

EVANDRO NOVAES

**MAPEAMENTO DE QTLs PARA QUALIDADE DA MADEIRA EM
Eucalyptus grandis x *E. urophylla* E ANCORAGEM DE CLONES
BAC NO MAPA GENÉTICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006**

EVANDRO NOVAES

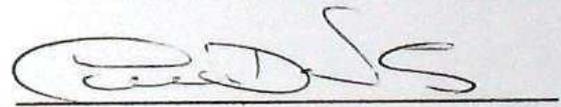
MAPEAMENTO DE QTLs PARA QUALIDADE DA MADEIRA EM
Eucalyptus grandis x *E. urophylla* E ANCORAGEM DE CLONES
BAC NO MAPA GENÉTICO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de "Magister Scientiae".

APROVADO: 17 de fevereiro de 2006



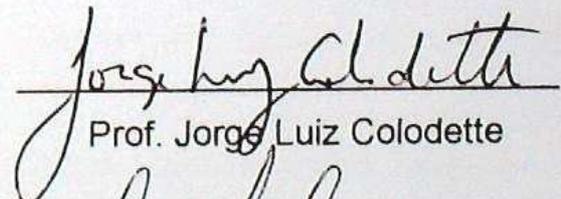
Prof. Dario Grattapaglia
(Co-orientador)



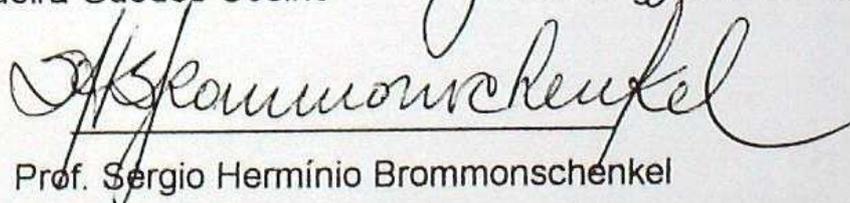
Prof. Cosme Damião Cruz
(Conselheiro)



Prof. Alexandre Siqueira Guedes Coelho



Prof. Jorge Luiz Colodette



Prof. Sergio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

N935m
2006

Novaes, Evandro, 1981-
Mapeamento de QTLs para qualidade da madeira em
Eucalyptus grandis x *E. urophylla* e ancoragem de clones
BAC no mapa genético / Evandro Novaes. – Viçosa :
UFV, 2006.
xi, 171f. : il. ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Mapeamento cromossômico. 2. Marcadores
genéticos. 3. Eucalipto - Melhoramento genético.
4. Madeira - Qualidade. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 572.8633

Aos meus pais Carlos e Márcia,

Ao meu irmão Rodrigo,

Ao meu grande amor Carolina.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

Ao Projeto Genolyptus MCT-FINEP pelo apoio financeiro e por me permitir o acesso a experimentos, dados e recursos genômicos ímpares ao nível mundial.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pela confiança, orientação e ensinamentos.

Ao Prof. Dario Grattapaglia pelo exemplo de pessoa e de profissional, pelo apoio incondicional no meu desenvolvimento acadêmico e pela colaboração na condução desse trabalho.

Ao Prof. Cosme Damião Cruz, pelos ensinamentos em estatística genômica e pela importante contribuição nas análises dos dados dessa tese.

Ao Prof. Alexandre Siqueira Guedes Coelho pelo auxílio técnico nas análises estatísticas.

Ao Prof. José Lívio Gomide, ao Prof. Jorge Colodette e à equipe do Laboratório de Celulose e Papel da UFV pelas análises de qualidade da madeira.

À equipe de melhoramento da Votorantim Celulose e Papel (VCP), liderada pelo Eng. Flor. César V. Bonine, pela coleta das folhas e mensuração dos caracteres de campo na família de irmãos-completos utilizada nesse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genômica, por me proporcionar um ótimo ambiente de trabalho; especialmente Miki, Lúcio, Bruno e Virgínia pelo auxílio técnico na manipulação dos BACs, e Janaína por me ajudar na catalogação e entrega da versão final da tese.

Ao Tadeu e Luiz, funcionários dedicados e solícitos, pela organização e limpeza do Laboratório de Genômica.

Aos colegas do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa/Cenargen, especialmente à Eva, Alexandre, Rodrigo, Marília e Nathália, pelo treinamento, troca de conhecimentos e pelo auxílio na geração de boa parte dos dados de mapeamento genético ainda antes do meu mestrado, quando bolsista de residência.

Aos colegas do Laboratório de Bioinformática, especialmente ao Adésio, Edimar e Tatiana por disponibilizarem um dos melhores computadores do laboratório para realização das análises dessa tese.

Ao Alejandro, Klaus e Valdir pelo convívio e companheirismo.

Aos meus grandes amigos Guilherme e Márcio e amigos da Rep. Lesma Lerda (ESALQ) que proporcionaram momentos de descontração durante os curtos períodos de férias e carnaval.

A todos os colegas do curso de Genética e Melhoramento, especialmente Leo, Tati, Milene e Welisson pela amizade.

Aos meus tios, avós e primos, pelo carinho, orações e torcida.

Meu especial agradecimento à minha esposa Carolina, por tornar minha vida em Viçosa enfim agradável, pelo apoio e incentivo, pelos conselhos e pela força nos momentos de dificuldade.

Às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais Carlos Alberto Duarte Novaes e Márcia Veronez Barboza Novaes, e meu irmão Rodrigo Novaes, pelo amor, carinho, dedicação e por terem sido fundamentais na formação do meu caráter e no meu desenvolvimento acadêmico.

BIOGRAFIA

Evandro Novaes, filho de Carlos Alberto Duarte Novaes e Márcia Veronez Barboza Novaes, nasceu no dia 10 de janeiro de 1981, em Piracicaba - SP.

Em 1985, sua família mudou-se para Araraquara, onde viveu até os 18 anos de idade, quando, tendo passado em primeiro lugar no vestibular da Fuvest, retorna à Piracicaba para cursar Engenharia Florestal na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). Em janeiro de 2004 obtém da Universidade de São Paulo o grau de Engenheiro Florestal.

Durante a graduação, desenvolveu projeto de iniciação científica com apoio financeiro do CNPq e realizou estágio no último semestre do curso na Embrapa/Cenargen sob orientação do pesquisador Dario Grattapaglia. Durante esse estágio teve a oportunidade de conhecer o projeto Genolyptus e começou a desenvolver o trabalho que culminou com essa tese.

Em março de 2004, iniciou o Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2006.

CONTEÚDO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1 - INTRODUÇÃO	1
2 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8

CAPÍTULO 1 : MAPEAMENTO DE QTLS PARA QUALIDADE DA MADEIRA EM *EUCALYPTUS GRANDIS* X *E. UROPHYLLA* UTILIZANDO MICROSSATÉLITES.

RESUMO	14
1 - INTRODUÇÃO	16
2 - MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. MATERIAL VEGETAL	21
2.2. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS	21
2.3. AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO DOS LOCOS MICROSSATÉLITES	22
2.4. CONSTRUÇÃO DO MAPA INTEGRADO E ANÁLISE DE QTLS POR MARCA SIMPLES	24
2.5. CONSTRUÇÃO DOS MAPAS GENÉTICOS PELA ESTRATÉGIA DE PSEUDO-CRUZAMENTO TESTE E ANÁLISE DE QTLS POR INTERVALO COMPOSTO	26
2.6. MAPEAMENTO DE QTLS POR INTERVALO EM MAPA INTEGRADO ATRAVÉS DA ESTRATÉGIA DE PARES DE IRMÃOS	28
3 - RESULTADOS	30
3.1. ANÁLISE DOS LOCOS INDIVIDUALMENTE E CONSTRUÇÃO DO MAPA GENÉTICO INTEGRADO	30
3.2. ANÁLISE DOS LOCOS QUE SEGREGARAM EM CADA PARENTAL E CONSTRUÇÃO DOS MAPAS GENÉTICOS PELA ESTRATÉGIA DE PSEUDO-CRUZAMENTO TESTE	33
3.3. ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS E ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS	37
3.4. ANÁLISE DE QTLS	39
3.4.1. ANÁLISE DE QTLS PARA DIÂMETRO DAS ÁRVORES À ALTURA DO PEITO.....	39
3.4.2. ANÁLISE DE QTLS PARA ALTURA DAS ÁRVORES	43
3.4.3. ANÁLISE DE QTLS PARA PROFUNDIDADE DE PENETRAÇÃO DO PILODYN	45
3.4.4. ANÁLISE DE QTLS PARA DENSIDADE BÁSICA DA MADEIRA	49
3.4.5. ANÁLISE DE QTLS PARA TEOR DE GLICANA DA MADEIRA	52
3.4.6. ANÁLISE DE QTLS PARA TEOR DE XILANA DA MADEIRA.....	55
3.4.7. ANÁLISE DE QTLS PARA TEOR DE ÁCIDO METILGLUCURÔNICO DA MADEIRA.....	58
3.4.8. ANÁLISE DE QTLS PARA TEOR DE ÁCIDO GALACTOURÔNICO DA MADEIRA	61
3.4.9. ANÁLISE DE QTLS PARA TEOR DE LIGNINA TOTAL DA MADEIRA	63
3.4.10. ANÁLISE DE QTLS PARA RELAÇÃO SIRINGIL/GUAIACIL DA MADEIRA	68
3.4.11. ANÁLISE DE QTLS PARA A PORCENTAGEM DE ÁLCALI EFETIVO UTILIZADO NO PROCESSO DE POLPAÇÃO	71
3.4.12. ANÁLISE DE QTLS PARA RENDIMENTO DEPURADO DE CELULOSE.....	74
3.4.13. ANÁLISE DE QTLS PARA VISCOSIDADE DA POLPA CELULÓSICA	76
3.4.14. ANÁLISE DE QTLS PARA TEOR DE EXTRATIVOS EM DICLOROMETANO.....	80
3.5. ANÁLISE DA CO-LOCALIZAÇÃO DOS QTLS	83
3.6. MAPEAMENTO DE QTLS PELA ESTRATÉGIA DE PARES DE IRMÃOS	88
3.6.1. MAPEAMENTO DE QTLS PARA PROFUNDIDADE DE PENETRAÇÃO DO PILODYN	90
3.6.2. MAPEAMENTO DE QTLS PARA TEOR DE LIGNINA DA MADEIRA.....	91
3.6.3. MAPEAMENTO DE QTLS PARA PORCENTAGEM DE ÁLCALI EFETIVO UTILIZADO NO PROCESSO DE POLPAÇÃO	92
3.6.4. MAPEAMENTO DE QTLS PARA VISCOSIDADE DA POLPA CELULÓSICA.....	93

3.7. ANÁLISE COMPARATIVA DOS QTLs MAPEADOS POR INTERVALO PELA ESTRATÉGIA DE PARES DE IRMÃOS E DE PSEUDO-TESTCROSS	95
3.7.1. ANÁLISE COMPARATIVA DOS QTLs MAPEADOS PARA PENETRAÇÃO DO PILODYN	95
3.7.2. ANÁLISE COMPARATIVA DOS QTLs MAPEADOS PARA TEOR DE LIGNINA DA MADEIRA	98
3.7.3. ANÁLISE COMPARATIVA DOS QTLs MAPEADOS PARA PORCENTAGEM DE ÁLCALI EFETIVO UTILIZADO NO PROCESSO DE POLPAÇÃO	101
3.7.4. ANÁLISE COMPARATIVA DOS QTLs MAPEADOS PARA VISCOSIDADE DA POLPA CELULÓSICA.....	103
4 - DISCUSSÃO.....	106
5 - CONCLUSÃO	117
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
CAPÍTULO 2 : ANCORAGEM DE CLONES BAC NO MAPA GENÉTICO DE <i>EUCALYPTUS</i>.	
RESUMO.....	126
1 - INTRODUÇÃO.....	128
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	134
2.1. ORGANIZAÇÃO DA BIBLIOTECA DE CLONES BAC E ESQUEMA DA TRIAGEM.....	134
2.2. SELEÇÃO DOS LOCOS MICROSSATÉLITES	135
2.3. TRIAGEM DOS MICROSSATÉLITES NOS <i>SUPERPOOLS</i>	136
2.4. TRIAGEM DOS MICROSSATÉLITES NOS <i>POOLS</i>	137
2.5. TRIAGEM DOS MICROSSATÉLITES NOS BACS	137
3 - RESULTADOS	139
4 – DISCUSSÃO	144
5 – CONCLUSÃO	151
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153
ANEXO.....	159

RESUMO

NOVAES, Evandro, M. S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006.
Mapeamento de QTLs para qualidade da madeira em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e ancoragem de clones BAC no mapa genético. Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-orientador: Dario Grattapaglia. Conselheiro: Cosme Damião Cruz.

Espécies do gênero *Eucalyptus* são amplamente utilizadas em plantios florestais homogêneos em nosso país. Para aumentar a competitividade da eucaliptocultura nacional são necessárias ações contínuas que visem melhorar as características de nossas florestas. Uma estratégia para buscar regiões genômicas que contenham genes ou seqüências regulatórias envolvidos no controle de caracteres de interesse é o mapeamento genético. Vários grupos de pesquisa identificaram regiões genômicas associadas a caracteres de interesse em *Eucalyptus* via mapeamento genético. Esses trabalhos, em sua maioria, utilizaram marcadores dominantes, que dificultam o compartilhamento interexperimental dos dados fazendo com que o uso das informações de ligação marcador/característica fique restrito ao *pedigree* utilizado. A utilização de microssatélites, marcadores codominantes, multialélicos, altamente polimórficos, e transferíveis, permite, por outro lado, a análise comparativa de QTLs entre *pedigrees* e espécies do gênero. No presente trabalho foram localizados QTLs com base no mapeamento de 235 microssatélites em uma família de 188 irmãos-completos, proveniente de um cruzamento entre *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. A detecção do polimorfismo dos microssatélites foi realizada via fluorescência na

plataforma ABI 3100. Os indivíduos desta família foram avaliados aos três anos para altura e diâmetro das árvores, densidade da madeira via penetração do Pilodyn e mais onze caracteres relacionados à qualidade da madeira, os quais foram avaliados indiretamente por Espectrofotometria de Infravermelho Próximo (NIRS). Os marcadores foram testados individualmente quanto à ligação a QTLs através de uma análise de variância no programa GQMOL. Marcadores significativamente ligados a QTLs foram identificados para todas as características com um nível de significância de 1% para cada marca individual. Também foi realizado mapeamento de QTLs através da metodologia de intervalo composto no programa QTLCartographer. Para isso, foram construídos mapas de ligação para cada parental utilizando a estratégia de pseudo-cruzamento teste no programa MapMaker. Através dessa estratégia, foram identificados QTLs para todas as quatorze características. Muitos dos QTLs, principalmente para caracteres correlacionados, foram identificados de forma co-localizada. Para fins comparativos, também foram realizadas análises de QTLs por intervalo em mapa integrado através do método de Fulker e Cardon, que utiliza uma regressão linear onde a variável dependente é o quadrado da diferença fenotípica entre pares de irmãos e a variável independente é a proporção de alelos idênticos por descendência (IBD) nos diferentes intervalos do mapa genético. Em geral, houve concordância entre os QTLs identificados por ambas metodologias de mapeamento por intervalo. Por fim, visando contribuir para a ancoragem do mapa genético com correspondentes físicos do genoma, para 38 microssatélites mapeados foram identificados um ou mais clones de cromossomos artificiais de bactérias (BAC). Esses clones serão utilizados para a construção de um mapa físico no âmbito do Projeto Genolyptus, etapa fundamental para um possível esforço de clonagem posicional de genes que controlam características quantitativas. A utilização de clones BAC pertencentes a grupos de ligação específicos, como sondas de FISH, permitirá ainda o estabelecimento da correta numeração de grupos de ligação com base na numeração citogenética de cromossomos, informação indisponível até o momento para o gênero *Eucalyptus*.

ABSTRACT

NOVAES, Evandro, M. S., Universidade Federal de Viçosa, February 2006. **QTL mapping for wood properties in *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* and anchoring of BAC clones in the genetic map.** Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-adviser: Dario Grattapaglia. Committee member: Cosme Damião Cruz.

Species of *Eucalyptus* are widely planted in continuous forests stands in our country. To increase the competitiveness of our *Eucalyptus* based forest industry it is imperative to continuously work toward improving the quality of our plantation forestry. The identification of genes or genomic regions controlling traits of interest has been one of the main molecular breeding approaches to this end. Several groups worldwide have started to identify QTLs for some productivity related traits. Most of these reports, however, have used dominant markers that do not allow data sharing and comparison among the various pedigrees and species. QTL information therefore remains restricted to the particular family used in the detection experiment. The use of codominant, multiallelic, highly polymorphic and transferable microsatellite markers, allows, on the other hand, a comparative mapping investigation across multiple pedigrees and even species of the genus. In this work QTLs were localized based on the genetic mapping of 235 microsatellites in a full-sib family of 188 individuals derived from a *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cross. Microsatellite genotyping was carried out by fluorescence detection on the ABI 3100. Individuals were measured at age of three years for volume growth, wood density by pilodyn penetration as well as eleven other traits

related to wood properties assessed by Near Infrared Spectroscopy (NIRS). Single marker analysis was carried out using GQMOL and QTLs were declared at a significance threshold of 1%. Composite interval mapping using QTLCartographer was also used after constructing both parental maps by the pseudo-testcross strategy using MapMaker. QTLs were identified for all 14 traits. Several QTLs for correlated traits mapped to the same genomic intervals. For comparative purposes, sib-pair analysis of Fulker and Cardon was also carried out on the integrated genetic map to detect QTL. A general agreement was seen between the two QTL interval mapping analyses. Finally, to contribute for an ongoing effort to anchor the genetic map to physical equivalents of the *Eucalyptus* genome, for 38 mapped microsatellites one or more BAC clones were identified by library screening. These BAC clones will be used for the construction of a physical map for future efforts of positional cloning of target genes. The use of BAC clones that belong to specific linkage groups as probes for FISH will also allow establishing the correct numbering of linkage groups based on cytogenetic chromosome numbering, information still lacking for species of *Eucalyptus*.

1 - INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Eucalyptus* têm destaque na produção de biomassa lenhosa no Brasil. Essas espécies, nativas da Austrália e ilhas próximas, apresentam excelente adaptação às nossas condições edafoclimáticas, além de boas características silviculturais e grande variabilidade inter e intra-específica, em termos de características físico-químicas da madeira, tornando-as úteis para diversas finalidades (energia, celulose e produtos sólidos). Esse é o gênero mais utilizado em plantios florestais homogêneos no Brasil, cobrindo uma área de aproximadamente três milhões de ha (SBS, 2001), o que corresponde a 16,7% dos 18 milhões de ha de *Eucalyptus* plantado no mundo (FAO, 2002). No ano de 2000, o setor florestal brasileiro gerou recursos da ordem de 21 bilhões de dólares, aproximadamente 4% do Produto Interno Bruto (SBS, 2001). Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF), a área plantada com *Eucalyptus* e *Pinus* cresceu em torno de 500 mil ha somente no ano de 2003 e estimativas indicam que esse crescimento foi ainda maior em 2004 e 2005 (www.celuloseonline.com.br).

Além da expansão das áreas plantadas, para aumentar de forma sustentável a competitividade da eucaliptocultura nacional frente ao mercado externo, são imprescindíveis ações contínuas que visem melhorar as características de nossas florestas. As técnicas de melhoramento clássico combinadas à silvicultura intensiva clonal têm tido um papel essencial para o aumento do crescimento e melhoria da qualidade dos plantios de *Eucalyptus*

(Ferreira e dos Santos, 1997). Os alvos do melhoramento florestal até a década de 1990 eram basicamente os caracteres silviculturais, como crescimento, retidão do tronco e volume de madeira, além de resistência a fatores bióticos e abióticos. Em meados da década de 90, novos métodos não destrutivos possibilitaram a análise dos caracteres relacionados à qualidade da madeira em uma grande quantidade de árvores a um custo relativamente baixo, permitindo que esses caracteres fossem incorporados aos programas de melhoramento (Raymond, 2002). Para a indústria de papel e celulose, atributos da madeira como o baixo teor de lignina e o alto teor de celulose são importantes para a extração de polpa celulósica com alto rendimento e qualidade (Raymond e Schimleck, 2002).

Recentemente, com o avanço nas áreas de biologia molecular e biotecnologia, existem perspectivas de melhoria no entendimento de como as variações na seqüência de DNA afetam o fenótipo. A partir desse conhecimento, poder-se-á selecionar aquelas seqüências que promovam ganhos em caracteres de interesse através do melhoramento molecular (Morgante e Salamini, 2003). O uso da biologia molecular e biotecnologia em conjunto com o melhoramento florestal clássico podem contribuir para a redução do tempo necessário para completar cada ciclo de seleção e recombinação, o que é extremamente desejável em espécies perenes. A seleção assistida e precoce por marcadores é útil para os caracteres relacionados à qualidade da madeira que, em geral, são de difícil mensuração, exigindo procedimentos caros, laboriosos, e que só podem ser conduzidos em idade avançada.

Duas estratégias gerais podem ser utilizadas para identificação dos genes responsáveis pelo controle da variação fenotípica quantitativa: a genética reversa (“reverse genetics”) e a genética direta (“forward genetics”). A estratégia reversa tem o foco principal na seqüência gênica, analisando suas variações naturais ou induzidas (mutagênese) com o objetivo de encontrar associação com alguma alteração no fenótipo ou na fisiologia. Fazem parte das abordagens de genética reversa os estudos de mutagênese direcionada, silenciamento gênico e super expressão. A estratégia direta inicia-se com a análise do fenótipo seguido da localização de regiões do genoma que contêm genes que controlam parte da

variabilidade da característica. Essa estratégia é baseada no mapeamento genético e na clonagem posicional (Peter et al., 2003).

A estratégia de genética reversa se apóia em parte no conhecimento da seqüência genômica completa ou parcial do organismo em estudo. Para espécies do gênero *Eucalyptus* existem poucas seqüências gênicas depositadas em bancos de dados públicos, embora bancos com grande quantidade de etiquetas de seqüências expressas (ESTs) existam no Brasil no âmbito dos projetos Genolyptus e Forest (Grattapaglia, 2004). Em *Populus*, a planta lenhosa modelo (Taylor, 2002), ESTs foram seqüenciados em larga escala (Sterky et al., 2004) e o primeiro rascunho de sua seqüência genômica está em vias de publicação (Tuskan et al., 2006). O grande desafio da genômica florestal é a caracterização funcional dos genes anotados na seqüência genômica de *Populus*. Porém, o tempo e o espaço físico necessários para as análises dos caracteres em ensaios de campo, juntamente com as dificuldades de realização de mutagênese e/ou alterações de expressão gênica nas espécies florestais, limitam bastante a utilização da genética reversa em larga escala.

Pela dificuldade de utilização da genética reversa em larga escala, a opção viável é a análise funcional de genes candidatos. As análises de transcritos em diferentes tecidos, principalmente em xilema (Paux et al., 2004), juntamente com os trabalhos envolvendo análises de expressão gênica em microarranjos (Kirst et al., 2004; Paux et al., 2005) têm identificado candidatos, em diversas rotas metabólicas, para os processos de formação da madeira. Porém, ainda são poucos os genes de *Eucalyptus* analisados funcionalmente para determinar o seu papel na xilogênese (Goicoechea et al., 2005). Em *Pinus*, *Populus* e principalmente em *Arabidopsis*, análises funcionais vêm comprovando a função de vários genes envolvidos na formação da parede celular (Mackay et al., 1997; Reiter, 2002; Li et al., 2003; Zhang et al., 2003; Karpinska et al., 2004; Brown et al., 2005).

Apesar desses avanços, ainda pouco se sabe sobre o controle genético da xilogênese. A grande maioria dos caracteres que definem a qualidade e crescimento da madeira exhibe herança complexa ou quantitativa, ou seja, são

controlados por muitos genes. Uma estratégia para identificar regiões genômicas que contêm genes ou seqüências regulatórias envolvidos no controle desses caracteres é o mapeamento genético associado à análise quantitativa. Essa estratégia de genética direta é interessante por não necessitar de conhecimento prévio da seqüência de genes candidatos (Hirschhorn e Daly, 2005). Os mapas genéticos permitem definir com certa probabilidade estatística regiões do genoma, delimitadas por marcadores moleculares, que controlam parte da variabilidade fenotípica. Essas regiões são comumente denominadas de locos controladores de caracteres quantitativos ("Quantitative Trait Loci" - QTL). As marcas ligadas aos QTLs podem ser utilizadas em seleção assistida por marcadores ou como guias visando a clonagem posicional dos genes ou regiões regulatórias envolvidos no controle do caráter.

Apesar de sua relevância, o mapeamento genético em espécies perenes não é trivial. O cálculo da freqüência de recombinação entre pares de locos é mais complexo em *Eucalyptus* do que em espécies anuais para as quais é factível a obtenção de linhagens endogâmicas. Com a estratégia de pseudocruzamento-teste (Grattapaglia e Sederoff, 1994), onde os marcadores segregantes são analisados separadamente para cada parental, a utilização de genitores heterozigóticos para a construção de mapas de ligação tornou-se possível. Com isso, vários grupos identificaram regiões genômicas associadas a caracteres de interesse em *Eucalyptus*, tais como altura, tamanho de folha e tolerância à geada em plântulas (Byrne et al., 1997a; Byrne et al., 1997b), habilidade de propagação vegetativa (Grattapaglia et al., 1995; Marques et al., 1999), resistência a doenças (Junghans et al., 2003), crescimento e qualidade da madeira (Grattapaglia et al., 1996; Verhaegen et al., 1997; Thamarus et al., 2004).

Esses trabalhos permitem obter estimativa do número mínimo de locos envolvidos no controle dos caracteres, a localização genômica desses locos, a quantificação das suas contribuições para a variação fenotípica e a avaliação dos seus efeitos em diferentes ambientes e genótipos, fazendo com que se tenha uma compreensão substancialmente melhor da arquitetura desses caracteres complexos (Neale e Savolainen, 2004). Porém, estes trabalhos são limitados pelo

tamanho pequeno das progênies empregadas, a restrita precisão das fenotipagens, o número reduzido de cruzamentos testados e as limitações inerentes aos tipos de marcadores moleculares, pedigrees e métodos estatísticos utilizados. Dessa forma, o número real de QTLs, assim como suas posições precisas e a magnitude de seus efeitos ainda são insuficientemente compreendidos (Grattapaglia, 2004), fazendo com que, apesar de todos os esforços no estudo dos caracteres complexos, ainda pouco se saiba sobre suas bases moleculares (Flint e Mott, 2001). Em plantas, mesmo com a facilidade de obtenção de grandes progênies e replicação clonal para muitas espécies, poucos foram os genes ou seqüências regulatórias identificados como responsáveis por parte da variação nesses caracteres (Margante e Salamini, 2003; Paran e Zamir, 2003). Também em espécies florestais, apesar dos vários trabalhos de mapeamento de QTL não só em *Eucalyptus*, como também em *Populus* e *Pinus*, nenhum gene foi confirmado como responsável por algum QTL (Neale e Savolainen, 2004). Outra limitação é que a maioria desses trabalhos utilizou marcadores dominantes (RAPD e AFLP) que não são normalmente transferíveis para outros cruzamentos, limitando o compartilhamento interexperimental de dados e a possibilidade de utilização dos marcadores ligados a QTLs em outros cruzamentos para a seleção assistida por marcadores (Brondani et al., 1998).

Na tentativa de reverter este quadro, o projeto Genolyptus possui uma rede de experimentos de campo envolvendo dezenas de famílias de irmãos completos, obtidas através de cruzamentos intra e interespecíficos, que contam com milhares de indivíduos por família e com réplicas (clones ou sementes) em diferentes regiões de relevância para a eucaliptocultura nacional. Nessas famílias serão realizados mapeamentos de QTLs utilizando marcadores microssatélites (Brondani et al., 1998; Brondani et al., 2002), permitindo avaliar a estabilidade desses QTLs em diferentes ambientes e cruzamentos (Grattapaglia, 2004). Com isso, poder-se-á investir em um mapeamento de maior resolução, reduzindo as distâncias entre marcadores e QTLs, em regiões que controlam uma significativa proporção da variabilidade genotípica em diferentes populações e ambientes. Por meio do posicionamento dos microssatélites que flanqueiam esses QTLs em

supercontíguos de BACs poder-se-á realizar a clonagem posicional de genes (Grattapaglia, 2004).

Além do mapeamento de QTLs aliado à clonagem posicional, outra abordagem utilizada para inferir se um determinado gene é responsável por parte das variações fenotípicas em caracteres de interesse é o mapeamento de genes candidatos, que são aqueles em que há evidência para um possível papel na característica em estudo. Nesse sentido, Frewen et al. (2000) mapearam QTLs para a época de florescimento em *Populus* e correlacionaram, por meio da detecção de polimorfismo em sítios de restrição de fragmentos amplificados de genes candidatos, um desses QTLs com um gene relacionado com a percepção do fotoperíodo e outro com um gene envolvido na transdução do ácido abscísico. Em uma estratégia parecida, porém utilizando marcadores SSCP (polimorfismo de conformação de fita-simples), Gion et al. (2000) localizaram genes envolvidos na biossíntese da lignina em um mapa genético de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Thamarus et al. (2002) mapearam genes envolvidos na formação da madeira utilizando-os como sondas RFLPs e verificaram posteriormente (Thamarus et al., 2004) que alguns desses genes co-localizaram com QTLs para caracteres de qualidade da madeira. Kirst et al. (2004) verificaram a co-localização de um gene envolvido na biossíntese de lignina com um QTL que controla uma proporção da variação dos seus níveis de transcritos (eQTL) e com outro QTL que controla parte da variabilidade no diâmetro das árvores. Goicoechea et al. (2005) verificaram a co-localização do fator de transcrição EgMYB2 com um QTL para conteúdo de lignina da madeira. Milhares de microssatélites foram encontrados em bibliotecas de ESTs (“expressed sequence tags”) no âmbito do projeto Genolyptus e alguns foram localizados no mapa genético referência (Grattapaglia et al., 2005). Essas seqüências simples repetidas também foram encontradas nas bibliotecas ESTs do projeto Forests (Ceresini et al., 2005), assim como em outros vegetais (Eujayl et al., 2002; Hackauf e Wehling, 2002; Thiel et al., 2003). Esses microssatélites possibilitam o mapeamento rápido e a um custo baixo dos genes onde estão contidos. Muitos desses genes podem vir a ser candidatos para uma determinada característica caso eles co-localizem com os QTLs nos mapas de ligação.

Por fim, o mapeamento utilizando marcadores microssatélites permite identificar regiões genômicas que possuem genes envolvidos na regulação de caracteres de relevância e avaliar a sintenia desses locos com QTLs previamente mapeados em outros trabalhos. Nesse sentido, o objetivo do capítulo 1 desta monografia foi o mapeamento de QTLs para caracteres de interesse para a indústria de base florestal, utilizando mais de 200 marcadores microssatélites em uma família de 188 irmãos completos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Como consequência da natureza dos marcadores microssatélites que são amplificados por iniciadores que se anelam especificamente nos seus flancos, esses locos podem ser localizados em bibliotecas genômicas, etapa imprescindível na clonagem posicional dos genes responsáveis pelos QTLs. Assim, o objetivo do capítulo 2 foi a localização de cerca de 50 microssatélites, regularmente distribuídos no mapa genético, em uma biblioteca BAC de *Eucalyptus*.

2 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brondani, R.P.V.; Brondani, C.; Tarchini, R. & Grattapaglia, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor Appl Gene*. **97**, 816-827. 1998.

Brondani, R.P.V.; Brondani, C. & Grattapaglia, D. Towards the construction of a genus wide reference linkage map for *Eucalyptus* based on microsatellite markers. *Molecular and General Genomics* **267**, 338-347. 2002.

Brown, D.M., Zeef, L.A., Ellis, J., Goodacre, R. & Turner, S.R. Identification of novel genes in Arabidopsis involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell* **17**, 2281-95. 2005.

Byrne M.; Murrell J.C.; Owen J.V.; Kriedemann, P.; Williams E.R. & Moran, G.F. Identification and mode of action of quantitative trait loci affecting seedling height and leaf area in *Eucalyptus nitens*. *Theor Appl Genet* **94**, 674-681. 1997a.

Byrne M.; Murrell J.C.; Owen J.V.; Williams E.R. & Moran, G.F. Mapping of quantitative trait loci influencing frost tolerance in *Eucalyptus nitens*. *Theor Appl Genet* **95**, 975-979. 1997b.

Ceresini, P.C.; Silva, C.L.S.P.; Missio, R. F. et al. Satellyptus: analysis and database of microsatellites from ESTs of *Eucalyptus*. *Genet Mol Biol* **28**, 589-600. 2005.

Eujayl, I.; Sorrells, M. E.; Baum, M.; Wolters, P. & Powell, W. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theor Appl Genet* **104**, 399-407. 2002.

FAO. Global forest resources assessment 2000: main report. Roma: FAO, 2002. 512p. (FAO forestry papers, n.140).

Ferreira, M. & Santos, P. E. T. dos. Melhoramento genético florestal do *Eucalyptus* no Brasil – breve histórico e perspectivas. In: INTERNATIONAL IUFRO CONFERENCE ON *EUCALYPTUS* GENETICS AND SILVICULTURE, 1997, Salvador, Brazil. Proceedings Vol. 1, p.14-33. 1997.

Flint, J. & Mott, R. Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nat Rev Genet* **2**, 437-45. 2001.

Frewen, B. E.; Chen, T. H.; Howe, G. T.; Davis, J.; Rohde, A.; Boerjan, W. & Bradshaw, H. D., Jr. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in *Populus*. *Genetics* **154**, 837-845. 2000.

Gion, J-M.; Rech, P.; Grima-Pettenati, J.; Verhaegen, D. & Plomion, C. Mapping candidate genes in *Eucalyptus* with emphasis on lignification genes. *Mol Breed*. **6**, 441-449. 2000.

Goicoechea, M.; Lacombe, E.; Legay, S. et al. EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant J* **43**, 553-67. 2005.

Grattapaglia, D. & Sederoff R.R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers, *Genetics* **137**, 1121-1137. 1994.

Grattapaglia, D.; Bertolucci, F.L. & Sederoff, R.R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Theor Appl Genet* **90**, 933-947. 1995.

Grattapaglia, D.; Bertolucci F.L.; Penchel R. & Sederoff R.R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers, *Genetics* **144**, 1205-1214. 1996.

Grattapaglia, D. Genômica Florestal. In: Luiz Mir. (Org.). Genômica. 1 ed. São Paulo, v. 1, p. 917-934, 2004.

Grattapaglia, D.; Falcão, C.L.; Alonso, A.; Pappas, M.C.R.; Lourenço, R.T.; Pádua, J.G.; Mamani, E.M.; Pappas Jr, G.J. Development and mapping of EST-derived microsatellites in *Eucalyptus*. Proceedings of the IUFRO Tree Biotechnology Conference, 2005. Poster abstract S5.33.

Hackauf, B. & Wehling, P. Identification of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the rye genome. *Plant Breed.* **121**, 17-25. 2002.

Hirschhorn, J. N. & Daly, M. J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* **6**, 95-108. 2005.

Junghans, D.; Alfenas, A. C.; Brommonschenkel, S. H.; Oda, S.; Mello, E. J. & Grattapaglia, D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of

inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. *Theor Appl Genet* **108**:175–180. 2003.

Karpinska, B.; Karlsson, M.; Srivastava, M.; Stenberg, A.; Schrader, J.; Sterky, F.; Bhalerao, R. & Wingsle, G. MYB transcription factors are differentially expressed and regulated during secondary vascular tissue development in hybrid aspen. *Plant Mol Biol* **56**, 255-70. 2004.

Kirst, M.; Myburg, A. A.; De Leon, J. P.; Kirst, M. E.; Scott, J. & Sederoff, R.. Coordinated genetic regulation of growth and lignin revealed by quantitative trait locus analysis of cDNA microarray data in an interspecific backcross of *Eucalyptus*. *Plant Physiol* **135**, 2368-78. 2004.

Li, L.; Zhou, Y.; Cheng, X.; Sun, J.; Marita, J. M.; Ralph, J. & Chiang, V. L. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4939-44. 2003.

