais próximos entre si, apresentando a distância de 0,572, estando a 0,745 dos indivíduos 1 e 13, que foram os mais distintos geneticamente dos primeiros. No entanto, na população 2, a menor distância encontrada foi 0,299 entre os indivíduos 9 e 15, sendo os indivíduos 5 e 18 os mais distantes em relação aos demais.

Durante o processo de seleção, foram tomadas precauções tais como o controle dos parentais polinizadores, para se evitar selecionar indivíduos muito aparentados para a composição das populações-núcleo. Os dados moleculares reforçam isso, visto que, pela análise dos dendrogramas, pode-se observar que as árvores são pouco relacionadas. Desta forma, os valores de distância genética encontrados entre os indivíduos das populações sugerem ampla base genética.

A diferença de uma população-base de melhoramento para a população comercial de uma empresa é exatamente o grau de variabilidade que cada uma deverá possuir. No caso da população comercial, quanto menor a variabilidade, maior será a uniformidade do plantio, facilitando-se a colheita da madeira e gerando-se produto final de qualidade.

A ideia de se usar distância genética como parâmetro para a escolha dos melhores indivíduos em cruzamentos está embasada na capacidade de combinação entre dois parentais contrastantes que

propiciaria um híbrido superior (MYBURG et al., 2003).

Foi observado elevado número de indivíduos heterozigotos, tanto na população 1 como na população 2. A diversidade genética estimada pela heterozigosidade esperada variou de 0,626 a 0,951 para a população 2 com uma média de 0,869. Houve uma diminuição nos valores de heterozigosidade esperada para a população 1, variando-se de 0,542 a 0,942 com uma média de 0,843.

A heterozigosidade é uma medida adequada para se quantificar a variação, porém também considera a frequência de heterozigotos como um importante indicador da diversidade genética, uma vez que cada heterozigoto carrega alelos diferentes. Muro-Abad et al. (2005), estudando locos SSR, encontraram heterozigosidade média de 0,2614 em híbridos de *Eucalyptus*, considerada baixa quando comparada com os valores obtidos neste estudo em que a heterozigosidade esperada nas populações 1 e 2 indicam variabilidade suficiente para se integrar uma população de melhoramento.

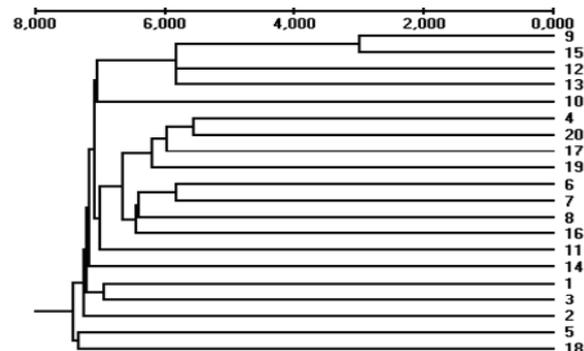


Figura 3. Dendrograma UPGMA para a representação de 20 genótipos da população 2 de *Eucalyptus* em função das distâncias genéticas, obtidas pelo coeficiente de Nei (1972).

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que o uso de marcadores moleculares, como ferramentas auxiliares, no programa de melhoramento, traz ganhos junto ao processo de seleção, pois permite verificar a existência e quantificar a diversidade genética da população selecionada, o que proporciona ganhos no campo.

As populações analisadas, apesar de terem redução quanto à sua forma silvicultural, estão aptas para compor o programa de melhoramento, visto que apresentaram taxas de diversidade adequadas, em se tratando de árvores geneticamente pouco relacionadas nas duas populações.

