



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA**

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE E DIVERGÊNCIA
GENÉTICA EM CLONES DE *Eucalyptus* spp.
POTENCIALMENTE IMPORTANTES PARA GOIÁS**

KELLY DE JESUS SILVA MACIEL

Orientador:
Prof. Evandro Novaes

Setembro – 2014

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Kelly de Jesus Silva Maciel

Título do trabalho: Análise da diversidade e divergência genética em clones de *Eucalyptus* spp. potencialmente importantes para Goiás.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Kelly de Jesus Silva Maciel
Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 20 / 09 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

² A assinatura deve ser escaneada.

KELLY DE JESUS SILVA MACIEL

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE E DIVERGÊNCIA
GENÉTICA EM CLONES DE *Eucalyptus* spp.
POTENCIALMENTE IMPORTANTES PARA
GOIÁS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

Prof. Dr. Evandro Novaes

Goiânia, GO – Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

de Jesus Silva Maciel, Kelly
Análise da diversidade e divergência genética em clones de
Eucalyptus spp. potencialmente importantes para Goiás [manuscrito]
/ Kelly de Jesus Silva Maciel. - 2014.
Ixiv, 64 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Novaes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Agronomia (EA) , Programa de Pós-Graduação em Genética &
Melhoramentos de Plantas , Goiânia, 2014.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Eucalyptus. 2. teste clonal. 3. diversidade genética. 4.
microssatélites. I. Novaes, Evandro, orient. II. Título.

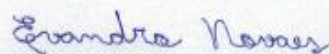


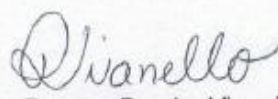
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
MELHORAMENTO DE PLANTAS




ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE KELLY DE JESUS SILVA MACIEL. Aos três dias do mês de Setembro do ano de dois mil e catorze (03.09.2014), às 14h00min, no Auditório PPGA Escola de Agronomia, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora, Prof. Dr. Evandro Novaes – Presidente/Orientador; Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho; Dr^a. Rosana Pereira Vianello. Sob a presidência do orientador, e em sessão pública, procedeu-se à avaliação da defesa de Dissertação intitulada: **“Análise da diversidade e divergência genética em clones de *Eucalyptus* spp. Potencialmente importantes para Goiás”**, de autoria de **Kelly de Jesus Silva Maciel**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, no nível de Mestrado, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. Evandro Novaes, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da Dissertação que, em 40 minutos, apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca argüiu o mestrando, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Ao final, a banca reunida em separado procedeu à avaliação da defesa. O título da dissertação foi alterado para “

_____”De acordo com a Resolução nº 1053/2011, do CEPEC - Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura, que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, e desde que procedidas às correções recomendadas, a Dissertação será considerada aprovada pela Banca Examinadora, estando integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, pela Universidade Federal de Goiás. O mestrando deverá efetuar as modificações eventualmente sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar a versão definitiva da Dissertação à Secretaria do PGMP, no prazo máximo de trinta dias após a data da Defesa. A conclusão do Curso e a emissão do Diploma dar-se-ão após o cumprimento do Artigo 52 da Resolução CEPEC nº 1053/2011. A Banca Examinadora recomenda a publicação de artigo(s) científico(s), oriundo(s) dessa Dissertação, em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17:20h. A presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação e, para constar eu, Jéssica Almeida, secretária PGMP, lavei a presente Ata que depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em duas vias de igual teor.


Prof. Dr. Evandro Novaes
Presidente/Orientador


Dr. Rosana Pereira Vianello
Membro Externo


Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho
Membro Interno

À minha família, por todo amor, apoio e esforço que fizeram para que eu tivesse acesso ao conhecimento.

Ofereço

Ao meu esposo Ricardo por todo amor, companheirismo e apoio que me deu nas horas difíceis.

Dedico

Agradecimentos

Mais uma jornada está chegando ao fim e eu não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que participaram da execução deste trabalho, direta ou indiretamente. Tenho certeza que sem a colaboração e apoio de vocês este sonho não teria sido concretizado.

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter permitido que eu vivenciasse tantas experiências positivas nesta formação. Muito obrigada pela força, coragem e determinação que me tens dado para seguir em busca de meus objetivos.

Agradeço a toda a minha família. Aos meus pais Antônio e Maria por todo amor e dedicação, por terem me educado e ensinado a correr atrás dos meus objetivos, sabendo que a educação é o único caminho que leva ao desenvolvimento pessoal e profissional do ser humano. À minha irmã Camila por todos os momentos que estivemos juntas, desde as brigas até os momentos de profunda alegria e felicidade. Tudo o que passei ao seu lado serviu de aprendizado para mim e ajudou a construir a pessoa que sou hoje. Muito obrigada pela credibilidade e apoio que sempre depositou em meus projetos. Por fim, agradeço especialmente ao meu esposo Ricardo por todo amor, incentivo, companheirismo, suporte e por tudo o que representas em minha vida. Por ter sido meu porto seguro nos momentos de tristeza e desânimo, por ter sido minha força quando eu pensei que já não pudesse seguir adiante. Por ter estado comigo e acompanhado de perto todo este processo de formação e obtenção de conhecimento. Tenho certeza que sem o seu apoio tudo teria sido muito mais difícil.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas (PGMP) na pessoa da Prof. Patrícia Guimarães (Coordenadora) e Prof. Mariana Pires Campos Telles (Subcoordenadora) pela oportunidade em realizar o mestrado nesta área tão rica e promissora pela qual tenho grande afinidade. Agradeço à Jessica Almeida Silva (secretária) por toda ajuda na solução de dúvidas, problemas e por sua disponibilidade. Agradeço à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela bolsa de mestrado concedida.

Agradeço a todos os professores que ministraram as disciplinas que participei. Todos vocês contribuíram de forma singular para a minha formação, obtenção de conhecimento e pensamento crítico. Agradeço ao Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho por seus ensinamentos referentes à biometria de marcadores moleculares que muito

contribuíram na execução e interpretação deste estudo. De maneira especial, agradeço ao Prof. Dr. Evandro Novaes primeiramente por ter aceitado me orientar durante estes dois anos de pós-graduação, dando-me instruções e ensinamentos valiosos tanto sobre o universo acadêmico quanto sobre caráter, dedicação, força de vontade e coragem de enfrentar os desafios da vida. Muito obrigada por sua paciência e amizade durante este período.

Agradeço aos viveiros e empresas parceiras que viabilizaram a execução deste trabalho fornecendo o material vegetal e informações utilizadas no estudo. Do mesmo modo, agradeço ao Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV) na pessoa do Prof. Dr. Acelino Couto Alfenas pela grande receptividade e oportunidade que forneceram na coleta do material estudado. Por todo o aprendizado que me proporcionaram, o meu muito obrigada!

Agradeço ao Prof. Dr. Dario Grattapaglia e à Danielle Paiva da Universidade de Brasília (UnB) pelo envio dos *primers* e do Kit de extração de DNA utilizados neste trabalho. Muito obrigada por todo apoio que me deram. Sem a colaboração de vocês, este estudo não teria sido realizado.

Gostaria também de agradecer a todos os estudantes e funcionários do Laboratório de Genética e Genômica de Plantas da Universidade Federal de Goiás (UFG) pela ajuda na realização dos experimentos e por terem fornecido um ambiente calmo e tranquilo para que a aprendizagem científica ocorresse naturalmente. Conviver com vocês foi um presente de Deus pra mim. Obrigada por tudo o que ensinaram. De modo especial quero agradecer às minhas queridas amigas Stela Ribeiro e Sabrina Delgado por terem sido companheiras de todas as horas e dificuldades. Muito obrigada pela grande ajuda que me deram durante todo esse período.

Agradeço aos meus colegas de turma por todas as vezes que serviram de inspiração e motivação no meu crescimento. Obrigada pelas conversas engrandecedoras que tivemos e pela ajuda que me forneceram nos momentos de dificuldades.

SUMÁRIO

	Lista de Figuras	vii
	Lista de Tabelas	viii
	RESUMO	ix
	ABSTRACT	x
1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	O GÊNERO EUCALYPTUS	14
2.1.1	Origem e caracterização das espécies de <i>Eucalyptus</i>	14
2.1.2	Importância do gênero <i>Eucalyptus</i> no setor florestal brasileiro	17
2.1.3	Melhoramento de <i>Eucalyptus</i>	19
2.2	MARCADORES MOLECULARES	21
2.2.1	Marcadores Microsatélites	22
2.3	DIVERSIDADE GENÉTICA	24
2.4	ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	MATERIAL VEGETAL.....	34
3.2	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	35
3.3	AMPLIFICAÇÃO DO DNA UTILIZANDO MICROSSATÉLITES.....	36
3.4	GENOTIPAGEM DOS CLONES-ELITE DE EUCALYPTUS.....	37
3.5	ANÁLISE DOS DADOS.....	38
3.5.1	Diversidade Genética.....	38
3.5.2	Divergência Genética.....	39
3.5.3	Estrutura populacional dos clones-elite de <i>Eucalyptus</i>	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	DIVERSIDADE GENÉTICA.....	41
4.2	ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES.....	47
4.3	DISTÂNCIA GENÉTICA ENTRE OS CLONES-ELITE DE EUCALYPTUS.....	51
5	CONCLUSÕES	55
6	REFERÊNCIAS	56

Lista de Figuras

Figura 1	Características gerais das árvores de <i>Eucalyptus</i> . A – árvore de grande porte pertencente ao gênero <i>Eucalyptus</i> ; B – caráter hermafrodita das flores de <i>Eucalyptus</i> ; C – polinização por entomofilia por abelha, o principal agente polinizador.....	16
Figura 2	Porcentagem de áreas de florestas plantadas com os gêneros <i>Eucalyptus</i> e <i>Pinus</i> , no período de 2012 a 2013 no Brasil (fonte: ABRAF, 2013).....	18
Figura 3	Quantificação das amostras de DNA em gel de agarose 0,8%.....	36
Figura 4	Picos de fluorescência encontrados na genotipagem de clones-elite de <i>Eucalyptus</i> utilizando o programa GenneMapper.....	38
Figura 5	Distribuição das frequências alélicas de 11 locos microssatélites de clones-elite de <i>Eucalyptus</i>	43
Figura 6	Valores de ΔK obtidos pelo programa <i>Structure</i> , evidenciando um pico maior em $K = 3$	48
Figura 7	Análise da composição genômica dos clones-elite de <i>Eucalyptus</i> em relação às três populações que contribuem para a estrutura genética da amostra. Figura obtida com o programa <i>Structure</i>	48
Figura 8	Dendrograma representando as distâncias genéticas entre os 90 clones-elite de <i>Eucalyptus</i> , O dendrograma foi construído através do agrupamento UPGMA, com base na distância genética de Rogers (modificado).....	52
Figura 9	Gráfico representando as distâncias genéticas entre os 90 clones-elite na primeira (eixo x) e segunda (eixo y) coordenadas principais (PCoA).	54

Lista de Tabelas

Tabela 1	Quantidade de clones-elite utilizada no estudo e suas procedências.....	34
Tabela 2	Sistemas <i>multiplex</i> utilizados para a genotipagem dos microssatélites. Para cada loco são apresentados o respectivo fluorocromo, motivo de repetição e suas faixas alélicas.....	37
Tabela 3	Estatística descritiva por loco microssatélite (n = número de indivíduos genotipados, P = frequência de alelos polimórficos, A = número de alelos por loco, He = heterozigosidade esperada, Ho = heterozigosidade observada, f = índice de fixação dos alelos).....	42
Tabela 4	Estimativas dos parâmetros de diversidade genética por população (n = número de indivíduos, P = frequência de alelos polimórficos, A = número de alelos por loco, He = heterozigosidade esperada, Ho = heterozigosidade observada, f = índice de fixação intrapopulacional).....	44
Tabela 5	Riquezas alélicas estimadas utilizando o programa FSTAT para três populações de <i>Eucalyptus</i> . As estimativas foram obtidas considerando amostras de 13 indivíduos diploides por população.....	45
Tabela 6	Estimativas de parâmetros para avaliar a estruturação da diversidade genética de <i>Eucalyptus</i> . As estimativas foram obtidas utilizando o programa GDA, com 10000 randomizações.....	49

RESUMO

MACIEL, K. J. S. **Análise da diversidade e divergência genética em clones de *Eucalyptus* spp. potencialmente importantes para Goiás.** 2014. 64 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.¹

O sucesso do setor florestal brasileiro deve-se em grande parte à excelente adaptabilidade do gênero *Eucalyptus* ao nosso clima e condições do solo. A recente expansão do eucalipto para as regiões norte e central do Brasil requer pesquisas para que os clones se adaptem à seca, elevadas temperaturas e escassez de nutrientes nos solos do Cerrado. O objetivo deste estudo foi estimar a diversidade e divergência genética entre 90 dos clones utilizados em uma rede de testes clonais no estado de Goiás. Os clones foram genotipados com nove locos microssatélites organizados em quatro sistemas “multiplex” para PCR. Os fragmentos amplificados foram separados na plataforma ABI-3100 (Applied Biosystems). A genotipagem foi realizada utilizando o programa *GeneMapper* (Applied Biosystems). Os parâmetros de diversidade genética foram estimados usando os programas *GDA* e *Fstat*. Os parâmetros número de alelos (*A*), heterozigosidade esperada (*He*), heterozigosidade observada (*Ho*), índice de fixação intrapopulacional (*f*) e riqueza alélica foram estimados para cada loco microssatélite. Os resultados mostraram que todos os locos utilizados neste estudo foram altamente polimórficos, com média de 16,78 alelos por loco. A genotipagem dos locos EMBRA28 e EMBRA3 mostrou o maior número de alelos (24 e 22). De maneira geral, para a maioria dos locos estudados, a heterozigosidade observada apresentou estimativas semelhantes à heterozigosidade esperada dentro das condições do Equilíbrio de Hardy-Weimberg. Como resultado, o índice de fixação (*f*) não diferiu significativamente de zero. A análise da estrutura genética dos clones foi realizada utilizando o programa *Structure* (versão 2.3.4), com valores de *K* variando de 1 a 10, com 10 iterações cada. Os resultados indicaram a presença de três grupos genéticos distintos (*K* = 3). Entretanto, não foi observada uma clara relação entre as populações obtidas e as diferentes espécies de *Eucalyptus* utilizadas no estudo. Esse resultado pode ser explicado pelo fato da amostra de clone ser originada de programas de melhoramento, onde os cruzamentos recombinam o material genético das populações, desfazendo algumas estruturas genéticas. De forma mais importante, as análises moleculares indicaram grande diversidade genética dentre os clones que estão sendo avaliados em Goiás. Esta diversidade genética pode ser explorada em um programa de melhoramento para obtenção de novos materiais genéticos adaptados às condições do Cerrado.

Palavras-chave: Eucalyptus, teste-clonal, diversidade genética, microssatélites.

¹Orientador: Prof. Dr. Evandro Novaes. EA-UFG.

ABSTRACT

MACIEL, K. J. S. **Genetic diversity and divergence among *Eucalyptus* spp. clones potentially adapted to Goiás**. 2014. 64 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.¹

The success of the Brazilian forestry is due largely to the excellent adaptability of the *Eucalyptus* genus to our climate and soil conditions. The recent expansion of eucalypts to the North and Midwest regions of Brazil presents challenges such as the need for clones adapted to drought, high temperatures and nutrient deficient soils of Cerrado. Three clonal trials were installed in different regions of Goiás State to evaluate the adaptability and growth of 113 elite clones of *Eucalyptus* spp. The objective of this study was to estimate the genetic diversity and divergence among 90 of the clones used in three clonal trials installed in different regions of Goiás State. The clones were genotyped with nine microsatellite loci organized into four "multiplex" systems for PCR. The amplified fragments were separated on the ABI-3100 platform (Applied Biosystems). The genotyping was performed using the *GeneMapper* software (Applied Biosystems). Genetic diversity parameters were estimated using the *GDA* and *Fstat* programs. The parameters number of alleles (*A*), expected heterozygosity (*He*), observed heterozygosity (*Ho*), intrapopulation fixation index (*f*) and allelic richness were estimated for each microsatellite locus. The results showed that all loci used in this study were highly polymorphic, with an average of 16.78 alleles per locus. The EMBRA28 and EMBRA3 loci showed the highest number of alleles (24 and 22). In general, for most markers, the observed heterozygosity had similar estimates when compared to the expected heterozygosity under Hardy-Weinberg Equilibrium. As a result, the fixation index (*f*) did not differ significantly from zero. Analyses of genetic structure of the clones was performed using the software *Structure* (version 2.3.4), with *K* values ranging from 1 to 10, with 10 interactions each. Results indicated presence of three distinct genetic groups (*K* = 3). However, there was no clear relationship between the populations obtained and the different species of *Eucalyptus* used in the study. This result can be explained by the clone sample is originated from breeding programs where crosses may have admixed populations, disrupting some genetic structures. Most importantly, the molecular analyses indicate extraordinary genetic diversity within the clonal trials installed in Goiás. This genetic diversity can be exploited for breeding new genetic material adapted to the Cerrado conditions.

Key words: Eucalyptus, clonal trial, genetic diversity, microsatellite.

¹Adviser: Prof. Dr. Evandro Novaes. EA-UFG.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o relatório estatístico da FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) do ano de 2013, existem mais de quatro bilhões de hectares de florestas em todo o mundo. Destes, aproximadamente 150 milhões estão localizados no Brasil, sendo o segundo país que mais possui áreas florestais. Apesar de a grande maioria dessa área ainda ser de florestas nativas, o desenvolvimento econômico atrelado à expansão da agricultura e dos centros urbanos vem causando forte pressão nesses ecossistemas. Assim, as florestas plantadas têm recebido papel de destaque principalmente para suprir, de maneira racional e sustentável, o constante aumento da demanda por produtos madeireiros. Este fornecimento de matéria-prima sustentável é fundamental para a preservação da vegetação nativa, evitando, assim, o desmatamento de áreas naturais (Grattapaglia & Kirst, 2008).