MacKay, J. J.; O'Malley, D. M.; Presnell, T.; Booker, F. L.; Campbell, M. M.; Whetten, R. W. & Sederoff, R. R. Inheritance, gene expression, and lignin characterization in a mutant pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8255-60. 1997.

Marques, C.M.; Vasquez-Kool, J.; Carocha, V.J.; Ferreira, J.G.; O'Malley, D.M.; Liu, B.H. & Sederoff, R. Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*. *Theor Appl Genet* **99**, 936-946. 1999.

Morgante, M. & Salamini, F. From plant genomics to breeding practice. *Curr Opin Biotechnol*, **14**: 214-219. 2003.

Neale, D.B. & Savolainen, O. Association genetics of complex traits in conifers. *Trends Plant Sci* **9**, 325-30. 2004.

Paran, I. & Zamir, D. Quantitative traits in plants: beyond the QTL. *Trends Genet* **19**, 303-6. 2003.

Paux, E.; Tamasloukht, M.; Ladouce, N.; Sivadon, P. & Grima-Pettenati, J. Identification of genes preferentially expressed during wood formation in *Eucalyptus*. *Plant Mol Biol* **55**, 263-80. 2004.

Paux, E.; Carocha, V.; Marques, C.; Mendes de Sousa, A.; Borralho, N.; Sivadon, P. & Grima-Pettenati, J. Transcript profiling of *Eucalyptus* xylem genes during tension wood formation. *New Phytol* **167**, 89-100. 2005.

Peters, J.L.; Cnudde, F. & Gerats, T. Forward genetics and map-based cloning approaches. *Trends Plant Sci* **8**, 484-91. 2003.

Raymond, C. A. Genetics of *Eucalyptus* wood properties. *Ann For Sci* **59**, 522-531. 2002.

Raymond, C. A. & Schimleck, L. R. Development of near-infrared reflectance analysis calibrations for estimating genetic parameters for cellulose content in *Eucalyptus globules*. *Can J For Res* **32**, 170-176. 2002.

Reiter, W.D. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 536-42. 2002.

SBS – Sociedade Brasileira de Silvicultura. Setor florestal brasileiro: área plantada com pinus e eucaliptos no Brasil (ha) – 2001. Disponível em: <http://www.sbs.org.br> (05 abr. 2005)

Sterky, F.; Bhalerao, R. R.; Unneberg, P. et al. A *Populus* EST resource for plant functional genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13951-6. 2004.

Taylor, G. Populus: Arabidopsis for Forestry. Do we need a model tree? *Annals of Botany* **90**, 681-689. 2002.

Thamarus, K. A.; Groom, K.; Murrell, J.; Byrne, M. & Moran, G. F. A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre, and floral traits. *Theor Appl Genet.* **104**, 379-387. 2002.

Thamarus, K.; Groom, K.; Bradley, A.; Raymond, C. A.; Schimleck, L. R.; Williams, E. R. & Moran, G. F. Identification of quantitative trait loci for wood and fibre properties in two full-sib properties of *Eucalyptus globulus*. *Theor Appl Genet.* **109**, 856-864. 2004.

Thiel, T.; Michalek, W.; Varshney, R. K. & Graner, A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* **106**, 411-22. 2003.

Tuskan, G.A.; DiFazio, S.P.; Hellsten, U. et al. The genome of western black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray ex Brayshaw). *Science*, 2006. (aceito - sob revisão).

Verhaegen D.; Plomion, C.; Gion, J.M.; Poitel, M.; Costa, P. & Kremer, A. Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers: 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression across different ages. *Theor Appl Genet* **95**, 597-608. 1997.

Zhang, Y.; Brown, G.; Whetten, R.; Loopstra, C. A.; Neale, D.; Kieliszewski, M. J. & Sederoff, R. R. An arabinogalactan protein associated with secondary cell wall formation in differentiating xylem of loblolly pine. *Plant Mol Biol* **52**, 91-102. 2003.

CAPÍTULO 1

MAPEAMENTO DE QTLS PARA QUALIDADE DA MADEIRA EM *EUCALYPTUS GRANDIS* X *E. UROPHYLLA* UTILIZANDO MICROSSATÉLITES.

RESUMO

As espécies do gênero *Eucalyptus* apresentam excelente adaptação às condições edafoclimáticas do Brasil, boas características silviculturais e uma grande variabilidade, inter e intra-específica, em termos de características físico-químicas da madeira, tornando-as úteis para diversas finalidades (energia, celulose e produtos sólidos). Por essas características, esse é o gênero mais utilizado em plantios florestais homogêneos no país. Para aumentar a competitividade da eucaliptocultura nacional são necessárias ações contínuas que visem melhorar as características de nossas florestas. Uma estratégia para buscar regiões genômicas que contenham genes ou seqüências regulatórias envolvidos no controle de caracteres é o mapeamento genético. Trabalhando com *Eucalyptus*, vários grupos identificaram regiões genômicas associadas a caracteres de interesse, tais como resistência a pragas e doenças, características silviculturais e de qualidade da madeira e habilidade de propagação vegetativa. Esses trabalhos, em sua maioria, utilizaram marcadores dominantes, que dificultam o compartilhamento interexperimental dos dados fazendo com que o uso das informações de ligação marcador/característica fique restrito ao *pedigree* utilizado. No presente trabalho foram genotipados 235 microssatélites em uma família de 188 irmãos-completos proveniente de um cruzamento entre *Eucalyptus*

grandis x *E. urophylla*. Os microssatélites são marcadores codominantes, multialélicos, altamente polimórficos e transferíveis até para outras espécies do gênero. A detecção do polimorfismo dos microssatélites foi realizada via fluorescência na plataforma ABI 3100. A família foi fenotipada aos três anos de idade para altura, diâmetro das árvores, profundidade de penetração da haste do Pilodyn e onze caracteres relacionados à qualidade da madeira, os quais foram avaliados por Espectrofotometria de Infravermelho Próximo (NIRS). Os marcadores foram testados individualmente quanto à ligação a QTLs no programa QQMOL através de análise de variância. Marcadores significativamente ligados a QTLs foram identificados para todos os caracteres com nível de significância de 1% pelo teste F, sendo que o menor número de marcadores significativos encontrados para um caractere foi quatro (densidade básica da madeira) e o máximo foi 27 (diâmetro à altura do peito, profundidade de penetração do Pilodyn e teor de lignina). Além disso, foi realizado mapeamento de QTLs através de metodologias de intervalo. Para isso, foram construídos mapas de ligação para cada parental utilizando a estratégia de pseudo-cruzamento teste no programa MapMaker. Os mapas foram analisados por meio do mapeamento por intervalo composto utilizando o modelo para retrocruzamento do programa QTL Cartographer. Em todas as características foram encontrados pelo menos um QTL utilizando análises de intervalo composto, sendo encontrado o máximo de seis QTLs para teor de lignina. Também foram realizadas análises de QTLs por intervalo através da estratégia de pares de irmãos de Fulker e Cardon, metodologia ainda não utilizada em *Eucalyptus*. Para fins comparativos, essa análise foi feita nos quatro caracteres para os quais se identificou o maior número de QTLs pela estratégia de pseudo-cruzamento teste. Em geral, houve concordância entre os QTLs identificados por ambas metodologias de mapeamento por intervalo.

1 - INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento das teorias de genética quantitativa, liderado por Fisher (1918), reconheceu-se que os caracteres complexos ou quantitativos são controlados pelos mesmos fatores hereditários descritos por Mendel, com a diferença de que vários fatores, cada um contribuindo com uma pequena parcela, estão envolvidos na expressão do caráter. Muitos geneticistas quantitativos acreditavam ser impossível a individualização dos locos que controlam as características quantitativas. Porém, já em 1923, Karl Sax encontrou associação entre o tamanho das sementes (característica complexa) e sua coloração (característica monogênica) em populações F_2 de feijão. Posteriormente, muitos outros trabalhos reportaram a associação entre marcadores morfológicos e locos que controlam caracteres quantitativos (QTL – do inglês “quantitative trait loci”), mas esses se limitavam àquelas espécies onde existem marcadores morfológicos em quantidade suficiente para permitir uma razoável cobertura do genoma.

Na década de 80, com o surgimento das diversas classes de marcadores, baseados tanto em hibridizações com sondas marcadas como em reações da polimerase em cadeia (PCR), tornou-se possível a busca de regiões do genoma responsáveis por parte da variabilidade fenotípica em qualquer espécie de interesse (Tanksley, 1993). A disponibilidade de marcadores cobrindo todo o genoma permitiu a construção de mapas genéticos em diferentes espécies. O cálculo das frequências de recombinação e o ordenamento dos marcadores possibilitou a obtenção de estimativas mais acuradas da localização e do efeito dos QTLs em estratégias de mapeamento de QTLs por intervalo (Lander e

Botstein, 1989; Haley e Knott, 1992), em que a informação dos genótipos de ambos marcadores que flanqueiam um intervalo são tomadas simultaneamente para estimação precisa desses parâmetros. Nova evolução do ponto de vista estatístico ocorreu com a proposição do mapeamento por intervalo composto (Zeng, 1993; Jansen, 1993; Zeng 1994), em que marcadores sabidamente relacionados a QTLs são incluídos como variáveis independentes no modelo de regressão múltipla, diminuindo a variância residual e, com isso, aumentando o poder do teste.

O mapeamento genético em espécies florestais é mais complicado do que àquele realizado em espécies agrícolas anuais. As espécies florestais possuem longo ciclo de vida e sofrem alta depressão em cruzamentos endogâmicos, dificultando ou até impossibilitando a obtenção de linhagens homozigóticas e, portanto, o emprego de delineamentos clássicos de mapeamento, tais como populações F2, retrocruzamentos e linhagens recombinantes endogâmicas (RILs). Dessa maneira, as famílias disponíveis para mapeamento em espécies arbóreas são derivadas do cruzamento de parentais heterozigóticos. Com isso, pode-se ter na população de mapeamento até quatro alelos segregando para cada loco, tornando complicadas as análises de ligação por causa da existência de muitos tipos de razões de segregação entre pares de marcas (Maliepaard et al., 1997). Assim, os primeiros mapas genéticos de espécies florestais foram gerados no início dos anos 1980 para gimnospermas utilizando isoenzimas e o tecido megagametofítico, que é haplóide e, portanto, tem origem em apenas um parental. Porém, essa metodologia é inviável para angiospermas e o mapeamento genético só pode ser utilizado de forma geral em espécies florestais a partir da década de 90, quando Grattapaglia e Sederoff (1994) analisaram separadamente os marcadores RAPD que segregavam para os parentais materno e paterno de um cruzamento entre *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*. Essa metodologia, denominada pelos proponentes de pseudo-cruzamento teste (“pseudo-testcross”), foi utilizada em diversos outros mapeamentos envolvendo não só *Eucalyptus* como *Pinus*, *Populus* e outras espécies perenes. Hoje já existem programas capazes de realizar os cálculos de frequência de recombinação levando em

consideração a informação simultânea das meioses dos dois parentais heterozigóticos para produzir um mapa integrado (Stam, 1993; Butcher et al., 2002; Cruz e Schuster, 2004). Porém, a construção dos mapas separados pela estratégia de pseudo-cruzamento teste continua sendo a opção mais utilizada devido às dificuldades de análise de QTL por intervalo em mapas que integram as informações das meioses de ambos parentais. O programa GQMOL (Cruz e Schuster, 2004) possui algoritmos capazes de realizar análises de QTL por intervalo em mapa integrado através da estratégia de pares de irmãos de Fulker e Cardon (1994).

Após a publicação de Grattapaglia e Sederoff (1994), vários mapas, utilizando diferentes marcadores, foram construídos em *Eucalyptus*. Verhaegen & Plomion (1996) e Gan et al. (2003) construíram mapas genéticos com RAPD, Marques et al. (1998) e Myburg et al. (2003) com AFLP, Byrne et al. (1995) com uma combinação de isoenzimas, RAPD e RFLP e Thamarus et al. (2002) com uma combinação de RFLP, microssatélites e isoenzimas. De todos esses autores, somente Byrne et al. (1995) e Thamarus et al. (2002) optaram por construir mapas integrados para ambos parentais, os outros mapas foram construídos utilizando a estratégia de pseudo-cruzamento teste.

Posteriormente, nesses mapas genéticos, foram localizadas regiões do genoma responsáveis pelo controle de caracteres de interesse econômico. Grattapaglia et al. (1995) e Marques et al. (1999) mapearam QTLs para capacidade de enraizamento em diferentes espécies de *Eucalyptus*. Byrne et al. (1997a) e Byrne et al. (1997b) mapearam QTLs em uma população de mudas de *E. nitens*, no primeiro para área foliar e altura e no segundo para tolerância à geada. QTLs para caracteres silviculturais e de qualidade da madeira foram identificados por Grattapaglia et al. (1996), Verhaegen et al. (1997) e Thamarus et al. (2004). Kirst et al. (2005), utilizando o mapa genético construído por Myburg et al. (2003) e análises de expressão de 2608 genes na mesma população de mapeamento, identificaram QTLs que explicam parte da variabilidade nos níveis de transcrição de 1067 genes. Kirst et al. (2004), utilizando os dados desse mesmo trabalho, verificaram correlação entre níveis de transcrição de genes, em

sua maioria pertencentes à via de biossíntese de lignina, e diâmetro das árvores. Todos os trabalhos utilizaram metodologias de mapeamento de QTLs por intervalo (simples e/ou composto), com exceção de Byrne et al. (1997a; 1997b) e Thamarus (2004) que utilizaram análises de marca simples devido às dificuldades de localização de QTLs por intervalo em mapas integrados.

Apesar do sucesso desses experimentos em encontrar regiões do genoma responsáveis pela variação na característica sob estudo, o número de QTLs, suas posições precisas e particularmente a magnitude dos seus efeitos ainda são insuficientemente compreendidos. Isso se deve ao tamanho relativamente pequeno das progênes empregadas, a precisão limitada na avaliação do fenótipo, o número reduzido de “backgrounds” genéticos testados (i.e. número de cruzamentos) e as limitações inerentes aos tipos de marcadores moleculares e *pedigrees* utilizados (Grattapaglia, 2004). A maioria desses trabalhos utilizou marcadores dominantes (RAPD e AFLP) que não são facilmente transferíveis para outros cruzamentos. Com isso, o uso da informação de ligação tem ficado restrito à população utilizada para o mapeamento. Isto limita o compartilhamento inter-experimental de dados e a possibilidade de utilização dos marcadores ligados à QTLs em outros cruzamentos, processo fundamental para viabilização da seleção assistida por marcadores (Grattapaglia, 2000).

Os marcadores RFLP são uma alternativa para esses problemas, tendo em vista que são codominantes, multialélicos e transferíveis para outros cruzamentos. Porém, os RFLPs apresentam baixa eficiência na geração de dados, já que sua operacionalização não é fácil e requer mão-de-obra especializada (Ferreira e Grattapaglia, 1998). O desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Eucalyptus* (Brondani et al., 1998; Brondani et al., 2002; Grattapaglia et al., 2005) representa um passo muito importante para um maior detalhamento nos estudos de mapeamento de QTLs e validação desses em diferentes “backgrounds” genéticos. Os microssatélites são marcadores codominantes, multialélicos, altamente polimórficos, abundantes e bem distribuídos no genoma de eucariotos e apresentam a praticidade de poderem ser genotipados por PCR com iniciadores (“primers”) que anelam nas regiões flaqueadoras dessas seqüências simples

repetidas (Brondani et al., 1998). Essas seqüências flanqueadoras dos microssatélites são geralmente conservadas, permitindo que estes marcadores possam ser compartilhados por diferentes laboratórios, compensando os altos investimentos necessários para o seu desenvolvimento e possibilitando a avaliação do efeito do QTL em outros cruzamentos. Marques et al. (2002) verificaram que os microssatélites desenvolvidos para *E. grandis* e *E. urophylla* (Brondani et al., 1998 e Brondani et al., 2002) apresentam alta transferibilidade para outras espécies do subgênero *Symphyomyrthus*, inclusive encontrando sintenia entre QTLs mapeados em dois trabalhos independentes (Grattapaglia et al., 1995; Marques et al., 1999). A avaliação da sintenia entre QTLs em diferentes cruzamentos e condições ambientais é importante para que as informações de mapeamento possam ser utilizadas na prática do melhoramento florestal (Grattapaglia, 2004). A transferibilidade dos microssatélites em diferentes espécies de *Eucalyptus* facilitaria sua adoção em processos de seleção assistida, uma vez que a hibridação é um método utilizado no melhoramento desse gênero. Ainda com respeito aos microssatélites, cabe destacar que são mais freqüentemente encontrados em regiões não repetitivas dos genomas vegetais, principalmente as regiões 5' e 3' não traduzida (UTR) de genes, como demonstrado por Morgante et al. (2002). Isso pode facilitar a busca de genes que influenciam característica de interesse em diferentes espécies vegetais.

Com base no exposto, os objetivos desse capítulo foram: 1) construir um mapa genético utilizando exclusivamente marcadores microssatélites em um cruzamento de *E. grandis* x *E. urophylla*; 2) localizar neste mapa QTLs para diferentes caracteres silviculturais e principalmente de qualidade da madeira; 3) avaliar a detecção de QTLs por diferentes métodos de análise estatística.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

No mapeamento genético e análise de QTLs foi utilizada uma família de irmãos-completos com três anos de idade, constituída por 188 indivíduos derivados de um cruzamento entre *Eucalyptus grandis* (parental feminino) e *E. urophylla* (parental masculino). Esse cruzamento foi realizado na Votorantim Celulose e Papel (VCP). A extração do DNA genômico total desses 188 filhos mais os dois parentais foi feita com o Kit DNeasy 96 (Qiagen) a partir de suas amostras foliares, fornecidas pela VCP. A qualidade e concentração do DNA das diferentes amostras foi avaliada em gel de agarose 1% corado com 0,15 µL/mL de brometo de etídio.

2.2. Avaliação das características quantitativas

A mensuração na população segregante dos caracteres altura, diâmetro à altura do peito (DAP) e profundidade de penetração da haste metálica do Pilodyn foram conduzidas no campo, com as árvores aos três anos de idade, pela equipe de melhoramento da VCP, coordenada pelo Engenheiro Florestal César V. Bonine. Essas mensurações foram realizadas uma única vez (por uma só pessoa) nas árvores individualmente, já que essas estavam distribuídas no campo sem réplicas clonais e, portanto, sem um delineamento estatístico.

As análises físico-químicas da madeira dessas árvores foram realizadas pela equipe dos Professores José Lívio Gomide e Jorge Colodette no Laboratório de Celulose e Papel da Universidade Federal de Viçosa. Para isso, 50 árvores componentes dessa progênie foram cortadas e levadas ao Laboratório de Celulose e Papel na forma de toretes e baguetas previamente retiradas antes do corte. A partir dos toretes foram realizadas todas as análises físicas e de química da madeira para calibração do Espectrofotômetro de Infra-Vermelho Próximo (NIRS).

Os caracteres de química da madeira mensurados para a calibração do NIRS foram: teor de glicana, xilana, ácido metilglucurônico e ácido galactourônico por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), teor de lignina total extraído com ácido conforme Gomide e Demuner (1986), relação siringil/guaiacil aferida por cromatografia líquida após oxidação com nitrobenzeno e teor de extrativos solúveis em diclorometano. Os toretes também foram submetidos a uma simulação de cozimento pelo processo Kraft, permitindo calibrar o NIRS para a porcentagem de álcali efetivo utilizado no processo de polpação, o rendimento depurado de celulose e a viscosidade da polpa celulósica. Também foi medida a densidade básica da madeira dos toretes, conforme a norma ABTCP, para calibração do NIRS.

A partir dessas calibrações utilizando a madeira dos toretes de 50 árvores, o NIRS foi utilizado para predizer os diferentes parâmetros referentes à qualidade da madeira com base no espectro da serragem das baguetas. Para as 138 árvores restantes da população enviou-se ao laboratório apenas baguetas, a partir das quais todos os fenótipos foram preditos pelo NIRS. A correlação entre os caracteres dois a dois foi verificada através da Correlação de Pearson.

2.3. Amplificação e detecção dos locos microssatélites

Foram utilizados marcadores microssatélites previamente desenvolvidos por Brondani et al. (1998; 2002), por Lourenço et al. (2004) e no âmbito do projeto Genolyptus a partir da mineração de bibliotecas ESTs (Grattapaglia et al., 2005), todos identificados pelo acrônimo EMBRA, assim como microssatélites desenvolvidos pelo CSIRO (<http://www.ffp.csiro.au/tigr/molecular/eucmsps.html>),

identificados pelos acrônimos EG, EN e ES. A amplificação dos microssatélites foi realizada via PCR, em placas de 96 poços, num volume final de 6 µL contendo 3 ng de DNA genômico, 0,2 mM de dNTP, 1,5 µg de BSA, 0,6 µL de tampão de PCR 10x, 2,0 mM de MgCl₂, 0,1 µM de cada par de oligonucleotídeos (primer), sendo utilizados 3 pares (triplex) em cada reação, e 1 u de enzima Taq polimerase. Os ciclos de PCR foram conduzidos em Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) e incluíram uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos com os seguintes passos: 94 °C por 1 minuto para desnaturação das moléculas de DNA, 56 °C por 1 minuto para anelamento do primer e 72 °C por 1 minuto para extensão das novas cadeias de DNA; e, para finalizar, um último passo de extensão a 72 °C por 15 minutos.

Antes de iniciar as genotipagens em sistemas multiplex (mais de um loco de uma vez) com todos os 190 indivíduos, os locos foram submetidos a uma triagem utilizando os parentais e mais dois indivíduos da progênie. Os locos que apresentaram fragmentos distinguíveis e com polimorfismo entre os parentais foram selecionados para genotipagem. Como um dos iniciadores de cada par, que flanqueiam o loco SSR, teve seu terminal 5' marcado com um dos fluorocromos 6-FAM, NED ou HEX (Applied Biosystems), os fragmentos amplificados foram detectados semi-automaticamente no analisador de DNA ABI 3100 (Applied Biosystems).

Assim, para a detecção dos fragmentos amplificados, tomou-se 1 µL de cada PCR, adicionou-se 8 µL de formamida deionizada e 0,9 µL de padrão com fragmentos de tamanho conhecido marcados com fluorocromo ROX (Brondani e Grattapaglia, 2001) em uma placa de 96 poços. As placas foram mantidas a 94 °C por 3 minutos e, posteriormente, colocadas em contato com gelo para desnaturação dos fragmentos amplificados. Por fim, as placas foram levadas ao ABI 3100 para realização da eletroforese.

A genotipagem de cada indivíduo foi aferida utilizando-se o programa GeneMapper (Applied Biosystems) que identifica os alelos segregantes pela fluorescência e pela estimativa do seu tamanho em pares de bases (Figura 1). Os

genótipos dos indivíduos foram convertidos em códigos de acordo com o formato exigido pelos programas de construção de mapas genéticos.

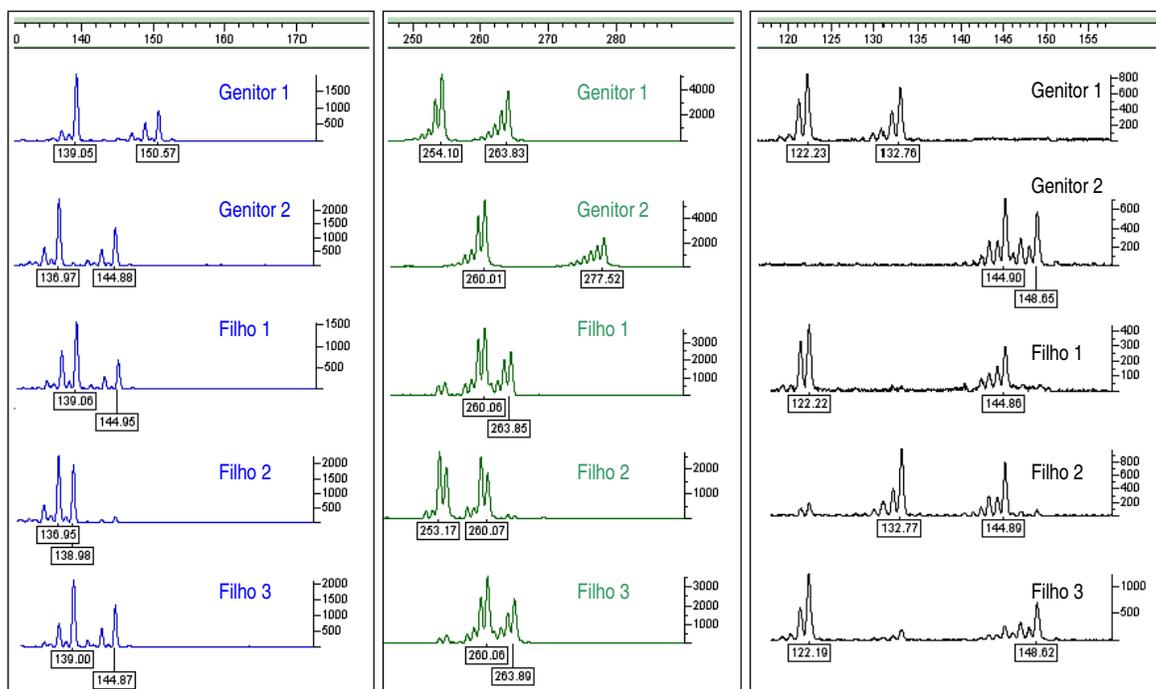


Figura 1. Visualização dos perfis eletroforéticos gerados pelo programa GeneMapper (Applied Biosystems) para genotipagem dos 2 genitores e 3 filhos com três diferentes microssatélites marcados com os fluorocromos 6-FAM, HEX e NED, respectivamente da esquerda para a direita.

2.4. Construção do mapa integrado e análise de QTLs por marca simples

Antes de proceder às análises de mapeamento, verificou-se a pressuposição de segregação mendeliana dos marcadores. A significância dos desvios entre o número de indivíduos observados e esperados em cada classe genotípica do marcador foi avaliada através de um teste de Qui-quadrado (χ^2) com um nível de significância de 5% para todo o experimento (“experiment wise”) utilizando a proteção de Bonferroni para múltiplos testes. Esses testes foram realizados pelo programa GQMOL (Cruz e Schuster, 2004). Os marcadores com

distorção das freqüências alélicas não foram incluídos nas análises de mapeamento.

Os locos foram mapeados integrando as informações das meioses de ambos parentais e analisando as segregações para cada parental separadamente segundo a estratégia de pseudo-testcross (Grattapaglia e Sederoff, 1994). O mapa integrado para ambos parentais foi construído utilizando o programa JoinMap (Van Ooijen e Voorrips, 2001). O JoinMap possui rotinas computacionais adequadas para a análise de ligação entre marcadores co-dominantes segregando em famílias de irmãos-completos derivadas de parentais heterozigóticos. Os parâmetros utilizados para declaração da ligação entre marcadores foram máxima freqüência de recombinação de 35% e mínimo valor de LOD (logaritmo da razão de verossimilhança) de 4,0. As distâncias entre marcadores foram calculadas através da função de mapeamento de Kosambi. O mapa foi construído com todos os marcadores de cada grupo de ligação, incluindo mesmo àqueles que não tiveram um suporte estatístico para o seu ordenamento (“jump threshold” maior do que 5,0). Isso foi feito para obter um posicionamento, mesmo que grosseiro, de todos os marcadores ligados a QTLs pela análise de marca simples nos 11 grupos de ligação do mapa referência de *Eucalyptus* (Brondani et al., 2002). Todos os mapas de ligação contidos nesse trabalho foram desenhados pelo programa MapChart (Voorrips, 2002).

Os marcadores foram testados individualmente quanto à ligação aos QTLs através de uma análise de variância onde os tratamentos foram os diferentes genótipos encontrados na população para cada marcador. Essa análise foi realizada no programa GQMOL (Cruz e Schuster, 2004). Para cada característica fenotípica marcadores significativamente ligados a QTLs, com um nível de significância de 1% pelo teste F, foram posicionados no mapa integrado.

2.5. Construção dos mapas genéticos pela estratégia de pseudo- cruzamento teste e análise de QTLs por intervalo composto

As tabelas de genotipagem dos microssatélites foram re-codificadas para análise da segregação de cada parental, separadamente, de acordo com a estratégia de pseudo-cruzamento teste (Grattapaglia e Sederoff, 1994). Assim, os locos foram separados em dois grupos: um com aqueles marcadores que segregaram no parental *E. urophylla* e outro com aqueles que segregaram no parental *E. grandis*. Os marcadores completamente informativos (segregação 1:1:1:1) foram incluídos nos dois grupos e os marcadores que segregaram como num delineamento F_2 (segregação 1:2:1) foram excluídos das análises devido à impossibilidade de identificação da origem parental dos alelos. Em cada grupo, os genótipos foram codificados com 0 e 1, identificando a presença e ausência de um determinado alelo (dominância) ou a presença de cada um dos dois alelos segregando no parental (co-dominância). Como não se dispõe da informação do genótipo dos avôs dessa família e, portanto, não se conhece a fase de ligação dos marcadores, cada loco foi duplicado invertendo-se os códigos dos seus genótipos (0 passou a ser 1 e vice-versa).

As freqüências alélicas de cada loco em cada parental foram testadas para verificar a pressuposição de segregação mendeliana. A significância dos desvios entre o número de indivíduos observados e esperados em cada uma das duas classe genotípica de cada marcador foi avaliada através de um teste de Qui-quadrado (X^2) com um nível de significância de 5% para o experimento todo (“experiment wise”) utilizando a proteção de Bonferroni para múltiplos testes. Esses testes foram conduzidos no programa GQMOL (Cruz e Schuster, 2004). Os marcadores com distorção das freqüências alélicas não foram incluídos nas análises de mapeamento.

Os dados genotípicos dos marcadores foram analisados no programa MapMaker (Lander et al., 1987) para o agrupamento, ordenação e mapeamento dos microssatélites. Como os dados genotípicos de cada marcador foram duplicados, obtiveram-se grupos de ligação idênticos, porém com fases de ligação

distintas para cada marca (grupos de ligação “espelho”). Assim, desconsiderou-se um dos grupos de ligação “espelho”, tomando somente uma das fases de cada marcador. Os critérios utilizados para declarar a ligação entre os marcadores foram máxima frequência de recombinação de 35% e mínimo valor de LOD igual a 4,0. Após o agrupamento dos marcadores, esses foram permutados dentro de cada grupo de ligação (comando “ripple”) para verificar a consistência do ordenamento. Quando a permuta gerou grupos de ligação com diferença de LOD menor do que 2, descartou-se o marcador envolvido na permuta que apresentava maior quantidade de genotipagens perdidas por falhas na reação de PCR.

Com base nos mapas do pseudo-testcross, efetuou-se o mapeamento de QTLs por intervalo composto (Zeng, 1994). Essas análises foram conduzidas utilizando o modelo de retrocruzamento do programa QTL Cartographer versão 2.5 para Windows (Wang et al., 2005). A escolha dos co-fatores, marcadores supostamente ligados a QTLs a serem incluídos como variáveis independentes no modelo de regressão múltipla, foi feita através de uma regressão stepwise (método “forward”) realizada pelo próprio QTL Cartographer. O número de co-fatores foi variável para cada característica, de acordo com a recomendação de Zeng (1994) de se testar múltiplos modelos para encontrar aquele que possui o melhor balanço entre os erros do tipo I e II. Para todas as características foram feitas análises com 0 (intervalo simples), 3, 5 e 8 co-fatores utilizando o modelo 6 do QTL Cartographer. Com isso, escolheu-se, para cada característica, o modelo cujo número de co-fatores proporcionou o maior número de QTLs com as maiores significâncias estatísticas (maior valor de LOD). O tamanho da janela de análise adotada foi de 10 cM e a resolução do mapeamento foi de 1 cM. Foi adotado um nível de significância de 5% para cada característica com base em um teste envolvendo 1000 permutações de acordo com o procedimento descrito por Churchill e Doerge (1994) implementado no QTL Cartographer.

2.6. Mapeamento de QTLs por intervalo em mapa integrado através da estratégia de pares de irmãos

Essa metodologia de análise de QTL ainda não foi conduzida em espécies do gênero *Eucalyptus*. A filosofia por trás dessa estratégia foi desenvolvida por Haseman e Elston (1972) e se baseia na regressão linear do quadrado da diferença fenotípica entre pares de irmãos com a proporção de alelos idênticos por descendência (IBD) que eles compartilham nos locos marcadores. O modelo desenvolvido por eles é:

$$Y_j = \beta_0 + \beta_1 \cdot \pi_j + \varepsilon_j, \text{ em que}$$

- $Y_j = (X_{1j} - X_{2j})^2$, sendo X_{1j} e X_{2j} os valores observados da característica para o primeiro e o segundo irmão do j-ésimo par;

- $\pi_j = \frac{1}{2} f_{j1} + f_{j2}$, sendo f_{j1} a probabilidade de que o j-ésimo par de irmão tenha 1 alelo IBD e f_{j2} a probabilidade de que o j-ésimo par de irmão tenha 2 alelos IBD.

Assim, quanto maior o número de alelos idênticos por descendência compartilhada entre dois indivíduos em um determinado loco, espera-se uma menor diferença fenotípica entre eles se esse loco estiver ligado a algum QTL. Haseman e Elston (1972) demonstraram que o coeficiente de regressão desse modelo é diretamente proporcional à variância genética aditiva (σ_A^2) do QTL e inversamente proporcional à frequência de recombinação entre o marcador analisado e o QTL (r):

$$\beta_1 = -2 \cdot (1 - 2 \cdot r)^2 \cdot \sigma_A^2$$

Fulker e Cardon (1994) desenvolveram uma metodologia de mapeamento de QTL por intervalo baseada na filosofia de análise de Haseman e Elston (1972). Nessa metodologia, as informações de mapeamento são empregadas

para que os IBDs dos marcadores que flanqueiam os diversos intervalos sejam utilizados para melhor estimativa da posição e do efeito dos QTLs.

Os dados genotípicos do presente trabalho foram analisados no programa GQMOL para o mapeamento de QTLs por intervalo pela estratégia de Fulker e Cardon (1994). Para isso, construiu-se um mapa integrado no GQMOL. Como o GQMOL não descarta os marcadores que não possuem um suporte para o ordenamento, foi adotado um critério mais restritivo nas análises dos dados genotípicos de cada microssatélite. Foram incluídos no mapa somente aqueles marcadores que possuem menos de 20 genótipos perdidos por falhas na PCR e não apresentam distorções de segregação com relação à primeira Lei de Mendel pelo teste de X^2 com nível de significância de 1% para cada teste. Também não foram incluídos no mapa aqueles marcadores que não tiveram um suporte estatístico para o seu ordenamento (“jump threshold” maior do que 5,0) no mapa integrado construído no JoinMap. Os microssatélites não excluídos foram mapeados de acordo com os seguintes parâmetros: máxima frequência de recombinação de 35% e mínimo valor de LOD de 4,0. As distâncias entre marcadores foram calculadas através da função de mapeamento de Kosambi.

Nesse mapa foram realizadas as buscas por QTLs através da estratégia de pares de irmãos (Fulker e Cardon, 1994) utilizando os dados fenotípicos das 4 características para as quais identificou-se o maior número de QTLs pela estratégia de pseudo-cruzamento teste. A estatística F foi utilizada para avaliar a existência de QTLs nos intervalos dentro dos grupos de ligação. O nível de significância adotado foi um valor de F com 1 grau de liberdade no numerador, infinito no denominador e nível de significância de 0,1% ($F_{1,\infty; 0,001} = 10,8$). Os QTLs identificados no mapa integrado pela estratégia de pares de irmãos e nos mapas do pseudo-cruzamento teste pela metodologia de intervalo composto foram comparados quanto ao número, suas posições e nível de significância.