Referências

- 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 Genomics**, v. 267, n. 3, p. 338-347, 2002.
- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization, mapping strategy of microsatellites markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 5-6, p. 816-827, 1998.
- BYRNE, M.; MARQUEZ-GARCIA, M. I.; UREN, T.; SMITH, D. S.; MORAN, G. F. Conservation and genetic diversity of microsatellites loci in the genus *Eucalyptus*. **Australian Journal of Botany**, v. 44, n. 3, p. 331-341, 1996.
- COTTERILL, P. P.; BRINDGERS, M. ***Eucalyptus globulus* breeding plan for CELBI**. Melbourne: CSIRO, 1988.
- COTTERILL, P. P.; CAMERON, J. M. ***Pinus radiata* breeding plan for APM Forests**. Melbourne: CSIRO, 1988. (Tech report).
- COTTERILL, P. P.; DEAN, C. A. **Successful breeding: a manual of applied index selection**. Melbourne: CSIRO, 1989.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.
- FANG, D. Q.; ROOSE, M. L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, n. 3, p. 408-417, 1997.
- FURLAN, R. A.; MORI, E. S.; TAMBARUSSI, E. V.; MORAES, C. B.; JESUS, F. A.; ZIMBACK, L. Estrutura genética de populações de melhoramento de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* por meio de marcadores microsatélites. **Bragantia**, v. 66, n. 4, p. 553-563, 2007.
- 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, n. 3, p. 1121-1137, 1994.
- KIRST, M.; CORDEIRO, C. M.; REZENDE, G. D. S. P.; GRATTAPAGLIA, D. Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding population. **Journal of Heredity**, v. 96, n. 2, p. 1-6, 2005.
- LEITE, S. M. M.; BONINE, C. A. V.; LOPES, C. R.; MORI, E. S.; VALLE, C. F.; MARINO, C. L. Genetic variability in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Silvae Genetica**, v. 51, n. 5-6, p. 253-256, 2002.
- MILLER, M. P. **Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) version 1.3**: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997.
- MYBURG, A. A.; GRIFFIN, A. R.; SEDEROFF, R. R.; WHETTEN, R. W. Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F₁ hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, n. 6, p. 1028-1042, 2003.
- MURO-ABAD, J. I.; ROCHA, R. B.; CRUZ, C. D.; ARAÚJO, E. F. Obtainment of *Eucalyptus* ssp. hybrids aided by molecular markers – SSR analysis. **Scientia Forestalis**, n. 67, p. 53-63, 2005.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, n. 949, p. 283-292, 1972.
- NEWBURY, H. J. **Plant molecular breeding**. London: Blackwell Scientific Publishers, 2003.
- ODA, S.; MENCK, A. L. D. E. M.; VENCOVSKY, R. Problemas no melhoramento genético clássico do Eucalipto em função da alta intensidade de seleção. **IPEF**, n. 41-42, p. 8-17, 1989.
- PHILLIPS, T. D.; MURPHY, J. P.; GOODMAN, M. M. Isozyme variation in germplasm accessions of wild oat, *Avena sterilis* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, n. 1, p. 54-64, 1993.
- RAFALSKI, D. J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. (Ed.). **Analysis of non-mammalian genomes: a practical guide**. New York: Academic Press, 1996. p. 75-134.
- ROCHA, R. B.; ABAD, J. I. M.; PIRES, I. E.; ARAÚJO, E. F. Fingerprint and genetic diversity analysis of *Eucalyptus* ssp. genotypes using RAPD and SSR markers. **Scientia Florestalis**, n. 62, p. 24-31, 2002.
- ROGERS, J. S. **Measures of genetic similarity and genetic distance**. Austin: University of Texas Publication, 1972. (Studies in genetics, 7).
- VAN DER NEST, M. A.; STEENKAMP, E. T.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Development of simple sequence repeats (SSR) markers in *Eucalyptus* from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR). **Plant Breeding**, v. 119, n. 5, p. 433-436, 2000.
- VIRK, P. S.; POONI, H. S.; SYED, N. H.; KEARSEY, M. J. Fast and reliable genotype validation using microsatellite markers in *Arabidopsis thaliana*. **Theoretical and Applied Genetic**, v. 98, n. 3-4, p. 462-464, 1999.
- WHITE, T. L.; MATHESON, A. C.; COTTERILL, P. P.; JOHNSON, R. G.; ROUT, A. F.; BOOMSMA, D. B. A nucleus breeding plan for radiata pine in Australia. **Silvae Genetica**, v. 48, n. 3-4, p. 122-133, 1999.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. v. 4.
- WU, K. S.; TANKSLEY, S. D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular and General Genetics**, v. 241, n. 1-2, p. 225-235, 1999.

Received on June 3, 2008.

Accepted on February 12, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.