A maioria das áreas de florestas plantadas do Brasil é formada por indivíduos dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*. O gênero *Eucalyptus* tem sido o mais amplamente plantado em todo o mundo, com áreas de cultivo equivalentes a aproximadamente 20 milhões de hectares em mais de 100 países (Myburg et al., 2014). Esse sucesso deve-se ao fato deste gênero apresentar grande adaptabilidade a diferentes condições edafoclimáticas. Outra razão da utilização de *Eucalyptus* em grande escala é devido às múltiplas aptidões de sua madeira, sendo utilizada para a produção de celulose, carvão vegetal, postes, madeira serrada, móveis, e até produtos não madeireiros como óleo essencial (Bertola, 2005; Ishii, 2009).

No Brasil, aproximadamente 75% das áreas destinadas a plantios florestais são compostas por árvores de eucalipto, perfazendo mais de cinco milhões de hectares. As demais áreas são ocupadas principalmente por coníferas do gênero *Pinus*. As áreas destinadas à eucaliptocultura foram desenvolvidas, inicialmente, nas regiões de Mata Atlântica, principalmente nas regiões Sul, Sudeste e no Sul do estado da Bahia. No entanto, o aumento da demanda por produtos madeireiros tanto no mercado nacional quanto internacional acabou impulsionando a implantação de plantios florestais em outras regiões

do país. Esse aumento da demanda, aliado ao aumento do preço de terras nas regiões Sul e Sudeste, acabaram gerando uma constante expansão da eucaliptocultura em praticamente todo o território nacional (ABRAF, 2013).

Na região Centro-Oeste, os estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul apresentaram aumento de suas áreas destinadas ao plantio de eucalipto, com crescimento de 1,9% e 19%, respectivamente, de 2011 a 2012. Do mesmo modo, o estado do Tocantins na região Norte do Brasil apresentou, no mesmo período, crescimento de aproximadamente 40% das áreas de plantações de eucalipto, sendo o estado que mais expandiu em todo o país. Por outro lado, o estado de Goiás apresentou um decréscimo acentuado de 55% nas áreas destinadas à eucaliptocultura, entre 2011 e 2012, totalizando 38.081 hectares neste último ano. Com isso, as áreas utilizadas em plantios florestais no estado diminuíram aproximadamente 30% considerando as áreas plantadas com árvores de *Eucalyptus* e *Pinus*, fazendo com que este esteja à frente apenas dos estados do Piauí e Rio de Janeiro com relação à quantidade de hectares utilizados em florestas plantadas (ABRAF, 2013).

De maneira geral, é possível concluir que o estado de Goiás tem apresentado um desempenho do setor florestal muito inferior ao encontrado nos demais estados da região Centro-Oeste. Isto pode ser resultado tanto da falta de políticas públicas que incentivem a implantação de atividades florestais no estado como de conhecimento técnico-científico para viabilizar grandes empreendimentos florestais. Além disso, a ausência de materiais genéticos adaptados e altamente produtivos nas condições de clima e umidade do estado pode ser um dos fatores que tem dificultado o interesse na eucaliptocultura em Goiás. Neste sentido, pesquisas que busquem identificar e selecionar materiais genéticos bem adaptados às condições edafoclimáticas encontradas em Goiás podem não só aumentar a produtividade das florestas plantadas como também catalisar investimentos no estado, promovendo maior desenvolvimento do mesmo.

Recentemente, pesquisadores da Universidade Federal de Goiás (UFG), em parceria com a Universidade Federal de Viçosa (UFV), Suzano Papel e Celulose e empresas parceiras, têm conduzido uma rede de testes clonais em regiões representativas das condições climáticas do Estado de Goiás, com o objetivo de identificar materiais genéticos de *Eucalyptus* superiores e adaptados para plantios no Estado. O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise da diversidade e divergência genética de 90 clones-elite potencialmente importantes para o estado de Goiás, utilizando como ferramenta marcadores microsatélites. Desses clones-elite, 55 estão sendo testados no estado. A

análise genética dos clones é importante para conhecimento da real diversidade da amostra em teste no Estado. Além disso, com os marcadores moleculares é possível estimar a divergência genética entre os clones. A análise de divergência é útil para guiar cruzamentos no sentido de reconstituir combinações híbridas bem sucedidas e explorar a heterose funcional nas progênies. A realização do *fingerprint* molecular é outra informação importante, pois possibilita a identificação de eventuais duplicidades de clones, ou seja, clones com a mesma constituição genética, mas que apresentam nomenclaturas diferentes. No geral, a análise molecular com marcadores microssatélites permitirá um melhor conhecimento do nível e da estruturação da diversidade disponível na amostra de clones-élite que estão sendo testados em Goiás. Esse conhecimento é importante para gerenciamento dessa diversidade e racionalização das ações caso esse material genético seja utilizado em um futuro programa de melhoramento de *Eucalyptus* no estado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O GÊNERO EUCALYPTUS

2.1.1 Origem e caracterização das espécies de *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, apresenta mais de 700 denominações diferentes incluindo espécies, variedades e híbridos. Dos dez subgêneros inclusos em *Eucalyptus*, o *Symphyomyrtus* é o mais numeroso, com aproximadamente 300 espécies descritas (Brooker, 2000). Dentre elas, encontram-se as mais comumente utilizadas para fins comerciais, como *E. grandis*, *E. globulus*, *E. urophylla* e *E. camaldulensis* (Kageyama & Vencovsky, 1983). No Brasil, são utilizados, ainda, alguns híbridos interespecíficos, como *E. grandis* x *E. urophylla* (com aproximadamente 47% da área destinada à indústria de celulose) e variedades de espécies puras, como *E. grandis* (26%), *E. saligna* (4%) e *E. dunnii* (3%) (Bracelpa, 2013).

E. grandis é a espécie mais plantada no território brasileiro, pois apresenta rápido crescimento e grande adaptabilidade a regiões de clima tropical. Indivíduos desta espécie têm sido muito utilizados na obtenção de híbridos e em clonagem de árvores selecionadas para a produção de papel e celulose (Rocha et al., 2005; Jones et al., 2006; Fonseca et al., 2010). Esse destaque como material genético se deve ao excelente rendimento volumétrico quando comparada com outras espécies cultivadas no Brasil.

O *E. urophylla* é uma das poucas espécies que não ocorre na Austrália, sendo encontrada em sete ilhas da Indonésia, ao norte do continente Australiano. É considerada importante por sua boa resistência a fatores bióticos e abióticos, principalmente ao cancro do eucalipto, e tolerância ao déficit hídrico. Os híbridos entre *E. grandis* e *E. urophylla* têm se destacado no cenário florestal brasileiro pelo crescimento rápido e por ter bom desempenho na produção de celulose e papel (Payn et al., 2008).

O *E. camaldulensis* é considerada a espécie de maior distribuição geográfica do

gênero, sendo encontrada em quase todo o continente Australiano, principalmente nas encostas de cursos d'água e rios. Estas árvores são capazes de se desenvolver em condições climáticas variadas, sendo uma das espécies mais adequadas para o plantio em zonas críticas de reflorestamento, onde os déficits hídrico e nutricional são fatores limitantes para outras espécies (Butcher et al., 2009).

O *E. globulus* é originária da ilha da Tasmânia e região Sudeste da Austrália, sendo mais comum em solos argilosos com moderada fertilidade (Silva et al., 2006; Barbour et al., 2008). Indivíduos desta espécie têm sido amplamente empregados em regiões temperadas, devido ao seu rápido crescimento nessas condições climáticas e excelentes propriedades da madeira para a produção de celulose e papel (Grattapaglia & Kirst, 2008).

A maioria das espécies de *Eucalyptus* conhecidas são árvores típicas de florestas altas, com altitude variando entre 30 e 50 metros, e de florestas abertas, com árvores menores, atingindo alturas de 10 a 25 metros (Ladiges et al., 2003). Sua reprodução ocorre principalmente por alogamia (fecundação cruzada) com a presença de mecanismos de autoincompatibilidade (Potts, 2004). Entretanto, níveis consideráveis de autofecundação são encontrados, podendo variar de 10% a 35% dos casos (Gaiotto et al., 1997; Moran et al., 2002). A ocorrência de autofecundação nas espécies deste gênero é possível devido ao caráter hermafrodita das flores, cuja fecundação se dá por entomofilia (Figura 1) (Moran et al., 2002; Horshley & Johnson, 2007). Indivíduos deste gênero são diploides, apresentando 22 cromossomos e o tamanho de seu genoma varia de 400 a 700 Mpb, dependendo da espécie (Rye, 1979; Marie & Brown, 1993; Grattapaglia & Bradshaw, 1994). O genoma de *E. grandis* foi recentemente sequenciado, apresentando 640 Mpb (Myburg et al., 2014). A presença de indivíduos poliploides ainda não foi encontrada na natureza, embora seja possível induzir este caráter artificialmente (Grattapaglia & Bradshaw, 1994).

Os ingleses foram os primeiros a catalogar árvores de *Eucalyptus*, em 1788, na Austrália. Entretanto, indivíduos deste gênero também são encontrados na Nova Zelândia, Tasmânia e ilhas vizinhas (Andrade, 1922). Atualmente, espécies de *Eucalyptus* são encontradas em mais de 100 países da América do Sul, sul da Europa, Austrália e África, perfazendo um total de mais de 20 milhões de hectares plantados (Myburg et al., 2014). A presença destas espécies em várias regiões do mundo é possível devido ao bom comportamento de seus indivíduos em amplas condições ambientais, sendo encontrados

em regiões pantanosas, solos arenosos e, em várias condições de precipitação e temperatura (Turnbull, 1999). Além de sua ampla adaptabilidade, os indivíduos de *Eucalyptus* podem ser utilizados para diversas finalidades, como produção de papel, postes, energia, carvão vegetal, madeira serrada, móveis, chapa e fibra, lâminas, compensados, aglomerados, além de serem utilizadas para outras finalidades, como a produção de óleos essenciais e mel (Ishii, 2009).

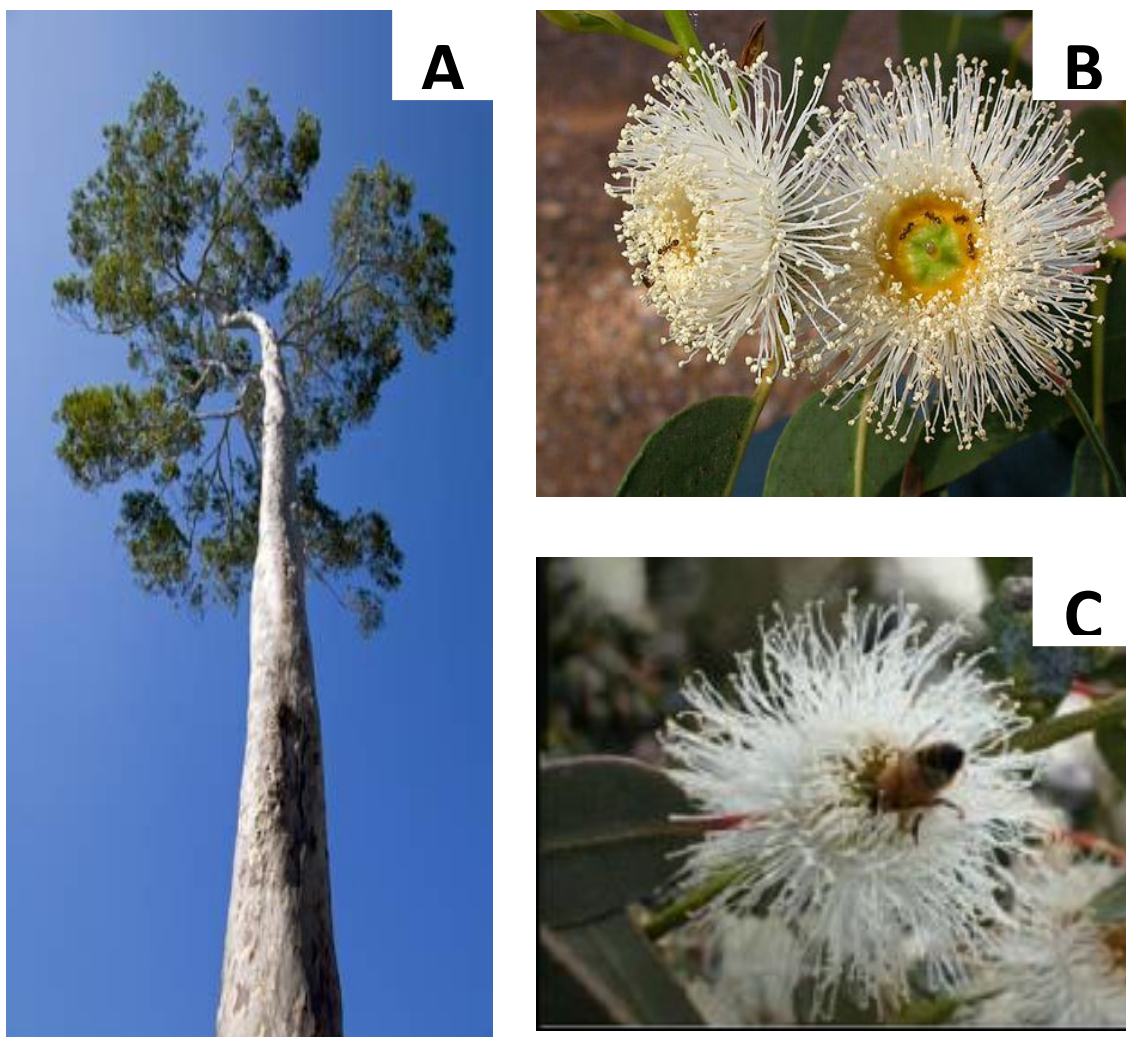


Figura 1. Características gerais das árvores de *Eucalyptus*. A – árvore de grande porte pertencente ao gênero *Eucalyptus*; B – caráter hermafrodita das flores de *Eucalyptus*; C – polinização por entomofilia por abelha, o principal agente polinizador (Grattapaglia et al., 2012).

A disseminação de sementes de *Eucalyptus* no mundo começou no início do século XIX. Em 1823 estas sementes chegaram à América do Sul, sendo utilizadas inicialmente em países como Chile, Argentina e Uruguai. As primeiras mudas de

Eucalyptus chegaram ao Brasil em 1868, mas a introdução deste gênero só foi impulsionada a partir do início do século XX com os experimentos de Edmundo Navarro de Andrade em Rio Claro, São Paulo. Nesses experimentos, Navarro de Andrade comparou várias espécies de eucalipto junto com espécies nativas. Apesar deste estudo pioneiro, a produção do *Eucalyptus* só alcançou destaque a partir da década de 1970. Já em 1980, devido ao sucesso do eucalipto, o Brasil obteve a primeira colocação mundial como produtor e exportador de celulose de fibra curta branqueada (Lima, 1993).

A partir da década de 90 os estudos envolvendo árvores de *Eucalyptus* passaram a se relacionar predominantemente com a utilização racional dos recursos naturais, procurando aumentar a produtividade das florestas sem causar danos excessivos ao solo e ao meio ambiente (Oda et al., 2007). Já nos últimos anos, o enfoque tem incluído também a biotecnologia, biologia molecular e genômica florestal, com o objetivo de aumentar a produtividade e a qualidade da madeira, importante para a fabricação de celulose. (Bertola, 2005).

2.1.2 Importância do *Eucalyptus* no setor florestal brasileiro

As plantações florestais e indústrias associadas, de modo geral, proporcionam benefícios econômicos, sociais e ambientais, como por exemplo, a geração de empregos, favorece a competitividade brasileira no mercado internacional, redução de CO₂ da atmosfera e regulação do ciclo hídrico (Mora & Garcia, 2000). Além destes benefícios, as florestas plantadas têm efeito direto na preservação da vegetação nativa, fornecendo matéria-prima que, de outro modo, seria obtida pelo desmatamento de áreas naturais (Grattapaglia & Kirst, 2008).

A utilização do *Eucalyptus* em plantações florestais foi rapidamente implementada após sua descoberta no século XVIII pelos europeus (Eldridge et al., 1993). Entretanto, árvores deste gênero só passaram a ser cultivadas para exploração comercial no Brasil a partir do século XX, por iniciativa da Companhia Paulista de Estradas de Ferro. O interesse pelo eucalipto, na época, surgiu da necessidade de carvão para abastecer as locomotivas e de madeira para os dormentes utilizados na construção de ferrovias (Mora & Garcia, 2000). Desde então, o gênero *Eucalyptus*, juntamente com *Pinus*, tem desempenhado papel cada vez mais importante na composição das florestas plantadas do país.

O gênero *Eucalyptus* possui ampla distribuição no território brasileiro, sendo encontrado em todos os estados com aproximadamente cinco milhões de hectares, perfazendo 76,6% da área de florestas plantadas no Brasil (Figura 2). O estado de Minas Gerais é o que apresenta a maior quantidade de áreas plantadas de *Eucalyptus* (aproximadamente 1,5 milhão de hectares), seguido dos estados de São Paulo e Paraná. A maior concentração de plantios de *Eucalyptus* nas regiões Sul e Sudeste deve-se principalmente ao fato de as principais unidades industriais dos segmentos de Celulose e Papel, Painéis de Madeira Industrializada, Siderurgia e Carvão Vegetal terem sido instaladas nestas regiões (ABRAF, 2013).