3 - RESULTADOS

3.1. Análise dos locos individualmente e construção do mapa genético integrado

As ampliações de 426 locos microssatélites foram avaliadas através de reações de PCR com os DNAs dos dois parentais e mais dois filhos. Desses, 276 locos, que amplificaram alelos distintos e que segregaram na progênie, foram selecionados para serem genotipados nos 190 indivíduos componentes da população segregante (188 irmãos-completos e os dois parentais). Obteve-se sucesso na genotipagem com 226 pares de primers, sendo que para 9 desses genotipou-se dois locos (identificados com as letras *a* e *b* na frente do nome dos microssatélites), gerando um total de 235 locos microssatélites genotipados. Desses locos, 141 foram completamente informativos (segregação 1:1:1:1), 6 segregaram nos dois parentais com dois alelos como em uma população F_2 (segregação 1:2:1), 58 foram informativos apenas no parental masculino (segregação 1:1 no *E. urophylla*) e 30 foram informativos apenas no parental feminino (segregação 1:1 no *E. grandis*).

Nove locos apresentaram distorção das proporções genotípicas esperadas de acordo com a Primeira Lei de Mendel ($\alpha = 0,05$ com proteção de Bonferroni). Esses 9 locos foram EG091, Embra001, Embra094, Embra113, Embra188, Embra221, Embra286, Embra292 e EN010. Para construção do mapa genético integrando as informações das meioses de ambos parentais, através do programa

JoinMap, foram utilizados os 226 locos que não apresentaram distorções de segregação. Desses, 225 locos foram mapeados em 12 grupos de ligação, cujos comprimentos variaram de 17,8 a 119,6 cM (Figura 2). O marcador Embra125 apresentou ligação gênica somente com o loco EG061, do grupo de ligação 3, ficando de fora do mapa integrado porque o programa JoinMap exige um mínimo de duas ligações para que o marcador seja incluído em um determinado grupo de ligação. O comprimento total do mapa foi de 950,8 cM, com um intervalo médio de 4,2 cM entre marcadores. A maior distância entre dois marcadores (“gap”) foi de 30,7 cM e ocorreu entre o Embra046 e o Embra347 em uma das extremidades do grupo de ligação 7. A ocorrência de 1 grupo de ligação a mais em relação ao número haplóide de cromossomos das espécies *E. grandis* e *E. urophylla* ocorreu porque o JoinMap, devido à exigência de um mínimo de duas ligações para os marcadores de um grupo de ligação, não pode unir todos os locos microssatélites componentes do grupo de ligação 3 do mapa referência de *Eucalyptus* (Brondani et al., 2002).

Dezesseis microssatélites mapeados foram encontrados dentro de genes a partir de bibliotecas ESTs no projeto Genolyptus. Esses microssatélites, seu grupo de ligação no mapa integrado e o gene de maior similaridade com seu EST estão listados na Tabela 1. Para encontrar os genes de maior similaridade com esses ESTs foi utilizado o algoritmo BLAST do banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI).

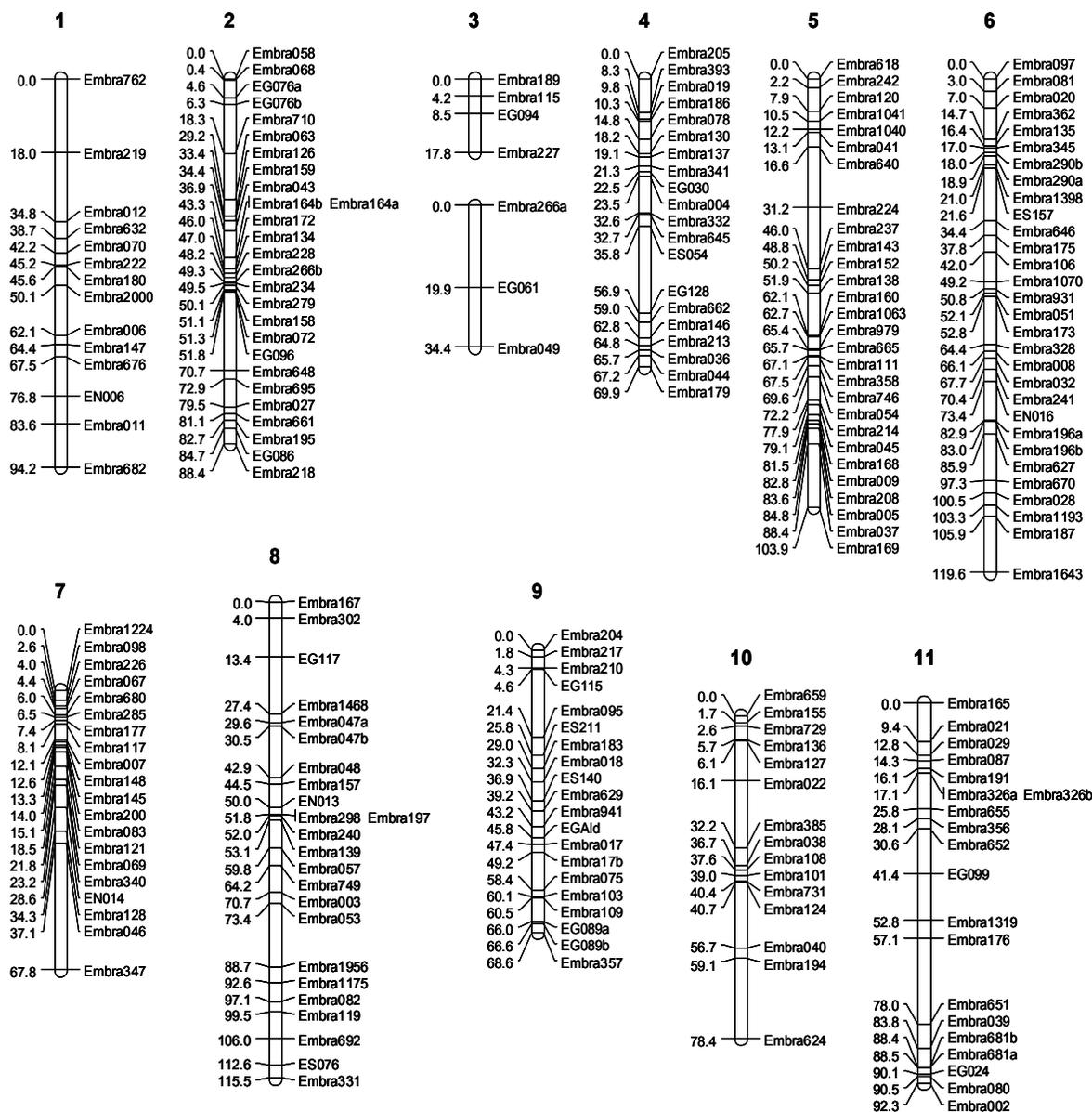


Figura 2. Mapa genético construído no JoinMap constituído por 225 marcadores microssatélites genotipados em uma família de 188 irmãos-completos de *E. grandis* x *E. urophylla*. Os grupos de ligação estão numerados de acordo com o mapa genético referência para o gênero *Eucalyptus* (Brondani et al., 2002).

Tabela 1. Locos microssatélites encontrados em ESTs, com os respectivos grupos de ligação onde foram mapeados e gene de maior similaridade com seu EST.

Loco	GL	Gene com maior similaridade pelo BLAST
EMBRA0931	6	signal peptidase subunit -related [Arabidopsis thaliana]
EMBRA0941	9	Skp1 [Medicago sativa]
EMBRA0979	5	cytochrome b561-related [Arabidopsis thaliana]
EMBRA1040	5	extensin like protein - [Populus nigra]
EMBRA1041	5	extensin like protein - [Populus nigra]
EMBRA1063	5	GTP-binding protein, ras-related - [Nicotiana tabacum]
EMBRA1070	6	putative Pi starvation-induced protein [Cicer arietinum]
EMBRA1175	8	fiber protein Fb2 [Gossypium barbadense]
EMBRA1193	6	DnaJ-like protein [Phaseolus vulgaris]
EMBRA1224	7	chlorophyll a/b-binding protein CP24 precursor [Vigna radiata]
EMBRA1319	11	KH domain/zinc finger protein [Arabidopsis thaliana]
EMBRA1398	6	NOI protein, nitrate-induced [Arabidopsis thaliana]
EMBRA1468	8	acetyl-CoA C-acetyltransferase [Arabidopsis thaliana]
EMBRA1643	6	tuber-specific and sucrose-responsive element binding factor [Solanum tuberosum]
EMBRA1956	8	myb family transcription factor [Arabidopsis thaliana]
EMBRA2000	1	auxin-induced protein family [Arabidopsis thaliana]

3.2. Análise dos locos que segregaram em cada parental e construção dos mapas genéticos pela estratégia de pseudo-cruzamento teste

Para construção do mapa de cada parental pela estratégia de pseudo-cruzamento teste os locos foram separados em dois grupos. O primeiro grupo contém 199 marcadores que segregaram no parental *E. urophylla* e o segundo grupo contém 171 marcadores que segregaram no parental *E. grandis*, sendo que 141 microssatélites são comuns a ambos grupos porque foram completamente informativos nesse cruzamento.

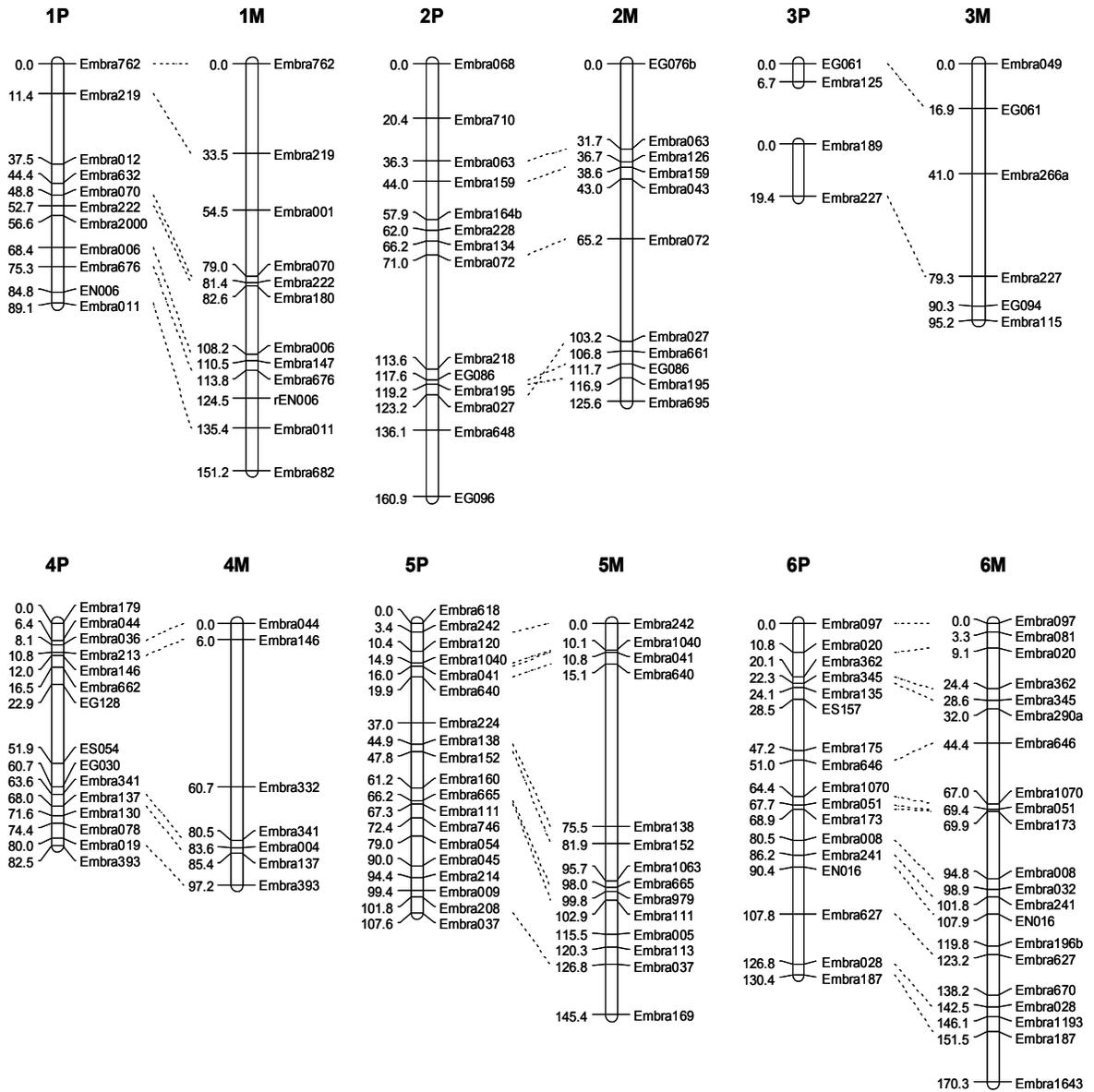
Dos 199 locos que segregaram no *E. urophylla*, sete apresentaram distorções das proporções genótípicas esperadas de acordo com a Primeira Lei de Mendel pelo teste de X^2 ($\alpha = 0,05$ com proteção de Bonferroni). Esses locos (EG091, Embra001, Embra113, Embra115, Embra286, Embra292 e EN010) foram descartados das análises de mapeamento genético do parental masculino.

Dos 171 locos que segregaram no *E. grandis*, apenas 1 loco (EG091) apresentou distorções de segregação pelo teste de X^2 ($\alpha = 0,05$ com proteção de

Bonferroni). Este loco também foi excluído das análises de mapeamento genético do parental feminino.

Como alguns marcadores foram descartados dos grupos de ligação para garantir o suporte estatístico para o seu ordenamento, o mapa genético do parental *E. urophylla* construído no programa MapMaker contém 140 locos microssatélites. Esse mapa genético é constituído por 12 grupos de ligação, sendo que, assim como ocorreu com o mapa integrado, o grupo de ligação 3 do mapa referência (Brondani et al., 2002) foi dividido em dois grupos de ligações. O comprimento total do mapa foi de 1115,9 cM, com uma densidade média de um marcador a cada 8,0 cM (Figura 3). A maior distância entre dois marcadores neste mapa é de 42,57 cM.

Dos 170 locos que não apresentaram distorção de segregação no parental *E. grandis*, 133 foram incluídos no seu mapa genético suporte. Esse mapa é constituído por 11 grupos de ligação (mesmo número haplóide de cromossomos das espécies), possui um comprimento total de 1311,7 cM e uma densidade média de um marcador a cada 9,9 cM (Figura 3). A maior distância entre dois microssatélites nesse mapa é de 60,4 cM.



Continua...

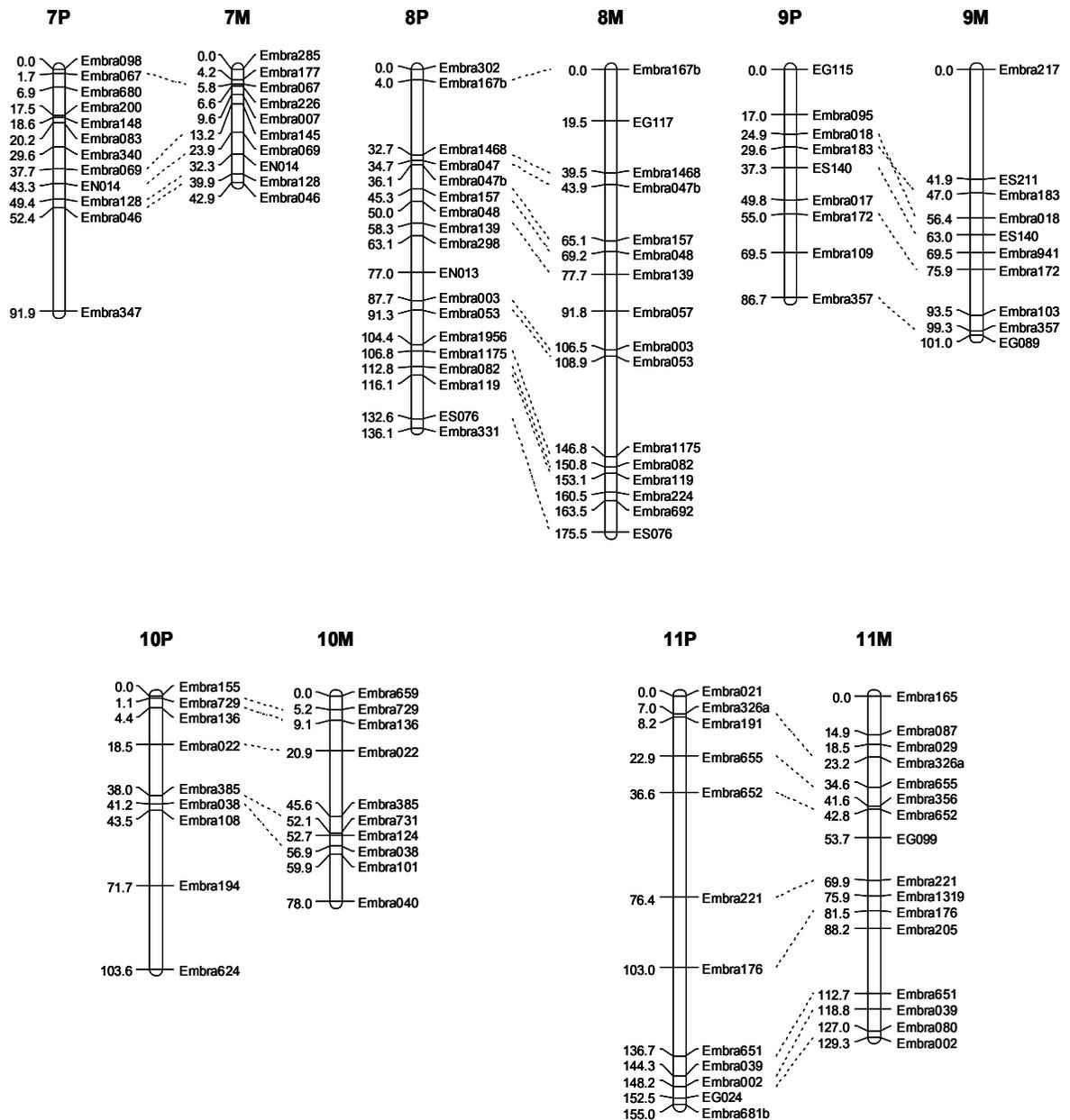


Figura 3. Mapas genéticos dos parentais masculino (grupos de ligação identificados pela letra P) e feminino (grupos de ligação identificados pela letra M) construídos com base em uma família de 188 irmãos-completos de *E. grandis* x *E. urophylla* através da estratégia de pseudo-cruzamento teste. As linhas pontilhadas ligam microssatélites completamente informativos mapeados em ambos parentais. Os grupos de ligação estão numerados de acordo com o mapa genético referência para o gênero *Eucalyptus* (Brondani et al., 2002).

3.3. Estatísticas descritivas e análise da correlação entre os caracteres

Na Tabela 2 encontram-se as estatísticas descritivas referente aos 14 caracteres analisados nos 188 irmãos-completos da família. As estatísticas descritivas demonstradas na Tabela 2 são: valores máximo e mínimo, variância, desvio padrão, média e coeficiente de variação.

Tabela 2. Valores máximo e mínimo, variância, desvio padrão, média e coeficiente de variação para as 14 características fenotipadas nos 188 irmãos-completos.

	Máximo	Mínimo	Variância	Desvio Padrão	Média	Coef. variação
DAP (cm)	22.5	10.63	3.6474	1.9098	15.2798	12.4989
Altura (m)	24.3	17	1.5854	1.2591	20.6191	6.1066
Pilodyn (mm)	21	12	3.0162	1.7367	16.8457	10.3095
Dens. Bas. (Kg/m ³)	413.0336	385.9023	56.9824	7.5487	403.3977	1.8713
Glicana (%)	49.9546	48.4347	0.1547	0.3933	49.0123	0.8024
Xilana (%)	13.2456	10.8461	0.1222	0.3496	12.0656	2.8976
Ac. MeGU (%)	3.8122	3.1960	0.0163	0.1277	3.5660	3.5823
Ác GaU (%)	0.6412	0.5290	0.0003	0.0184	0.5765	3.1964
Lignina (%)	29.2941	22.3237	0.9758	0.9878	26.3492	3.7491
Rel. S/G	3.6052	2.6228	0.0498	0.2232	3.0795	7.2495
Alcali Ef. (%)	16.2831	10.4871	1.0885	1.0433	13.1597	7.9282
Rend. Dep. (%)	55.3082	45.7632	1.4948	1.2226	52.0169	2.3504
Viscos. (cP)	91.5095	33.9213	90.9156	9.5350	61.6816	15.4584
Extrativos (%)	0.4974	-0.1503	0.0201	0.1418	0.1113	127.4141

As análises de correlação de Pearson revelaram caracteres com alta relação linear. Como já era esperado, a altura e o diâmetro das árvores são positivamente correlacionados ($r_{xy}=0,72$). Outra correlação positiva também esperada ocorreu entre o teor de lignina e a porcentagem de álcali utilizado no processo de polpação ($r_{xy}=0,67$). O álcali efetivo também foi negativamente correlacionado com a viscosidade da polpa celulósica ($r_{xy}= - 0,67$) e com a relação siringil/guaiacil ($r_{xy}= - 0,55$). Essas correlações também são bastante plausíveis tendo em vista o processo de cozimento da madeira para extração da celulose. Por outro lado, uma correlação esperada e que não ocorreu nesse trabalho foi entre a profundidade de penetração da haste do Pilodyn e a densidade básica da madeira ($r_{xy}=0,02$).

Os teores de glicana, de xilana e de ácido galactourônico foram positiva e altamente correlacionados entre si. Essas correlações podem ser explicadas pelo fato de a UDP-D-xilose (precursor da xilana) e o UDP-D-ácido galactourônico serem sintetizados a partir da UDP-D-glicose, precursor da glicana (Sjöström, 1993). Esses carboidratos foram negativamente correlacionados com a densidade básica da madeira e positivamente correlacionados com o rendimento depurado de celulose, o que já era esperado tendo em vista que os constituintes mais abundantes na polpa de eudicotiledôneas são a celulose (glicanas) e as xilanas. O ácido metilglucurônico, por sua vez, apesar de também ser sintetizado a partir da UDP-D-glicose, não obteve correlações altas com esses açúcares. Por outro lado, o ácido metilglucurônico foi alta e negativamente correlacionado com o teor de lignina total da madeira ($r_{xy} = -0,80$).

Correlações altas também ocorreram entre teor de lignina e relação siringil/guaiacil ($r_{xy} = -0,75$), entre teor de extrativos e densidade básica da madeira ($r_{xy} = -0,71$) e entre teor de extrativos e teor de glicana da madeira ($r_{xy} = 0,67$). As correlações entre todas as 14 características fenotípicas analisadas neste trabalho estão demonstradas na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de correlação de Pearson entre as 14 características fenotípicas mensuradas nos 188 irmãos completos de *E. grandis* x *E. urophylla*.

	DAP	Altura	Pilodyn	Dens Bas	Glicana	Xilana	Ác MeGU	Ác GaU	Lignina	S/G	Alcali Ef	Rend Dep	Viscos	Extrat
DAP	X	0.72 **	0.04 ns	0.03 ns	0.03 ns	0.24 **	0.25 **	0.19 **	-0.14 ns	0.26 **	-0.11 ns	0.22 **	-0.10 ns	-0.15 *
Altura		X	-0.01 ns	-0.06 ns	0.10 ns	0.26 **	0.17 *	0.20 **	-0.01 ns	0.07 ns	0.03 ns	0.26 **	-0.15 *	-0.02 ns
Pilodyn			X	0.02 ns	-0.04 ns	-0.11 ns	-0.12 ns	-0.10 ns	0.07 ns	-0.09 ns	-0.11 ns	-0.04 ns	0.19 **	-0.03 ns
Dens Bas				X	-0.97 **	-0.61 **	0.43 **	-0.79 **	-0.33 **	0.16 *	-0.46 **	-0.52 **	-0.08 ns	-0.71 **
Glicana					X	0.72 **	-0.25 **	0.87 **	0.24 **	-0.05 ns	0.40 **	0.62 **	0.06 ns	0.67 **
Xilana						X	0.35 **	0.95 **	-0.28 **	0.37 **	-0.13 ns	0.93 **	0.27 **	0.28 **
Ác. MeGU							X	0.15 *	-0.80 **	0.61 **	-0.52 **	0.27 **	0.06 ns	-0.38 **
Ác. GaU								X	-0.13 ns	0.28 **	0.07 ns	0.83 **	0.15 *	0.47 **
Lignina									X	-0.75 **	0.67 **	-0.17 *	-0.30 **	0.28 **
Rel S/G										X	-0.55 **	0.30 **	0.23 **	-0.31 **
Alcali Ef.											X	-0.26 **	-0.67 **	0.51 **
Rend Dep												X	0.43 **	0.15 *
Viscos.													X	-0.02 ns
Extrativos														X

*Correlações significativas ao nível de 5%; **Correlações significativas ao nível de 1%; Cédulas marcadas em cinza contém correlações com valor em módulo acima de 0,65.

3.4. Análise de QTLs

Os marcadores foram testados quanto à ligação a QTLs através de uma análise de variância, onde os tratamentos foram os diferentes genótipos dos marcadores, com um nível de significância de 1% pelo teste F. Marcadores significativamente ligados a QTLs para cada uma das 14 características fenotípicas disponíveis foram identificados nos diferentes grupos de ligação do mapa integrado. Em anexo (Anexo 1) segue a saída dos dados da análise de variância do programa GQMOL para os marcadores significativos de cada característica.

Também foram localizados QTLs nos diferentes grupos de ligação de cada parental através do mapeamento por intervalo composto. A localização dos QTLs foi demonstrada por meio de gráficos contendo na ordenada o valor de LOD e na abscissa os intervalos, em cM, entre os marcadores contidos no grupo de ligação. Os QTLs foram mapeados com um nível de significância de 5%, definido através de um teste com 1000 permutações dos dados fenotípicos.

Nos próximos itens serão descritos os QTLs identificados por essas duas estratégias de análise em cada uma das 14 características avaliadas na família de irmãos-completos de *E. grandis* x *E. urophylla*.

3.4.1. Análise de QTLs para diâmetro das árvores à altura do peito

A característica diâmetro à altura do peito (DAP) é correlacionada com o crescimento volumétrico das árvores. Quanto maior o diâmetro das árvores, maior tende a ser o seu volume de madeira. Na população segregante do presente trabalho, as árvores tiveram um DAP médio de 15,28 cm, com desvio padrão de 1,91 cm.

Para essa característica foram identificados 27 marcadores ligados a QTLs pelo teste F com um nível individual de 1%. No Anexo 1 estão os resultados da

análise de variância desses marcadores, que foram localizados nos grupos de ligação 2, 4, 6, 8 e 11 (Figura 4).

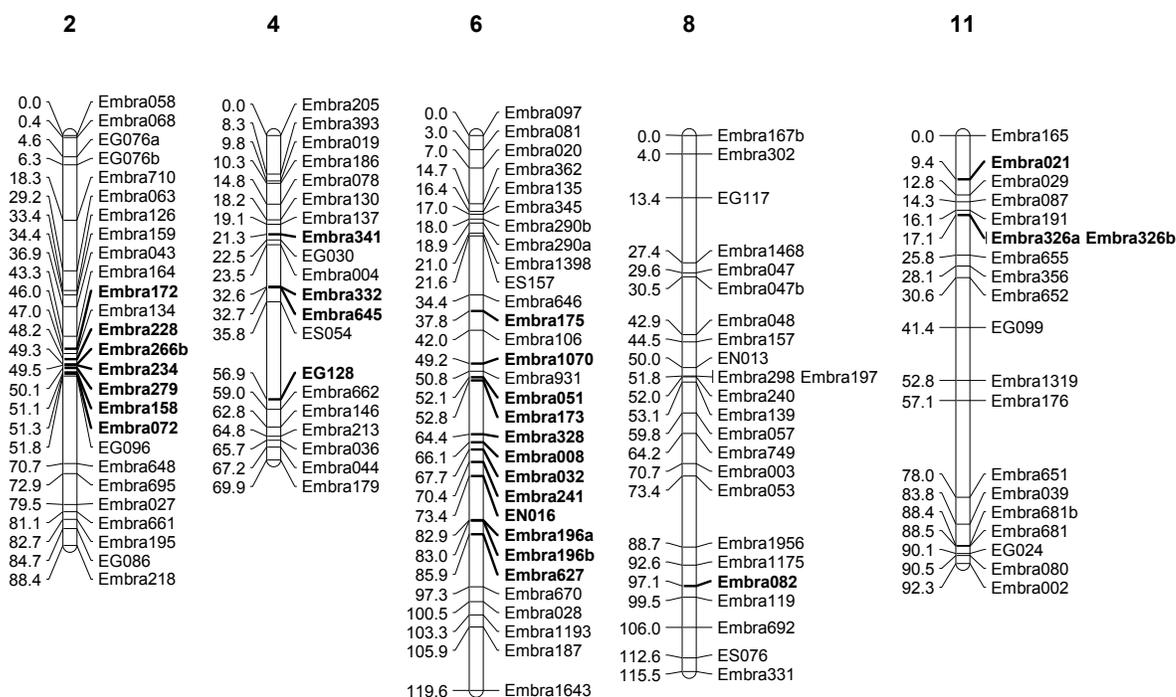


Figura 4. Localização dos marcadores (sublinhados e em negrito) ligados a QTLs para DAP no mapa integrado construído pelo programa JoinMap (item 3.1.). A análise da ligação foi realizada através de uma ANOVA com 1% de significância pelo teste F.

Através do mapeamento por intervalo composto foram detectados três QTLs, um no genoma do parental *E. grandis* e dois no genoma do parental *E. urophylla*. O QTL identificado no *E. grandis* localiza-se no grupo de ligação (g.l.) 6 (Figura 5) e explica 8,3% da variação no DAP. Os 2 QTLs identificados no genoma do *E. urophylla* foram localizados nos grupos de ligação 6 e 11 (Figura 6). O QTL do g.l. 6 explica 9,1% da variação no DAP encontrada na população e o QTL do g.l. 11 explica 6,7%.

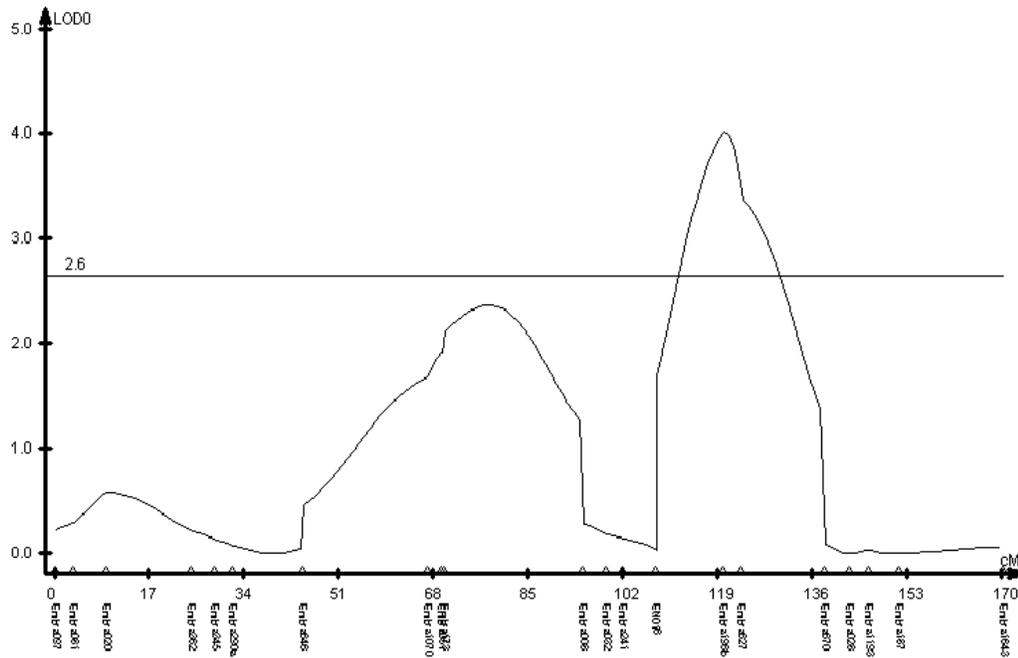


Figura 5. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para DAP mapeado por intervalo composto no grupo de ligação 6 do genoma do *E. grandis*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,6.

3.4.2. Análise de QTLs para altura das árvores

A característica altura também tem correlação com o crescimento volumétrico das árvores. Quanto maior a altura das árvores, maior tende a ser o seu volume de madeira. Na população segregante do presente trabalho, as árvores tiveram altura média de 20,62 m, com desvio padrão de 1,26 m.

Para essa característica foram identificados 25 marcadores ligados a QTLs pelo teste F com um nível individual de 1%. No Anexo 1 estão os resultados da análise de variância desses marcadores, que foram localizados nos grupos de ligação 2, 4, 6, 8 e 11 (Figura 7).

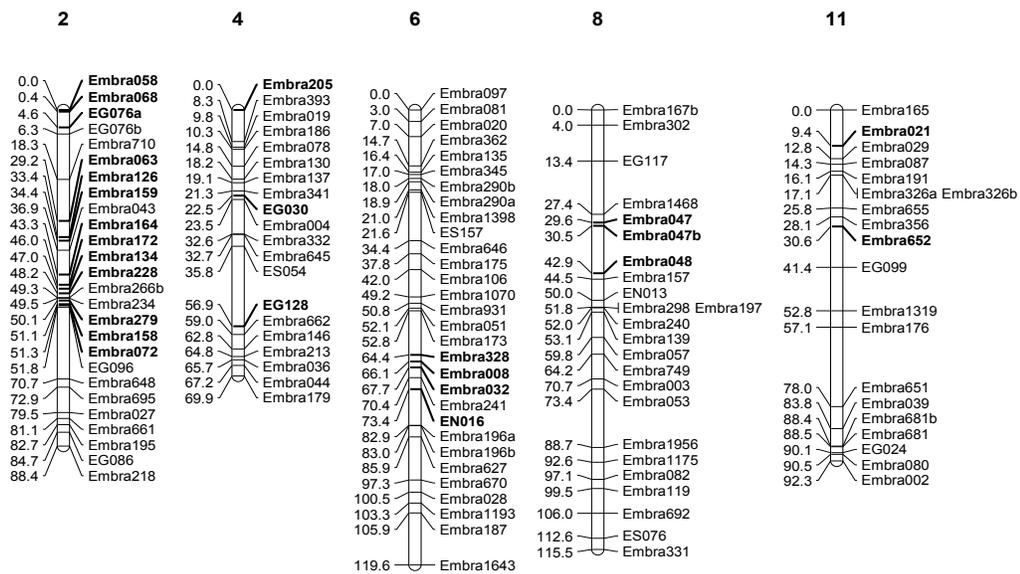


Figura 7. Localização dos marcadores (sublinhados e em negrito) ligados a QTLs para altura das árvores no mapa integrado construído pelo programa JoinMap (item 3.1.). A análise da ligação foi realizada através de uma ANOVA com 1% de significância pelo teste F.

Através do mapeamento por intervalo composto foram detectados dois QTLs, ambos no genoma do parental *E. urophylla*. Esses QTLs localizaram-se nos grupos de ligação 2 e 11 (Figura 8). O QTL do g.l. 2 explica 7,0% da variação fenotípica encontrada na população, enquanto o QTL do g.l. 11 explica 7,9%.

3.4.3. Análise de QTLs para profundidade de penetração do Pilodyn

Essa característica fenotípica foi obtida pela medida da penetração na madeira de um elemento metálico do equipamento Pilodyn. A penetração da haste desse instrumento é utilizada como uma medida indireta da densidade básica da madeira. Quanto maior a penetração dessa haste na madeira, menor tende a ser sua densidade. Na população segregante do presente trabalho, a profundidade média de penetração do Pilodyn foi de 16,85 mm, com desvio padrão de 1,74 mm.

Para essa característica foram identificados 27 marcadores ligados a QTLs pelo teste F com um nível individual de 1%. No Anexo 1 estão os resultados da análise de variância desses marcadores, que foram localizados nos grupos de ligação 2, 6, 8, 9 e 10 (Figura 9).