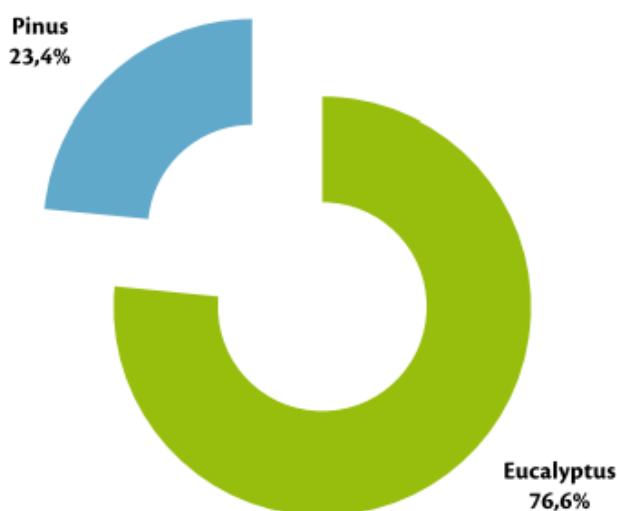


Figura 2. Porcentagem de áreas de florestas plantadas com os gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*, no período de 2012 a 2013 no Brasil (fonte: ABRAF, 2013).

As áreas plantadas com *Eucalyptus* no Brasil vêm crescendo nos últimos cinco anos. Os estados do Mato Grosso do Sul e Tocantins são os que apresentaram maior crescimento (19% e 40%, respectivamente) no período 2011-2012 (ABRAF, 2013). Já os estados da Bahia, Paraná e Goiás são os que apresentam maiores índices de redução, com este último apresentando decréscimo de 55% no mesmo período. Com esse decréscimo Goiás possui hoje aproximadamente 40 mil hectares de florestas plantadas com *Eucalyptus* (ABRAF, 2013). O crescimento das áreas utilizadas na silvicultura brasileira é resultado de investimentos realizados pelas indústrias, o que favorece o aumento da produtividade e qualidade dos produtos florestais brasileiros (Bandeira, 2011). Entretanto, o aumento de áreas agrícolas e a pressão de ambientalistas têm impulsionado os produtores a buscarem maneiras alternativas de aumentar a qualidade e produtividade do eucalipto sem que haja

crescimento das áreas de plantio. Neste sentido, o melhoramento genético das espécies de *Eucalyptus* tem capital importância para melhoria contínua da produtividade florestal (Assis & Mafia, 2007).

2.1.3 Melhoramento de *Eucalyptus*

O melhoramento genético florestal possui como objetivo a seleção de árvores superiores, visando características de interesse, como aumento do volume e densidade da madeira, tronco cilíndrico e retilíneo, e melhorias da qualidade da madeira. Essas características são importantes, pois trazem benefícios ao longo de toda a cadeia produtiva, gerando economia no corte e transporte das árvores e diminuindo a quantidade de terras usadas para produção de um determinado volume de madeira (Grattapaglia & Kirst, 2008). Além dessas, outras características importantes são aquelas relacionadas à resistência a pragas, doenças e estresses ambientais. Nestes casos, a produtividade da floresta está diretamente relacionada à qualidade do material genético utilizado, sendo maximizada quando este material está bem adaptado às condições ecológicas locais.

Plantas superiores de *Eucalyptus* são aquelas que apresentam alelos favoráveis para diversas características econômicas. Além disso, é necessário que estes indivíduos sejam adaptados às condições edafoclimáticas das regiões de plantio. Tais características desejáveis geralmente encontram-se associadas a alelos de alta frequência em espécies contrastantes, podendo ser reunidos através do processo de hibridação interespecífica (Brune & Zobel, 1981).

A hibridação interespecífica consiste na criação de novas combinações genotípicas não existentes na natureza e que só podem ser obtidas através de cruzamentos entre indivíduos de espécies diferentes. Esse processo é interessante devido à ampla variabilidade fenotípica existente entre as espécies de eucalipto, o que viabiliza a obtenção de características complementares em um mesmo indivíduo, além de potencializar o seu vigor híbrido devido à alta heterozigosidade das progênies obtidas (Griffin et al., 1988).

A obtenção de híbridos interespecíficos de *Eucalyptus* é baseada na grande quantidade de alelos existentes entre as diferentes espécies e populações deste gênero, o que caracteriza sua elevada diversidade genética (Grattapaglia & Kirst, 2008). Desse modo, cada indivíduo pode contribuir com uma característica diferente em um programa de melhoramento, seja para características relacionadas à qualidade da madeira ou para

resistência a doenças e condições ambientais (Brune & Zobel, 1981). Após a seleção do genótipo de interesse, é necessária a replicação deste material sem que ele perca suas características vantajosas no processo de recombinação genética resultante de um cruzamento. Neste contexto, dada a grande heterozigosidade das espécies florestais, especialmente das árvores híbridas interespecíficas, a clonagem constitui-se na única maneira de propagar os genótipos superiores. A propagação vegetativa possibilita a perpetuação das características vantajosas das árvores selecionadas, através da fixação das combinações genéticas desejáveis. Outra grande vantagem da clonagem é a obtenção de produtos florestais homogêneos (Leroux & Vanstaden, 1991).

Clone é o indivíduo ou grupo de indivíduos geneticamente idênticos, derivados de um ancestral comum por reprodução assexuada. Neste processo, o genótipo de interesse é transmitido inteiramente dos genitores para a prole, permitindo que as características vantajosas de um indivíduo sejam transmitidas à sua descendência. Para se produzir um clone superior é necessário primeiramente gerar, através da seleção recorrente de árvores elite parentais e de cruzamentos entre elas, um indivíduo com combinação genotípica superior. A partir de então é possível explorar a complementariedade das características e os possíveis efeitos heteróticos existentes em cruzamentos interespecíficos (Sansaloni, 2008). De modo geral, os clones obtidos pelo cruzamento entre diferentes espécies geram árvores mais resistentes a pragas e doenças, com maior taxa de crescimento e capacidade para produzir mais celulose por hectare (Assis & Mafia, 2007).

A clonagem de árvores superiores de *Eucalyptus* é uma estratégia de curto prazo para a obtenção de ganhos em produtividade, qualidade e adaptabilidade nos programas de melhoramento genético conduzidos nas empresas florestais. A grande utilização desta técnica deve-se ao fato de o melhoramento de eucalipto estar ainda em suas etapas iniciais devido ao longo tempo que estes indivíduos necessitam para alcançar a maturidade reprodutiva quando comparados a plantas anuais (Potts, 2004).

Recentemente, novas metodologias e estratégias de seleção têm sido incorporadas aos programas de melhoramento com o objetivo de acelerar o processo de obtenção de materiais genéticos superiores. Dentre elas, o uso de marcadores moleculares tem sido uma boa opção, possibilitando o gerenciamento da variabilidade genética, proteção varietal, controle de qualidade dos cruzamentos realizados em programas de melhoramento, identificação de genes de interesse, produção de mapas genéticos, entre outras finalidades (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Grattapaglia & Kirst, 2008). Além disso,

a utilização destes marcadores fornece novas oportunidades para seleção mais acurada e eficiente de árvores com boas características de crescimento, forma e propriedades da madeira (Ishii, 2009; Aguiar et al., 2007).

2.2 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares são fragmentos de DNA, encontrados em locais específicos do genoma, que permitem a detecção de polimorfismos no material genético. Esses marcadores são transmitidos de uma geração para outra obedecendo aos padrões das leis de herança, descritos por Mendel (Schlötter, 2004; Agarwal et al., 2008). Os marcadores podem estar localizados em qualquer região do genoma, ou seja, em sequências codantes, regulatórias ou intergênicas sem função definida (Schlötter, 2004). Outra característica importante dos marcadores moleculares é o fato de sua herança não ser influenciada por fatores ambientais, sendo considerados neutros (Sansaloni, 2008).

A utilização de marcadores moleculares tem sido aplicada a muitas questões biológicas, que variam desde o mapeamento genético de populações, reconstrução filogenética, análises de diversidade e divergência genética, testes de paternidade a aplicações forense (Agarwal et al., 2008). Já em programas de melhoramento, os marcadores podem ser utilizados em sua etapa inicial, proporcionando um gerenciamento da diversidade genética dos indivíduos utilizados. Além disso, o uso de marcadores moleculares pode proporcionar uma melhor caracterização do germoplasma e maximização dos ganhos genéticos (Souza et al., 2010).

Em trabalhos realizados com *Eucalyptus*, os marcadores moleculares têm sido utilizados na produção de mapas genéticos (Grattapaglia & Sederoff, 1994; Brondani et al., 1998), estudos de diversidade genética e *fingerprint* de indivíduos (Kirst et al., 2005; Ribeiro et al., 2009; Souza et al., 2010; Faria et al., 2010; Faria et al., 2011) e obtenção da estrutura genética de populações (Payn et al., 2008). Nestes estudos, vários tipos de marcadores moleculares têm sido empregados, como RAPD (Caixeta et al., 2003; Grattapaglia & Sederoff, 1994), RFLP (Byrne et al., 1998), microssatélites (Hirakawa et al., 2011) e SNP's (Brumfield et al., 2003; Correia, 2011). Devido ao seu multialelismo e alto polimorfismo, os microssatélites têm se mostrado bastante úteis em estudos para avaliar os níveis de diversidade e divergência genética entre árvores de *Eucalyptus*.

2.2.1 Marcadores Microsatélites

Marcadores microsatélites (Litt & Luty, 1989), também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Tautz et al., 1986), são sequências genômicas repetidas em *tandem*. Tais sequências são denominadas motivos de repetição, podendo apresentar, geralmente, de um a seis nucleotídeos repetidos (Birboin & Strauss, 1975; Hamada et al., 1982). O número de vezes em que o motivo se repete em cada região microsatélite é devido principalmente a mutações que ocorrem durante a replicação do DNA. Essas mutações são conhecidas como *slippage*, em que a enzima DNA-polimerase gera sequências diferentes ao adicionar ou deletar pares de bases quando há um pareamento incorreto entre as fitas complementares nestas regiões repetitivas do DNA. A relativamente mais alta taxa de mutações que ocorrem dentro das sequências microsatélites faz com que, geralmente, estas apresentem uma gama de tamanhos variáveis em diferentes indivíduos de uma mesma espécie e população. Essas diferenças de comprimento do microsatélite é que proporciona alto polimorfismo e multialelismo deste marcador (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Para que seja possível a utilização destes marcadores, é necessária a amplificação de seus fragmentos por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (Mullis, 1983). Esta técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA através da enzima DNA-polimerase, viabilizando sua detecção e genotipagem (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Durante a PCR, a fita dupla da molécula de DNA é desnaturada, formando cadeias simples. Após esse processo, fragmentos curtos de DNA conhecidos como *primers* ligam-se a regiões complementares da sequência alvo, fornecendo à enzima Taq-DNA-polimerase a extremidade 3' livre necessária para que ela inicie a síntese de uma nova fita de DNA complementar à fita molde. Este processo ocorre durante aproximadamente 30 ciclos, finalizando com a obtenção de mais de um bilhão de cópias da região alvo delimitada pelos *primers*. Devido à amplificação da região microsatélite obtida nesta etapa, não é necessário que haja grandes quantidades de DNA para realização dos trabalhos (Semagn et al., 2006).

Em estudos envolvendo microsatélites, os *primers* utilizados na PCR geralmente são loco específicos, ou seja, complementares a sequências únicas que flanqueiam o loco microsatélite de interesse. Sendo assim, para que estes *primers* possam

ser confeccionados é necessário ter conhecimento prévio das sequências do genoma da espécie em estudo ou das partes que envolvem os microssatélites de interesse. A necessidade de conhecimento prévio das sequências que flanqueiam o microssatélite tornam altos os custos de desenvolvimento desses marcadores; sendo esta sua principal desvantagem. Outra grande desvantagem dos marcadores microssatélites é o baixo paralelismo, ou seja, capacidade de avaliar milhares de marcadores ao mesmo tempo, como é o caso para marcadores SNPs quando genotipados via microarrajos ou via sequenciamento de nova geração (Semagn et al., 2006).

Reações de PCR para microssatélites ocorrem na presença de pares de *primers* (*forward* e *reverse*) que hibridizam nas regiões alvo do DNA. Nessa reação, o fragmento de DNA contendo a região microssatélite será amplificado, podendo ser visualizado posteriormente na forma de bandas em gel de agarose ou poliacrilamida, na presença de um corante de DNA (brometo de etídio ou nitrato de prata). Outra maneira de visualização dos fragmentos de DNA amplificados está relacionada à marcação de *primers* com fluorescência ou radioisótopos (Semagn et al., 2006).

O desenvolvimento de fluorocromos para a marcação de *primers* utilizados na análise de microssatélites possibilitou grandes avanços na genotipagem destes marcadores na medida em que permitiu a identificação dos fragmentos amplificados através de plataformas automáticas. Esta automatização do processo de genotipagem de microssatélites possui muitas vantagens, como a genotipagem de mais de um loco microssatélite simultaneamente (Kimpton et al., 1993) . Para tanto, é necessário que durante a PCR o pesquisador utilize um sistema “multiplex” com pares de *primers* marcados com fluorocromos diferentes para os locos que serão amplificados. Esta co-amplificação de locos microssatélites é interessante, pois otimiza os custos e principalmente o tempo gasto para a realização da amplificação dos fragmentos e da genotipagem dos mesmos, fator limitante em vários trabalhos de pesquisa (Sansaloni, 2008).

A plataforma automática ou semiautomática para a genotipagem de microssatélites tem sido empregada em vários laboratórios. De modo geral, o objetivo desta tecnologia é estabelecer sistemas universais e altamente robustos de identificação genética para fins de exame de vínculo genético, estudos de variabilidade em populações e estimativas de distância genética. Entre outras vantagens destes sistemas estão: (1) rapidez e acurácia na geração de dados; (2) avaliação simultânea de vários locos microssatélites em

uma única corrida na plataforma de análise de fragmentos de DNA; (3) aquisição e armazenamento dos dados (computadorizados) em tempo real, reduzindo a manipulação da informação; (4) possibilidade de exportação direta dos dados para os programas de análise genética e (5) transferibilidade imediata do sistema para outros laboratórios, permitindo a padronização dos locos amostrados e a comparação e compartilhamento de resultados (Sansaloni, 2008).

A crescente utilização dos microssatélites na comunidade científica deve-se ao fato deles serem altamente informativos, pois são altamente polimórficos, bem distribuídos no genoma de eucariotos e apresentam caráter codominante, possibilitando a visualização de ambos os alelos em indivíduos heterozigotos (Faria et al., 2011). Além disso, a genotipagem de SSRs necessita de uma pequena quantidade de DNA, é de fácil repetibilidade entre diferentes laboratórios e possui alto grau de transferibilidade de *primers* entre espécies relacionadas. Essas características representam vantagens dos microssatélites quando comparados a outras classes de marcadores.

Em estudos realizados com espécies do gênero *Eucalyptus*, os microssatélites têm sido utilizados com diferentes finalidades, que vão desde a produção de mapas genéticos (Brondani et al., 2006) até a avaliação do grau de polimorfismo presente no genoma destas espécies (Hirakawa et al., 2011), a análise de diversidade genética e obtenção de *fingerprint* molecular (Faria et al., 2011; Kirst et al., 2005). Dentre suas utilidades, o gerenciamento da diversidade genética e identificação de sua estrutura são essenciais para racionalizar as atividades envolvidas no melhoramento genético de plantas. A identificação correta dos materiais genéticos também é importante para vários procedimentos relacionados ao melhoramento, como manejo de sementes ou programas de polinização, o que evita erros e aumenta a qualidade das atividades envolvidas no programa (Grattapaglia & Kirst, 2008).

2.3 DIVERSIDADE GENÉTICA

Uma das aplicações mais importantes dos marcadores microssatélites é a análise da diversidade genética em populações, sejam elas naturais ou de melhoramento. Diversidade genética pode ser definida como a variação de sequências genômicas nos indivíduos de uma mesma espécie. A presença de variação genética nos indivíduos fornece um conjunto de marcadores próprios para o estudo genético de organismos nos seus

habitats nativos, incluindo organismos para os quais a domesticação ou o crescimento em laboratório não podem ser realizados ou que a manipulação genética é impossível (Hartl & Clark, 2010).

Informações sobre a diversidade genética e as relações entre indivíduos, populações, variedades ou raças são importantes, pois, através delas, é possível aperfeiçoar as atividades em programas de conservação de germoplasma ou de melhoramento genético, tanto de plantas como de animais. Além disso, essas informações contribuem também para a conservação biológica das espécies e para estudos de evolução e ecologia de populações. A associação da diversidade genética com a variabilidade fenotípica pode, ainda, identificar alelos que possam afetar a capacidade do organismo de sobreviver em seu *habitat* ou que possam permitir a ele sobreviver em ambientes mais diversificados. Este conhecimento é muito importante para a conservação de germoplasma, identificação de indivíduos, populações, variedades ou raças com características superiores (Duran et al., 2009).

Uma das principais utilizações dos polimorfismos do DNA em estudos de genética de populações está relacionada à investigação das relações genéticas entre subpopulações de uma espécie. Estes estudos partem do princípio de que os alelos são compartilhados entre subpopulações em virtude de terem sido originadas de uma população comum e/ou da migração dos indivíduos de uma subpopulação para outra. Já nas populações humanas, os polimorfismos genéticos são úteis como marcadores genéticos, podendo estar ligados a genes deletérios que causam doenças, por exemplo. Nestes casos, esses marcadores podem ser utilizados tanto para detectar quais membros da família provavelmente carregam o gene deletério, quanto na realização de diagnósticos precoces de pessoas que provavelmente possam ser afetadas (Hartl & Clark, 2010).

Para o gerenciamento da diversidade genética em populações de plantas é imprescindível a sua quantificação. Para tanto, a maioria dos estudos tem utilizado os seguintes parâmetros: heterozigosidade esperada (H_e) e número de alelos por loco (A_p) (Pinto, 2001). Além destes, outro parâmetro frequentemente utilizado é o coeficiente de endogamia (f).

A heterozigosidade observada é uma medida da frequência de heterozigotos encontrada na amostra estudada. Este parâmetro é importante, pois demonstra a existência de variação genética na população, uma vez que cada heterozigoto apresenta diferentes alelos para um determinado gene (Weir, 1996). Além disso, a frequência de heterozigotos

tende a ser maior com o aumento da diversidade genética. Já a heterozigosidade esperada é medida a partir das frequências alélicas encontradas na amostra, partindo do pressuposto de que a população esteja em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este parâmetro pode ser definido pela subtração da frequência de homozigotos esperada (p_i^2) de um (frequência total), a partir da seguinte fórmula:

$$He = 1 - \sum p_i^2$$

Onde p_i é a frequência do *i*ésimo alelo.

Outro parâmetro importante para estimar a diversidade genética de uma população é o número de alelos encontrados por loco (A_p). Esta estimativa é de fundamental importância para a escolha de populações que irão participar de programas de conservação ou melhoramento, pois quanto maior o número de alelos presentes em uma população, maior é a sua diversidade e, portanto, maior é a chance de se encontrar combinações genotípicas favoráveis do ponto de vista do melhoramento genético (Petit et al., 1998). Entretanto, a estimativa de A_p é fortemente influenciada pela quantidade de indivíduos presentes nas amostras, tendendo a aumentar quanto maior for o tamanho amostral. Isso ocorre porque em amostras grandes há uma maior chance de se detectar alelos raros, ou seja, alelos que são encontrados em baixa frequência na população (Zucchi, 2002; Caballero et al., 2010). A fim de corrigir este problema, vários estudos têm utilizado a riqueza alélica para comparar o número de alelos por loco encontrados entre populações que apresentam tamanho amostral diferente. Um dos métodos mais utilizados para estimar riqueza alélica é o proposto por Foulley & Ollivier (2006). Neste método um tamanho populacional fixo é estabelecido para estimativa da riqueza alélica utilizando o método de rarefação proposto por Hulbert (1971). Desse modo, os valores de riqueza alélica obtidos não são afetados pela diferença na quantidade de indivíduos existente nas populações em estudo.

A endogamia é o fenômeno que ocorre em decorrência do acasalamento entre indivíduos aparentados ou, no caso mais extremo, quando ocorre auto-fecundação. O coeficiente de endogamia (f) refere-se à probabilidade de que os alelos de um loco sejam idênticos por ascendência, ou seja, quando derivam ou são cópias de um alelo comum, encontrado em seus ancestrais. Este parâmetro pode ser definido através do coeficiente de

parentesco entre dois indivíduos ou através da frequência de heterozigotos presentes na amostra (Cruz et al., 2011). Se o valor de f encontrado for baixo ou até mesmo negativo, a endogamia para aquele loco é nula na população estudada. Por outro lado, se o valor de f é elevado, a endogamia está presente, fazendo com que a frequência de homozigotos seja maior do que o esperado sob equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A maioria dos estudos de diversidade genética baseia-se em informações de locos amostrados aleatoriamente em populações não estruturadas de maneira hierárquica. Sendo assim, diversas medidas de dissimilaridade (distância) têm sido propostas para verificar o grau de similaridade e a variação genética em amostras de populações, com estimativas em nível individual, intrapopulacional e interpopulacional (Cruz et al., 2011).

As medidas de dissimilaridade são estatísticas multivariadas de redução de dados ou informações, sendo empregadas para se comparar pares de populações (ou indivíduos) em estudo (Weir, 1996). As estimativas de distâncias obtidas pela análise par a par geram uma matriz capaz de proporcionar uma classificação objetiva e estável das populações estudadas (Dias, 1998). Algumas dessas medidas utilizam dados binários, representando presença e ausência de um determinado alelo ou marca. Essas medidas têm sido mais usadas para informações provenientes de marcadores dominantes, uma vez que não é possível distinguir o genótipo homozigoto dominante do heterozigoto (Robinson, 1998). Já outras medidas de dissimilaridade se baseiam nas frequências alélicas ou genotípicas, cujo cálculo é realizado com base em locos individuais, sendo a distância final representada pela média das distâncias de cada loco (Cruz et al., 2011).

Uma das distâncias genéticas mais utilizadas em estudos envolvendo marcadores codominantes, como os microssatélites, é baseada no coeficiente de Rogers (1972) modificado por Wright (1978). Essa medida de distância genética é bastante utilizada na caracterização de acessos de uma população de melhoramento. Esta distância é baseada em uma modificação na distância euclidiana, sendo a distância de Rogers uma média em relação a todos os locos, o que facilita a comparação dos valores obtidos entre estudos cujo número de locos estudados seja diferente. Além disso, para se utilizar essa medida de distância genética, não é necessário conhecimento prévio das forças evolutivas capazes de promover a divergência entre as populações analisadas.

A identificação de grupos mais similares através da análise visual da matriz de distâncias não é trivial, especialmente quando a matriz é muito extensa. Logo, as análises de agrupamento facilitam bastante essa identificação. A análise de agrupamento é uma

técnica exploratória que visa à geração de hipóteses sobre o padrão de aglomeração estabelecido, tendo como fundamento o princípio proposto por Rannala & Mountain (1997). De acordo com esse princípio, a análise de agrupamento deve ser capaz de reunir organismos geneticamente semelhantes e identificar grupos a partir de dados genéticos de uma amostra de indivíduos, assumindo que estes são originados de populações desconhecidas.

O resultado final das análises de agrupamento geralmente é representado em um dendrograma. No entanto, os grupos identificados no dendrograma nem sempre são confiáveis, pois o resultado final pode não representar muito bem a matriz de dissimilaridade genética utilizada. Dessa forma, é importante que se realize uma avaliação da concordância existente entre a matriz de distâncias genéticas e o dendrograma obtido. Essa avaliação é realizada através do coeficiente de correlação cofenética, que indica qual é o grau de correlação entre a matriz de distâncias original e a matriz de distâncias cofenéticas, obtida a partir do dendrograma. A estimativa de correlação cofenética varia de zero (0) a um (1) e, quanto maior for o valor obtido para este coeficiente, maior a representatividade do dendrograma em relação à matriz de distâncias genéticas (Cruz & Regazzi, 2001; Templeton, 2006; Cruz et al., 2011).

Em estudos de diversidade genética com marcadores microssatélites envolvendo diferentes espécies, o método de agrupamento mais utilizado é o UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*). Trata-se de uma técnica que utiliza as médias não ponderadas das medidas de dissimilaridade, evitando, assim, caracterizar a dissimilaridade por valores extremos (mínimo e máximo) entre os genótipos considerados (Cruz et al., 2011). A grande utilização do método UPGMA em trabalhos envolvendo estudos de diversidade genética deve-se ao fato de que este método maximiza o coeficiente de correlação cofenética, o que traz maior confiabilidade aos resultados obtidos (Sokal & Rolf, 1962).

2.4 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

De acordo com Robinson (1998), população é um grupo de indivíduos pertencentes a uma mesma espécie e que convivem em uma área geográfica de tamanho suficientemente restrito, para que qualquer destes indivíduos tenha chance de se cruzar com qualquer outro. Ocasionalmente, as populações podem estar estruturadas em

subpopulações devido a barreiras que restringem o fluxo gênico, causando o acúmulo gradual de diferenças genéticas entre as subpopulações (Hartl & Clark, 2010). Tais diferenças são conhecidas como divergência genética, podendo resultar de forças evolutivas, tais como mutação, seleção e deriva genética, e são identificadas quando a distribuição dos alelos e genótipos entre as subpopulações é heterogênea (Hamrick, 1982; Vekemans & Hardy, 2004). Logo, uma população tende a ser estruturada quando existe limitada migração e fluxo gênico entre as subpopulações ou quando elas se encontram completamente isoladas (Soares, 2006).

Mutação é o termo usado para designar qualquer modificação herdável no material genético, englobando tanto mudanças na sequência nucleotídica de um único gene como a formação de rearranjos cromossômicos, tais como inversão ou translocação. Desse modo, a mutação é a fonte primordial de variabilidade genética, que é a base sob a qual agem as forças evolutivas (Hartl & Clark, 2010). A variabilidade genética é muito importante, pois permite que as populações se adaptem às transformações ambientais (Soares, 2006).

Com o processo de mutação, a frequência inicial do alelo mutante é baixa, especialmente quando o tamanho populacional é elevado. Essa quantidade pode ser aumentada nas gerações seguintes com a seleção positiva, se o alelo conferir alguma vantagem evolutiva, e com o surgimento de novos indivíduos mutantes. Por deriva genética o novo alelo também pode aumentar sua frequência ao longo das gerações. Porém, o mais comum é que a deriva genética acabe eliminando esse novo alelo. O efeito cumulativo da mutação, juntamente com a seleção e deriva genética ao longo de grandes períodos de tempo, pode se tornar considerável, contribuindo para o surgimento de estrutura genética em uma determinada população (Hartl & Clark, 2010).

O processo de migração refere-se ao movimento de alguns organismos (ou de seus gametas) entre as subpopulações de uma população. Esse processo resulta em fluxo gênico entre as subpopulações, o que limita a ocorrência de divergência genética entre elas (Slatkin, 1985). Sendo assim, a migração apresenta caráter homogeneizante, limitando, impedindo ou retardando a diferenciação entre as populações e, portanto, o processo de especiação (Melo, 2012). Tal fator é determinante quando diz respeito a populações de espécies arbóreas. Estas populações geralmente apresentam baixa estruturação genética devido a uma eficiente dispersão de pólenes e sementes. Além disso, por serem espécies perenes e de ampla distribuição geográfica, a taxa de perda de alelos por deriva genética

acaba sendo menor quando comparada com espécies herbáceas anuais (Loveless & Hamrick, 1984; Collevatti et al., 2001; Gandara, 2009).

O estudo da estrutura genética de uma população é de fundamental importância, pois permite presumir de maneira indireta possíveis fenômenos ecológicos e genéticos atuantes na mesma. A avaliação da estrutura genética de populações permite, também, detectar modos de reprodução e estrutura familiar, inferir a respeito dos níveis de migração e dispersão, ajudar na conservação e manejo de espécies ameaçadas de extinção e na manutenção de bancos de germoplasma, além de auxiliar no diagnóstico do histórico evolutivo de um conjunto de táxons. Em populações utilizadas para o melhoramento genético, informações de sua estrutura permitem ao melhorista encontrar grupos heteróticos que podem ser inter cruzados para tentar obter progênies com maior vigor híbrido (Cruz et al., 2001).

A caracterização da estrutura genética de uma população pode ser realizada através de marcadores codominantes como os microssatélites, podendo ser abordada utilizando as estatísticas F de Wright (Wright, 1965), a análise da diversidade genética em populações subdivididas (Nei, 1977) ou com os coeficientes de coancestralidade de Cockerham (Cockerham, 1969; Weir, 1996). As três abordagens estimam a distribuição da diversidade genética tanto dentro quanto entre populações, sendo semelhantes quanto a sua base genética (Nagylaki, 1998; Robinson, 1998).

Nas estatísticas F de Wright, a caracterização da estrutura genética de uma população é realizada através da obtenção de três parâmetros distintos: F_{IS} , F_{ST} e F_{IT} . O F_{IS} determina o índice de fixação ou coeficiente de endogamia intrapopulacional; F_{ST} corresponde ao índice de fixação entre populações e o F_{IT} equivale ao índice de fixação para todas as subpopulações estudadas. Estes parâmetros também podem ser obtidos utilizando a análise estatística de Cockerham (1969), sendo estes representados por f , θ e F , respectivamente.

O F_{IS} ou f corresponde ao coeficiente de endogamia, e é dado pela probabilidade de que os dois alelos de um loco presentes em um mesmo indivíduo sejam idênticos por descendência, ou seja, derivem de um mesmo alelo na geração parental. Logo, o valor elevado deste parâmetro sugere que a população em estudo apresenta excesso de genótipos homozigotos e deficiência de genótipos heterozigotos. Este resultado é característico de populações onde ocorrem endocruzamentos (Hartl & Clarck, 2010). Já em populações em que não existe endogamia, o valor de f não difere significativamente de

zero, indicando que os cruzamentos ocorrem ao acaso (panmixia) e as frequências alélicas e genóticas estão de acordo com o que é esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Templeton, 2006). Este parâmetro pode ser definido pela seguinte fórmula:

$$F_{IS} = \frac{H_s - H_o}{H_s}$$

Onde:

H_s – probabilidade de que dois alelos escolhidos aleatoriamente de uma mesma subpopulação sejam diferentes por estado.

H_o – probabilidade de que dois alelos homólogos de um indivíduo escolhido aleatoriamente sejam diferentes.

De acordo com Holsinger & Weir (2009), o F_{ST} mede a correlação de alelos entre indivíduos de subpopulações diferentes, equivalendo à probabilidade de que dois alelos tomados ao acaso em subpopulações diferentes sejam idênticos por descendência. Dessa forma, quando o F_{ST} é baixo, a frequência dos alelos dentro de cada população é semelhante, já quando este valor é elevado, as frequências alélicas nas populações são distintas (Weir, 1996). Segundo Hartl & Clarck (2010), os valores obtidos para este parâmetro podem ser interpretados da seguinte maneira:

- F_{ST} variando de 0 a 0,05 indica pequena diferenciação genética
- F_{ST} variando de 0,05 a 0,15 indica moderada diferenciação genética
- F_{ST} variando de 0,15 a 0,25 indica grande diferenciação genética, e
- F_{ST} maior que 0,25 indica diferenciação genética muito elevada.

De maneira análoga ao F_{ST} , a estatística θ , estimada a partir da análise de variância das frequências alélicas, corresponde ao coeficiente de coancestralidade, que é uma medida de diferenciação entre as subpopulações (Cockerham, 1969; Weir & Cockerham, 1984). Os valores de F_{ST} podem ser definidos segundo a fórmula abaixo:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

Onde:

H_s – probabilidade de que dois alelos escolhidos aleatoriamente de uma mesma subpopulação sejam diferentes por estado.

H_T – probabilidade de que dois alelos escolhidos aleatoriamente em uma população sejam diferentes.

Já o F_{IT} ou F calcula o quanto as frequências genotípicas da população variam em relação ao esperado nas condições de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo que estas variações estão relacionadas aos cruzamentos não aleatórios que são realizados nesta população (endogamia). Esta definição pode ser obtida através da seguinte fórmula:

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_o}{H_T}$$

Além das estatísticas F , outras análises podem ser realizadas a fim de obter informações complementares sobre a estrutura genética de uma população. Dentre elas, as estatísticas que utilizam abordagem Bayesiana têm sido muito adotadas em estudos de genética de populações, possibilitando a alocação de indivíduos em sua população de origem. Para tanto, é preciso analisar os dados referentes às frequências alélicas dos indivíduos em vários locos diferentes, gerando a probabilidade de cada genótipo pertencer a uma população específica (Evanno et al., 2005). Logo, estas estimativas são muito vantajosas em estudos em que se desconhece a origem do material utilizado, como no caso das populações base de melhoramento e das coleções ou bancos de germoplasma.

Além de estatísticas que utilizam análise Bayesiana, muitos trabalhos têm utilizado métodos de ordenação para auxiliar a análise de estrutura genética de uma população. Dentre estes métodos, a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) (Gower, 1966), também conhecida como Escalonamento Multidimensional Métrico (Torgerson, 1952), é o mais utilizado. Esta análise demonstra as distâncias genéticas existentes entre os indivíduos de uma população através de representação gráfica, possibilitando a identificação de grupos de indivíduos em gráficos bi ou tridimensionais. Os eixos representam as coordenadas principais, sendo que a primeira coordenada explica a maior parte da variação genética entre os indivíduos, seguido do segundo eixo e assim por diante. Dessa maneira, os indivíduos são representados por pontos no plano (ou espaço) entre as coordenadas principais, de modo que a distância genética entre os indivíduos é

representada pela distância existente entre os pontos. Esses gráficos facilitam a visualização de estruturação genética entre os indivíduos e populações amostradas.

A obtenção de informações acerca da estrutura genética de populações de melhoramento é extremamente importante, pois a partir delas é possível identificar grupos geneticamente distintos (heteróticos), a partir dos quais cruzamentos poderão ser realizados a fim de maximizar a heterozigosidade da progênie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Foram coletados tecidos foliares de 90 clones-elite de *Eucalyptus* sendo que, desses, 55 estão sendo avaliados em uma rede de testes clonais no estado de Goiás. Estes clones foram obtidos de sete empresas diferentes, sendo 33 da empresa CLONAR, dois da empresa CELMAR, dois da empresa CENIBRA, um do Viveiro ESTEIO, 26 da empresa PLANTAR e 26 da empresa SUZANO Papel e Celulose. A maioria dos indivíduos utilizados é proveniente de *E. urophylla* e *E. grandis*, sendo procedentes dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Tocantins, Maranhão e Bahia (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de clones-elite utilizada no estudo e suas procedências.

Empresa Doadora	Procedência	Espécie	Quantidade de clones
CLONAR	Minas Gerais	<i>E. urophylla</i>	33
CELMAR	São Paulo	<i>E. grandis</i>	2
CENIBRA	Minas Gerais	<i>E. grandis</i>	1
		<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	1
ESTEIO	Tocantins	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	1
PLANTAR	Minas Gerais	<i>E. urophylla</i>	10
		<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	9
		<i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i>	1
		<i>E. camaldulensis</i>	1
		<i>E. grandis</i>	1
		Desconhecida	4
SUZANO	Bahia	<i>E. grandis</i>	1
	Maranhão	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	22
		<i>E. urophylla</i>	1
		<i>E. grandis</i> x <i>E. pellita</i>	1
		<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>	1
TOTAL			90

O material vegetal coletado foi transportado em recipiente com gelo até o Laboratório de Genética e Genômica de Plantas da Universidade Federal de Goiás (UFG).

No laboratório, este foi mantido em sacos plásticos e de papel, sendo estocados em freezer a -20°C , até o momento da extração do DNA.