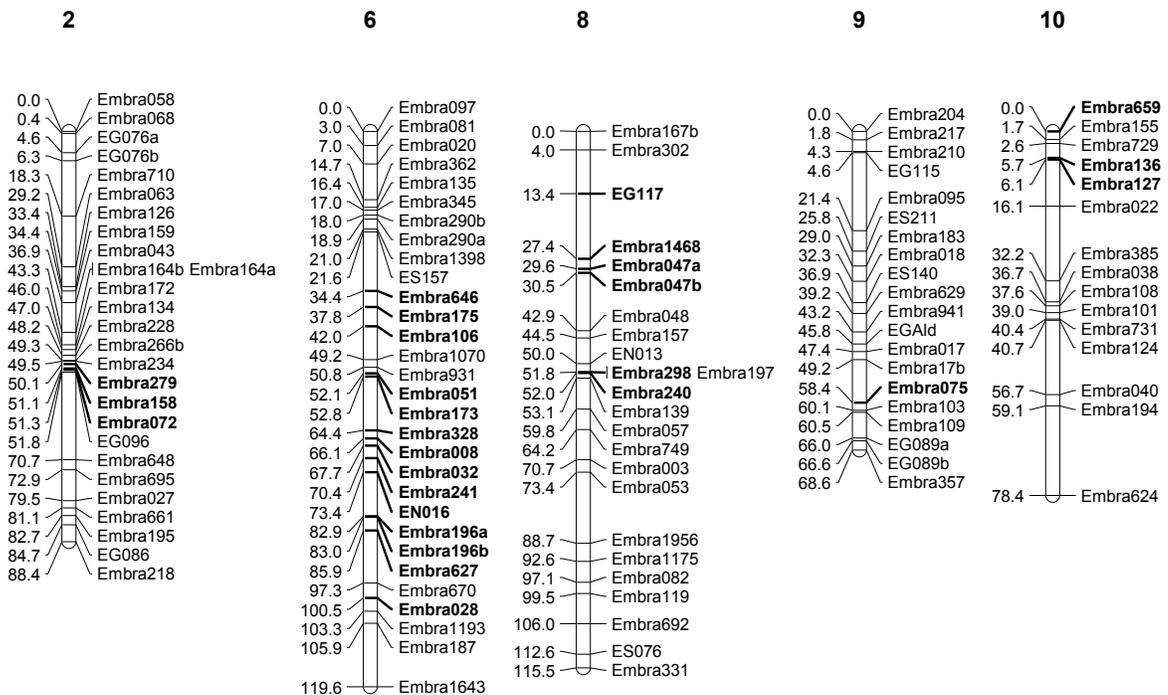


Figura 9. Localização dos marcadores (sublinhados e em negrito) ligados a QTLs para profundidade de penetração da haste do Pilodyn no mapa integrado construído pelo programa JoinMap (item 3.1.). A análise da ligação foi realizada através de uma ANOVA com 1% de significância pelo teste F.

Através do mapeamento por intervalo composto foram detectados cinco QTLs, dois no genoma do parental *E. grandis* e três no genoma do parental *E. urophylla*. Os QTLs localizaram-se nos grupos de ligação 8 e 10 do *E. grandis* (Figura 10) e grupos de ligação 6 e 9 do *E. urophylla*, sendo que no g.l. 9 foram identificados 2 QTLs (Figura 11). O QTL do g.l. 8 do *E. grandis* explica 7,7% da variação fenotípica encontrada na população, enquanto o do g.l. 10 explica 7,0%. O QTL mapeado no g.l. 6 do *E. urophylla* explica 15,4% da variação fenotípica. Já os QTLs mapeados no g.l. 9 do *E. urophylla* explicam 6,4% e 8,0% da variabilidade fenotípica da população.

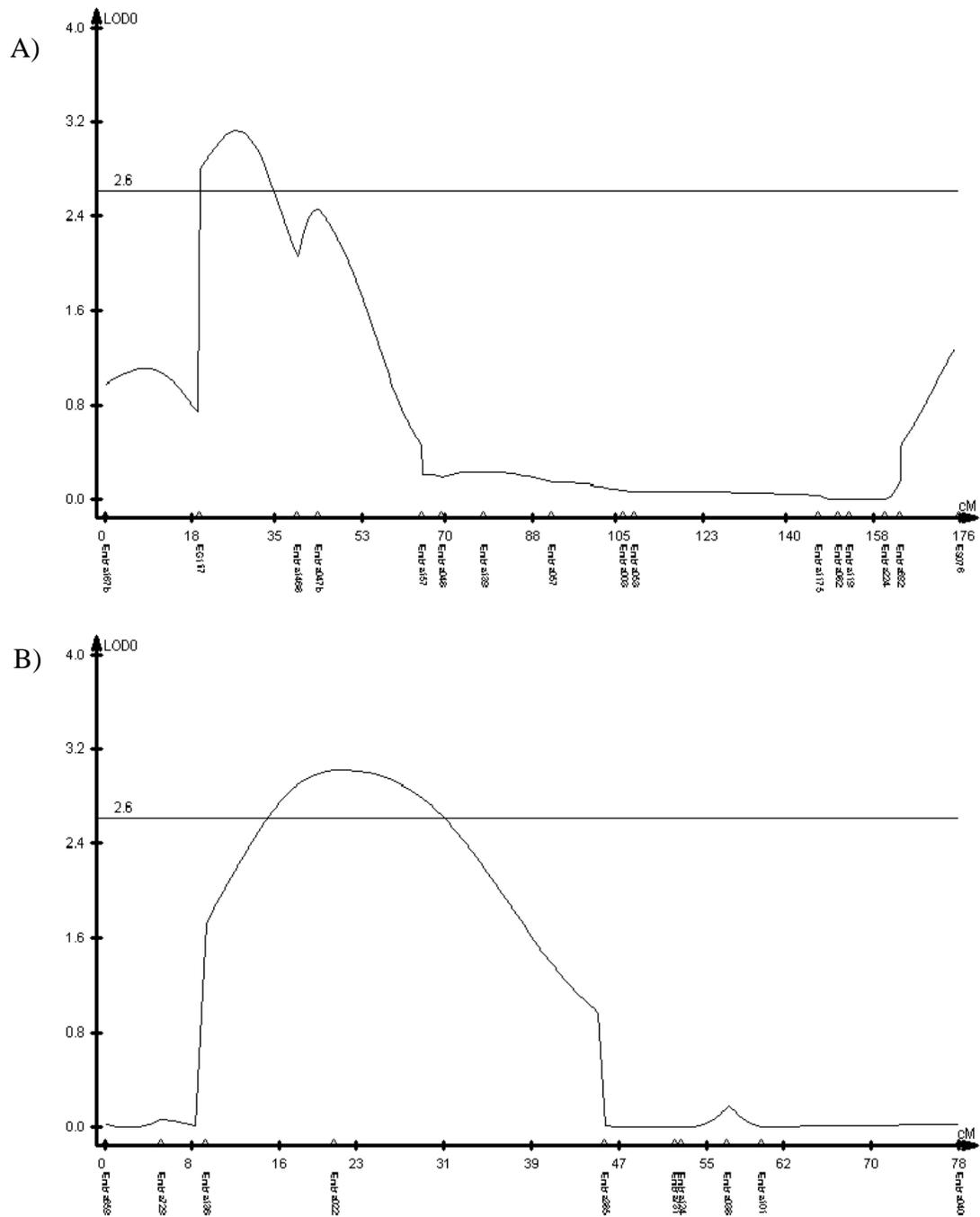


Figura 10. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando os QTLs para penetração do Pilodyn mapeados por intervalo composto nos grupos de ligação 8 (A) e 10 (B) do genoma do *E. grandis*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,6.

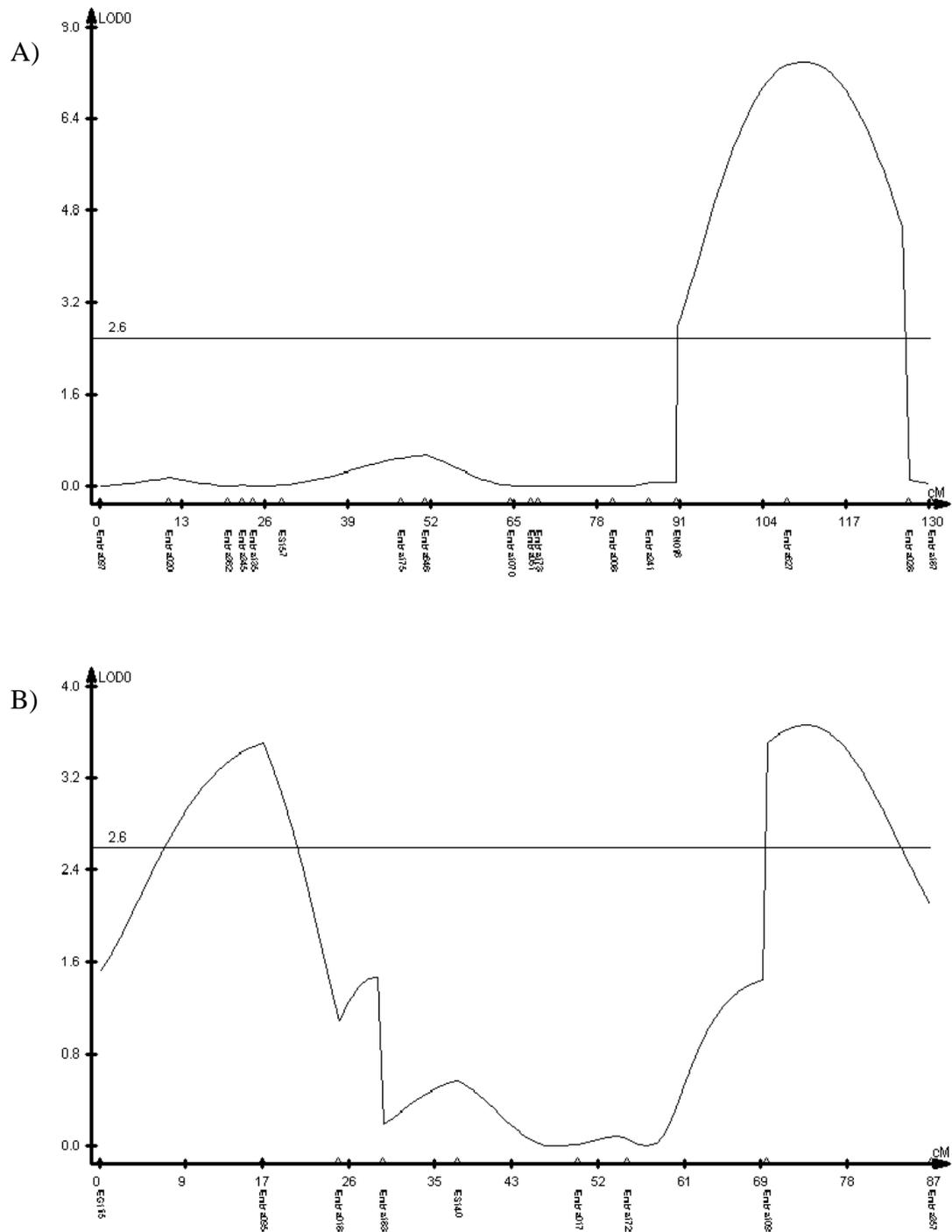


Figura 11. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando os QTLs para penetração do Pilodyn mapeados por intervalo composto nos grupos de ligação 6 (A) e 9 (B) do genoma do *E. urophylla*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,6.

3.4.4. Análise de QTLs para densidade básica da madeira

A densidade básica da madeira é uma medida interessante porque quanto maior a densidade menor é a porosidade da madeira e, portanto, maior tende a ser o seu conteúdo de celulose por unidade de volume. Porém, a lignina também contribui para a densidade da madeira e, portanto, nem sempre uma madeira mais densa reflete uma matéria-prima de qualidade superior para a indústria de celulose. A densidade básica da madeira foi mensurada nesse trabalho de maneira indireta pelo NIRS. A densidade básica média foi de 403,40 kg/m³, com desvio padrão de 7,55 kg/m³.

Para essa característica foram identificados cinco marcadores ligados a QTLs pelo teste F com um nível individual de 1%. No Anexo 1 estão os resultados da análise de variância desses marcadores, que foram localizados nos grupos de ligação 1, 6 e 8 (Figura 12). O marcador Embra125 não mapeado, mas que agrupou junto com os marcadores do g.l.3, também está ligado a QTL.

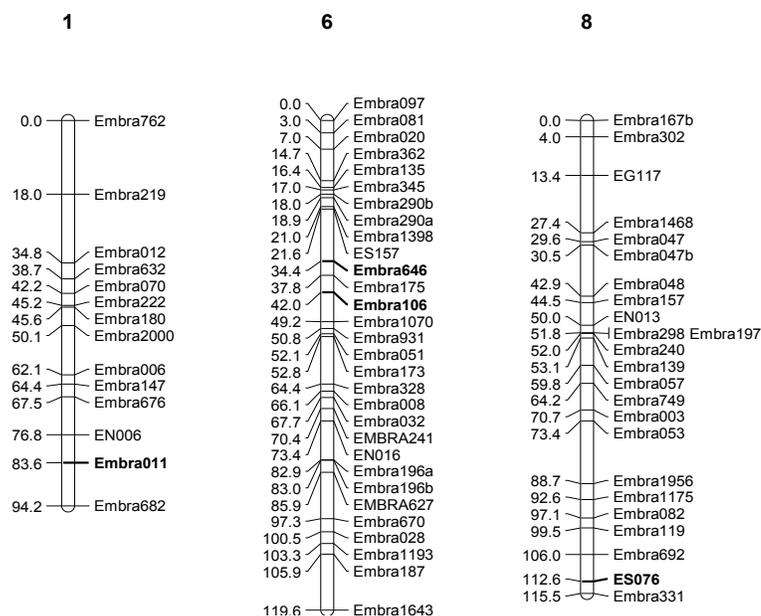


Figura 12. Localização dos marcadores (sublinhados e em negrito) ligados a QTLs para densidade básica da madeira no mapa integrado construído pelo programa JoinMap (item 3.1.). A análise da ligação foi realizada através de uma ANOVA com 1% de significância pelo teste F.

Através do mapeamento por intervalo composto foram detectados três QTLs, dois no genoma do parental *E. grandis* e um no genoma do parental *E. urophylla*. Os QTLs localizaram-se no grupo de ligação 3 do *E. urophylla* (Figura 13) e nos grupos de ligação 6 e 8 do *E. grandis* (Figura 14). Os QTLs encontrados nos g.l. 6 e 8 do *E. grandis* explicam, respectivamente, 7,1% e 5,8% da variação na densidade básica da madeira na população. O QTL encontrado no g.l. 3 do *E. urophylla* explica 6,6% da variabilidade fenotípica.

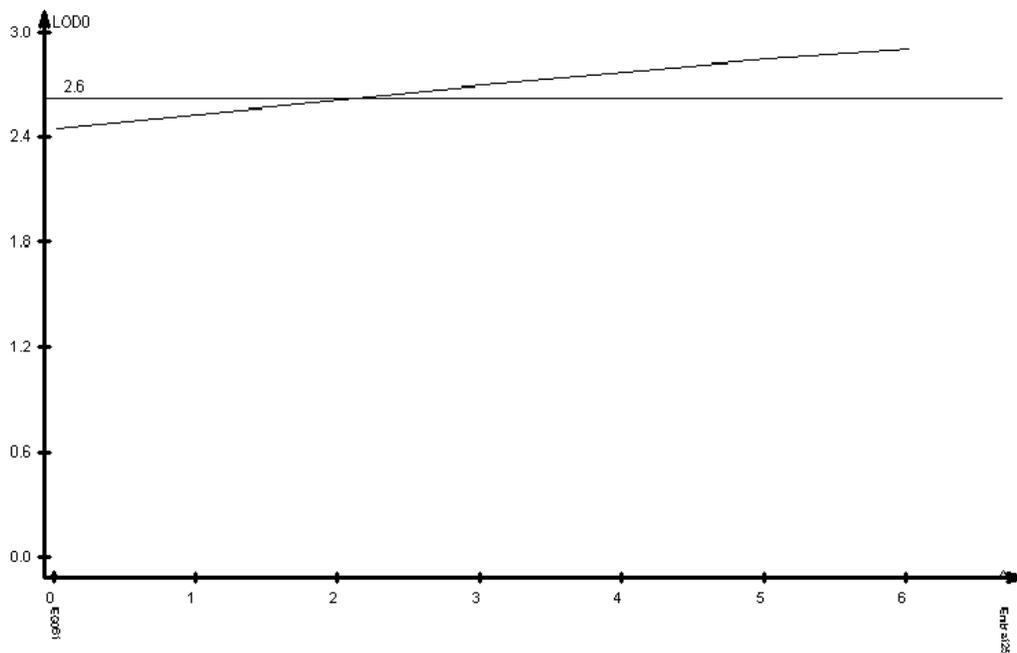


Figura 13. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para densidade básica da madeira mapeado por intervalo composto no grupo de ligação 3 do genoma do *E. urophylla*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,6.

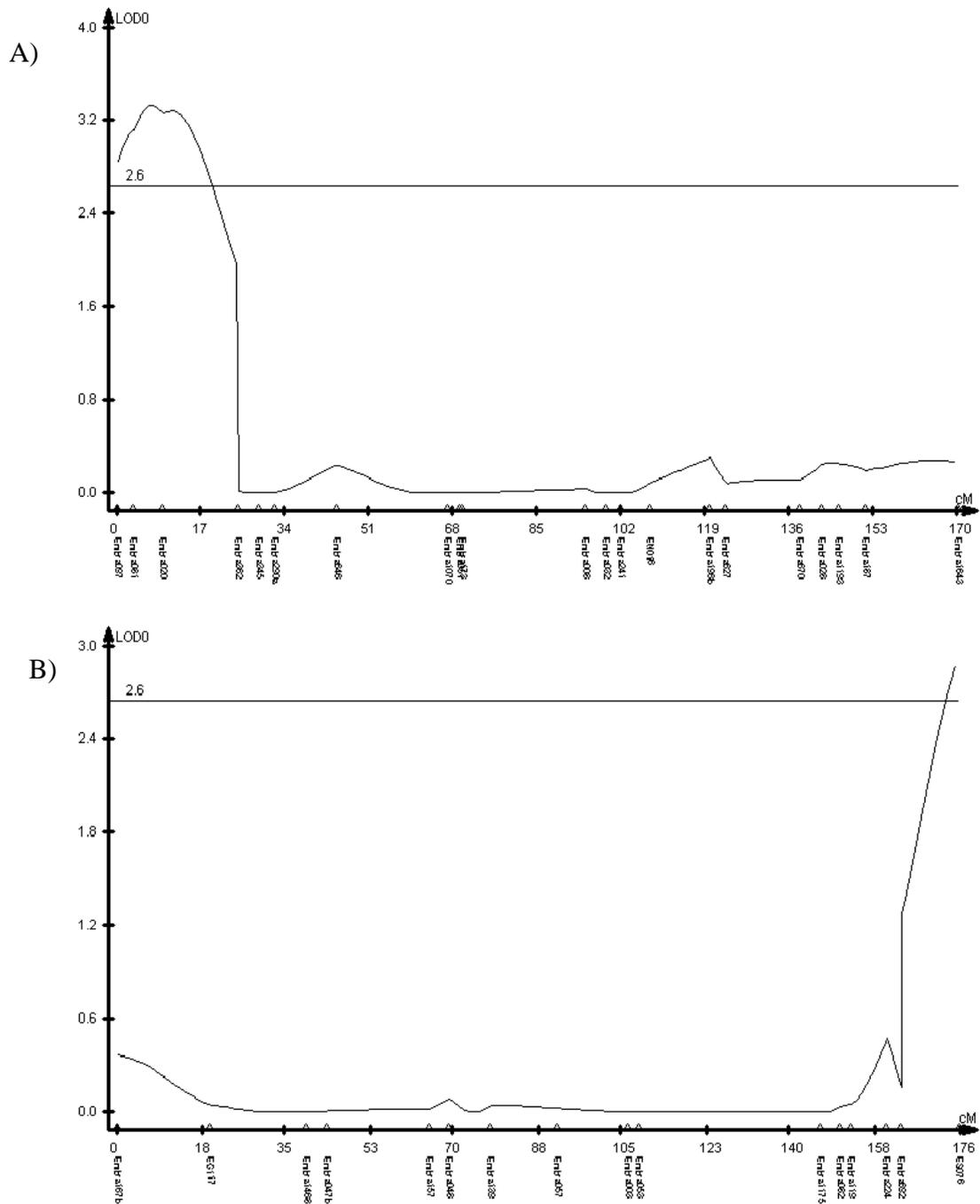


Figura 14. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando os QTLs para densidade básica da madeira mapeados por intervalo composto nos grupos de ligação 6 (A) e 8 (B) do genoma do *E. grandis*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,6.

3.4.5. Análise de QTLs para teor de glicana da madeira

A glicana, também conhecido como celulose, é o polissacarídeo formado pela polimerização da β -D-glicose. O teor de glicana da madeira, apesar de pouco variável entre genótipos, é importante na definição da qualidade da madeira e na determinação do rendimento do processo de polpação. Na população segregante do presente trabalho, o teor de glicana médio foi de 49,01%, com desvio padrão de 0,39%.

Para essa característica foram identificados oito marcadores ligados a QTLs pelo teste F com um nível individual de 1%. No Anexo 1 estão os resultados da análise de variância desses marcadores, que foram localizados nos grupos de ligação 1, 4, 6, 7, 8, 11 (Figura 15). O marcador Embra125 não mapeado, mas que agrupou junto com os marcadores do g.l.3, também está ligado a QTL.

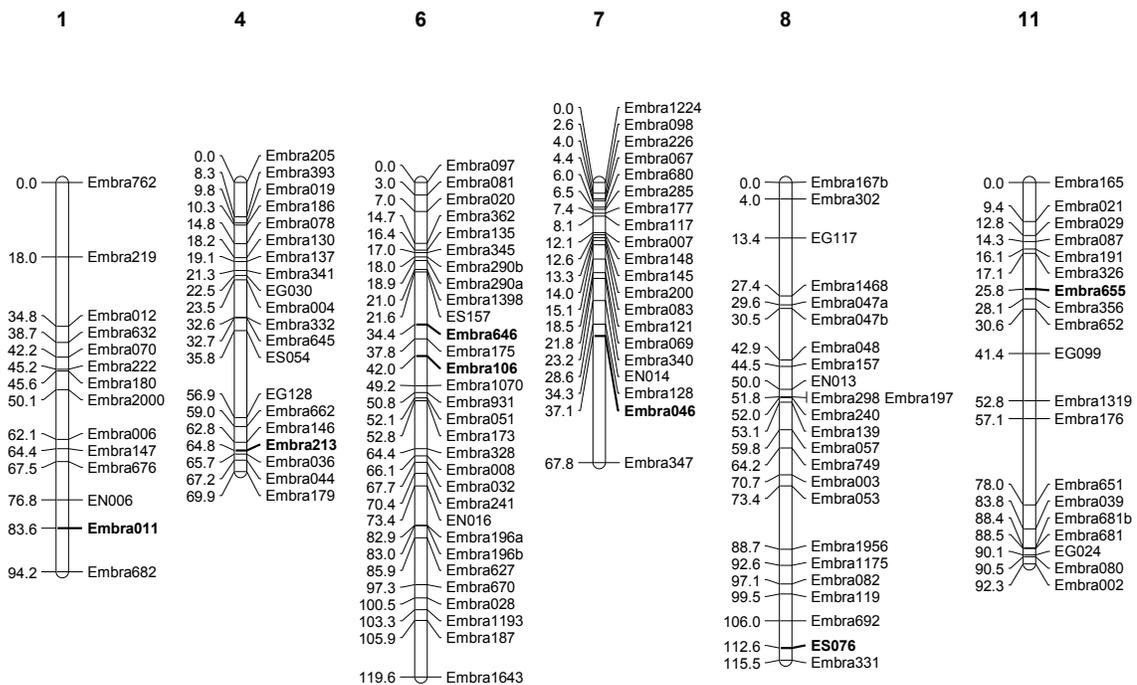


Figura 15. Localização dos marcadores (sublinhados e em negrito) ligados a QTLs para teor de glicana da madeira no mapa integrado construído pelo programa JoinMap (item 3.1.). A análise da ligação foi realizada através de uma ANOVA com 1% de significância pelo teste F.

Através do mapeamento por intervalo composto foram detectados três QTLs, dois no genoma do *E. grandis* e um no genoma do *E. urophylla*. Os QTLs localizaram-se no grupo de ligação 7 do *E. urophylla* (Figura 16) e nos grupos de ligação 6 e 9 do *E. grandis* (Figura 17). Os QTLs encontrados nos g.l. 6 e 9 do *E. grandis* explicam, respectivamente, 6,5% e 10,1% da variação no teor de glicana da madeira na população. O QTL encontrado no g.l. 7 do *E. urophylla* explica 5,3% da variabilidade fenotípica.

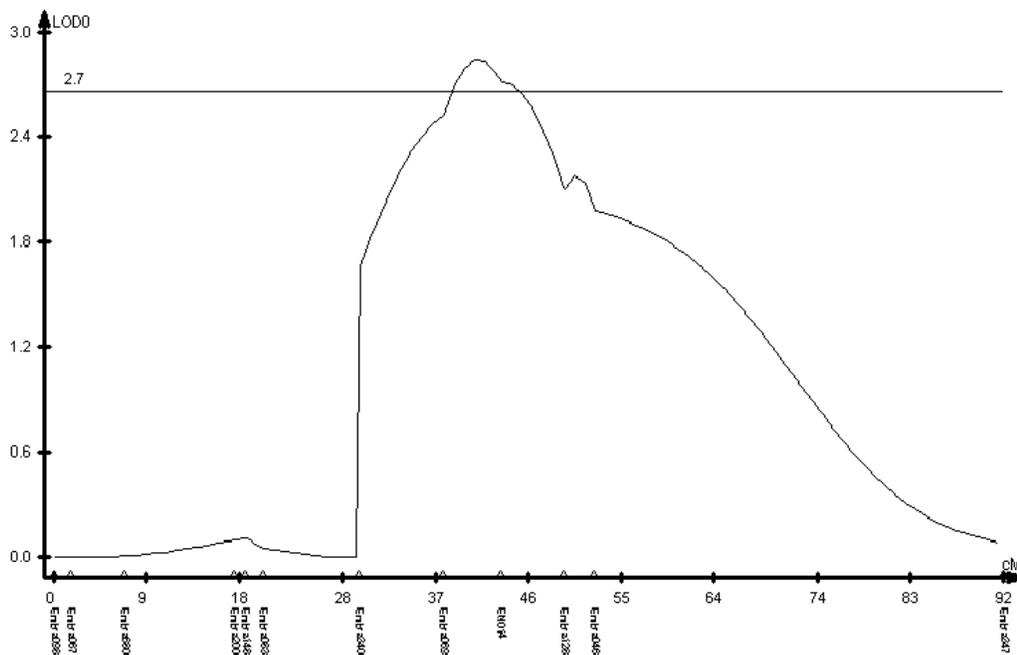


Figura 16. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para teor de glicana da madeira mapeado por intervalo composto no grupo de ligação 7 do genoma do *E. urophylla*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,7.

3.4.6. Análise de QTLs para teor de xilana da madeira

A xilana é um polissacarídeo cujo açúcar predominante é a xilose. As xilanas são os principais polissacarídeos encontrados na fração hemicelulósica das eudicotiledôneas. As hemiceluloses se aderem às fibras de celulose formando uma rede coesa fundamental na estrutura da parede celular. Devido a essa estrutura, as hemiceluloses protegem as fibras de celulose da degradação pelo álcali, fazendo com que a presença desses polissacarídeos sejam desejáveis para o processo de polpação. Na população segregante do presente trabalho, o teor de xilana médio foi de 12,06%, com desvio padrão de 0,35%.

Para essa característica foram identificados 14 marcadores ligados a QTLs pelo teste F com um nível individual de 1%. No Anexo 1 estão os resultados da análise de variância desses marcadores, que foram localizados nos grupos de ligação 4, 6, 8, 10 (Figura 18).

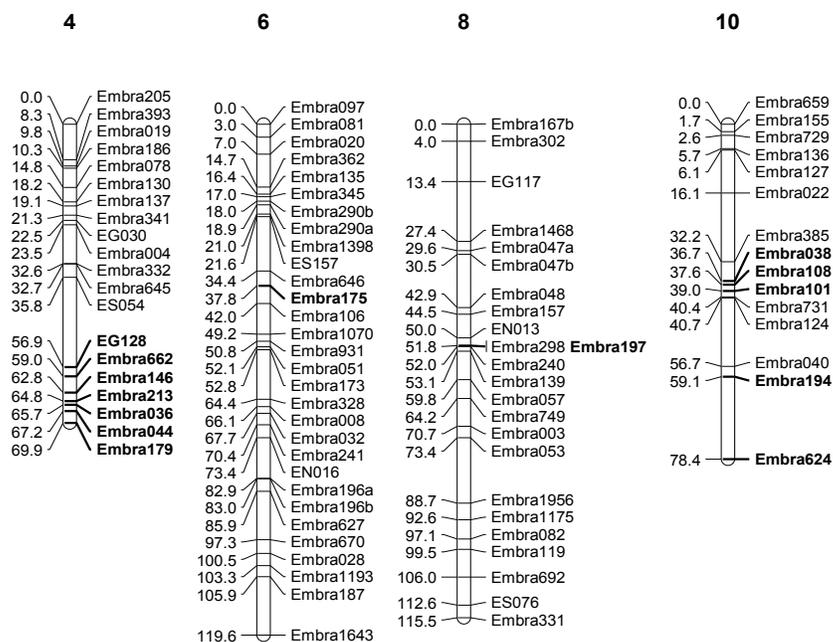


Figura 18. Localização dos marcadores (sublinhados e em negrito) ligados a QTLs para teor de xilana da madeira no mapa integrado construído pelo programa JoinMap (item 3.1.). A análise da ligação foi realizada através de uma ANOVA com 1% de significância pelo teste F.

Através do mapeamento por intervalo composto foram detectados três QTLs, um no genoma do parental *E. grandis* e dois no genoma do parental *E. urophylla*. Os QTLs localizaram-se no grupo de ligação 8 do *E. grandis* (Figura 19) e nos grupos de ligação 4 e 10 do *E. urophylla* (Figura 20). Os QTLs encontrados nos g.l. 4 e 10 do *E. urophylla* explicam, respectivamente, 9,5 e 16,6% da variação no teor de xilana da madeira na população. O QTL encontrado no g.l. 8 do *E. grandis* explica 6,0% da variabilidade fenotípica.

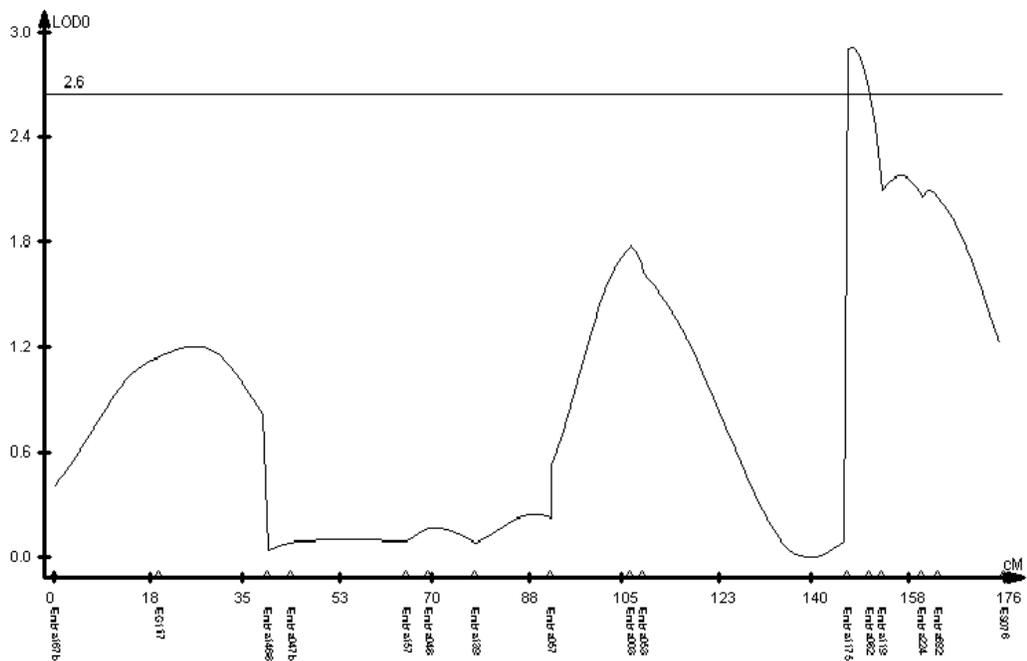


Figura 19. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para teor de xilana da madeira mapeado por intervalo composto no grupo de ligação 8 do genoma do *E. grandis*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,6.

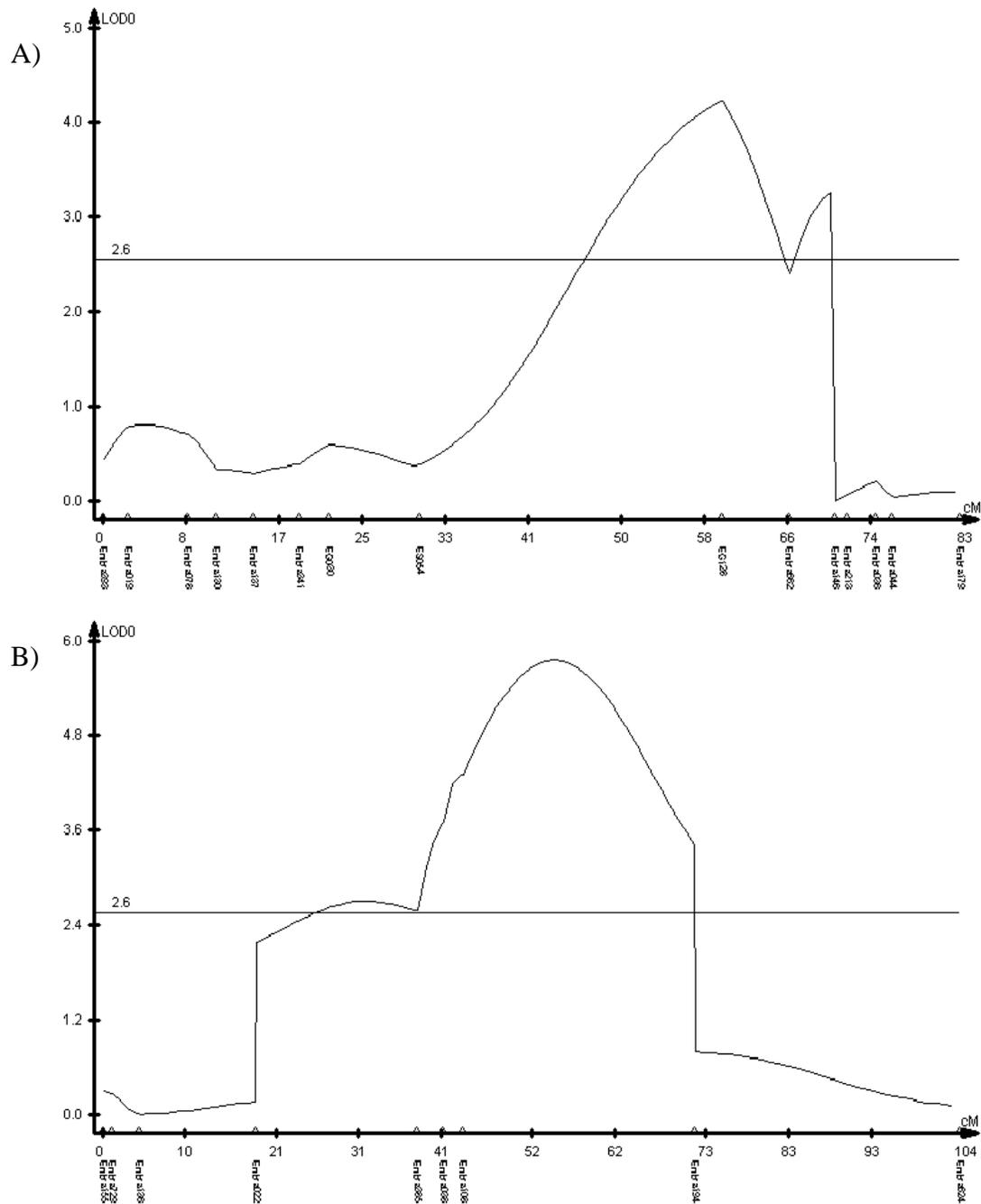


Figura 20. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando os QTLs para teor de xilana da madeira mapeados por intervalo composto nos grupos de ligação 4 (A) e 10 (B) do genoma do *E. urophylla*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,6.