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A extração do DNA de *Eucalyptus* foi realizada segundo o protocolo desenvolvido por Doyle & Doyle (1987), adaptado por Ferreira e Grattapaglia (1998). Para tanto, foram utilizados 50 mg de material foliar de cada indivíduo, sendo macerados utilizando o equipamento TissueLyser (Qiagen) com o auxílio de duas *beads* metálicas. A maceração ocorreu na presença de 700 μL de tampão CTAB 2% e 1,4 μL de β -Mercaptoetanol por três minutos à frequência de 30 agitações por segundo. Após a maceração, os tubos foram deixados em banho-maria por 30 minutos a 65°C , sendo agitados a cada 10 minutos para a homogeneização do material. Em seguida, foram acrescentados 600 μL de CIA (Clorofórmio-Álcool-Isoamílico) para a extração do DNA genômico. Os tubos foram invertidos durante cinco minutos até fazer uma emulsão homogênea, sendo em seguida centrifugados à velocidade de 12000 rotações por minuto (rpm) durante cinco minutos. Após a centrifugação dos tubos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde novamente foram adicionados 600 μL de CIA e os tubos foram levados à centrífuga por mais 5 minutos. Em seguida, a parte aquosa foi novamente retirada e colocada em um novo tubo. A partir de então, deu-se início à precipitação do DNA, com adição de 400 μL de isopropanol a -20°C no tubo, que deve permanecer por 30 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas a 7500 rpm durante cinco minutos para a formação do *pellet*. Em seguida, foi realizado o descarte do sobrenadante e a precipitação do *pellet*. Após este processo, o DNA extraído foi lavado com 500 μL de etanol 70%. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em 50 μL de Tris/EDTA com Ribonuclease A (RNaseA) e deixado *over-night* à temperatura ambiente ou incubado a 37°C durante 30 minutos para possibilitar a ação da enzima. As amostras de DNA foram então armazenadas em freezer com temperatura de -20°C .

A qualidade do DNA extraído foi verificada utilizando o Espectrofotômetro NanoDrop Lite para avaliação da razão entre os comprimentos de onda A260/A280, que representa a quantidade de ácidos nucleicos pela quantidade de proteína na amostra. Foram consideradas adequadas amostras com A260/A280 entre 1,80 e 2,10, indicando elevada qualidade do DNA extraído.

A quantificação do DNA vegetal foi realizada em gel de agarose 0,8% corado com 10 μL de Brometo de Etídio através de eletroforese em tampão TBE (Tris Borato EDTA) 0,5X. Para aferir a concentração de DNA nas amostras extraídas, também foram carregados no gel de agarose padrões de DNA de fago λ com peso molecular conhecido, no caso 10, 20, 50 e 100 ng. Assim, a concentração das amostras foi estimada pela comparação visual das intensidades de fluorescência refletidas nas bandas de DNA das amostras com a das bandas do DNA de fago λ (Figura 3).

Após a quantificação das amostras, o DNA foi diluído à concentração de 3 ng/ μL , utilizando Água ultrapura Milli-Q, a fim de deixá-lo em concentração ideal para o preparo da reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

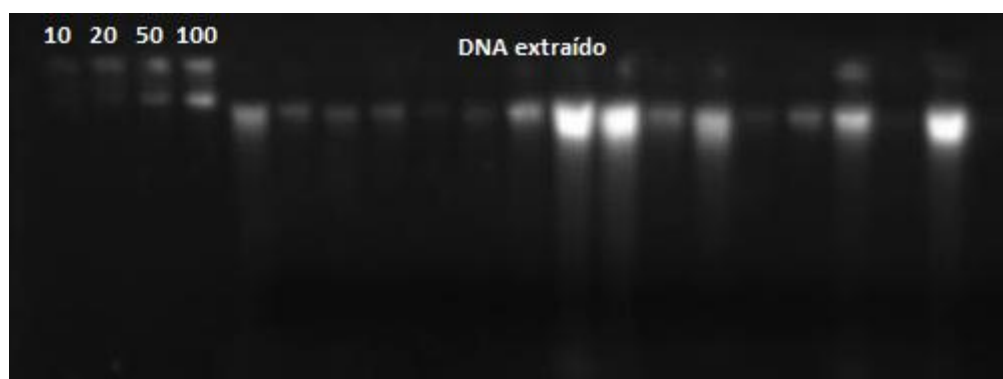


Figura 3. Quantificação das amostras de DNA em gel de agarose 0,8%.

3.3 AMPLIFICAÇÃO DO DNA UTILIZANDO MICROSSATÉLITES

Um conjunto de 11 locos microssatélites, previamente caracterizados por Faria et al. (2011) e com perfil genético conhecido, foi utilizado na realização deste trabalho (Tabela 2). Os *primers* foram marcados com um de três fluorocromos diferentes: 6-FAM, HEX e NED. Dessa maneira, eles puderam ser combinados em sistemas *multiplex* para amplificação simultânea de dois ou três diferentes locos. A escolha dos *primers* para a formação dos *multiplex* foi realizada baseada na fluorescência de cada *primer* e no tamanho esperado dos fragmentos a serem amplificados.

A amplificação do DNA foi realizada através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando o kit Multiplex PCR Qiagen. A reação foi feita utilizando 2,5 μL de Master Mix, 0,25 μL de cada um dos *primers* a 100M para a formação dos *triplex*, 0,5 μL de Q-solution, 0,25 μL de Água ultrapura Milli-Q e 1 μL de DNA à concentração de 3

ng/ μ L, totalizando ao final uma reação com volume de 5 μ L. Para a realização do *duplex* a reação foi modificada, utilizando 0,5 μ L de cada *primer* e não utilizando a Água ultrapura Milli-Q no processo.

O programa da PCR utilizado para a amplificação do DNA teve início com a etapa de desnaturação a 96°C por cinco minutos, seguida de 10 ciclos com os seguintes passos: 94°C por um minuto, 64°C por 1 minuto e 72°C por dois minutos. Após esta etapa, 20 ciclos com 94°C por um minuto, 56°C por um minuto e 72°C por dois minutos, totalizando 30 ciclos de amplificação durante todo o processo. A etapa de extensão final deu-se a 72°C por sete minutos e a temperatura de anelamento correspondeu a 60°C

Tabela 2. Sistemas *multiplex* utilizados para a genotipagem dos microssatélites. Para cada loco são apresentados o respectivo fluorocromo, motivo de repetição e suas faixas alélicas.

<i>Multiplex</i>	Loco	Fluorocromo	Faixa Alélica (pb)	Motivo
1	EMBRA3	NED	110-180	(AG)
	EMBRA157	FAM	100-200	(GT)
	EMBRA204	HEX	90-190	(TC)
2	EMBRA11	FAM	85-200	(AG)4GG(AG)
	EMBRA186	HEX	150-178	(GA)
	EMBRA333	NED	210-254	(TG)AG(TC)
3	EMBRA4	NED	63-121	(AG)
	EMBRA28	FAM	170-310	(AG)
	EMBRA63	HEX	160-250	(AG)
4	EMBRA41	HEX	160-218	(AG)
	EMBRA681	NED	175-290	(AG)

A fim de verificar a eficiência do processo de amplificação do DNA, antes da genotipagem através de eletroforese capilar, as amostras foram novamente submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%, corados com Brometo de Etídio.

3.4 GENOTIPAGEM DOS CLONES-ELITE DE *EUCALYPTUS*

A obtenção dos genótipos dos clones-elite de *Eucalyptus* foi realizada por meio de eletroforese capilar utilizando a plataforma semi-automática ABI 3100 (Applied Biosystems). A reação foi preparada utilizando 1 μ L do produto de PCR, 0,6 μ L de uma

mistura de fragmentos de tamanho conhecido marcados com fluorescência ROX (Brondani & Grattapaglia, 2001) e 8,4 μL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) por amostra. Após o preparo, a mistura foi mantida por cinco minutos a 95°C, sendo imediatamente colocada em um recipiente com gelo para desnaturação das moléculas de DNA. A injeção das amostras na plataforma ABI-3100 foi feita de acordo com o protocolo padrão do equipamento.

A genotipagem dos indivíduos foi realizada com o programa *GeneMapper* (Applied Biosystems). A detecção automatizada dos microssatélites foi possível devido a presença de um fluorocromo ligado à extremidade 5' de um dos *primers* do par. Foram utilizados três diferentes tipos de fluorocromos: 6-FAM (emite fluorescência azul), HEX (verde) e NED (amarela). Durante a eletroforese capilar, esses fluorocromos são identificados e geram um padrão de picos que correspondem aos alelos do indivíduo. A genotipagem é feita através da identificação do tamanho dos alelos amplificados para cada microssatélite. A estimativa de tamanho dos alelos é realizada com base no tamanho conhecido dos picos do padrão marcado com o fluorocromo ROX (Brondani & Grattapaglia, 2001) (Figura 4).

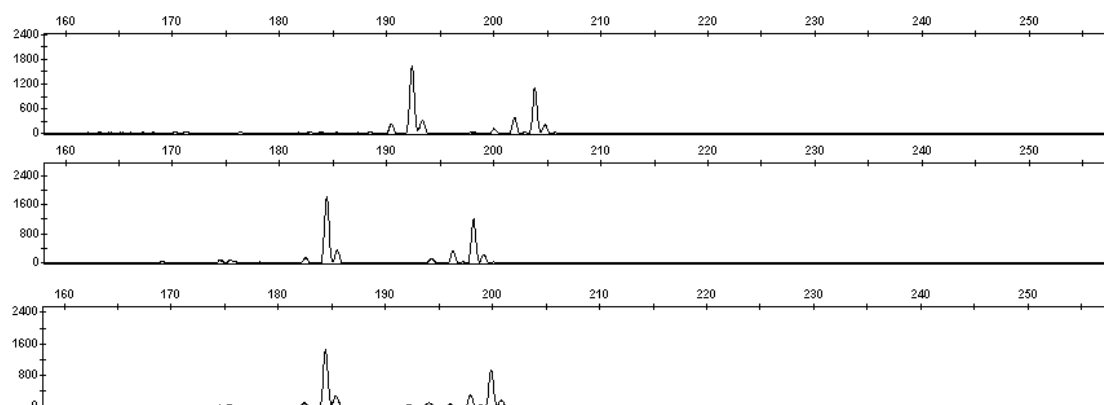


Figura 4. Picos de fluorescência encontrados na genotipagem de clones-elite de *Eucalyptus* utilizando o programa *GeneMapper*.

Por apresentarem difícil genotipagem e baixa amplificação de seus alelos, os locos EMBRA157 e EMBRA681 foram retirados deste estudo. Assim, para as análises de diversidade genética dos clones-elite foram genotipados nove locos microssatélites: EMBRA3, EMBRA4, EMBRA11, EMBRA28, EMBRA41, EMBRA63, EMBRA186, EMBRA204 e EMBRA333.

3.5 ANÁLISE DOS DADOS

3.5.1 Diversidade Genética

A análise da diversidade genética dos clones-elite de *Eucalyptus* foi realizada utilizando os programas *GDA* (Lewis & Zaykin, 2001) e *Fstat* (Goudet, 2002). Esta análise ocorreu em duas etapas, sendo que a primeira considerou todos os indivíduos amostrados como pertencentes a uma única população e a segunda, organizando estes clones em três populações diferentes (A, B e C). Estas três populações foram identificadas na análise de estrutura genética realizada com o programa *Structure* localizada no item 4.2 deste trabalho.

A estimativa da diversidade foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: número de alelos por loco (A), heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho) e o índice de fixação dos alelos na população (f). Estes valores foram estimados utilizando o programa *GDA* a partir das frequências alélicas e genotípicas. Os locos foram considerados polimórficos caso a frequência do alelo mais comum não ultrapassasse 0,99.

Duas novas análises foram feitas considerando a separação dos indivíduos nas três populações: estimativa da estruturação genética utilizando o programa *GDA* e estimativa da riqueza alélica por loco e população utilizando o programa *Fstat*.

A estimativa da estruturação das populações foi realizada utilizando a estatística F de Weir e Cockerham (1984), calculada a partir da análise de variância das frequências alélicas encontradas para as populações do estudo. A consistência dos dados foi obtida pelo método *Bootstrap*, com 10000 randomizações e nível de confiança de 95%. A partir desta análise, foram estimados os seguintes parâmetros: índice de fixação intrapopulacional (f), índice de fixação entre populações ou coeficiente de coancestralidade (θ) e índice de fixação para o conjunto de populações (F).

3.5.2 Divergência Genética

Para calcular a divergência genética existente entre os indivíduos de *Eucalyptus* foram utilizados os programas *BOOD* (Coelho, 2002) e a plataforma R. Inicialmente, foi realizada a confecção da matriz de distância genética utilizando o coeficiente de similaridade de Rogers (1972) modificado por Wright (1978). Esta matriz

foi obtida utilizando o programa *BOOD* a partir das frequências alélicas encontradas na amostra. As distâncias genéticas entre os clones de *Eucalyptus*, contidas na matriz, foram graficamente representadas em um dendrograma. Este dendrograma foi produzido utilizando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*) na plataforma R. A fim de verificar a consistência dos nós do dendrograma obtido, foi realizada uma análise de *Bootstrap* utilizando o programa *BOOD*, com 10.000 randomizações.

3.5.3 Estrutura populacional dos clones-elite de *Eucalyptus*

A análise da estrutura populacional dos clones utilizados neste estudo foi realizada utilizando o programa *Structure* 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Este programa utiliza uma abordagem Bayesiana para alocar os indivíduos em um número pré-determinado de populações (K). Para a análise do presente trabalho utilizou-se um modelo que prevê a possibilidade de fluxo gênico ou miscigenação entre as populações (*admixture model*). Com isso, o programa *Structure* estima, para o genoma de cada indivíduo, a proporção de alelos que vieram de cada uma dessas populações. Além disso, o programa *Structure* também estima a medida de verossimilhança dos diferentes modelos testados, com os vários números de população (K).

A análise do *Structure* foi realizada assumindo frequências alélicas correlacionadas no modelo que prevê miscigenação (*admixture model*), com *burn-in* de 50.000 e 500.000 randomizações coletadas via Cadeia de Markov (MCMC). Nesta análise, o valor de K variou de 1 a 10, com 10 repetições independentes cada. O parâmetro K equivale ao número de populações geneticamente distintas, pré-definidas. A partir dessas análises do *Structure*, é possível encontrar qual é o número de populações que melhor explica o conjunto de dados e, portanto, definir esse importante parâmetro sem a necessidade de conhecimento prévio da estruturação genética presente nas amostras. A escolha do valor mais provável de K foi realizada através da análise dos valores de ΔK , segundo o método de Evanno et al. (2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DIVERSIDADE GENÉTICA

Os resultados da análise da diversidade genética dos clones-elite de *Eucalyptus* foram obtidos em dois momentos. Primeiramente, os indivíduos foram analisados como pertencentes a uma única população, desconsiderando a presença de estruturação genética, e em um segundo momento, como pertencentes às três populações (A, B e C) identificadas com os resultados obtidos pelo programa *Structure 2.3.4* descritas abaixo (item 4.2).

Considerando uma única população, os nove locos microssatélites genotipados amplificaram um total de 151 alelos, dos quais 88 são considerados alelos raros (frequência menor que 0,05). Os demais alelos encontrados são considerados de frequência comum (0,05-0,5), inexistindo nesta amostra alelos abundantes, com frequência maior que 0,5. Os locos EMBRA4 e EMBRA63 apresentaram o menor número de alelos, com dez alelos cada. Já o loco EMBRA28 foi o que apresentou maior quantidade de alelos, totalizando 24. Em média, foram encontrados 16,78 alelos por loco estudado (Tabela 3).

A análise das frequências alélicas dos locos estudados mostrou que, para a maioria destes, a frequência não se apresentou uniforme, ou seja, a frequência de alguns alelos é bem maior que a de outros. Os locos EMBRA186 e EMBRA333 são bons exemplos da desuniformidade na distribuição de frequências alélicas. No EMBRA186 o alelo de 139 pb foi o mais encontrado na amostra, atingindo 30% de frequência, enquanto a frequência dos outros alelos não chega a 10%. Da mesma forma ocorre com o alelo de 218 pb do loco EMBRA333, que sozinho possui 45% de frequência. Por outro lado, os locos EMBRA11, EMBRA28 e EMBRA41 possuem uma distribuição de frequências alélicas um pouco mais uniforme (Figura 5).

A heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) apresentou valores elevados para todos os locos, com médias aproximadas de 0,84 e 0,85 respectivamente. Esses valores indicam que a população estudada apresenta uma elevada diversidade genética e que a frequência de heterozigotos observada (H_o) está próxima do esperado

(He) de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Como consequência, a estimativa do coeficiente de fixação intrapopulacional médio é muito próxima de zero ($f = -0,008$). Isso indica que, de modo geral, os alelos desta população não estão sendo fixados seja por endogamia ou qualquer outro fator que poderia levar a população a um distanciamento do EHW. Apenas o loco EMBRA3 apresentou valor mais acentuado para esta estimativa ($f = 0,111$), indicando menor presença de heterozigotos que o esperado sob condição de equilíbrio. O elevado valor de He encontrado para este loco (0,908) pode ser consequência do elevado número de alelos presentes em sua genotipagem quando comparado com os demais locos (22). Quanto maior o número de alelos, maior a probabilidade de eles estarem em heterozigose. Entretanto, a uniformidade das frequências alélicas também influencia na frequência de heterozigotos, pois quanto mais uniformes forem as frequências, maior será a frequência esperada de heterozigotos e, portanto, maior é a diversidade.

Tabela 3. Estatística descritiva por loco microssatélite (n = número de indivíduos genotipados, P = frequência de alelos polimórficos, A = número de alelos por loco, He = heterozigosidade esperada, Ho = heterozigosidade observada, f = índice de fixação dos alelos).

Loco	n	A	He	Ho	F
EMBRA3	83	22	0,908	0,807	0,111
EMBRA4	73	10	0,808	0,767	0,051
EMBRA11	76	14	0,867	0,881	-0,016
EMBRA28	81	24	0,918	0,963	-0,049
EMBRA41	77	15	0,891	0,922	-0,035
EMBRA63	72	10	0,691	0,694	-0,054
EMBRA186	83	19	0,854	0,916	-0,072
EMBRA204	78	18	0,904	0,923	-0,021
EMBRA333	83	19	0,738	0,771	-0,045
Média	78,44	16,78	0,842	0,849	-0,008

A análise da heterozigosidade dos locos microssatélites, do número de alelos por loco e das frequências alélicas sugerem ampla diversidade genética na população que está sendo avaliada em testes clonais em Goiás. Resultados semelhantes também foram apresentados em diversos trabalhos envolvendo árvores de *Eucalyptus* (Faria et al., 2011; Kirst et al., 2005; Ottewell et al., 2005). Esta conclusão vai ao encontro da ideia de que espécies florestais alógamas tendem a apresentar elevadas taxas de diversidade genética,

mesmo em populações de melhoramento. Isso ocorre porque a grande longevidade das espécies florestais, associada a mecanismos eficientes de dispersão de pólen e sementes, dificultam a eliminação de alelos por deriva genética e fazem com que suas populações sejam grandes quando comparadas com as de espécies anuais. Essa dinâmica resulta em populações com elevada diversidade genética (Hamrick & Godt, 1996). Como houve diversas importações de sementes de *Eucalyptus* da Oceania, e como as populações de melhoramento de *Eucalyptus* do Brasil ainda estão no segundo ou terceiro ciclo de melhoramento, é esperado que estas retenham a maior parte da grande diversidade introduzida no país.

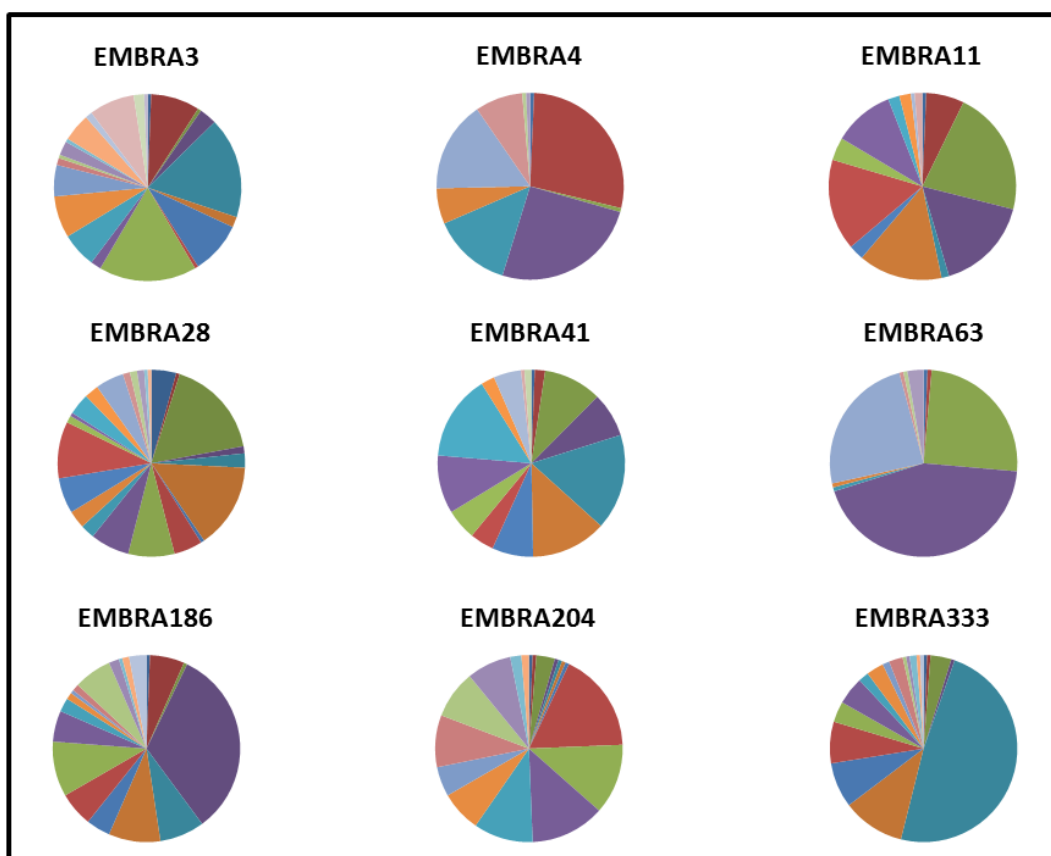


Figura 5. Distribuição das frequências alélicas de nove locos microssatélites de clones-élite de *Eucalyptus*.

Faria et al. (2011) em estudo envolvendo a caracterização de 21 locos microssatélites com repetições de tetra, penta e hexa-nucleotídeos utilizando quatro espécies de *Eucalyptus* encontraram alta diversidade genética, com H_e variando de 0,5 a 0,7 entre locos. Esses valores de H_e são inferiores aos encontrados neste estudo. Tal fato pode ser explicado em parte pelo tamanho do motivo dos microssatélites utilizados, uma

vez que neste estudo foram utilizados marcadores com motivos de dinucleotídeos. Este tipo de microssatélite tende a ser mais polimórfico por apresentar maior número de alelos por loco, o que contribui para o aumento da heterozigidade observada (Chakraborty et al., 1997; Ellegren, 2004; Brondani et al., 2006; Ottewell et al., 2005; Vigouroux et al., 2002). Outra explicação possível seria a de que a população de teste clonal utilizada neste trabalho é mais diversa que a amostrada por Faria e colaboradores (2011).

A diversidade genética dos clones-elite de *Eucalyptus* amostrados também foi analisada considerando que estes pertencem às três populações identificadas pelo programa *Structure* (resultados descritos no item 4.2). As três populações de *Eucalyptus* foram nomeadas como populações A, B, e C, e apresentam quantidades diferentes de clones. Os tamanhos dessas populações bem como as estimativas dos parâmetros de diversidade genética em cada uma delas encontram-se listados na Tabela 4.

Tabela 4. Estimativas dos parâmetros de diversidade genética por população (n = número de indivíduos, P = frequência de alelos polimórficos, A = número de alelos por loco, He = heterozigidade esperada, Ho = heterozigidade observada, f = índice de fixação intrapopulacional).

População	n	A	He	Ho	f
A	18	6,44	0,740	0,849	-0,152
B	47	15,44	0,855	0,846	0,011
C	25	8,77	0,776	0,852	-0,100
Média	-	10,22	0,791	0,849	-0,075

A população A é formada por 18 indivíduos, apresentando uma média de seis alelos por loco. A heterozigidade observada foi maior que a esperada para esta população, gerando um índice de fixação intrapopulacional negativo ($f = -0,152$). Este resultado indica a presença de mais heterozigotos na população do que o esperado nas condições de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Resultados semelhantes podem ser observados na população C, cujo número de heterozigotos encontrados na amostra ($Ho=0,852$) foi maior que o esperado ($He=0,776$), gerando um valor negativo de f ($-0,075$). Já a população B apresenta 47 indivíduos, mais da metade do total deste estudo, e possui aproximadamente 15 alelos por loco. Os valores de He e Ho não apresentaram diferenças acentuadas, gerando uma estimativa de f próxima de zero. Isso indica que as frequências genotípicas encontrados nesta população estão de acordo com o esperado nas condições de EHW.

A análise do número de alelos por loco (A) indicou que os indivíduos pertencentes à população B apresentam maior quantidade de alelos que os demais indivíduos, com média de 15,44 alelos por loco estudado. Esse resultado poderia ser devido ao fato dessa população possuir maior número de indivíduos. Porém, resultados semelhantes também foram observados na análise da riqueza alélica (El Mousadik & Petit, 1996), que normaliza as diferenças de tamanho populacional (Tabela 5). Este parâmetro tem sido muito utilizado em estudos para estimativa da diversidade genética, pois permite comparar o número médio de alelos por loco entre populações com amostras de tamanhos diferentes.

Tabela 5. Riquezas alélicas estimadas utilizando o programa FSTAT para três populações de *Eucalyptus*. As estimativas foram obtidas considerando amostras de 13 indivíduos diploides por população.

Locos	A	B	C	Média
EMBRA3	5,812	13, 293	8,520	11,793
EMBRA4	6,000	6,647	5,669	6,443
EMBRA11	6,684	9,916	6,767	8,885
EMBRA28	6,437	14,127	8,265	12,789
EMBRA41	7,379	10,211	8,393	10,010
EMBRA63	3,000	4,803	4,872	4,636
EMBRA186	5,528	11,311	7,631	10,666
EMBRA204	8,246	11,277	9,621	10,634
EMBRA333	5,250	8,921	7,564	9,224
Média	6,037	10,056	7,478	9,453

De modo geral, a população B foi a que apresentou a maior riqueza alélica, com média aproximada de 10 alelos por loco. Isso indica a presença de maior diversidade genética nos indivíduos desta população quando comparada com as demais. As populações A e C apresentaram em média menos que oito alelos por loco, sendo que a população A é a que apresentou menor número médio de alelos (6,037). Dos nove locos utilizados neste estudo, o EMBRA28 foi o que apresentou maior riqueza alélica, com média de 12,789 alelos, seguido pelos locos EMBRA3, EMBRA186 e EMBRA204.

Em trabalho envolvendo a genotipagem de seis locos microssatélites em 192 indivíduos não relacionados de uma população de melhoramento de *Eucalyptus* da antiga Aracruz Celulose S.A., o número de alelos por loco variou de seis a 33 alelos, com média de 19,8 alelos por loco (Kirst et al., 2005). De modo similar, na genotipagem de oito locos

microsatélites em 68 indivíduos provenientes de duas populações naturais de *Eucalyptus leucoxylon*, foram encontrados 12,3 alelos por loco com grande variação entre os locos (Ottewell et al., 2005). Em um estudo realizado com 15 microsatélites dinucleotídeos foram observados, em média, 11 alelos por loco para uma população de *E. dunnii* e 11,8 alelos por loco para uma população de *E. urophylla* (Brondani et al., 1998). Na genotipagem de 24 microsatélites (di e trinucleotídeos) em 112 indivíduos provenientes de seis diferentes espécies do gênero *Eucalyptus*, foi obtido número médio de alelos variando de sete em indivíduos de *E. dunnii* a 10,75 alelos por loco para *E. grandis* (Correia, 2011).

Em estudos envolvendo diferentes espécies florestais, é possível observar uma variação considerável na quantidade de alelos encontrados nos locos estudados. Cole (2005), estudando 192 árvores de *Populus tremuloides* originárias de 11 populações naturais, encontrou elevada variação do número de alelos por loco (2-20), com média de 8,25 alelos para os 16 microsatélites utilizados. Azevedo et al. (2007), em seu estudo realizado com 481 árvores de *Manilkara huberi* utilizando sete microsatélites encontraram uma média de 17,7 alelos por loco. Outro estudo envolvendo 314 indivíduos de 10 populações naturais de *Caryocar brasiliense* encontrou elevado número de alelos por loco, variando de 20 a 27 alelos. Entretanto, ao considerar o número de alelos por loco encontrados em cada população, houve uma grande diminuição neste quantitativo, variando de 10 a 11,5 (Collevati et al., 2001). Neste trabalho, o número médio de alelos por loco passou de 16,78, considerando todos os indivíduos, para 10,22 considerando a número médio em cada uma das três populações. Isso indica a presença de alelos privados, isto é, específicos de uma única população, sendo este um fator importante na determinação da estruturação genética entre as populações.

De modo geral, é possível concluir que a diversidade genética existente entre os clones-elite utilizados neste trabalho é bastante elevada, sendo observada tanto pelo número de alelos encontrados na amostra quanto pela elevada frequência de heterozigotos presentes na mesma quando comparada com outras populações de *Eucalyptus* ou outras árvores florestais. Esta ampla diversidade genética ocorre, provavelmente, devido ao fato da amostra conter clones de várias espécies, bem como híbridos interespecíficos, de vários programas de melhoramento. Além disso, é importante ressaltar a ampla variabilidade existente nos programas de melhoramento genético do *Eucalyptus* conduzidos pelas empresas brasileiras. A ampla diversidade do gênero em seu centro de origem (Oceania),

aliada às múltiplas introduções de material genético no país e o fato dos programas estarem ainda em sua infância (segundo ou terceiro ciclo de seleção), garantem que uma imensa diversidade genética ainda esteja presente mesmo entre clones elite.

4.2 ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES

A estrutura genética da população de *Eucalyptus* foi verificada através de análise com o programa *Structure* 2.3.4. O número mais provável de populações diferentes que contribuíram na composição genética da população em estudo foi verificado pela estimativa do ΔK descrito por Evanno et al. (2005). O ΔK foi estimado para K variando de um até 10, sendo que o maior valor ocorre para o número de populações geneticamente distintas que melhor explica o conjunto de dados. Para este estudo, o valor de K indicou a presença de três grupos genéticos, ou populações, distintas dentre os clones-elite estudados (Figura 6).

O gráfico da composição genética dos 90 indivíduos de *Eucalyptus* foi obtido utilizando o *Structure*, com $K = 3$. Os três grupos genéticos encontrados estão representados nas cores vermelho, azul e verde, indicando respectivamente as populações A, B e C (Figura 7). A Figura 7 indica que as três populações estão presentes na composição genômica dos diferentes grupos de espécies (puras ou híbridas) que compõem os clones-elite. Ainda que os grupos de espécies dos clones tenham proporções diferentes de contribuição das populações A, B e C, não há uma relação clara entre espécies com essas populações. Isso indica a inexistência de relação entre a classificação dos clones, obtida dos viveiros que forneceram as mudas, com os grupos genéticos identificados pelo programa *Structure*.

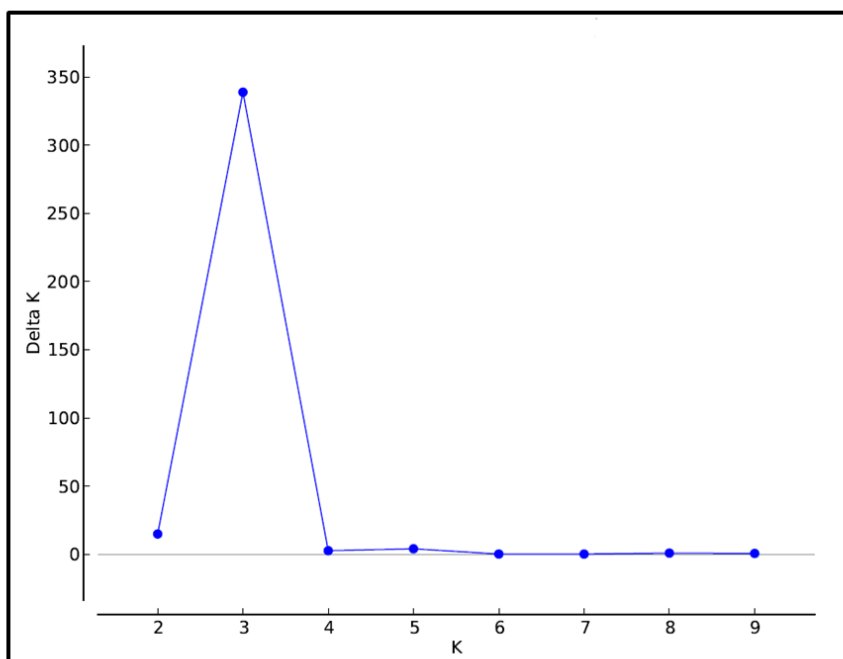


Figura 6. Valores de ΔK obtidos pelo programa *Structure*, evidenciando um pico maior em $K = 3$.

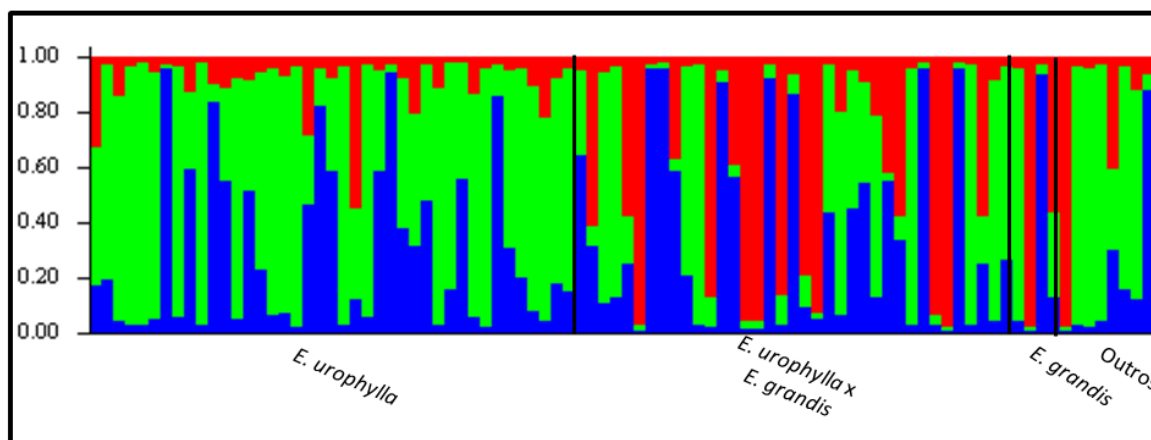


Figura 7. Análise da composição genômica dos clones-elite de *Eucalyptus* em relação às três populações que contribuem para a estrutura genética da amostra. Figura obtida com o programa *Structure*.

A fim de verificar se a divisão de grupos genéticos é significativa para esta população de *Eucalyptus*, foi realizada uma análise de estruturação da diversidade genética utilizando o programa GDA. Os resultados desta análise são mostrados na Tabela 6.