3.4.7. Análise de QTLs para teor de ácido metilglucurônico da madeira

O ácido metilglucurônico é um açúcar constituinte de diversas hemiceluloses e pectinas da parede celular. O ácido 4-O-metilglucurônico é o principal constituinte das cadeias laterais das xilanas. A importância desses grupos está relacionada com o consumo de álcali durante a polpação, com conseqüente hidrólise e transformação em ácidos hexenourônicos, indesejáveis nas operações de branqueamento da polpa celulósica (Gomide et al., 2005). Na população segregante do presente trabalho, o teor de ácido metilglucurônico médio foi de 3,57%, com desvio padrão de 0,128%.

Para essa característica foram identificados 20 marcadores ligados a QTLs pelo teste F com um nível individual de 1%. No Anexo 1 estão os resultados da análise de variância desses marcadores, que foram localizados nos grupos de ligação 1, 2, 4 e 10 (Figura 21). O marcador Embra125 não mapeado, mas que agrupou junto com os marcadores do g.l.3, também está ligado a QTL.

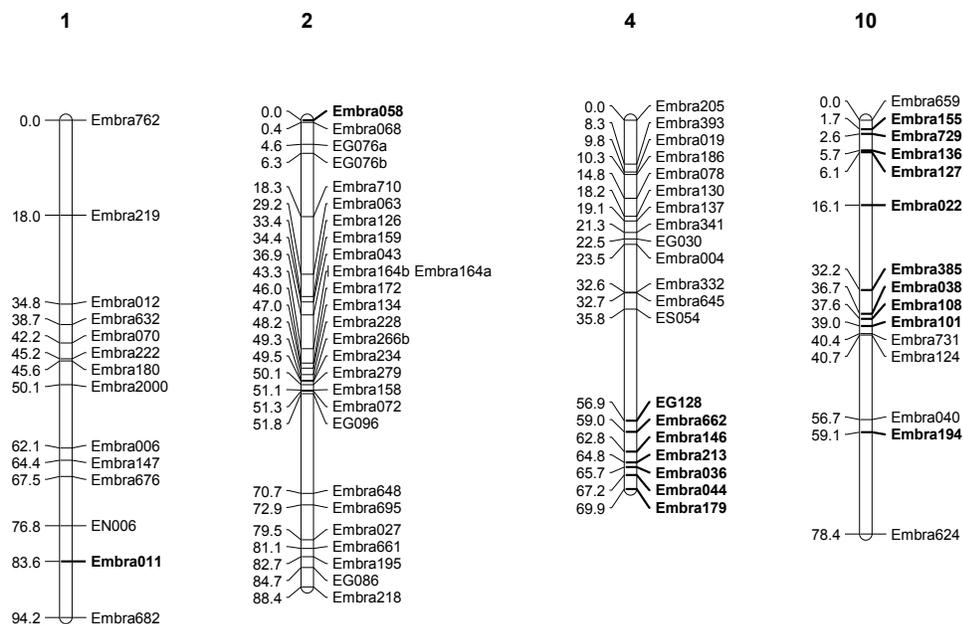


Figura 21. Localização dos marcadores (sublinhados e em negrito) ligados a QTLs para teor de ácido metilglucurônico da madeira no mapa integrado construído pelo programa JoinMap (item 3.1.). A análise da ligação foi realizada através de uma ANOVA com 1% de significância pelo teste F.

Através do mapeamento por intervalo composto foram detectados quatro QTLs, um no genoma do parental *E. grandis* e três no genoma do parental *E. urophylla*. Os QTLs localizaram-se no grupo de ligação 4 do *E. grandis* (Figura 22) e nos grupos de ligação 4 e 10 do *E. urophylla*, sendo que no g.l. 10 foram identificados dois QTLs (Figura 23). O QTL encontrado no g.l. 4 do *E. urophylla* explica 11,7% da variação do teor de ácido metilglucurônico na população, enquanto os dois QTLs encontrados no g.l. 10 explicam 19,6% e 5,6%. O QTL encontrado no g.l. 4 do *E. grandis* explica 8,0% da variabilidade fenotípica.

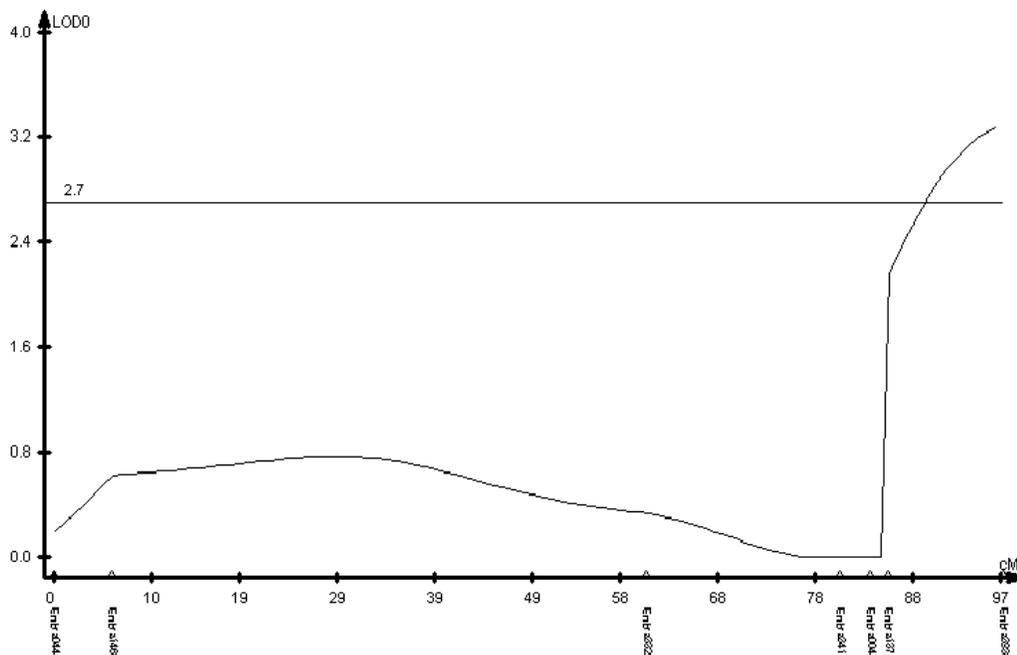


Figura 22. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para teor de ácido metilglucurônico da madeira mapeado por intervalo composto no grupo de ligação 4 do genoma do *E. grandis*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,7.

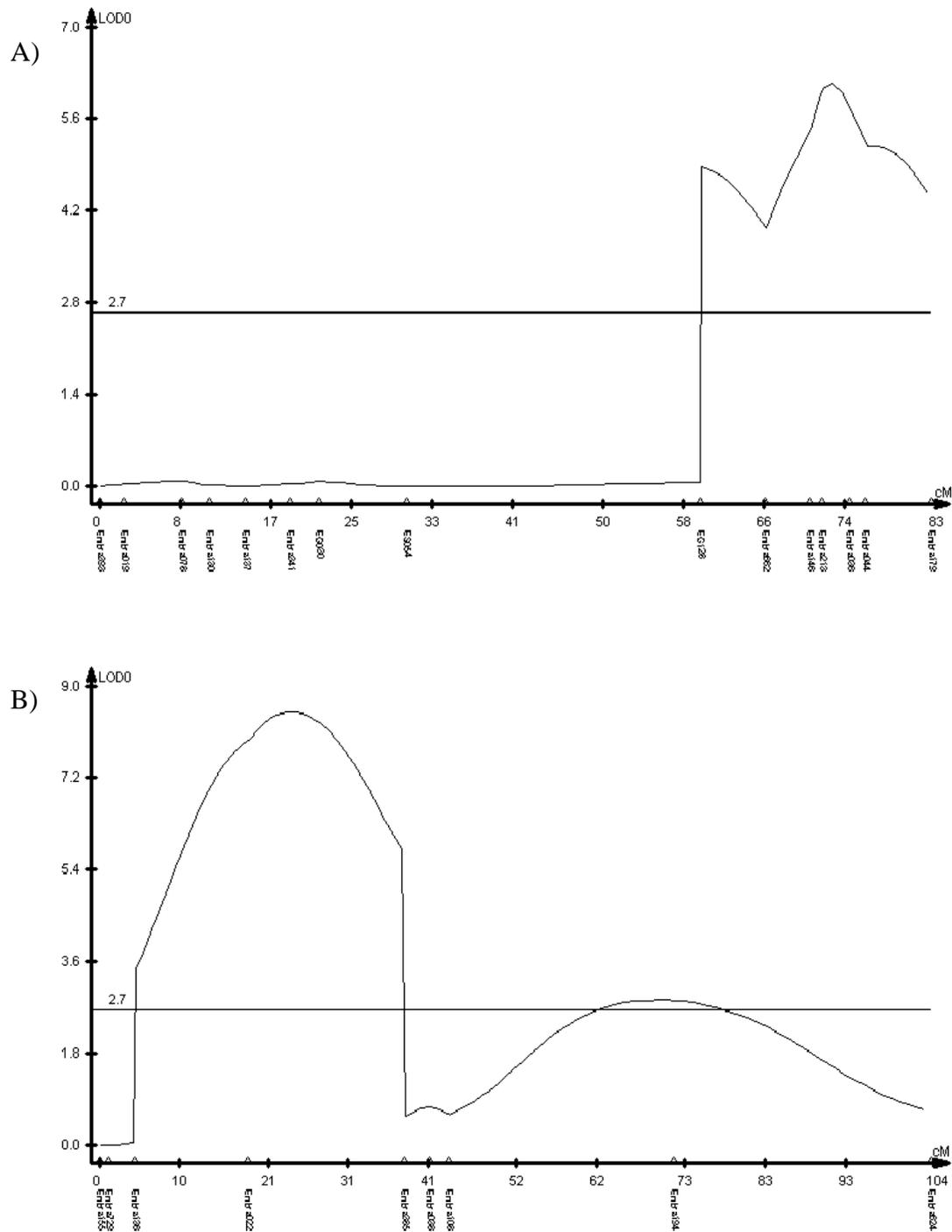


Figura 23. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando os QTLs para teor de ácido metilglucurônico da madeira mapeados por intervalo composto nos grupos de ligação 4 (A) e 10 (B) do genoma do *E. urophylla*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,7.

3.4.8. Análise de QTLs para teor de ácido galactourônico da madeira

O ácido galactourônico é o principal açúcar encontrado na fração pectica da parede celular. As pectinas formam uma matriz hidratada na qual está implantada a rede celulose-hemicelulose. Na população segregante do presente trabalho, o teor de ácido galactourônico médio foi de 0,58%, com desvio padrão de 0,018%.

Para essa característica foram identificados 12 marcadores ligados a QTLs pelo teste F com um nível individual de 1%. No Anexo 1 estão os resultados da análise de variância desses marcadores, que foram localizados nos grupos de ligação 4, 6, 8, 10 e 11 (Figura 24).

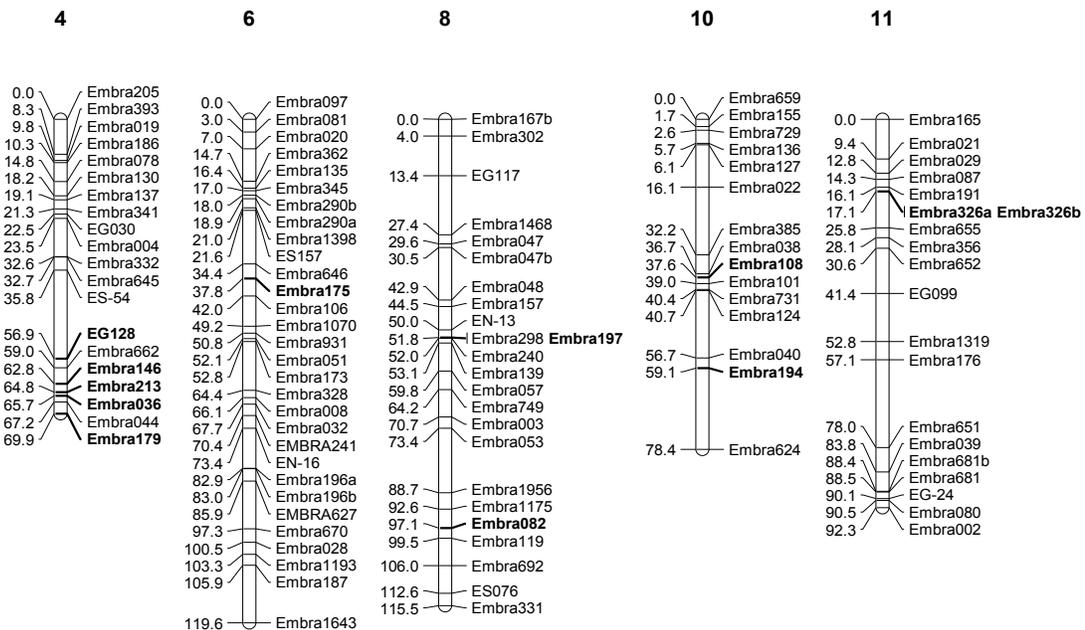


Figura 24. Localização dos marcadores (sublinhados e em negrito) ligados a QTLs para teor de ácido galactourônico da madeira no mapa integrado construído pelo programa JoinMap (item 3.1.). A análise da ligação foi realizada através de uma ANOVA com 1% de significância pelo teste F.

Através do mapeamento por intervalo composto foram detectados dois QTLs, ambos no genoma do *E. urophylla*. Os QTLs localizaram-se nos grupos de ligação 4 e 10 desse parental (Figura 25). O QTL encontrado no g.l. 4 explica 7,6% da variação do teor de ácido galactourônico na população, enquanto o QTL encontrado no g.l. 10 explica 11,0%.

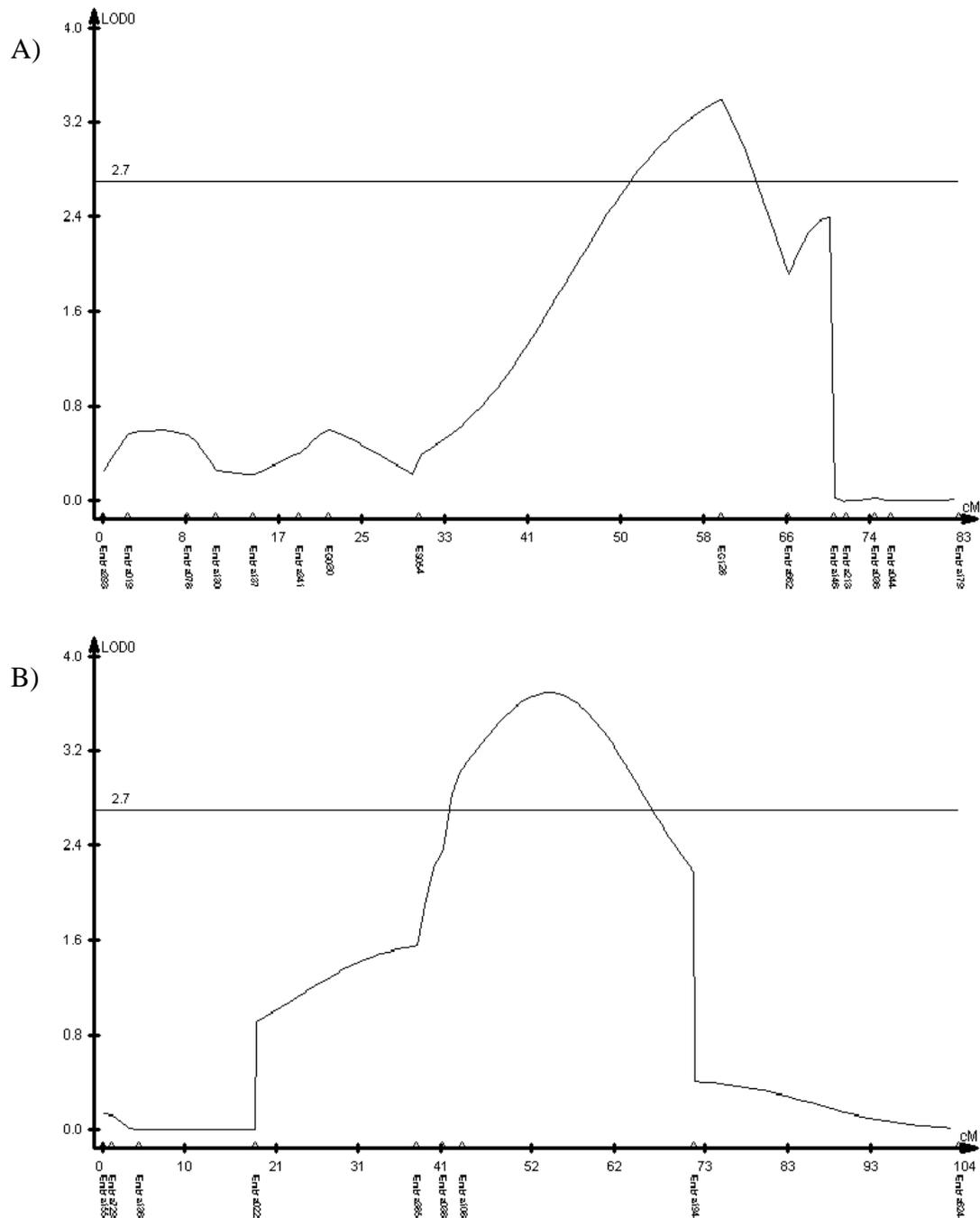


Figura 25. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando os QTLs para teor de ácido galactourônico da madeira mapeados por intervalo composto nos grupos de ligação 4 (A) e 10 (B) do genoma do *E. urophylla*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,7.

3.4.9. Análise de QTLs para teor de lignina total da madeira

A lignina é, depois da celulose, o constituinte mais abundante da madeira. Para a produção da polpa celulósica, é necessária a desagregação das microfibrilas de celulose. A lignina, por ser um agente permanente de ligação entre as células, necessita ser eliminada no processo de polpação, exigindo uma grande quantidade de energia e reagentes nocivos ao ambiente para sua solubilização. Além disso, a lignina também dificulta as operações de branqueamento da polpa celulósica. Porém, é importante destacar que a lignina extraída durante a polpação é utilizada como energia para re-alimentar o processo. Tudo isso faz do teor de lignina da madeira um dos atributos mais importantes na definição da qualidade da madeira para a indústria de celulose. Na população segregante do presente trabalho, o teor de lignina total médio foi de 26,35%, com desvio padrão de 0,988%.

Para essa característica foram identificados 27 marcadores ligados a QTLs pelo teste F com um nível individual de 1%. No Anexo 1 estão os resultados da análise de variância desses marcadores, que foram localizados nos grupos de ligação 4, 7, 9, 10 e 11 (Figura 26).

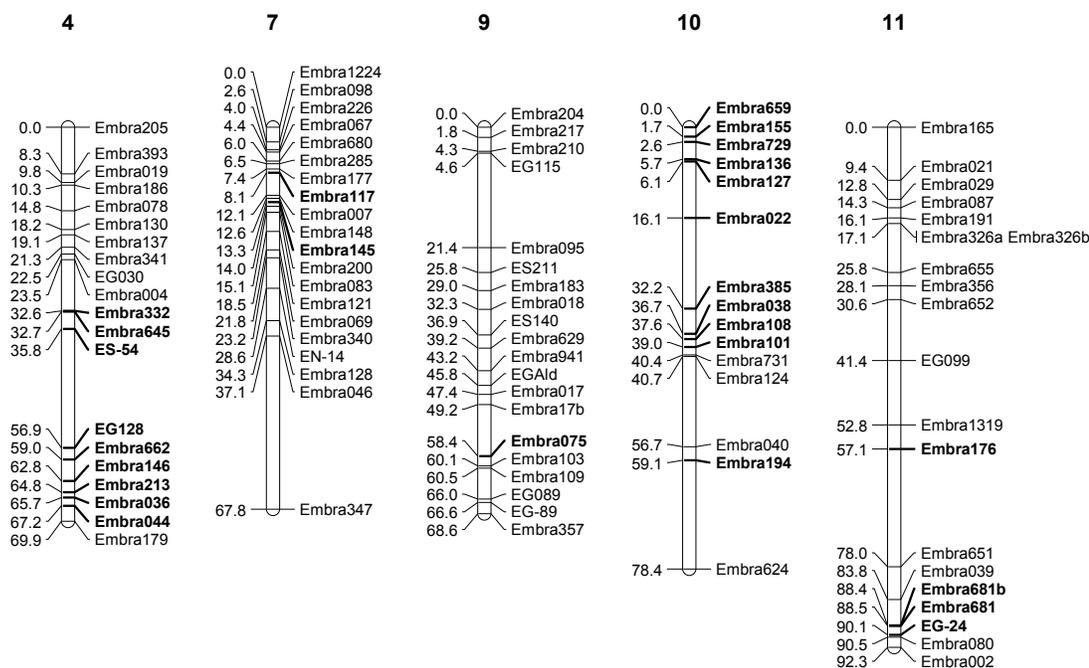
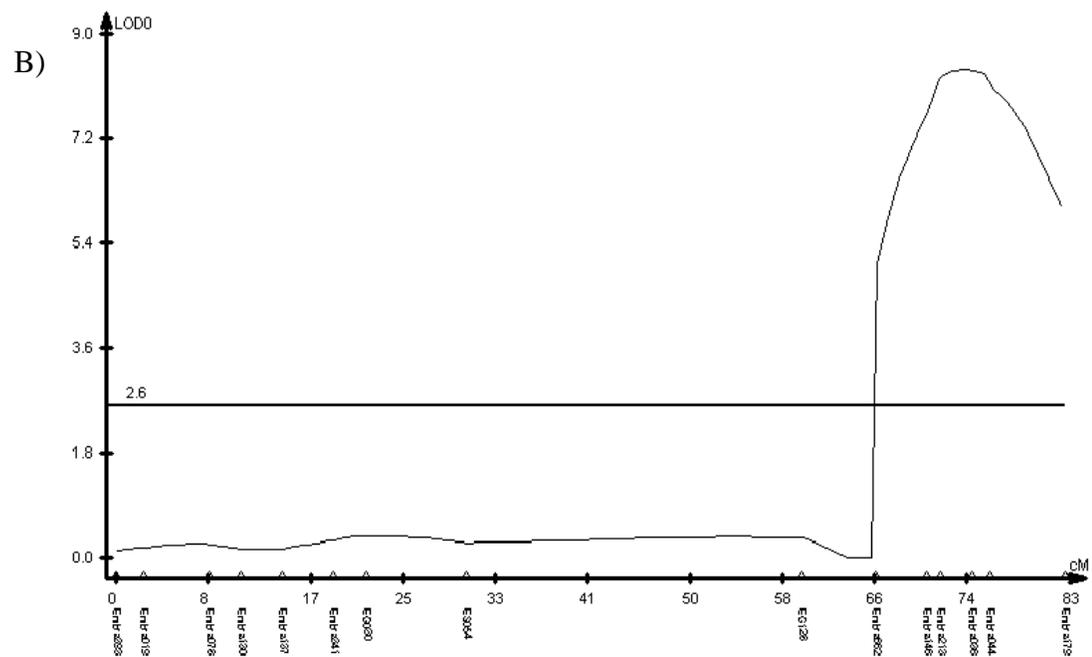
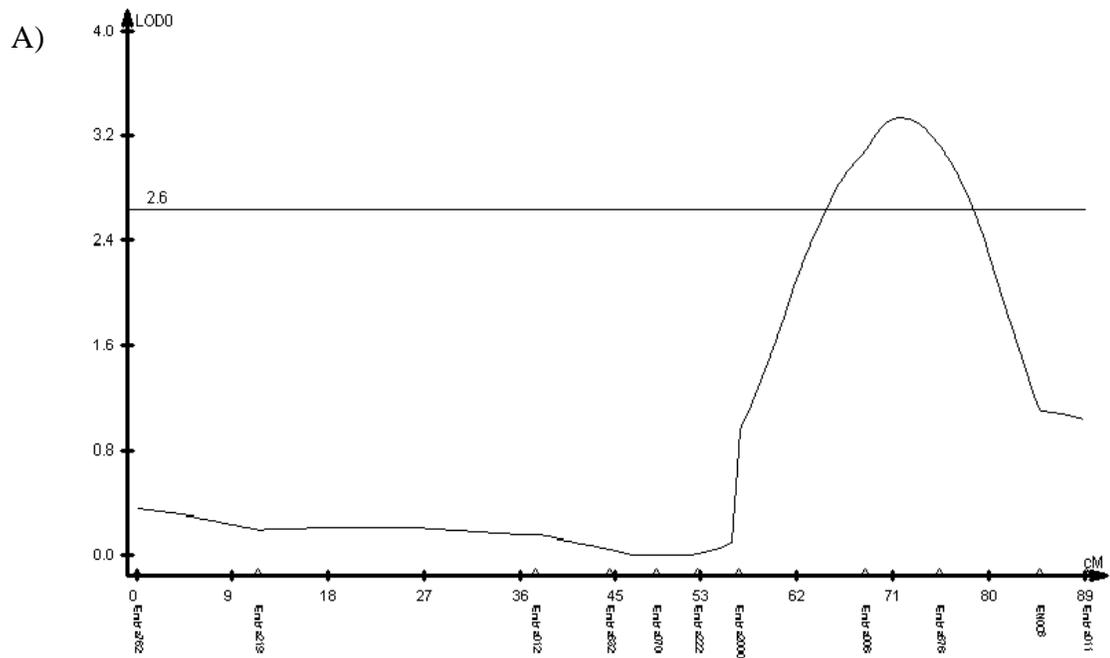


Figura 26. Localização dos marcadores (sublinhados e em negrito) ligados a QTLs para teor de lignina total da madeira no mapa integrado construído pelo programa JoinMap (item 3.1.). A análise da ligação foi realizada através de uma ANOVA com 1% de significância pelo teste F.

Através do mapeamento por intervalo composto foram detectados seis QTLs, três no genoma do parental *E. grandis* e três no genoma do parental *E. urophylla*. Os QTLs localizaram-se nos grupos de ligação 1, 4 e 10 do *E. urophylla* (Figura 27) e nos grupos de ligação 8 e 10 do *E. grandis*, sendo que no g.l. 8 foram identificados 2 QTLs (Figura 28). Os 2 QTLs identificados no g.l. 8 do *E. grandis* explicam 6,5% e 7,2% da variação fenotípica, enquanto o QTL identificado no g.l. 10 desse parental explica 7,6%. Os QTLs dos g.l. 1, 4 e 10 do *E. urophylla* explicam, respectivamente, 5,3%, 13,1% e 17,2% da variação fenotípica encontrada na população.



Continua...

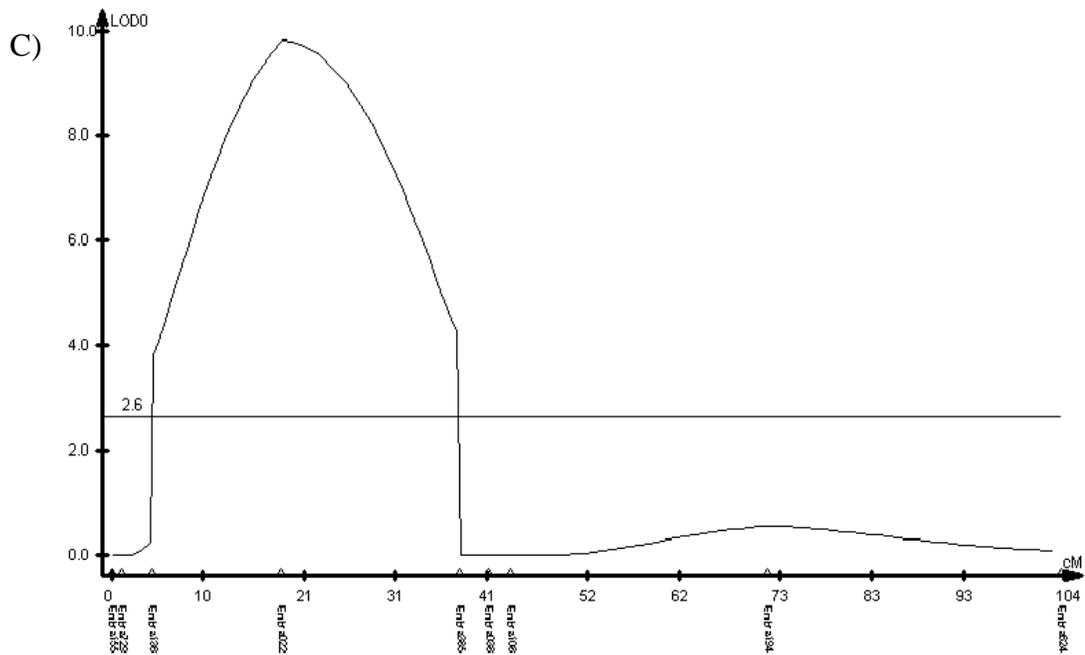


Figura 27. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando os QTLs para teor de lignina da madeira mapeados por intervalo composto nos grupos de ligação 1 (A), 4 (B) e 10 (C) do genoma do *E. urophylla*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,6.

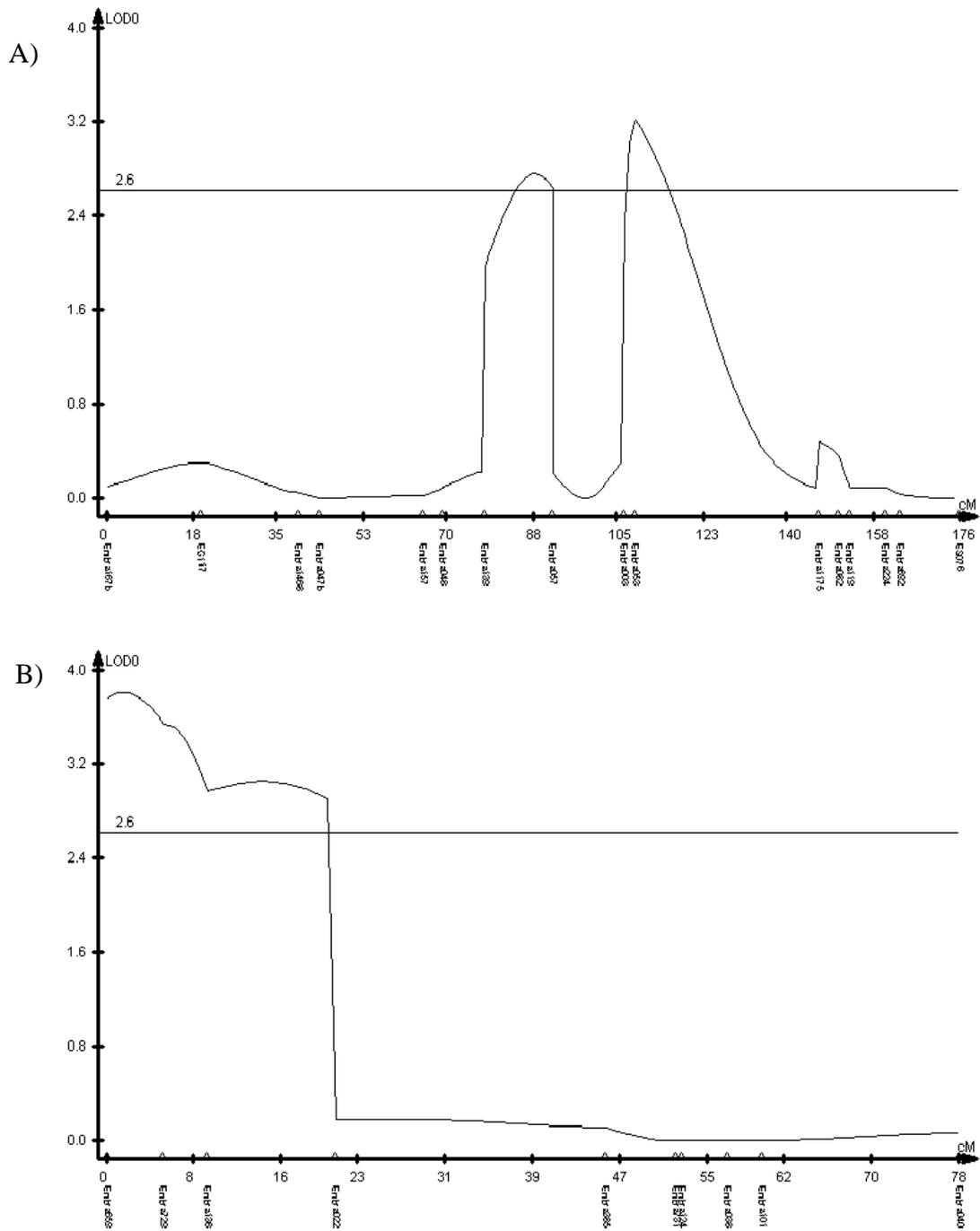


Figura 28. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando os QTLs para teor de lignina da madeira mapeados por intervalo composto nos grupos de ligação 8 (A) e 10 (B) do genoma do *E. grandis*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,6.

3.4.10. Análise de QTLs para relação Siringil/Guaiacil da madeira

O siringil e guaiacil são dois monolignóis, ou seja, álcoois componentes da lignina. A relação entre esses dois álcoois é fundamental para determinar a reatividade da lignina. O siringil, por não possuir o carbono C5 disponível para reação, faz com que as estruturas de lignina siringil sejam menos condensadas e, conseqüentemente, mais favoráveis ao ataque pelo álcali. Assim, quanto maior a relação siringil/guaiacil maior é a reatividade da lignina e, portanto, mais fácil será a sua extração no processo de polpação (Gomide et al., 2005). Pela importância da lignina no fornecimento de energia para alimentar o processo de polpação, o grande alvo das pesquisas nas áreas de melhoramento e biologia molecular tem sido o aumento na relação siringil/guaiacil e não a redução do teor de lignina das madeiras. Na população segregante do presente trabalho, a relação siringil/guaiacil média foi de 3,08, com desvio padrão de 0,223.

Para essa característica foram identificados 12 marcadores ligados a QTLs pelo teste F com um nível individual de 1%. No Anexo 1 estão os resultados da análise de variância desses marcadores, que foram localizados nos grupos de ligação 9 e 10 (Figura 29).

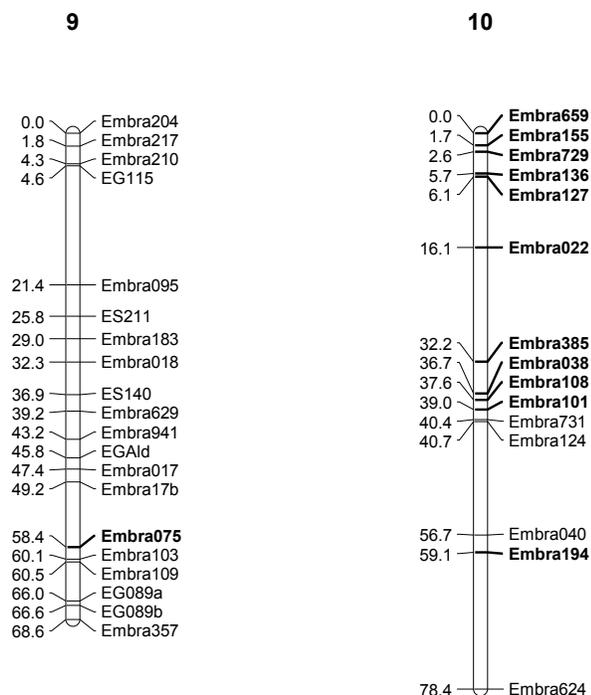


Figura 29. Localização dos marcadores (sublinhados e em negrito) ligados a QTLs para relação siringil/guaiacil da madeira no mapa integrado construído pelo programa JoinMap (item 3.1.). A análise da ligação foi realizada através de uma ANOVA com 1% de significância pelo teste F.