A análise da estimativa de f indica não haver fixação dos alelos dentro das populações estudadas, evidenciando ausência de cruzamentos endogâmicos. De fato, o intervalo de confiança da estimativa de f é menor do que zero, indicando que a frequência

de homozigotos é menor do que o esperado sob EHW. A estimativa de θ indica que aproximadamente 6% da variabilidade total é devida às diferenças entre as subpopulações, podendo ser explicada pelas diferenças existentes entre as frequências alélicas das subpopulações A, B e C. Apesar de se tratar de um valor numericamente baixo, este é significativamente maior do que zero e, de acordo com classificação proposta por Wright (1978), indica a existência de uma moderada diferenciação genética entre as subpopulações encontradas. Logo, este resultado corrobora a estrutura genética identificada pelo programa *Structure*.

Tabela 6. Estimativas de parâmetros para avaliar a estruturação da diversidade genética de *Eucalyptus*. As estimativas foram obtidas utilizando o programa GDA, com 10000 randomizações.

Limites	<i>F</i>	θ	<i>F</i>
Superior	-0,0049	0,0836	0,0518
Inferior	-0,0865	0,0431	-0,018
Estimativa	-0,0491	0,0603	0,0141
Número de randomizações	10.000	10.000	10.000
Nível de confiança	95%	95%	95%

De modo geral, é possível concluir que a população de clones encontra-se estruturada em três subpopulações, sendo que a diferenciação genética existente entre elas é significativa. Entretanto, a distribuição dos clones-elite nas subpopulações de acordo com o programa *Structure* não está relacionada com a identificação, em termos de espécies, obtida previamente a partir de dados fornecidos pelas empresas parceiras. A Figura 7 demonstra que as diferenças entre espécies, como identificadas, não são as responsáveis únicas e diretas pela estruturação. Esse resultado indica a possibilidade de que, embora o melhoramento genético do eucalipto esteja em seus ciclos iniciais, este processo tem alterado a estrutura genética das populações de melhoramento. Os cruzamentos intra- e inter-específicos, realizados durante os ciclos de melhoramento, promovem a miscigenação (*admixture*) das diferentes populações, contribuindo para a rarefação da estrutura genética. Deve-se levar, ainda, em consideração que durante a realização destes cruzamentos pode ocorrer contaminação de pólenes ou até mesmo erros de identificação destes indivíduos, o que explicaria a baixa correlação entre a estrutura genética observada e a identificação dos clones em termos de espécie. A obtenção de informações acerca da estrutura genética dos

clones-elite de *Eucalyptus* é fundamental para o desenvolvimento de futuros estudos de associação, bem como para a escolha dos cruzamentos a serem realizados na operacionalização de um futuro programa de melhoramento com estes indivíduos.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram encontrados por Faria et al. (2011), que realizaram a análise de estrutura genética entre 88 indivíduos pertencentes a quatro espécies e clones-elite do gênero *Eucalyptus*, utilizando 21 microssatélites. Os autores observaram que houve uma nítida separação dos indivíduos em quatro diferentes grupos genéticos, representados pelas quatro espécies amostradas, sendo que cada indivíduo foi alocado corretamente no grupo de sua espécie de origem. Entretanto, os clones-elite presentes no estudo foram alocados de forma intermediária entre os grupos de *E. urophylla* e *E. grandis*. A partir destes dados, os autores concluíram que 19 dos 20 clones utilizados neste estudo possuem origem híbrida, com genoma predominante de *E. urophylla*. Apenas um dos clones-elite utilizados por Faria et al. (2011) foi alocado juntamente aos indivíduos de *E. urophylla*, o que indica que este seja provavelmente originado a partir de árvores desta espécie.

Estudos relacionados à estrutura genética de *Eucalyptus* têm sido realizados principalmente em populações naturais com finalidade de obter informações que auxiliem no processo de conservação dos recursos genéticos deste gênero (Payn et al., 2008). Em estudo envolvendo indivíduos de *Eucalyptus* de seis espécies diferentes (*E. grandis*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. nitens* e *E. dunii*) utilizando 24 microssatélites, Correia (2011) encontrou seis populações que separam de maneira consistente as amostras das seis espécies. Resultado semelhante foi encontrado por Faria et al. (2010), em seu trabalho envolvendo 96 indivíduos de seis espécies de *Eucalyptus* utilizando 20 microssatélites. A análise da estrutura de populações identificou seis grupos genéticos referentes às espécies de origem.

Arumugasundaram et al. (2011) em seu trabalho envolvendo 93 árvores de *Eucalyptus* utilizando 62 locos microssatélites utilizaram o programa *Structure* para alocar os indivíduos em suas populações de origem, fixando o valor de K para a obtenção de dois grupos genéticos, tendo em vista que os indivíduos eram provenientes das espécies *E. tereticornis* e *E. camaldulensis*. Payn et al. (2008) em estudo envolvendo 19 populações naturais de *E. urophylla* analisaram a estrutura genética destes indivíduos utilizando 12 locos microssatélites. Como resultados foram obtidos dois grupos genéticos distintos, com fraca influência aparente da insularidade geográfica na diversidade e estrutura genéticas

das espécies estudadas. Esses resultados indicam a presença de fluxo gênico mesmo entre populações de ilhas diferentes.

Os resultados obtidos nos trabalhos acima listados demonstram a presença de elevada estruturação genética entre as espécies do gênero *Eucalyptus*. Tal estruturação deve-se, provavelmente, ao fato de estes indivíduos estarem amplamente distribuídos no continente Australiano e ilhas vizinhas, provocando isolamento geográfico entre as diferentes espécies. Com isso, é possível concluir que a ausência de correlação entre a estruturação genética encontrada neste trabalho com a classificação das espécies que compõem os clones da amostra pode estar associada ao fato de os clones estudados serem originados de cruzamentos envolvendo diferentes espécies. Sendo assim, a composição genética desses indivíduos possui caráter intermediário entre as espécies utilizadas na realização dos cruzamentos, o que dificulta a obtenção de dados referentes à estrutura genética desses indivíduos. Além disso, esses resultados também indicam a possibilidade dos clones poderem estar erroneamente identificados em relação as espécie que compuseram seus genomas.

4.3 DISTÂNCIA GENÉTICA ENTRE OS CLONES-ELITE DE *EUCALYPTUS*

A distância genética entre os clones-elite de *Eucalyptus* foi obtida através de uma matriz gerada pelo programa BOOD utilizando a distância genética de Rogers (1972) modificada por Wright (1978). A partir dessa matriz, foi elaborado o dendrograma das distâncias genéticas utilizando o método de agrupamento *UPGMA* na plataforma R (Figura 8). O índice de correlação cofenética encontrado nesta análise foi de 0,778, indicando forte correlação entre a matriz de distâncias genéticas e a matriz de distâncias cofenéticas obtida a partir do dendrograma. A confiabilidade dos nós do dendrograma foi gerada pelo programa BOOD através do método de *bootstrapping* com 10.000 repetições. A confiabilidade dos nós é indicada no dendrograma na forma de porcentagem dos *bootstraps* em que aquele grupo foi formado (Figura 8).

A análise da figura abaixo indica a presença na amostra de indivíduos geneticamente idênticos com nomenclatura distinta. É o caso dos clones 6045, 2707 e BA9843; BA1887 e CLRGX162; 3335, CLRGX46 e 3346; Copebrás80 e CLRGX03; 3041 e A068; BA7346 e 386; 9857 e 3281. Tais inconsistências na identificação dos clones-elite pode ser gerada pela não utilização de uma nomenclatura padrão para as

diferentes variedades de *Eucalyptus*, pois cada empresa estabelece o seu sistema de identificação dos clones, podendo gerar confusões. Outro fator que também pode explicar as discrepâncias entre o genótipo e a identificação de cada indivíduo é a ocorrência de troca de amostras durante o manejo dos clones ou até mesmo a perda ou troca de sua identificação original, acarretando falhas tanto no manejo quanto no controle de qualidade dos clones comercializados.

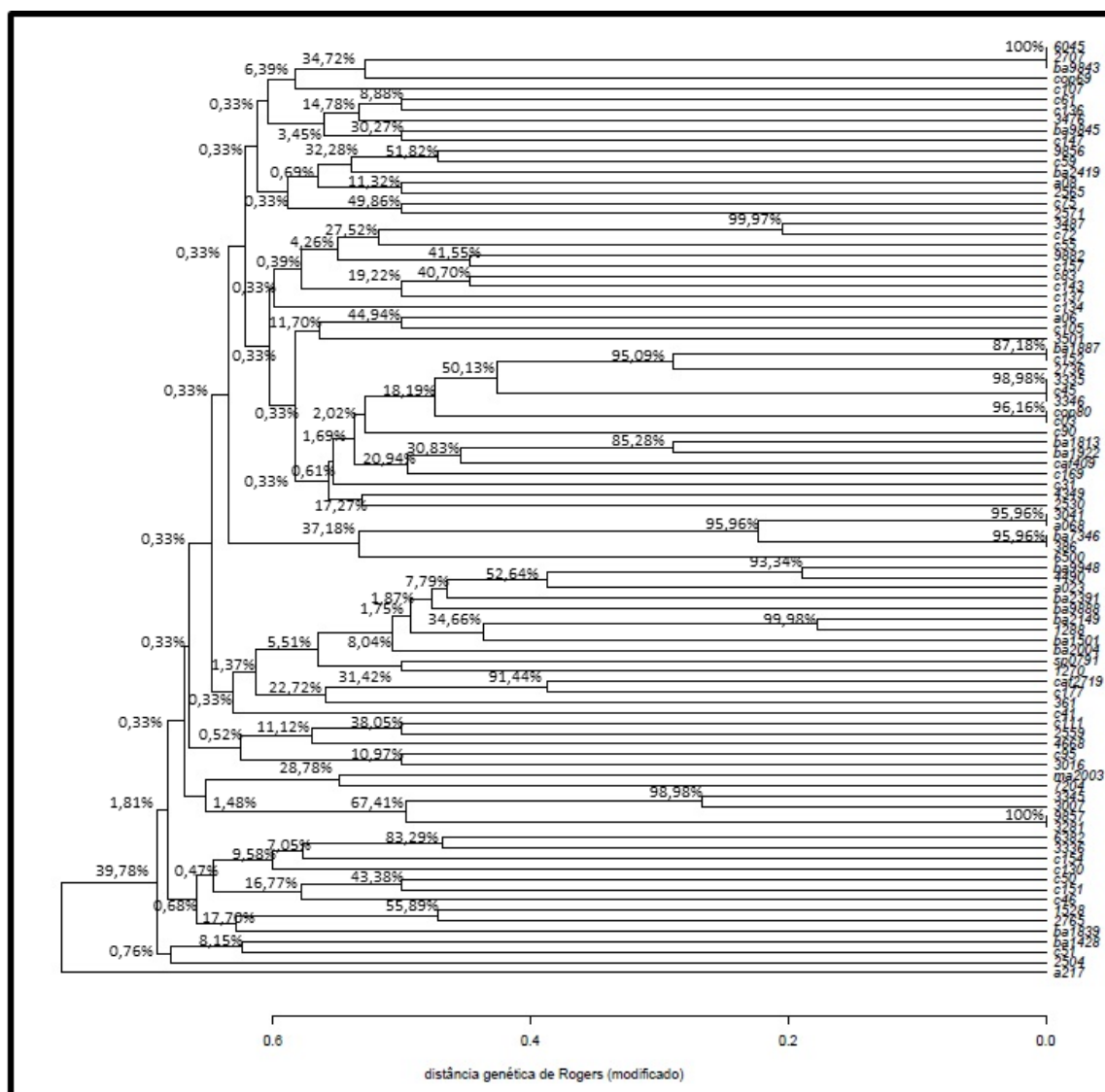


Figura 8. Dendrograma representando as distâncias genéticas entre os 90 clones-elite de *Eucalyptus*. O dendrograma foi construído através do agrupamento UPGMA, com base na distância genética de Rogers (modificada).

Não foi possível identificar no dendrograma grupos genéticos bem definidos, consistentemente representados nos *bootstraps*, o que indica a ausência de subpopulações bem estruturadas dentro da população de melhoramento de *Eucalyptus*. A avaliação da

confiabilidade dos nós obtidos, através dos resultados dos *bootstraps*, mostrou a falta de consistência entre os grupos formados no dendrograma. Apenas alguns nós do dendrograma apresentaram valores de *bootstrap* maiores que 50%, estando estes localizados geralmente entre indivíduos com alta similaridade genética no final dos ramos ou nós que agrupam menor quantidade de indivíduos. Esse resultado não condiz com a estruturação identificada pelo programa *Structure*, cujas análises indicaram a presença de três populações divergentes que contribuíram para composição genética dos clones-elites. Uma possível explicação pode estar no fato de que a estruturação dessa população só pode ser identificada com um modelo que admite miscigenação (*admixture*), como é o caso da análise feita no programa *Structure*. Como muitos desses clones são frutos de cruzamentos controlados, geralmente entre espécies ou indivíduos contrastantes, a estrutura só pode ser avaliada quando se admite a possibilidade de que os indivíduos possam ser híbridos.

Estimar as distâncias genéticas entre os clones-elite de *Eucalyptus* é importante, pois a partir destes dados é possível sugerir a realização de cruzamentos ou acompanhar possíveis cruzamentos potenciais, a fim de explorar o vigor híbrido entre as progênies (Furlan et al., 2007; Souza et al., 2010). Além disso, esta análise permite avaliar possíveis redundâncias no conjunto de indivíduos. Os cruzamentos entre indivíduos mais distantes possibilita que haja maior segregação nos futuros ciclos de melhoramento e, portanto, enriquecimento de sua base genética (Souza et al., 2010; Cruz et al., 2011). Dentre os indivíduos presentes na amostra estudada, os clones 6045 e A217 são os que apresentam maior distanciamento genético.

A partir da distância genética de Rogers (modificada), o gráfico PCoA foi gerado na plataforma R (Figura 9). Apesar de significativo, o coeficiente de correlação cofenética foi de 0,36, indicando uma correlação moderada entre a matriz de distâncias genéticas e as distâncias representadas no gráfico bidimensional de coordenadas principais.

A análise do gráfico abaixo corrobora a ideia de que os indivíduos desta amostra não se encontram organizados em grupos bem definidos, sendo, provavelmente, pertencentes a uma única população não estruturada. Tal conclusão baseia-se na ausência de grupos distintos separados no espaço entre as coordenadas principais. Através do gráfico é possível visualizar que os clones-elite estão ordenados próximos uns dos outros em uma nuvem de pontos única, sem nenhuma estruturação visível.

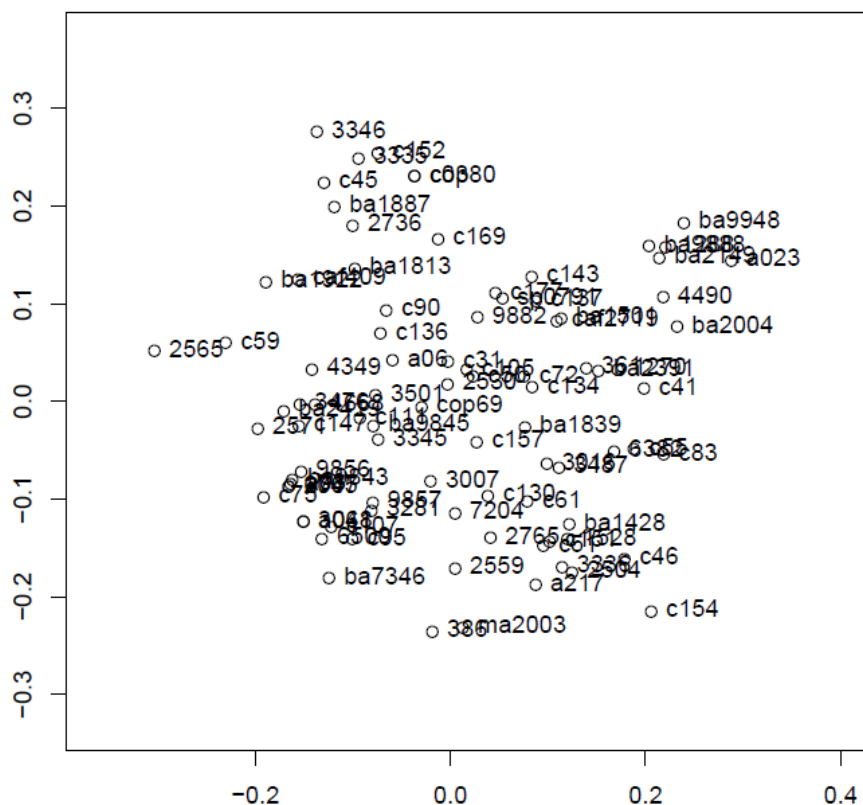


Figura 9. Gráfico representando as distâncias genéticas entre os 90 clones-elite na primeira (eixo x) e segunda (eixo y) coordenadas principais (PCoA).

Em resumo, os resultados apontam para uma alta diversidade genética entre os clones-elite de *Eucalyptus* e uma baixa estruturação genética entre eles. Apesar de três populações terem sido identificadas na análise de estruturação com o programa *Structure*, somente 6,6% da variabilidade genética total é devido às divergências entre populações. Essa alta diversidade genética poderá ser explorada em um futuro programa de melhoramento específico para Goiás. As análises de divergência genética feitas nesse trabalho poderão ser utilizadas para guiar a seleção de genitores a serem cruzados. O cruzamento entre genitores mais divergentes pode, potencialmente, maximizar a heterozigosidade e heterose da progênie, aumentando as chances de seleção de clones-elite superiores. Clones de *Eucalyptus* selecionados e testados no estado possuem maior chance de serem mais adaptados às condições edafoclimáticas do bioma Cerrado.