Através do mapeamento por intervalo composto foram detectados três QTLs, todos no genoma do *E. urophylla*. Os QTLs localizaram-se nos grupos de ligação 1 e 10 desse parental (Figura 30), sendo que no g.l. 10 foram identificados dois QTLs. O QTL do g.l. 1 explica 5,0% da variação na relação siringil/guaiacil encontrado na população, enquanto os QTLs do g.l. 10 explicam 7,6% e 6,4%.

3.4.11. Análise de QTLs para a porcentagem de álcali efetivo utilizado no processo de polpação

O álcali é o reagente utilizado na retirada da lignina da madeira durante o processo de polpação. Quanto maior a quantidade de lignina na madeira e quanto menor sua relação siringil/guaiacil, maior tende a ser a quantidade de álcali necessário para sua extração. Na população segregante do presente trabalho, a porcentagem de álcali efetivo médio foi de 13,16%, com desvio padrão de 1,043%.

Para essa característica foram identificados 14 marcadores ligados a QTLs pelo teste F com um nível individual de 1%. No Anexo 1 estão os resultados da análise de variância desses marcadores, que foram localizados nos grupos de ligação 1, 4, 6, 7, 10 e 11 (Figura 31).

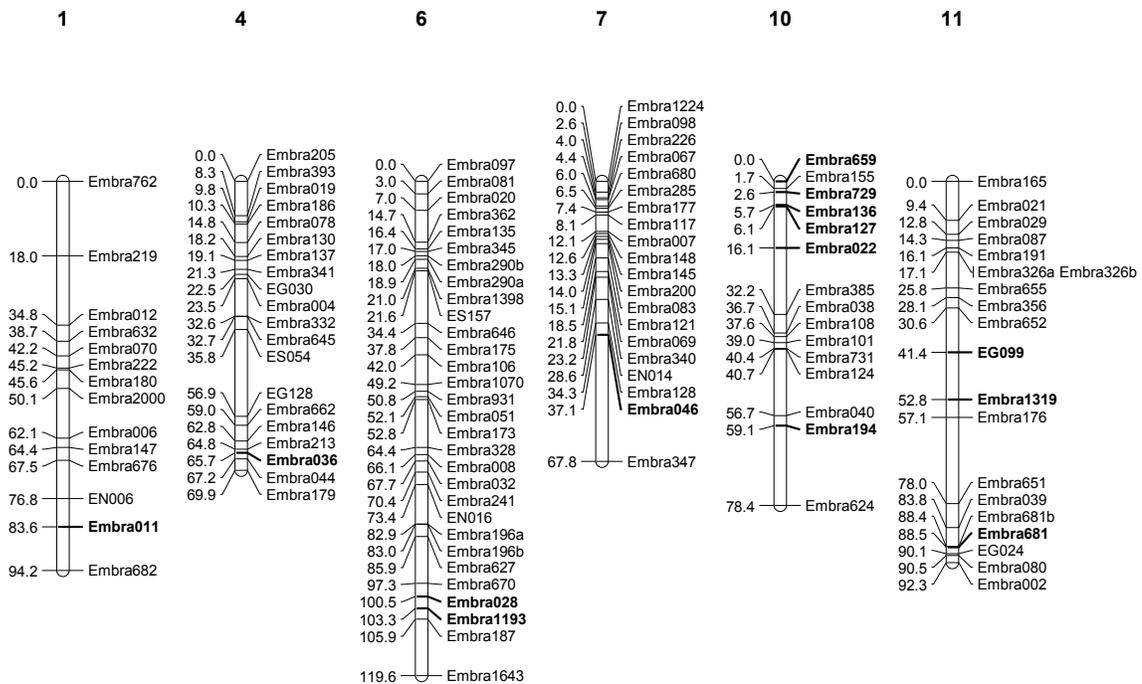


Figura 31. Localização dos marcadores (sublinhados e em negrito) ligados a QTLs para porcentagem de álcali efetivo utilizado na polpação no mapa integrado construído pelo programa JoinMap (item 3.1.). A análise da ligação foi realizada através de uma ANOVA com 1% de significância pelo teste F.

Através do mapeamento por intervalo composto foram detectados quatro QTLs, um no genoma do parental *E. grandis* e três no genoma do parental *E. urophylla*. Os QTLs localizaram-se no grupo de ligação 10 do *E. grandis* (Figura 32) e nos grupos de ligação 6, 10 e 11 do *E. urophylla* (Figura 33). O QTL encontrado no g.l. 10 do *E. grandis* explica 16,2% da variabilidade na porcentagem de álcali efetivo. Os QTLs encontrados nos grupos de ligação 6, 10 e 11 do *E. urophylla* explicam, respectivamente, 7,7%, 8,3% e 7,4% da variação fenotípica.

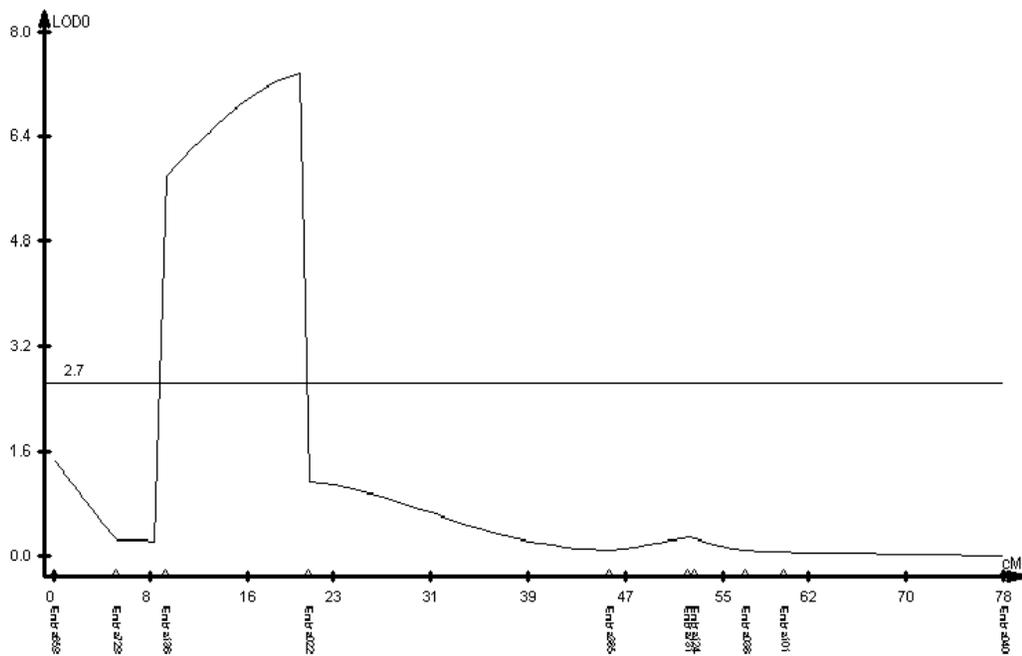
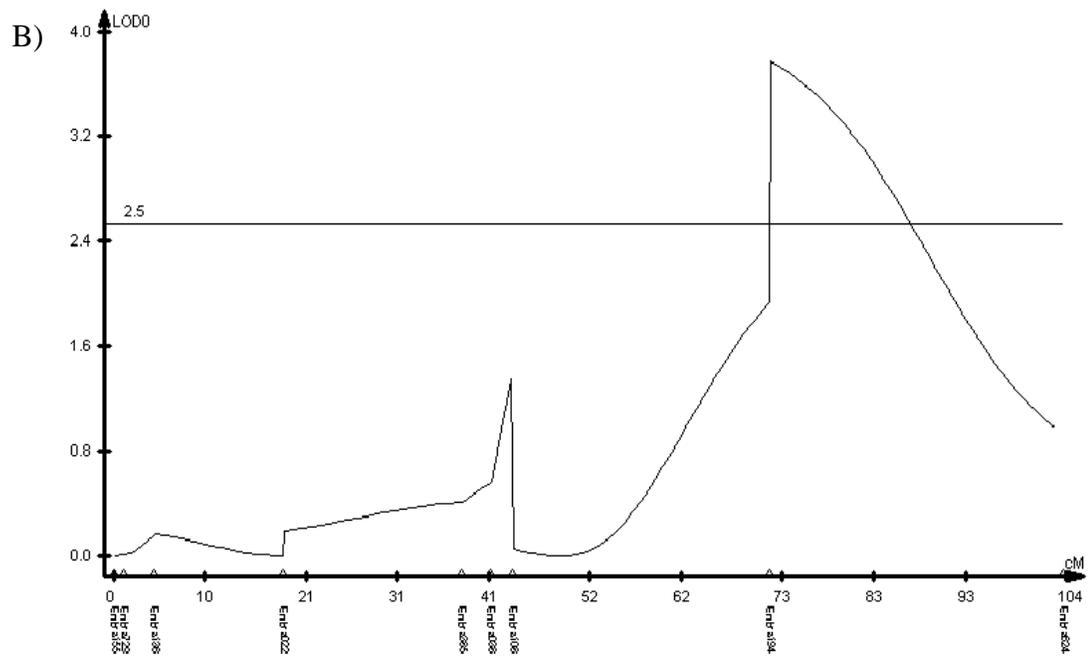
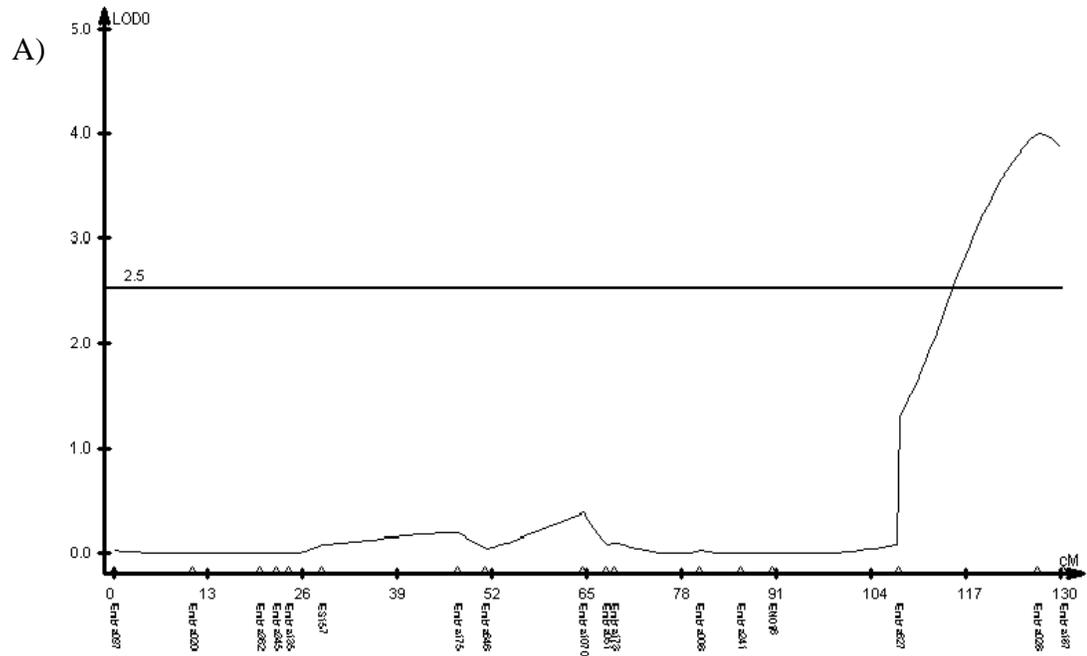


Figura 32. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para porcentagem de álcali efetivo utilizado na polpação mapeado por intervalo composto no grupo de ligação 10 do genoma do *E. grandis*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,7.



Continua...

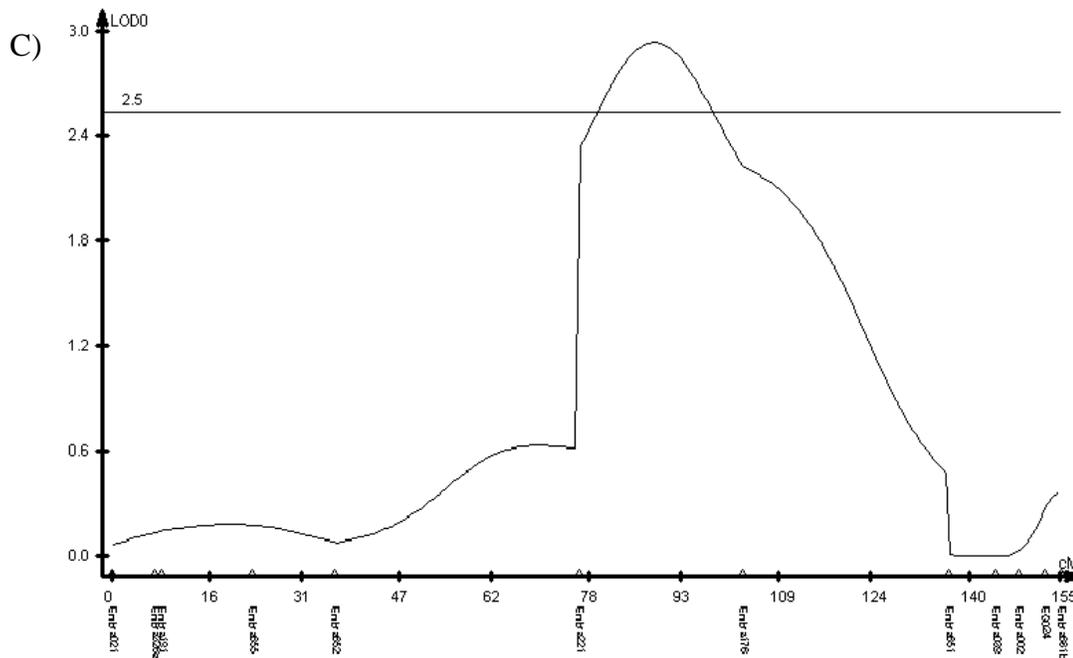


Figura 33. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando os QTLs para porcentagem de álcali efetivo mapeados por intervalo composto nos grupos de ligação 6 (A), 10 (B) e 11 (C) do genoma do *E. urophylla*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,5.

3.4.12. Análise de QTLs para rendimento depurado de celulose

O rendimento depurado refere-se à quantidade de celulose gerada no final da polpação em relação à quantidade de madeira utilizada no início do processo. Esse é um dos atributos mais importantes para a indústria de celulose, pois é uma medida da qualidade da madeira obtida no final do processo de extração da celulose. Na população segregante do presente trabalho, o rendimento depurado médio foi de 52,01%, com desvio padrão de 1,22%.

Para essa característica foram identificados sete marcadores ligados a QTLs pelo teste F com um nível individual de 1%. No Anexo 1 estão os resultados da análise de variância desses marcadores, que foram localizados nos grupos de ligação 4 e 10 (Figura 34).

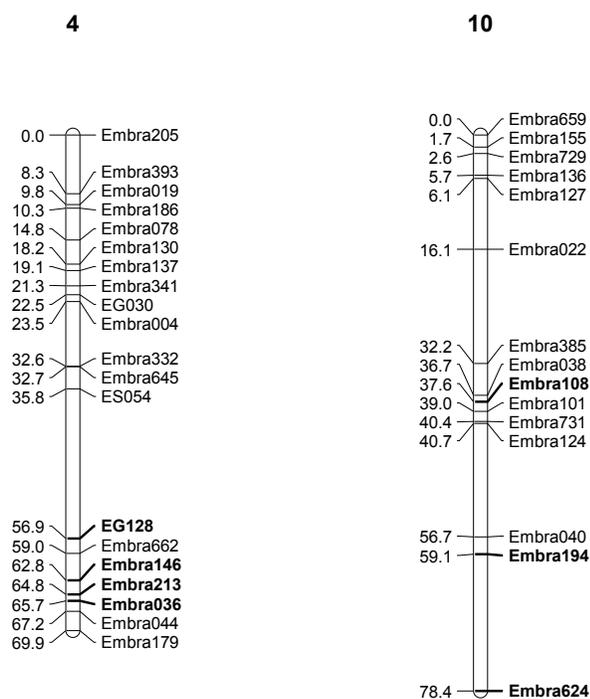


Figura 34. Localização dos marcadores (sublinhados e em negrito) ligados a QTLs para rendimento depurado de celulose no mapa integrado construído pelo programa JoinMap (item 3.1.). A análise da ligação foi realizada através de uma ANOVA com 1% de significância pelo teste F.

Através do mapeamento por intervalo composto foi detectado apenas um QTL localizado no grupo de ligação 10 do genoma do parental *E. urophylla* (Figura 35). Esse QTL explica 12,8% da variação fenotípica encontrada na população.

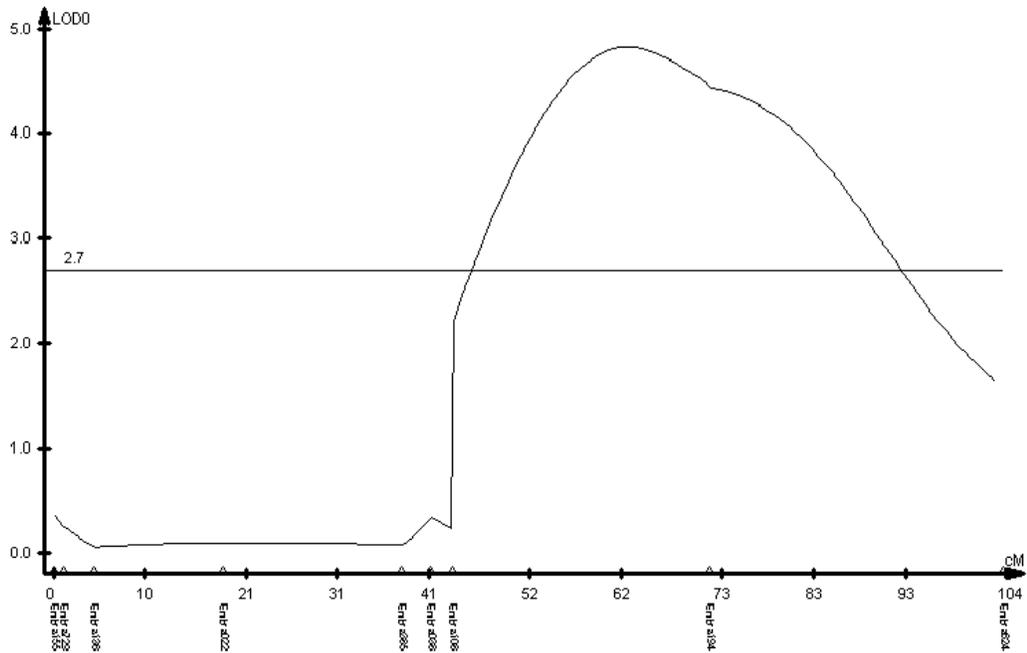


Figura 35. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para porcentagem do rendimento depurado de celulose mapeado por intervalo composto no grupo de ligação 10 do genoma do *E. urophylla*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,7.

3.4.13. Análise de QTLs para viscosidade da polpa celulósica

A determinação da viscosidade da polpa celulósica é fundamental para mensurar a sua qualidade. Quanto maior a viscosidade da polpa maior é a integridade das fibras celulósicas. Em geral, quanto maior a quantidade de álcali necessário para a retirar a lignina da polpa, maior será a degradação das fibras celulósicas e, portanto, menor a viscosidade da polpa. Na população segregante do presente trabalho, a viscosidade média das polpas celulósicas foi de 61,68 cP, com desvio padrão de 9,53 cP.

Para essa característica foram identificados 14 marcadores ligados a QTLs pelo teste F com um nível individual de 1%. No Anexo 1 estão os resultados da

análise de variância desses marcadores, que foram localizados nos grupos de ligação 5, 6, 10 e 11 (Figura 36).

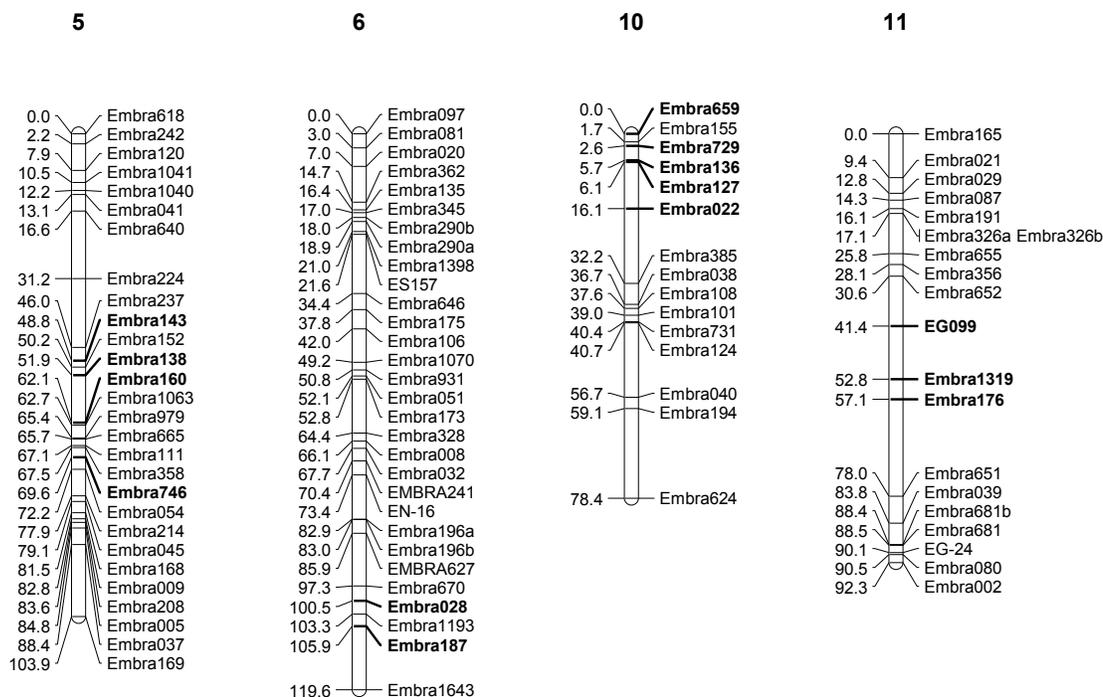


Figura 36. Localização dos marcadores (sublinhados e em negrito) ligados a QTLs para viscosidade da polpa celulósica no mapa integrado construído pelo programa JoinMap (item 3.1.). A análise da ligação foi realizada através de uma ANOVA com 1% de significância pelo teste F.

Através do mapeamento por intervalo composto foram detectados cinco QTLs, dois no genoma do parental *E. grandis* e três no genoma do parental *E. urophylla*. Os QTLs localizaram-se nos grupos de ligação 5 e 10 do *E. grandis* (Figura 37) e nos grupos de ligação 5, 6 e 11 do *E. urophylla* (Figura 38). Os QTLs identificados nos grupos de ligação 5 e 10 do *E. grandis* explicam, respectivamente, 17,8% e 13,2% da variabilidade na viscosidade das polpas da população. Os QTLs encontrados nos grupos de ligação 5, 6 e 11 do *E. urophylla* explicam, respectivamente, 7,9%, 7,6% e 7,1% da variação fenotípica.

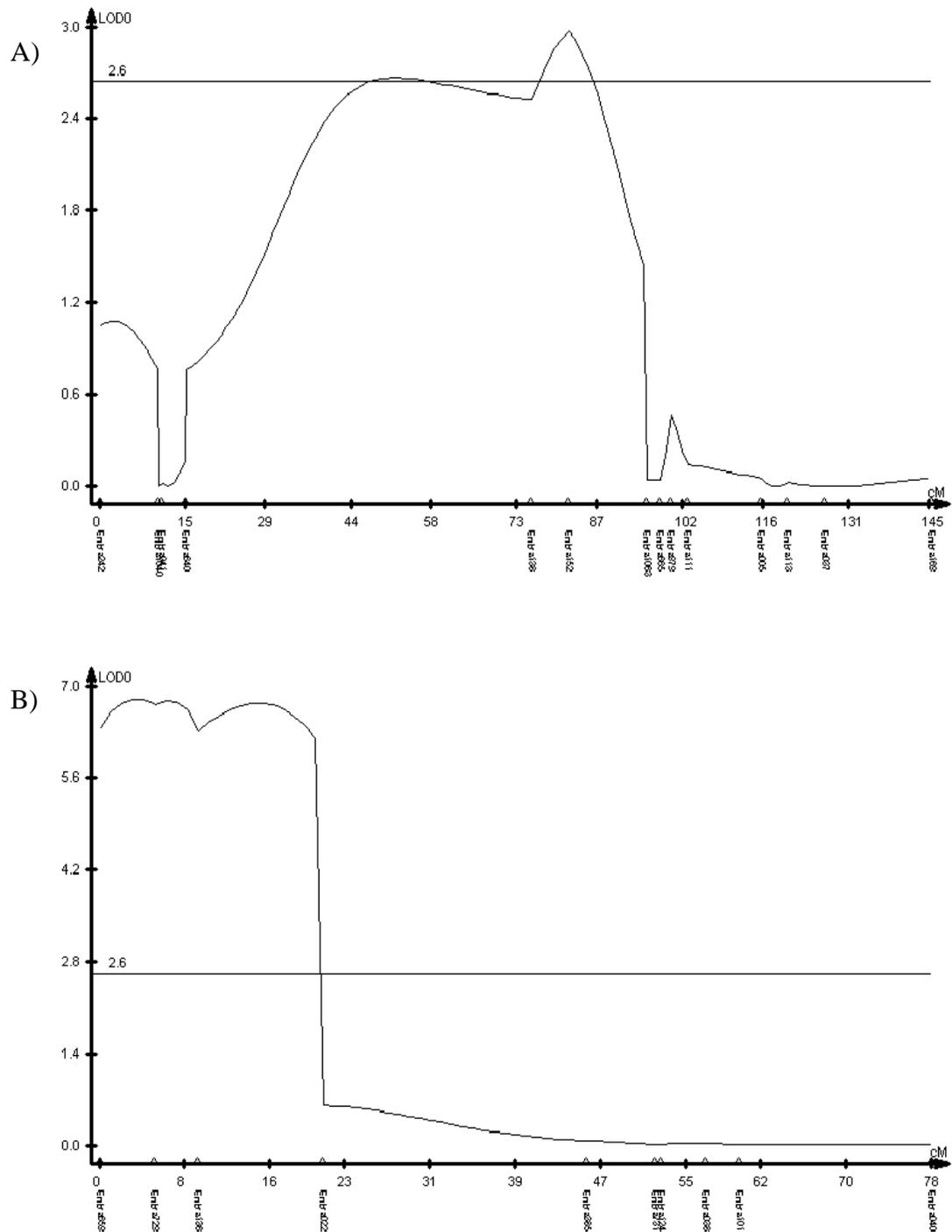
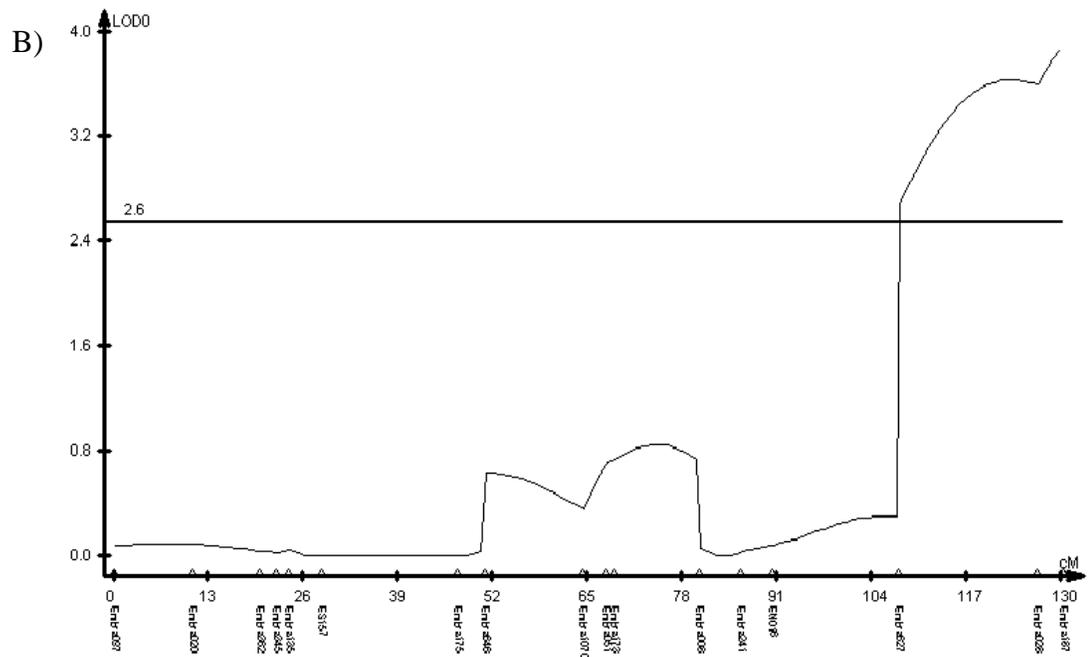
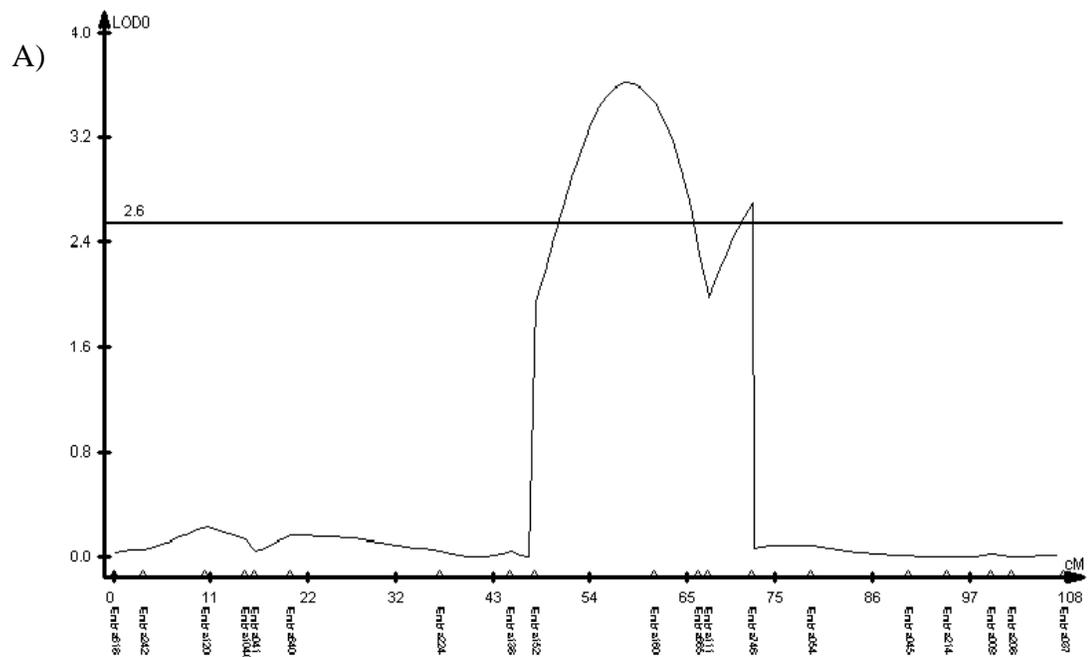


Figura 37. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando os QTLs para viscosidade da polpa celulósica mapeados por intervalo composto nos grupos de ligação 5 (A) e 10 (B) do genoma do *E. grandis*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,6.



Continua...

Para essa característica foram identificados nove marcadores ligados a QTLs pelo teste F com um nível individual de 1%. No Anexo 1 estão os resultados da análise de variância desses marcadores, que foram localizados nos grupos de ligação 6, 7, 8 e 10 (Figura 39). O marcador Embra125 não mapeado, mas que agrupou junto com os marcadores do g.l.3, também está ligado a QTL.

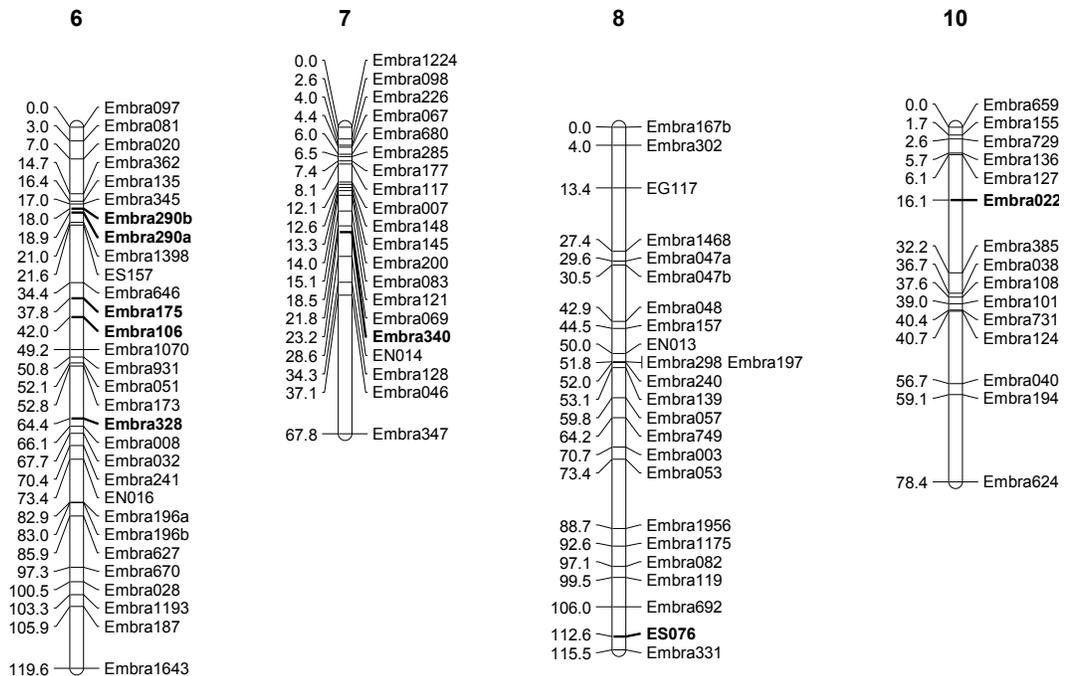


Figura 39. Localização dos marcadores (sublinhados e em negrito) ligados a QTLs para teor de extrativos da madeira no mapa integrado construído pelo programa JoinMap (item 3.1.). A análise da ligação foi realizada através de uma ANOVA com 1% de significância pelo teste F.

Através do mapeamento por intervalo composto foram detectados três QTLs, dois no genoma do parental *E. grandis* e um no genoma do parental *E. urophylla*. Os QTLs localizaram-se nos grupos de ligação 8 e 10 do *E. grandis* (Figura 40) e no grupo de ligação 6 do *E. urophylla* (Figura 41). Os QTLs dos grupos de ligação 8 e 10 do *E. grandis* explicam, respectivamente, 6,6% e 5,7% da variabilidade no teor de extrativos da população. O QTL identificado no g.l. 6 do *E. urophylla* explica 7,2% da variação fenotípica.

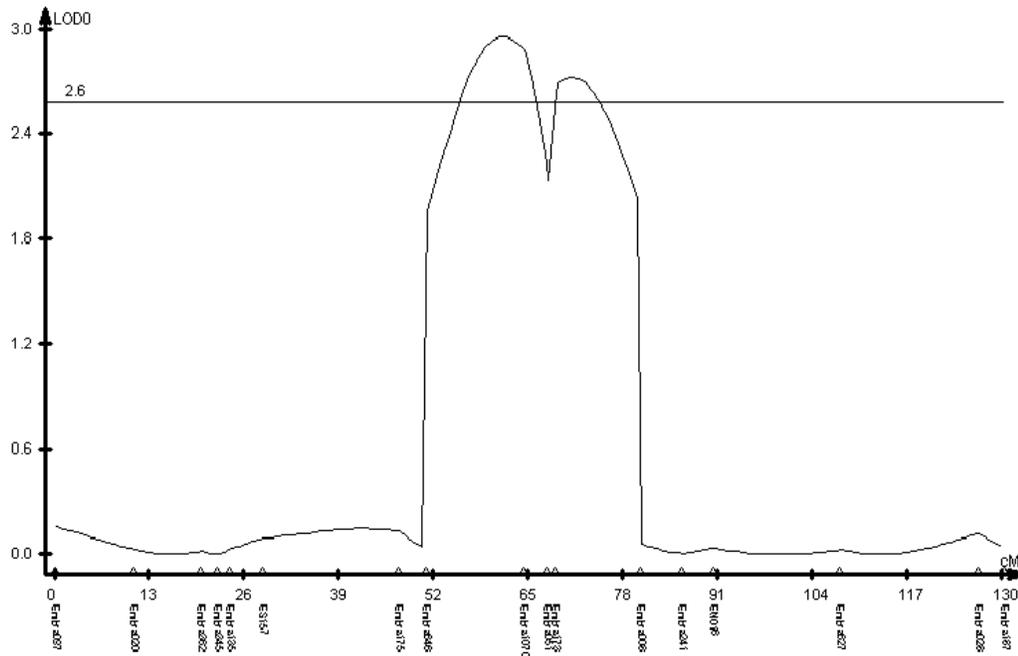


Figura 41. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para teor de extrativos mapeado por intervalo composto no grupo de ligação 6 do genoma do *E. urophylla*. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação com 5% de significância foi de 2,6.

3.5. Análise da co-localização dos QTLs

Para todas as 14 características fenotípicas analisadas foi detectado pelo menos um QTL por intervalo composto nos mapas gerados pela estratégia de pseudo-cruzamento teste. A Tabela 4 fornece um sumário das informações de todos os QTLs detectados por essa estratégia de análise. O posicionamento dos QTLs para todos os caracteres nos grupos de ligação do parental feminino (Figura 42) e masculino (Figura 43), permitiu verificar a existência de pontos quentes (“hot spots”) de QTLs. O grupo de ligação 10, tanto do *E. grandis* quanto do *E. urophylla*, é um exemplo disso. Nesse grupo ocorre co-localização de QTLs para diferentes características. Outros pontos quentes ocorreram nos grupos de ligação 4 e 6 do parental masculino.

Tabela 4. Sumário das informações dos QTLs detectados por intervalo composto pela estratégia de pseudo-cruzamento teste. Estão descritos os genitores e os grupos de ligação onde os QTLs foram detectados, bem como seus valores de LOD, porcentagem da variação explicada e os marcadores que os flanqueiam.

Característica	Genitor	Grupo de ligação	Valor de LOD	Varição explicada (%)	Marcadores dos flancos
Diâmetro	<i>E. grandis</i>	6	4,1	8,3	Embra196b - Embra627
Diâmetro	<i>E. urophylla</i>	6	4,3	9,1	Embra173 - Embra627
Diâmetro	<i>E. urophylla</i>	11	2,9	6,7	Embra191 - Embra655
Altura	<i>E. urophylla</i>	2	3,1	7,0	Embra063 - Embra159
Altura	<i>E. urophylla</i>	11	3,2	7,9	Embra191 - Embra655
Pilodyn	<i>E. grandis</i>	8	3,1	7,7	EG117 - Embra1468
Pilodyn	<i>E. grandis</i>	10	3,0	7,0	Embra136 - Embra385
Pilodyn	<i>E. urophylla</i>	6	7,4	15,4	EN016 - Embra028
Pilodyn	<i>E. urophylla</i>	9	3,5	6,4	EG115 - Embra018
Pilodyn	<i>E. urophylla</i>	9	3,7	8,0	Embra109 - Embra357
Densidade	<i>E. grandis</i>	6	3,3	7,1	Embra020 - Embra081
Densidade	<i>E. grandis</i>	8	2,8	5,8	Embra692 ...*
Densidade	<i>E. urophylla</i>	3	2,9	6,6	EG061 ...
Glicana	<i>E. grandis</i>	6	3,1	6,5	Embra020 - Embra081
Glicana	<i>E. grandis</i>	9	2,7	10,1	Embra172 - Embra103
Glicana	<i>E. urophylla</i>	7	2,8	5,3	Embra069 - EN014
Xilana	<i>E. grandis</i>	8	2,9	6,0	Embra1175 - Embra082
Xilana	<i>E. urophylla</i>	4	4,3	9,5	ES054 - Embra662
Xilana	<i>E. urophylla</i>	10	5,7	16,6	Embra108 - Embra194
Ác. MeGu	<i>E. grandis</i>	4	3,2	8,0	Embra137 ...
Ác. MeGu	<i>E. urophylla</i>	4	6,3	11,7	Embra213 - Embra044
Ác. MeGu	<i>E. urophylla</i>	10	8,6	19,6	Embra022 - Embra385
Ác. MeGu	<i>E. urophylla</i>	10	3,0	5,6	Embra108 - Embra194
Ác. GaU	<i>E. urophylla</i>	4	3,5	7,6	ES054 - Embra662
Ác. GaU	<i>E. urophylla</i>	10	3,7	11,0	Embra108 - Embra194
Lignina	<i>E. grandis</i>	8	2,7	6,5	Embra139 - Embra057
Lignina	<i>E. grandis</i>	8	3,2	7,2	Embra053 - Embra1175
Lignina	<i>E. grandis</i>	10	3,8	7,6	Embra659 - Embra729
Lignina	<i>E. urophylla</i>	1	3,2	5,3	Embra006 - Embra676
Lignina	<i>E. urophylla</i>	4	8,5	13,1	Embra213 - Embra044
Lignina	<i>E. urophylla</i>	10	9,8	17,2	Embra136 - Embra385
Rel. S/G	<i>E. urophylla</i>	1	2,7	5,0	Embra006 - Embra676
Rel. S/G	<i>E. urophylla</i>	10	3,6	7,6	Embra136 - Embra022
Rel. S/G	<i>E. urophylla</i>	10	3,1	6,4	Embra106 - Embra624
Álcali efetivo	<i>E. grandis</i>	10	7,4	16,2	Embra136 - Embra022
Álcali efetivo	<i>E. urophylla</i>	6	4,0	7,7	Embra627 - Embra187
Álcali efetivo	<i>E. urophylla</i>	10	3,9	8,3	Embra194 - Embra624
Álcali efetivo	<i>E. urophylla</i>	11	3,0	7,4	Embra221 - Embra176
Rend. Dep.	<i>E. urophylla</i>	10	4,8	12,8	Embra106 - Embra194
Viscosidade	<i>E. grandis</i>	5	3,0	17,8	Embra138 - Embra1063
Viscosidade	<i>E. grandis</i>	10	6,8	13,2	Embra659 - Embra022
Viscosidade	<i>E. urophylla</i>	5	3,6	7,9	Embra152 - Embra160
Viscosidade	<i>E. urophylla</i>	6	3,8	7,6	Embra187 ...
Viscosidade	<i>E. urophylla</i>	11	3,0	7,1	Embra221 - Embra176
Extrativos	<i>E. grandis</i>	8	3,2	6,6	Embra692 ...
Extrativos	<i>E. grandis</i>	10	2,9	5,7	Embra136 - Embra385
Extrativos	<i>E. urophylla</i>	6	2,9	7,2	Embra646 - Embra1070

* Os três pontos indicam que o valor de LOD continua aumentando até a extremidade do grupo de ligação e que, portanto, não se tem nenhum marcador no outro flanco do QTL.

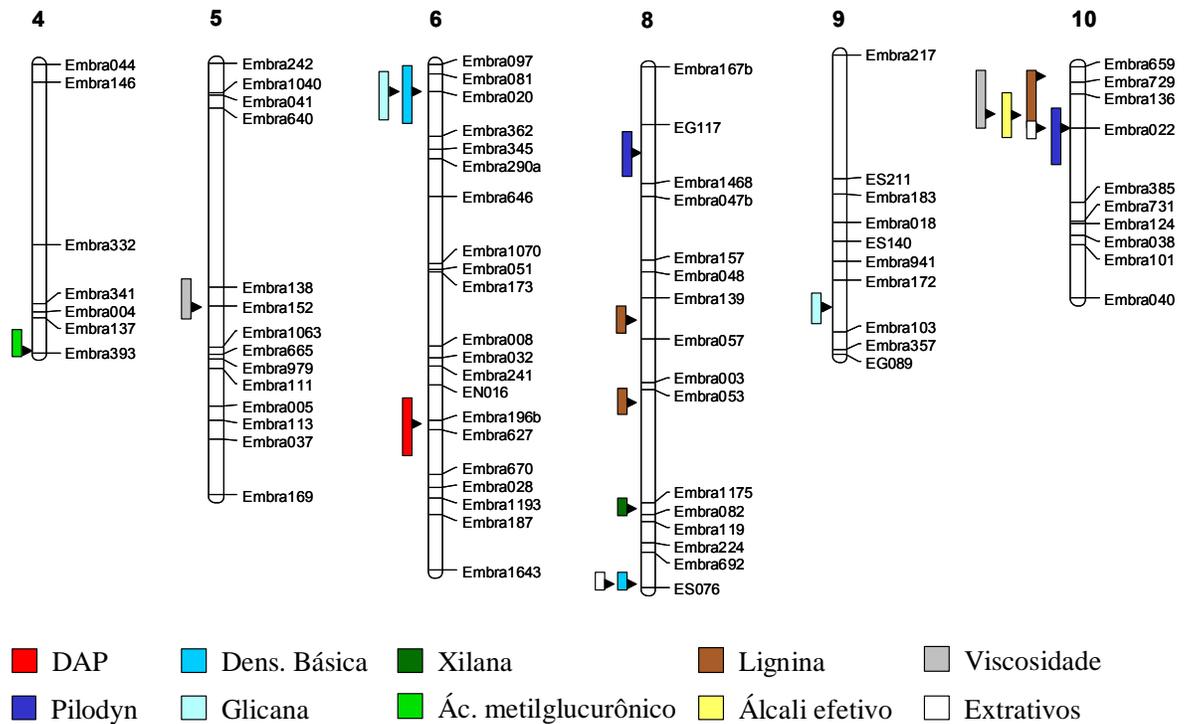


Figura 42. Localização dos QTLs, para todos os caracteres fenotípicos analisados, nos diferentes grupos de ligação do parental feminino (*E. grandis*). Apenas os grupos de ligação e as características para as quais mapeou-se QTLs estão demonstrados. As barras demonstram as regiões onde o valor de LOD ultrapassou o limiar definido pelo teste de permutação com nível de significância de 5% e as setas localizam a região de maior verossimilhança em cada QTL.

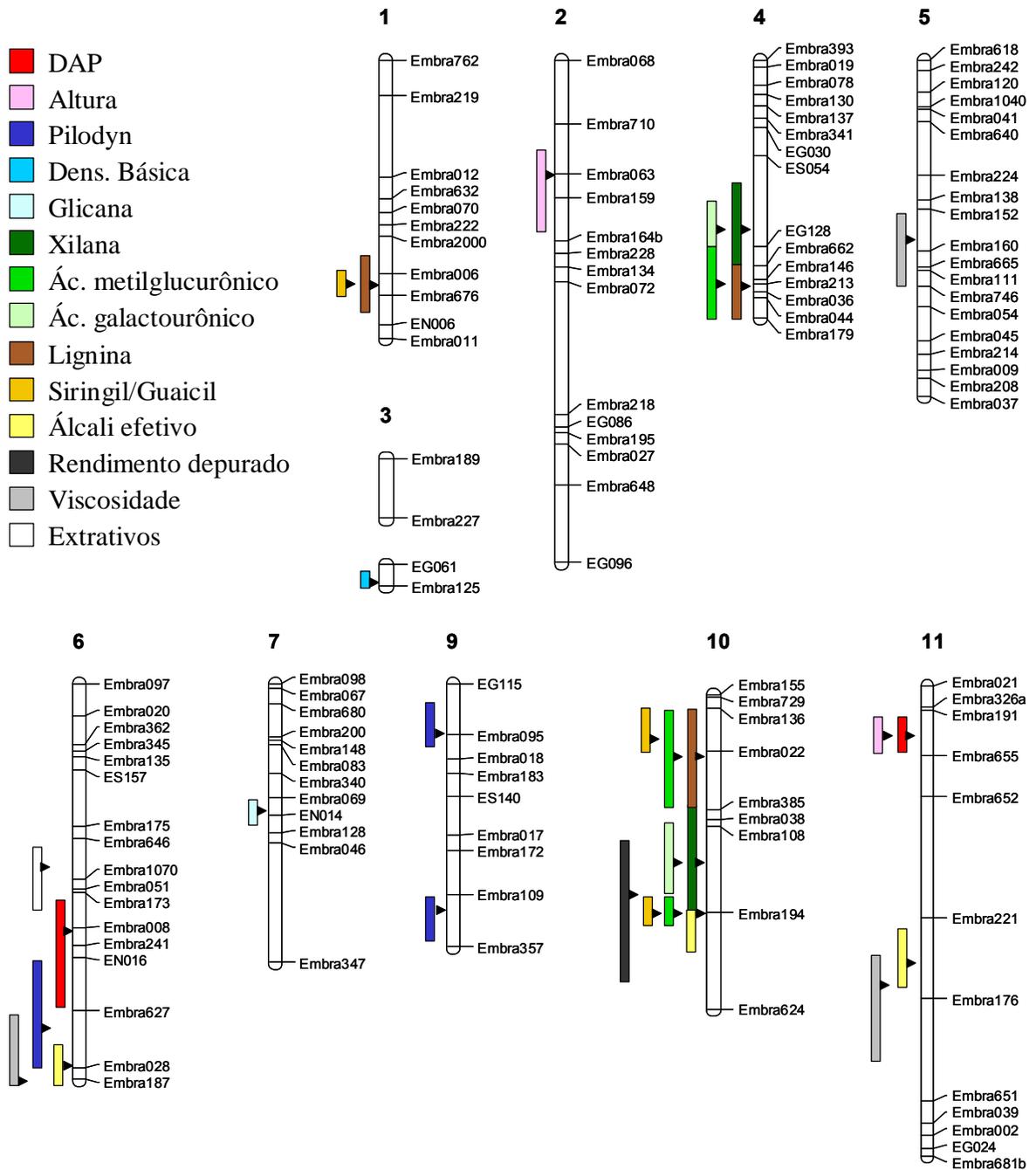


Figura 43. Localização dos QTLs, para todos os caracteres fenotípicos analisados, nos diferentes grupos de ligação do parental masculino (*E. urophylla*). Apenas os grupos de ligação onde foram mapeados QTLs estão demonstrados. As barras demonstram as regiões onde o valor de LOD ultrapassou o limiar definido pelo teste de permutação com nível de significância de 5% e as setas localizam a região de maior verossimilhança em cada QTL.

A co-localização de QTLs ocorreu principalmente nas características correlacionadas. No g.l. 6 do *E. grandis* (Figura 42) foram identificados QTLs na mesma posição para as características densidade básica e teor de glicana da madeira ($r_{xy} = -0,97$). O mesmo ocorreu no g.l. 10 do parental feminino para viscosidade da polpa celulósica e porcentagem de álcali efetivo utilizado na polpação ($r_{xy} = -0,67$) e no g.l. 8 desse mesmo parental para os caracteres densidade básica e teor de extrativos da madeira ($r_{xy} = -0,71$). Outra co-localização de QTLs ocorreu no g.l.10 também do parental feminino para os caracteres teor de extrativos da madeira e profundidade de penetração da haste do Pilodyn, mas esses caracteres não foram correlacionados ($r_{xy} = -0,03$).

No genoma do *E. urophylla*, um número ainda maior de QTLs ocorreram de forma co-localizada (Figura 43). Os caracteres teor de lignina e relação siringil/guaiacil ($r_{xy} = -0,75$) tiveram QTLs sobrepostos no g.l. 1 e g.l. 10. Altura e DAP ($r_{xy} = 0,72$) tiveram QTLs co-localizados no g.l. 11. Os açúcares xilana e ácido galactourônico ($r_{xy} = 0,95$) tiveram QTLs co-localizados no g.l. 4 e g.l. 10. Os caracteres viscosidade e álcali efetivo ($r_{xy} = -0,67$) mapearam QTLs sobrepostos nos grupos de ligação 6 e 11. Para o teor de lignina e de ácido metilglucurônico da madeira ($r_{xy} = -0,80$) QTLs co-localizados foram mapeados no g.l. 4 e g.l. 10. No g.l. 10 também houve duas co-localizações de QTLs para a relação siringil/guaiacil e ácido metilglucurônico ($r_{xy} = 0,61$).

O mapeamento de microssatélites completamente informativos em ambos parentais oferece a oportunidade de verificar a ocorrência de QTLs em regiões homólogas do genoma dos parentais. O caractere DAP teve QTLs mapeados na mesma região do g.l. 6 em ambos parentais. O mesmo ocorreu para os caracteres viscosidade da polpa celulósica no g.l. 5 e teor de lignina da madeira no g.l. 10.

3.6. Mapeamento de QTLs pela estratégia de pares de irmãos

Para o mapeamento de QTLs por intervalo através da estratégia de pares de irmãos, desenvolvida por Fulker e Cardon (1994), foi necessário a construção de um novo mapa integrado no programa GQMOL (Cruz e Schuster, 2004). Para esse mapeamento foram descartados 27 locos cujas proporções genótípicas observadas diferem das esperadas, de acordo com a primeira lei de Mendel, com um nível de significância de 1% pelo teste de X^2 . Também não foram incluídos 14 locos que possuem mais de 20 indivíduos com dados genótipos perdidos devido às falhas na PCR e 26 locos que não tiveram um suporte estatístico para o seu ordenamento (“jump threshold” maior do que 5,0) no mapa integrado construído no JoinMap. Dos 168 locos restantes, 166 mapearam em 11 grupos de ligação, cujos comprimentos variaram de 54,6 a 120,8 cM (Figura 44). O comprimento total do mapa foi de 919,2 cM, com um intervalo médio entre marcadores de 5,5 cM. A maior distância entre dois marcadores foi de 33,3 cM e ocorreu entre o Embra046 e o Embra347 em uma das extremidades do grupo de ligação 7.

Para a análise comparativa da metodologia de mapeamento de QTLs no mapa integrado por meio da estratégia de pares de irmãos de Fulker e Cardon com o mapeamento de QTLs em cada parental separadamente, foram escolhidos os quatro caracteres com o maior número de QTLs mapeados através da estratégia de pseudo-cruzamento teste, sendo elas: profundidade de penetração do Pilodyn, teor de lignina da madeira, porcentagem de álcali efetivo utilizado na polpação e viscosidade da polpa celulósica. Nesses quatro caracteres foram realizadas as análises de mapeamento de QTLs por intervalo através da estratégia de pares de irmãos de Fulker e Cardon (1994).

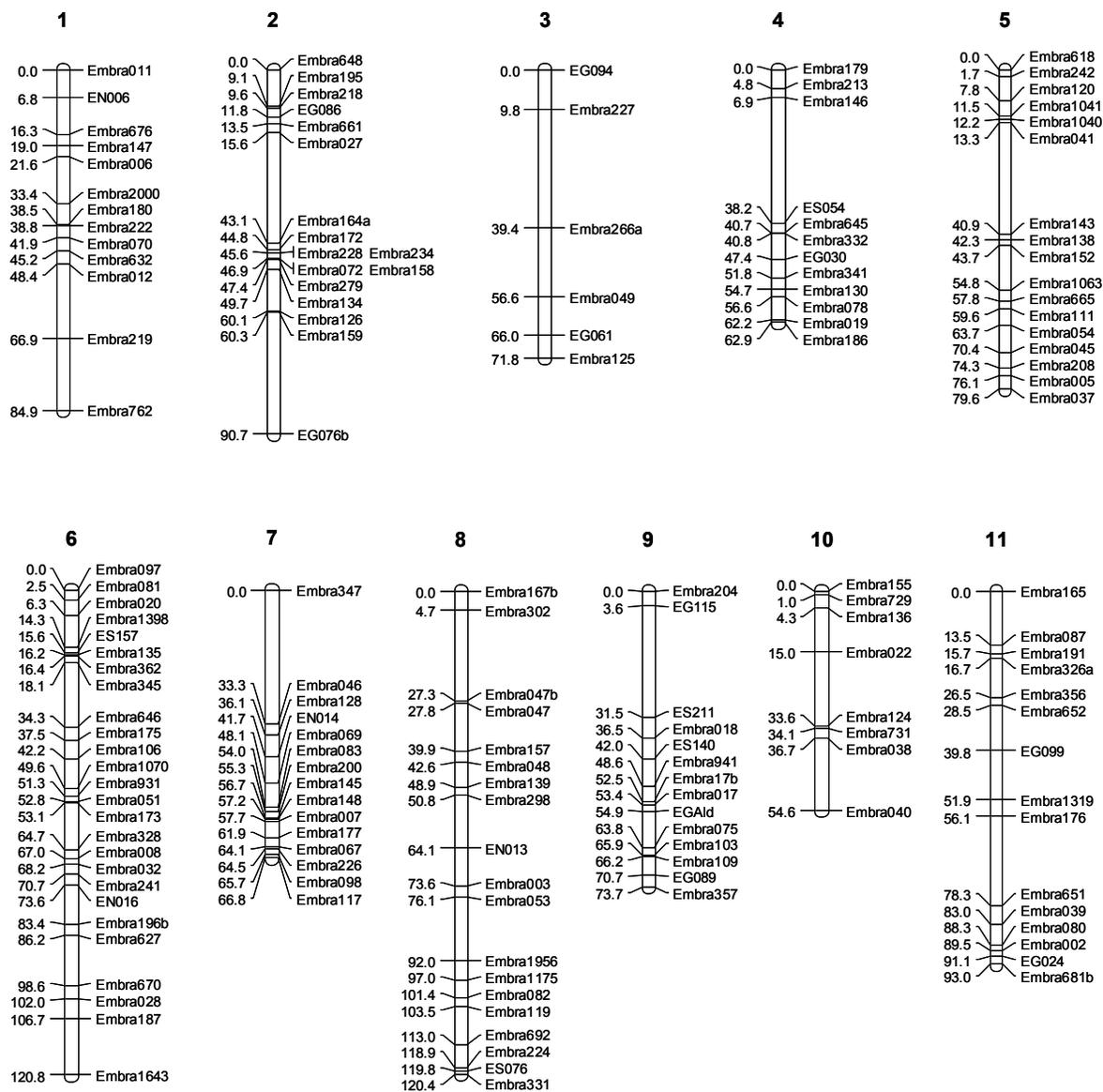
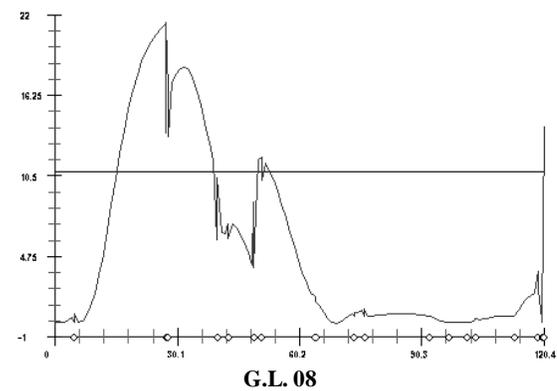
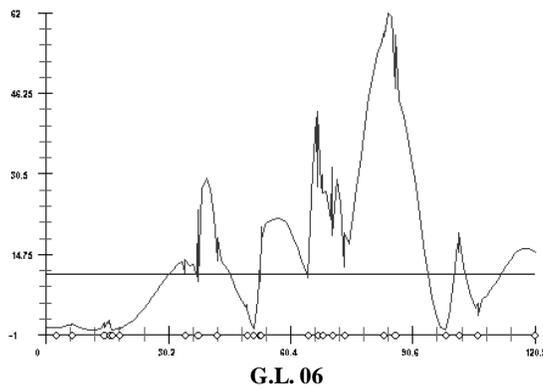
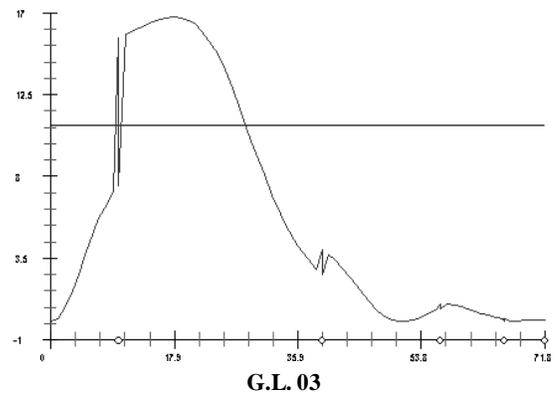
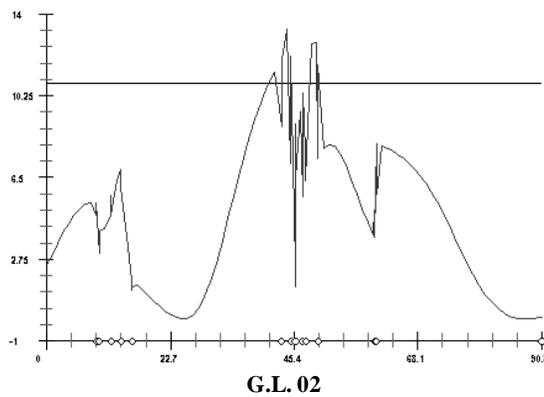


Figura 44. Mapa genético construído no QGMOL para mapeamento de QTLs pela estratégia de pares de irmãos de Fulker e Cardon. O mapa é constituído por 166 marcadores microssatélites genotipados em uma família de 188 irmãos-completos de *E. grandis* x *E. urophylla*. Os grupos de ligação estão numerados de acordo com o mapa genético referência para o gênero *Eucalyptus* (Brondani et al., 2002).

3.6.1. Mapeamento de QTLs para profundidade de penetração do Pilodyn

Para a característica profundidade de penetração da haste do Pilodyn foram mapeados 6 QTLs através da estratégia de pares de irmãos. Esses QTLs localizaram-se nos grupos de ligação 2, 3, 6, 8, 9 e 10 e seus valores de estatística F na região de maior verossimilhança foram 13, 17, 62, 22, 21 e 17, respectivamente (Figura 45).



Continua...

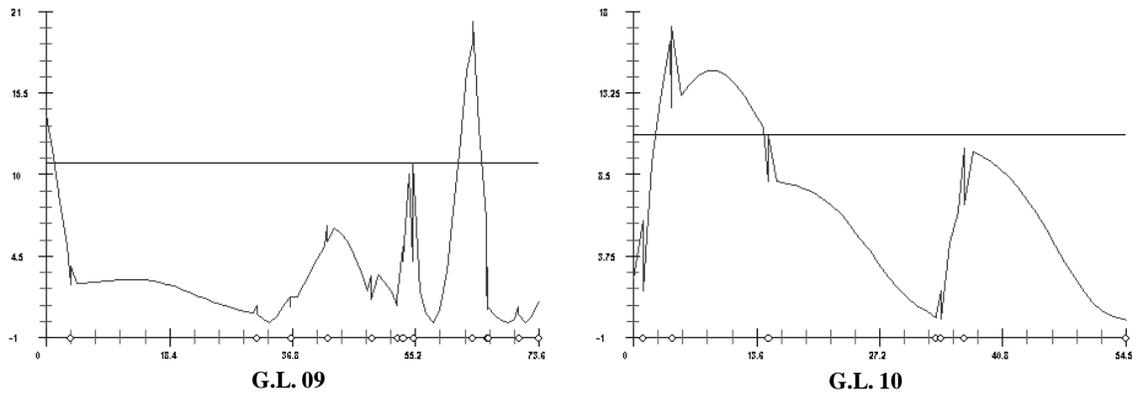


Figura 45. Gráficos gerados pelo GQMOL demonstrando os QTLs para penetração do Pilodyn mapeados através da estratégia de pares de irmãos nos grupos de ligação 2, 3, 6, 8, 9 e 10. Eixo Y: valor de F; Eixo X: distâncias genéticas em cM entre os marcadores (representados por círculos abertos) do grupo de ligação. O nível de significância definido foi de 0,1% ($F = 10,8$).

3.6.2. Mapeamento de QTLs para teor de lignina da madeira

Para o teor de lignina da madeira foram mapeados 5 QTLs através da estratégia de pares de irmãos. Esses QTLs localizaram-se nos grupos de ligação 3, 4, 9 e 10, sendo que no g.l. 10 foram identificados 2 QTLs. Os valores da estatística F na região de maior verossimilhança desses QTLs foram 14, 32, 19, 106 e 43, respectivamente nesses grupos de ligação (Figura 46).

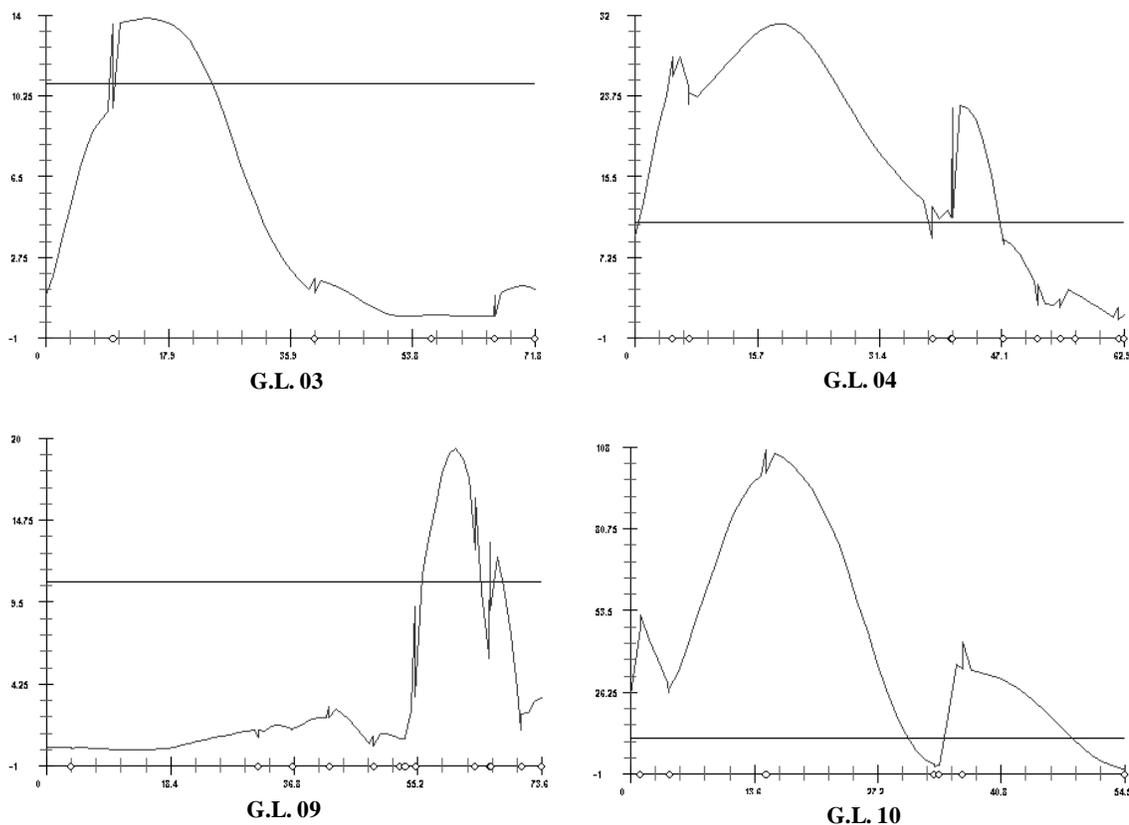


Figura 46. Gráficos gerados pelo QMOL demonstrando os QTLs para teor de lignina da madeira mapeados através da estratégia de pares de irmãos nos grupos de ligação 3, 4, 9 e 10. Eixo Y: valor de F; Eixo X: distâncias genéticas em cM entre os marcadores (representados por círculos abertos) do grupo de ligação. O nível de significância definido foi de 0,1% ($F = 10,8$).

3.6.3. Mapeamento de QTLs para porcentagem de álcali efetivo utilizado no processo de polpação

Para a porcentagem de álcali efetivo foram mapeados 3 QTLs através da estratégia de pares de irmãos. Esses QTLs localizaram-se nos grupos de ligação 6, 10 e 11 e seus valores de estatística F na região de maior verossimilhança foram 13, 91 e 16, respectivamente (Figura 47).

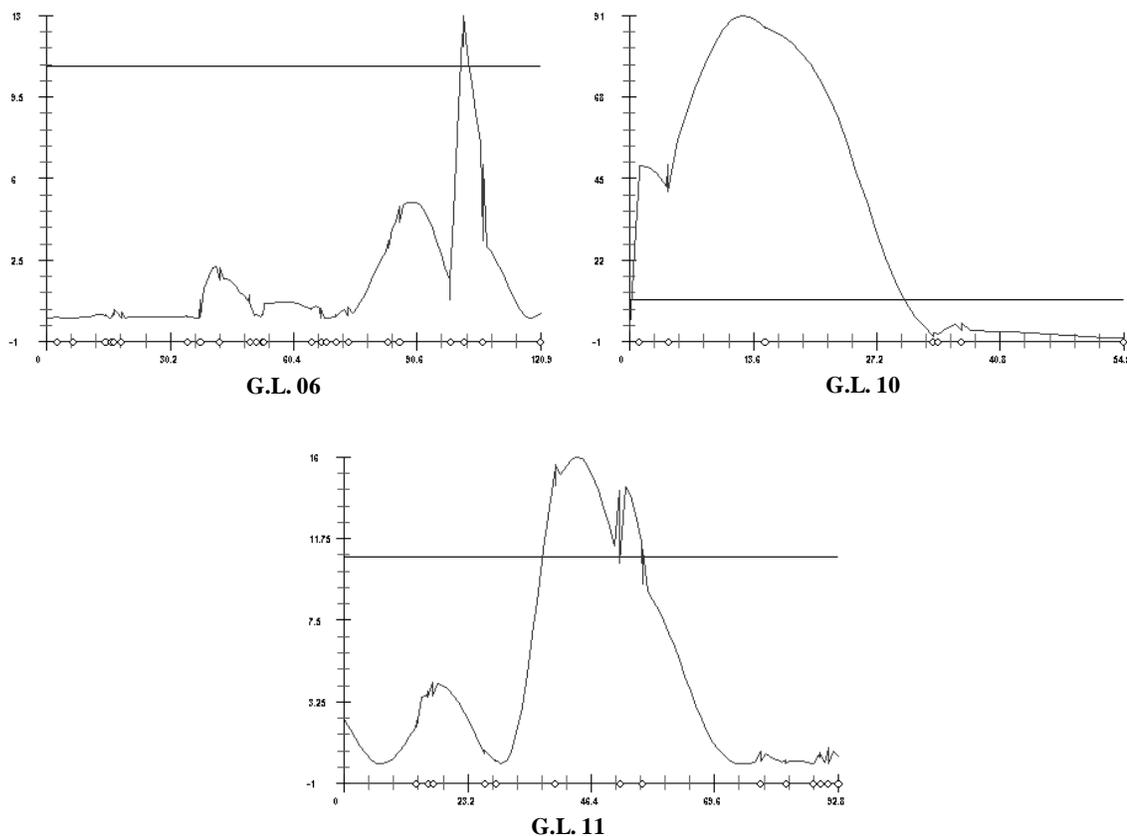


Figura 47. Gráficos gerados pelo QQMOL demonstrando os QTLs para álcali efetivo mapeados através da estratégia de pares de irmãos nos grupos de ligação 6, 10 e 11. Eixo Y: valor de F; Eixo X: distâncias genéticas em cM entre os marcadores (representados por círculos abertos) do grupo de ligação. O nível de significância definido foi de 0,1% ($F = 10,8$).

3.6.4. Mapeamento de QTLs para viscosidade da polpa celulósica

Para a viscosidade da polpa celulósica foram mapeados 5 QTLs através da estratégia de pares de irmãos. Esses QTLs localizaram-se nos grupos de ligação 5, 6, 9, 10 e 11, sendo seus valores de estatística F na região de maior verossimilhança iguais a 24, 13, 21, 84 e 23 respectivamente (Figura 48).