5 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que:

- Existe elevada diversidade genética entre os clones-elite analisados.
- A população de melhoramento utilizada neste trabalho se encontra dividida em três subpopulações ($K = 3$). Este resultado é corroborado pelo valor de θ (0,066), que indica moderada estruturação genética entre elas.
- A análise de divergência genética não demonstrou a estruturação genética existente entre os clones de *Eucalyptus*, sugerindo ausência de subpopulações bem definidas. Esse resultado é corroborado pela análise de agrupamento que mostrou baixa consistência para a maioria dos grupos formados.
- Essa aparente contradição entre as três subpopulações identificadas com uma abordagem Bayesiana e a ausência de estruturação observada nas análises de divergência e de agrupamento pode ser explicada pelo caráter híbrido da maioria dos clones-elite utilizados. A análise Bayesiana (Structure) foi realizada com um modelo que prevê a possibilidade de miscigenação (hibridação), enquanto que na análise de divergência e agrupamento isso não ocorre.
- Existe a possibilidade de haver problemas na classificação dos clones utilizados, uma vez que as identificações de espécies fornecidas pelos viveiros não condizem com a diferenciação genética encontrada neste estudo.

6 REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário Estatístico ABRAF 2013 ano base 2012**: Florestas Plantadas. Brasília, 2013. 142 p.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**. Heidelberg, v. 27, n. 1, p. 617-631, 2008.
- AGUIAR, M. S.; FERREIRA, D. F.; AGUIAR, A. M.; BISON, O.; REZENDE, G. D. S. P.; GRATTAPAGLIA, D. Potencial de híbridos entre clones-elite de eucalipto por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 42, n. 7, p. 1007-1012, jul. 2007.
- ANDRADE, E. N. D. **O Reflorestamento do Brasil e a Companhia Paulista de Estradas de Ferro**. Rio Claro, 1922.
- ARUMUGASUNDARAM, S.; GHOSH, M.; VEERASAMY, S. RAMASAMY, Y. Species discrimination, population structure and linkage disequilibrium in *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus tereticornis* using SSR markers. **Plos One**. San Francisco, v. 6, n. 12, p. 1-8, dec. 2011.
- ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e Clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. p. 95-121.
- AZEVEDO, V. C. R.; MILTON, K.; CIAMPI, A. Y.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi* (Ducke) a. chev. a Heavly Logged Amazonian Timber Species. **Journal of Heredity**. Oxford, v. 97, n. 7, p. 646-654, 2007.
- BANDEIRA, L. F. **Caracterização preliminar de genes *myb* no genoma de *Eucalyptus* spp.** 2011. 168 f. Tese (Doutorado em Biologia: Biologia Celular e Molecular)-Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.
- BARBOUR, R. C. et al. Assessing the risk of pollen-mediated gene flow from exotic *Eucalyptus globulus* plantation into native eucalypt populations of Australia. **Biological Conservation**. v.141, n. 4, p. 896-907, 2008.
- BERTOLA, A. Eucalipto: Verdades e Mentiras. Disponível em: <www.celuloseonline.com.br/imagembank/Docs/DocBank/dc/dc009.pdf>. Acesso em: 5 mai. 2012.

BIRBOIN, H. C.; STRAUSS, N. A. DNA from eukaryotic cells contains a unusually long pyrimidine sequences. **Canadian Journal of biochemistry**, v. 53, p. 640-643, 1975.

BRACELPA – Associação Brasileira de Celulose e papel. www.bracelpa.org.br

BRONDANI, R. P. V.; WILLIAMS, E. R.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. **BMC Plant Biology**. London, v. 6, n. 20, p. 1-16, set. 2006.

BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. **Biotechniques**. New York, v. 31, n. 1, p. 793-800, 2001.

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

BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**. Clayton, v. 13, n. 1, p. 79-148, 2000.

BRUMFIELD, R. T.; BEERLI, P.; NICKERSON, D. A.; EDWARDS, S. V. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. **TRENDS in Ecology and Evolution**. Cambridge, v. 18, n. 5, p. 249-256, 2003.

BRUNE, A.; ZOBEL, B. Genetic base-populations, gene pools and breeding populations for *Eucalyptus* in Brazil. **Silvae Genetica**. v.30, n. 4-5, p. 146-149, 1981.

BUTCHER, P. A.; MCDONALD, M. W.; BELL, J. C. Congruence between environmental parameters, morphology and genetic structure in Australia's most widely distributed eucalypt, *Eucalyptus camaldulensis*. **Tree Genetics & Genomes**. Heidelberg, v. 5, p. 189-210, 2009.

BYRNE, M.; PARRISH, T. L.; MORAN, G. F. Nuclear RFLP diversity in *Eucalyptus nitens*. **Journal of Heredity**. Oxford, v. 81, p. 225-233, feb. 1998.

CABALLERO, A.; RODRÍGUEZ-RAMILO, S. T.; ÁVILA, V.; FERNÁNDEZ, J. Management of genetic diversity on subdivided populations in conservation programmes. **Conservation Genetics**. Dordrecht, v. 11, n. 1, p. 409-419, 2010.

CAIXETA, R. P.; CARVALHO, D.; ROSADO, S. C. S.; TRUGILHO, P. F.; Variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. detectadas por meio de marcadores moleculares. **Revista Árvores**. Viçosa, v. 27, n. 3, p. 357-363, 2003.

CHAKRABORTY, R.; KIMMEL, M.; STIVERS, D. N.; DAVISON, L. J.; DEKA, R. Relative mutation rates at di-, tri- and tetranucleotide microsatellite loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 94, n. 1, p. 1041-1046, feb. 1997.

COCKERHAM, C. C. Analysis of gene frequencies. **Genetics**. Baltimore, v. 74, p. 679-700, 1969.

COELHO, A.S.G. BOOD: Avaliação de dendrogramas baseada em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Versão 3.0, Goiânia, Universidade Federal de Goiás, 2001.

COLE, C. T. Allelic and population variation of microsatellite loci in aspen (*Populus tremuloides*). **New Phytologist**. Lancaster, v. 167, n.1, p. 155-164, 2005.

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**. Malden, v. 10, n. 1, p. 349-356, 2001.

CORREIA, L. Q. **Avaliação comparativa de SNPs e microssatélites para identificação individual, determinação de parentesco e ancestralidade em espécies de *Eucalyptus***. 2011. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia)-Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2011.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2001. 390 p.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa: Suprema, 2011. 620 p.

DIAS, L. A. S. Análises Multidimensionais. In: ALFENAS, A. C. (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afns**. Viçosa: UFV, 1998. P. 405-475.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. v. 19, p. 11-15, 1987

DURAN, C.; APPLEBY, N.; EDWARDS, D., BATHEY, J. Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualisation. **Current Bioinformatics**. Roma, v. 4, n. 1, p. 16-27, 2009.

ELDRIDGE, K. G.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C. E.; WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarence Press, 1994. 288 p.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Genetics**. . New York, v. 5, n. 1, p. 435, 445, 2004.

EL MOUSADIK, A.; PETIT, R. J. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. **Theoretical and Applied Genetics**. Stuttgart, v. 92, n. 1, p. 832-839, 1996.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. **Molecular Ecology**. Malden, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Statistical Yearbook**: World, food and agriculture. Roma, 2013. 289 p.

FARIA, D. A.; MAMANI, E. M. C.; PAPPAS JR, M. R.; GRATTAPAGLIA, D. Genotyping Systems for *Eucalyptus* based on tetra-, penta- and hexanucleotide repeat EST microsatellites and their use for individual fingerprinting and assignment tests. **Tree Genetics & Genomics**. Heidelberg, v. 7, p. 63-77, jun. 2011.

FARIA, D. A.; MAMANI, E. M. C.; PAPPAS, M. R.; PAPPAS JR, G. J.; GRATTAPAGLIA, D. A selected set of EST – derived microsatellites, polymorphic and transferable across 6 species of *Eucalyptus*. **Journal of Heredity**. Oxford, v. 101, n. 4, p. 512-520, march. 2010.

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

FONSECA, S. M. et al. **Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2010. 200 p.

FOULLEY, J. L.; OLLIVIER, L. Estimating allelic richness and its diversity. **Livestock Science**. Tjele, v. 101, n. 1, p. 150-158, 2006.

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 microssatélites. **Bragantia**. Campinas, v. 66, n. 4, p. 553-563, 2007.

GAIOTTO, F. A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**. Stuttgart, v. 95, n. 5-6, p. 842-849, 1997.

GANDARA, F. B. **Diversidade genética de populações de cedro (*Cedrela fissilis* Vell. Meliaceae) no Centro-Sul do Brasil**. 2009. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GOUDET, J. FSTAT: A computer program to calculate F-statistics (Version 2.9.3.2.). **Journal of Heredity**. Edinburg, v. 86, n. 1, p. 485-486, 2002.

GOWER, J. C. Properties of Latent Root and Vector Methods Used in Multivariate Analysis. **Biometrika**. Oxford, v. 53, n. 3-4, p. 325-338, 1966.

GRATTAPAGLIA, D.; VAILLANCOURT, R. E.; SHEPHERD, M.; THUMMA, B. R.; FOLEY, W.; KULHEIM, C.; POTTS, B. M.; MYBURG, A. A. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, p. 463-508, 2012.

GRATTAPAGLIA, D. BRADSHAW, H. D. Nuclear-DNA content of commercially important eucalyptus species and hybrids. **Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere**, v. 24, n. 5, p. 1074-1078, 1994.

GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist**. Lancaster, v. 179, n. 4, p. 911-929, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic Linkage Maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* Using a Pseudo-Tetrcross: Mapping Strategy and RAPD Markers. **Genetics**. Bethesda, v. 137, n. 1, p. 1121-1137, 1994.

GRIFFIN, A. R.; BURGUESS, I. P.; WOLF, L. Patterns of natural and manipulated hybridization in the genus *Eucalyptus* lherit – a review. **Australian Journal of Botany**. Collingwood, v. 36, n. 1, p. 41-66, 1988.

HAMADA, H.; PETRINO, M. G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, p. 6465-6469, 1982.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Effects of Life History Traits on Genetic Diversity in Plant Species. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, v. 351, n. 1, p. 1291-1298, 1996.

HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**. Columbus, v. 69, n. 10, p. 1685-1693, 1982.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.

HIRAKAWA, H.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; ISOBE, S.; SAKAI, H.; KATO, T.; HIBINO, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; YAMADA, M.; NAKAYAMA, S.; FUJISHIRO, T.; KISHIDA, Y.; KOHARA, M.; TABATA, S.; SATO, S. Survey of genetic information carried in the genome of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Biotechnology**. Malden, v. 28, n. 1, p. 471-480, 2011.

HOLSINGER, K. E.; WEIR, B. S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. **Fundamental Concepts in Genetics**. London, v. 10, p. 639-650, 2009.

HORSLEY, T. N.; JOHNSON, S. D. Is *Eucalyptus* critically self-incompatible? **Annals of Botany**, v. 100, p. 1373-1378, 2007.

HULBERT, S. H. The Nonconcept of Species Diversity: A Critique and Alternative Parameters. **Molecular Ecology**. Oxford, v. 52, n. 4, p. 577-586, 1971.

ISHII, K. DNA Markers in *Eucalyptus* with emphasis on species identification. **Environment Control in Biology**, Tokyo, v. 47, n. 1, p. 1-11, 2009.

JONES, T. H. Chloroplast DNA variation and population structure in the widespread forest tree, *Eucalyptus grandis*. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 5, p. 691-703, 2006.

KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Variação genética em progênies de uma população de *Eucalyptus grandis* (HILL) Maiden. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**. Piracicaba, n. 24, p. 9-26, ago. 1983.

KIMPTON, G. P.; GILL, P.; WALTON, A.; URQUHART, A.; MILLICAN, E. S.; ADAMS, M. Automated DNA profiling employing *multiplex* amplification of short tandem repeat loci. **PCR Methods and Applications**, v. 3, p. 13-22, 1993.

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 populations. **Journal of Heredity**. Oxford, v. 96, n. 2, p. 161-166, dec. 2005.

LADIGES, P.Y.; UDOVICIC, F.; NELSON, G. Australian biogeographical connections and the phylogeny of large genera in the plant family Myrtaceae. **Journal of Biogeography**. Malden, v. 30, n. 7, p. 989-998, 2003.

LEROUX, J. J.; VANSTADEN, J. Micropropagation of Eucalyptus species. **Hortscience**. v.26, n. 2, p. 199-200, 1991.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Versão 1.0, 2001. Disponível em <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>. Acesso em: 20 de outubro de 2013.

LIMA, W. P. **Impacto Ambiental do Eucalipto**. São Paulo: EDUSP, 1993. 301 p.

LITT, M.; LUTY, J. M. A hipervariável microsatélite revelada por in vitro amplificação de um dinucleotídeo repetido dentro do gene da actina muscular cardíaca. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 397-401, 1989.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**. Palo Alto, v. 15, n. 1, p. 65-95, 1984.

MARIE, D.; BROWN, S. C. Exercícios citométricos em histogramas de DNA de plantas, com 2-c valores para 70 espécies. **Biology of the Cell**, v. 78, p. 41-51, 1993.

MELO, A. T. O. **Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica**. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

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

- MORAN, G. F. et al. Genomics of *Eucalyptus* wood traits. **Annals of Forest Science**, v. 59, n. 5-6, p. 645-650, 2002.
- MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 4, p. 56-65, 1983.
- MYBURG, A. A.; GRATTAPAGLIA, D.; TUSKAN, G. A.; HELLSTEN, U.; HAYES, R. D.; GRIMWOOD, J.; JENSKINS, J.; LINDQUIST, E.; TICE, H.; BAUER, D.; GOODSTEIN, D. M.; DUBCHAK, I.; POLIAKOV, A.; MIZRACHI, E.; KULLAN, A. R. K.; HUSSEY, S. G.; PINARD, D.; MERWE, K.; SINGH, P.; JAARVELD, I.; SILVA-JUNIOR, O. B.; TOGAWA, R. C.; PAPPAS, M. R.; FARIA, D. A.; SANSALONI, C. P.; PETROLI, C. D.; YANG, X.; RANJAN, P.; et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**. New York, v. 510, n. 1, p. 356-374, 2014.
- NAGYLAKI, T. Fixation indices in subdivided populations. **Genetics**. Bethesda, v. 148, p. 1325-1332, 1998.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**. Bethesda, v. 89, p. 583-590, jul. 1978.
- ODA, S. et al. Melhoramento Florestal. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. Melhoramento Florestal, p. 125-142.
- OTTEWELL, 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 others *Eucalyptus* species. **Journal of Heredity**. Oxford, v. 94, n. 4, p. 445-451, apr. 2005.
- PAYN, K. G.; DVORAK, W. S.; JANSE, B. J. H.; MYBURG, A. A. Microsatellite diversity and genetic structure of the commercially important tropical tree species *Eucalyptus urophylla*, endemic to seven islands in eastern Indonesia. **Tree Genetics & Genomics**. Heidelberg, v. 4, p. 519-530, march. 2008.
- PETIT, R. J.; MOUSADIK, A.; PONS, A. O. Identifying Populations for Conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**. Gainesville, v. 12, n. 4, p. 844-855, 1998.
- PINTO, L. R. Analysis of the genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. somatic embryos by flow cytometry. **Theoretical and Applied Genetics**. Stuttgart, v. 109, n. 3, p. 580-587, 2001.
- POTTS, B. M. Genetic improvement of eucalypts. In: BURLEY, J.; EVANS, J.; YOUNGQUIST, J. A. (Ed.). **Encyclopedia of Forest Science**. Oxford: Elsevier Science, 2004. P. 1480-1490.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**. Baltimore, v. 155, p. 945-959, 2000.

RANNALA, B.; MOUNTAIN, J. L. Detecting immigration by using multilocus genotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. La Jolla, v. 94, n. 1, p. 9197-9201, 1997.

RIBEIRO, M. M.; SANCHÉZ, L.; BORRALHO, N.; MARQUES, C. M. Estimativa do parentesco numa população de melhoramento de *Eucalyptus globulus* através de microssatélites nucleares. In: CONGRESSO FLORESTAL NACIONAL, 6., 2009, Ponta Delgada. **Actas das comunicações do 6º Congresso Florestal Nacional**. Ponta Delgada: SPCF, 2009. p. 296.

ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: Ed. UFV, Universidade Federal de Viçosa, 1998. p. 329-380.

ROCHA, R. B.; ABAD, J. I. M.; ARAÚJO, E. F.; CRUZ, C. D. Avaliação do método centroide para estudo de adaptabilidade ao ambiente de clones de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 255-266, ago. 2005.

ROGERS, J. S. Measures of genetic similarity and genetic distance. **University of Texas Publication**. Austin, v. 7, p. 145-153, 1972.

RYE, B. L. Chromosome-number variation in the Myrtaceae and its taxonomic implications. **Australian Journal of Botany**, v. 27, p. 547-553, 1979.

SANSALONI, C. P. **Desenvolvimento, caracterização de mapeamento de microssatélites de tetra e pentanucleotídeos em *Eucalyptus spp.*** 2008. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Nature Genetics**. New York, v.5, n. 1, p. 63-69, jan. 2004

SEMAGN, K.; BJORNSTAD, A.; NDJIONDJOP, M. N. An overview of molecular marker methods for plants. **African Journal of Biotechnology**. Rondebosch, v. 5, n. 25, p. 2540-2568, dec. 2006.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**. Palo Alto, v. 16, p. 393-430, 1985.

SILVA, J. C. E.; POTTS, B. M.; DUTKOWSKI, G. W. Genotype by environment interaction for growth of *Eucalyptus globulus* in Australia. **Tree Genetics & Genomes**. Heidelberg, v. 2, n. 2, p. 61-75, 2006.

SOARES, T. N. **Estrutura e padrão espacial da variabilidade genética de *Dipterux alata* Vogel (barueiro) no cerrado**. 2006. 126 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**. Mainz, v. 11, n. 1, p. 30-40, 1962.