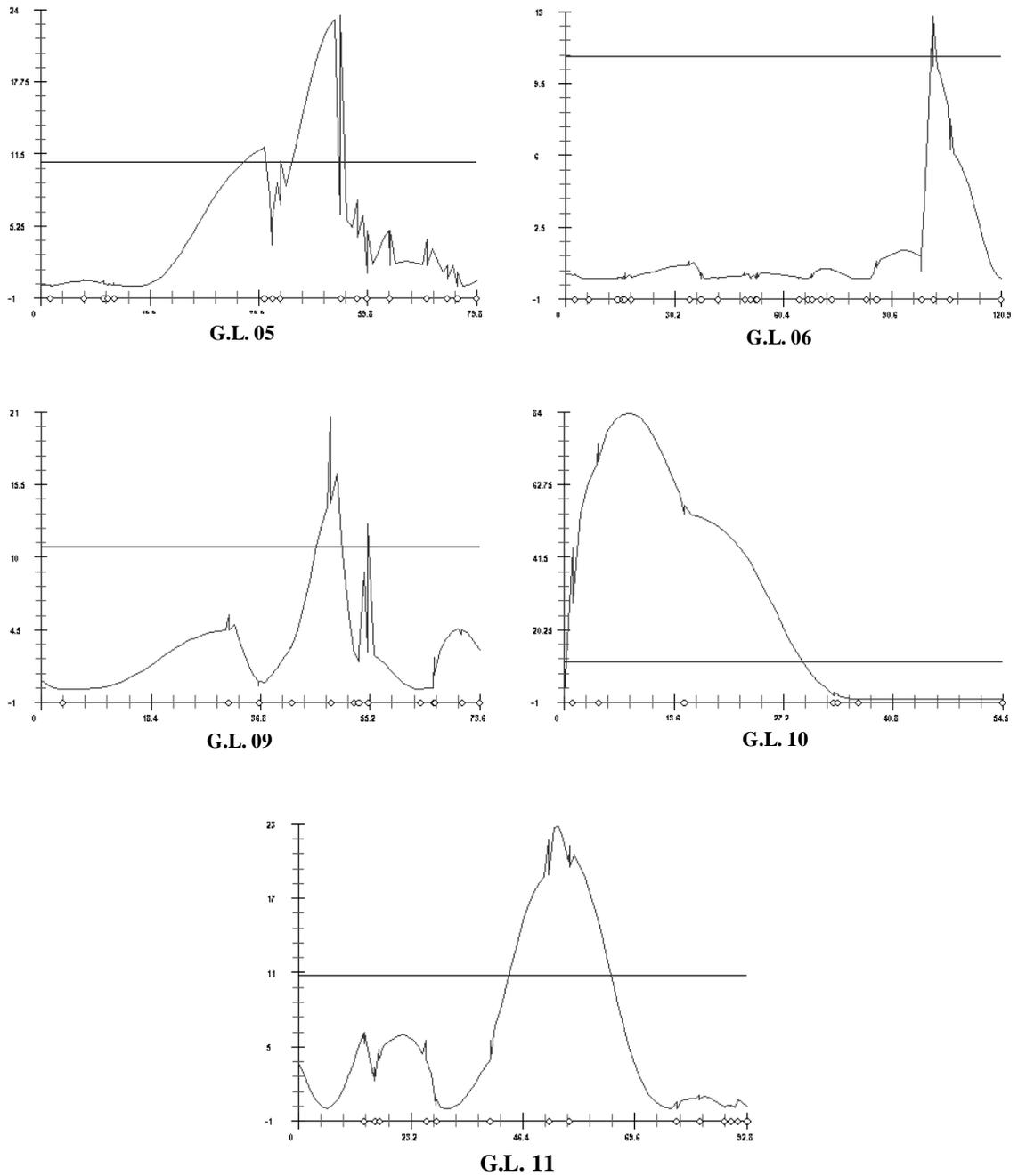


Figura 48. Gráficos gerados pelo QQMOL demonstrando os QTLs para viscosidade da polpa celulósica mapeados através da estratégia de pares de irmãos nos grupos de ligação 5, 6, 9, 10 e 11. Eixo Y: valor de F; Eixo X distâncias genéticas em cM entre os marcadores (representados por círculos abertos) do grupo de ligação. O nível de significância definido foi de 0,1% ($F = 10,8$).

3.7. Análise comparativa dos QTLs mapeados por intervalo pela estratégia de pares de irmãos e de pseudo-cruzamento teste

Para comparação da metodologia de mapeamento de QTLs no mapa integrado através da estratégia de pares de irmãos (Fulker e Cardon, 1994) com o mapeamento de QTLs nos mapas de cada parental separadamente através de intervalo simples (Lander e Botstein, 1989) e composto (Zeng, 1994), o mapa integrado construído no GQMOL foi alinhado com os mapas do pseudo-cruzamento teste construídos no MapMaker. Nos grupos de ligação alinhados foram identificados os QTLs mapeados por essas diferentes estratégias para as 4 características selecionadas: penetração do Pilodyn, teor de lignina da madeira, álcali efetivo utilizado na polpação e viscosidade da polpa celulósica.

3.7.1. Análise comparativa dos QTLs mapeados para profundidade de penetração do Pilodyn

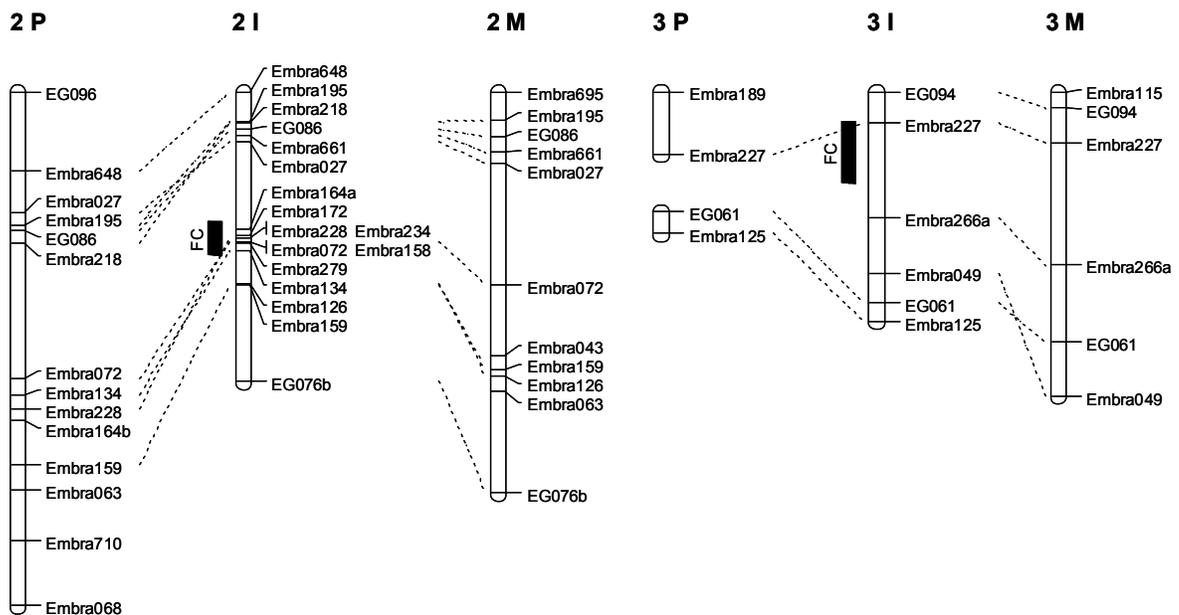
A comparação das localizações dos QTLs para penetração do Pilodyn detectados no genoma de cada parental pela estratégia de pseudo-cruzamento teste com aqueles detectados no mapa integrado pela estratégia de pares de irmãos estão demonstradas na Figura 49.

Os QTLs detectados através da estratégia de pares de irmãos nos grupos de ligação 2I e 3I não foram detectados, através das metodologias clássicas de mapeamento por intervalo simples e composto, nos respectivos grupos de ligação dos mapas do pseudo-testcross. As significâncias desses QTLs foram, juntamente com aquele localizado no g.l. 10I, as menores dentre os QTLs detectados pela estratégia de pares de irmãos.

Também não houve coincidência entre o posicionamento dos QTLs identificados nos grupos de ligação 9P e 9I. Isso deve ter ocorrido porque foram detectados 2 QTLs por intervalo composto no parental masculino, o que pode

dificultar a localização precisa desses sem a utilização de co-fatores em regressões múltiplas.

Por outro lado, os QTLs dos grupos de ligação 6, 8 e 10 foram detectados tanto através da análise do genoma de cada parental separadamente, pela estratégia de pseudo-cruzamento teste, como através da análise do mapa integrado, pela estratégia de pares de irmãos. Esses QTLs detectados por essas estratégias foram localizados nas mesmas regiões do genoma. O QTL de maior significância pela estratégia de pares de irmãos localizado no g.l. 6I também foi o QTL de maior significância nas análises por pseudo-cruzamento teste, sendo detectado no parental masculino (g.l. 6P). Os QTLs dos grupos de ligação 8M e 10M, só puderam ser detectados através da inclusão de co-fatores por meio do mapeamento por intervalo composto.



Continua...

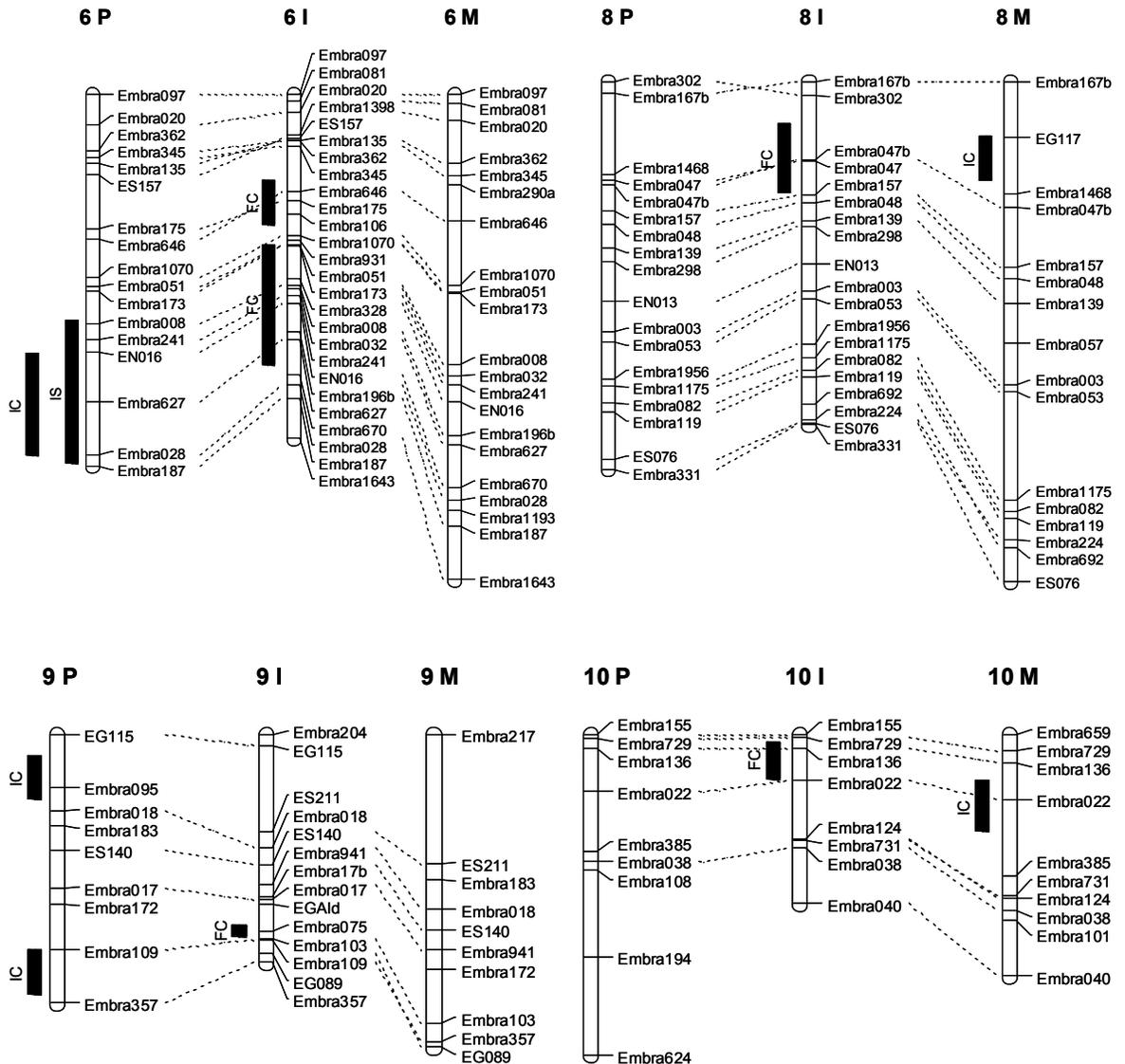


Figura 49. Grupos de ligação onde foram localizados QTLs para penetração do Pilodyn pelos métodos: regressão de pares de irmãos de Fulker e Cardon (barras identificadas por FC), mapeamento por intervalo simples (barras identificadas por IS) e mapeamento por intervalo composto (barras identificadas por IC). Os grupos de ligação do parental masculino, feminino e integrado, identificados com as letras P, M e I, respectivamente, estão alinhados para permitir a comparação do posicionamento dos QTLs. Linhas pontilhadas ligam locos microssatélites comuns nos diferentes mapas.

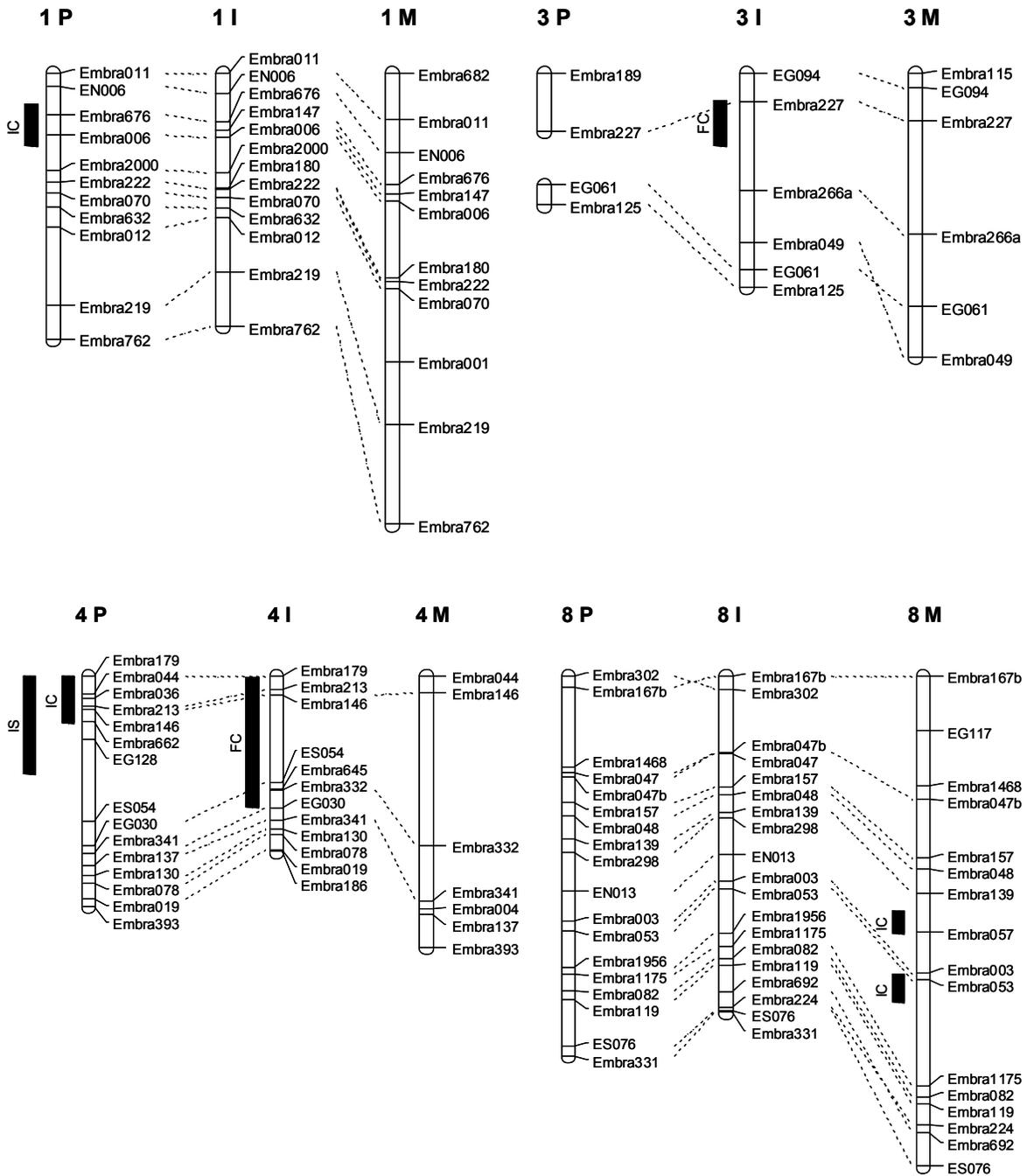
3.7.2. Análise comparativa dos QTLs mapeados para teor de lignina da madeira

A comparação das localizações dos QTLs para teor de lignina da madeira detectados no genoma de cada parental pela estratégia de pseudo-cruzamento teste com aqueles detectados no mapa integrado pela estratégia de pares de irmãos estão demonstradas na Figura 50.

Os QTLs detectados através da estratégia de pares de irmãos nos grupos de ligação 3I e 9I não foram detectados nos mapas do pseudo-cruzamento teste através do mapeamento por intervalo simples e composto. O nível de significância desses QTLs foram os menores detectados pela estratégia de pares de irmãos.

Por outro lado, os QTLs detectados através do mapeamento por intervalo compostos nos grupos de ligação 1P e 8M não foram detectados pela estratégia de pares de irmãos. Isso pode ser explicado pela baixa significância desses QTLs quando não são utilizados co-fatores para controle de parte da variabilidade residual. No caso do grupo de ligação 8M, a detecção dos QTLs pela estratégia de pares de irmãos é ainda mais complicado porque nesse grupo foram detectados dois QTLs geneticamente ligados. A não detecção de QTL no g.l. 11I pela estratégia de pares de irmãos é mais difícil de ser explicada, uma vez que no g.l. 11P foi detectado QTL sem a inclusão de co-fatores (intervalo simples).

Por outro lado, também para o teor de lignina da madeira, os QTLs de maior significância detectados através da estratégia de pares de irmãos também foram os de maior significância na análise do genoma de cada parental pela estratégia de pseudo-cruzamento teste. Um desses QTLs co-localizou-se nos grupos de ligação 4P e 4I. O outro co-localizou-se nos grupos 10P e 10I. Esses QTLs foram localizados no genoma do parental masculino tanto por intervalo simples como por intervalo composto.



Continua...

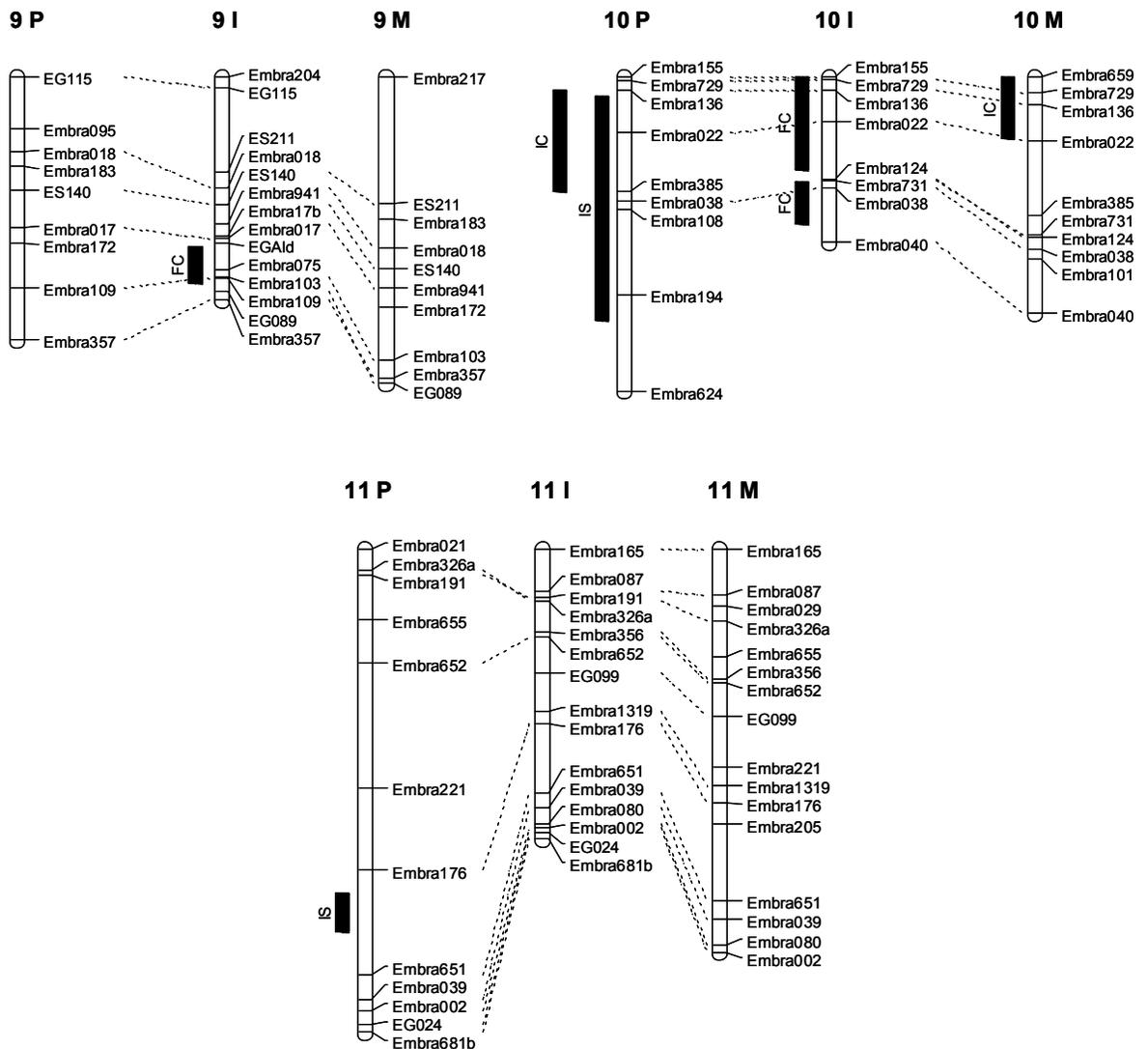


Figura 50. Grupos de ligação onde foram localizados QTLs para teor de lignina da madeira pelos métodos: regressão de pares de irmãos de Fulker e Cardon (barras identificadas por FC), mapeamento por intervalo simples (barras identificadas por IS) e mapeamento por intervalo composto (barras identificadas por IC). Os grupos de ligação do parental masculino, feminino e integrado, identificados com as letras P, M e I, respectivamente, estão alinhados para permitir a comparação do posicionamento dos QTLs. Linhas pontilhadas ligam locos microssatélites comuns nos diferentes mapas.

3.7.3. Análise comparativa dos QTLs mapeados para porcentagem de álcali efetivo utilizado no processo de polpação

A comparação das localizações dos QTLs para porcentagem de álcali efetivo detectados no genoma de cada parental por meio da estratégia de pseudo-cruzamento teste com aqueles detectados no mapa integrado pela estratégia de pares de irmãos estão demonstradas na Figura 51.

Para essa característica, todos os QTLs detectados no mapa integrado pela estratégia de pares de irmãos também foram detectados nas análises dos mapas de cada parental através do mapeamento por intervalo composto. A recíproca também ocorreu para todos os QTLs detectados pela estratégia de pseudo-cruzamento teste.

Os QTLs de menor significância detectados pela estratégia de pares de irmãos, grupos de ligação 6I e 11I, só puderam ser detectados nos mapas de cada parental através do mapeamento por intervalo composto. Nessas regiões, sem a inclusão dos co-fatores (mapeamento por intervalo simples) os valores de LOD não ultrapassaram o nível crítico.

Por outro lado, novamente o QTL de maior significância detectado pela estratégia de pares de irmãos (g.I. 10I), também foi o QTL de maior valor de LOD nas análises por meio do pseudo-cruzamento teste (g.I. 10M). Esse QTL foi detectado tanto através do mapeamento por intervalo simples como por intervalo composto.

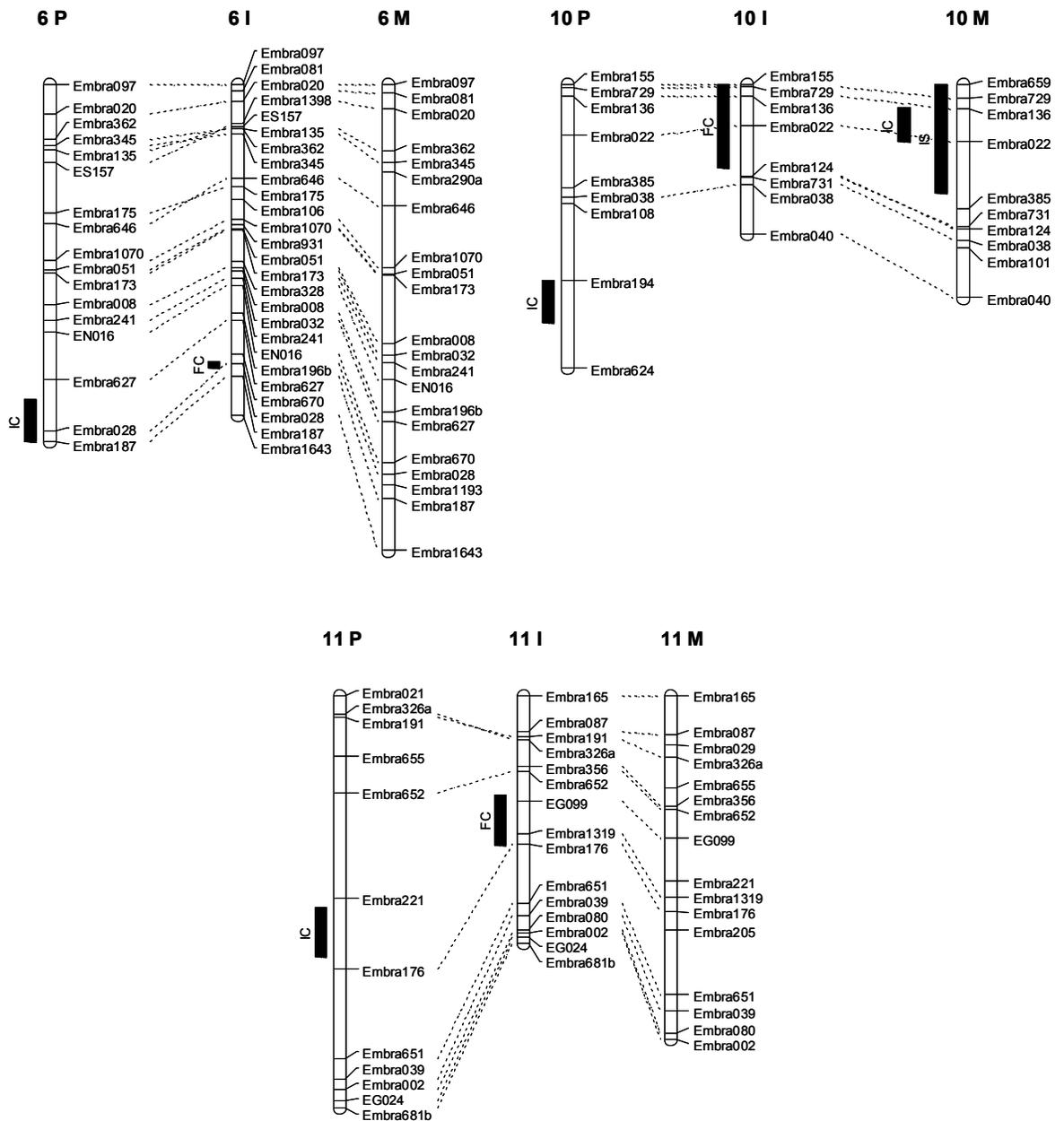


Figura 51. Grupos de ligação onde foram localizados QTLs para álcali efetivo pelos métodos: regressão de pares de irmãos de Fulker e Cardon (barras identificadas por FC), mapeamento por intervalo simples (barras identificadas por IS) e mapeamento por intervalo composto (barras identificadas por IC). Os grupos de ligação do parental masculino, feminino e integrado, identificados com as letras P, M e I, respectivamente, estão alinhados para permitir a comparação do posicionamento dos QTLs. Linhas pontilhadas ligam locos microsatélites comuns nos diferentes mapas.

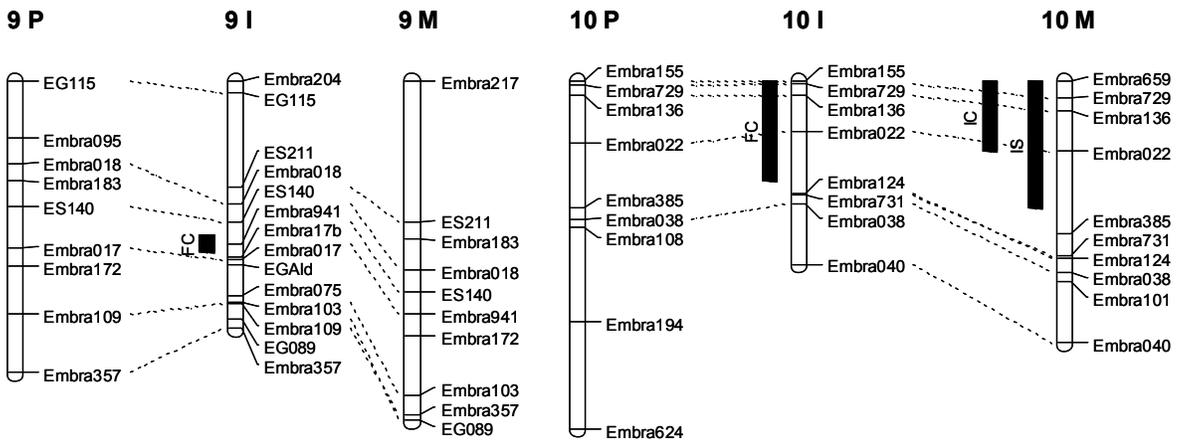
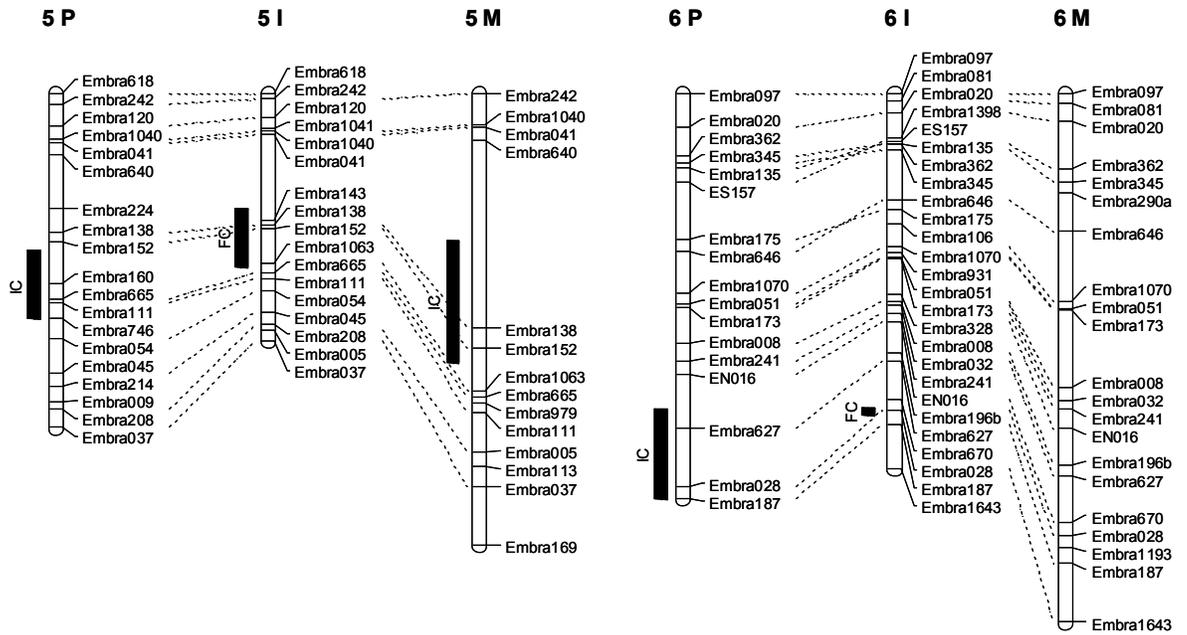
3.7.4. Análise comparativa dos QTLs mapeados para viscosidade da polpa celulósica

A comparação das localizações dos QTLs para viscosidade da polpa detectados nos mapas de cada parental por meio da estratégia de pseudo-cruzamento teste com aqueles detectados no mapa integrado pela estratégia de pares de irmãos estão demonstradas na Figura 52.

Para essa característica, os QTLs detectados pela estratégia de pares de irmãos, com exceção daquele detectado no g.l. 9I, também foram detectados por meio da estratégia de pseudo-cruzamento teste. Da mesma maneira, todos os QTLs detectados nas análises dos mapas de cada parental separadamente também foram detectados por meio da estratégia de pares de irmãos.

O QTL detectado no grupo de ligação 9I possui valor de F relativamente baixo ($F=23$), mas o de menor valor de F é aquele localizado no g.l. 6I. Apesar disso, o QTL do grupo de ligação 6 também foi detectado no genoma do parental masculino (g.l. 6P), já o do g.l. 9 não foi detectado em nenhum dos mapas do pseudo-cruzamento teste.

Também para a viscosidade da polpa celulósica, os QTLs de maior significância pela estratégia de pares de irmãos (g.l. 10I) como pela de pseudo-cruzamento teste (g.l. 10M), foram coincidentes.



Continua...

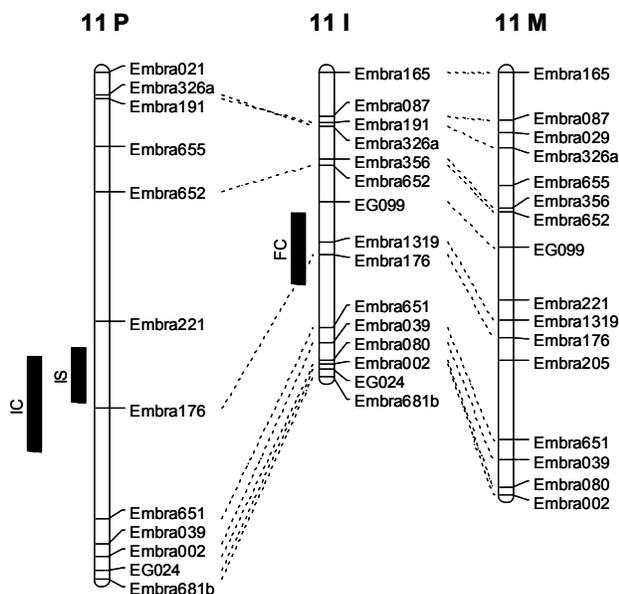


Figura 52. Grupos de ligação onde foram localizados QTLs para viscosidade da polpa celulósica pelos métodos: regressão de pares de irmãos de Fulker e Cardon (barras identificadas por FC), mapeamento por intervalo simples (barras identificadas por IS) e mapeamento por intervalo composto (barras identificadas por IC). Os grupos de ligação do parental masculino, feminino e integrado, identificados com as letras P, M e I, respectivamente, estão alinhados para permitir a comparação do posicionamento dos QTLs. Linhas pontilhadas ligam locos microssatélites comuns nos diferentes mapas.

4 - DISCUSSÃO

Foram genotipados 235 locos microssatélites em 188 irmãos completos de um cruzamento entre *E. grandis* e *E. urophylla*. O número de marcadores foi adequado para cobrir de forma satisfatória os 11 grupos de ligação do mapa referência de *Eucalyptus* (Brondani et al., 2002). Dois outros trabalhos também utilizaram uma família de irmãos-completos proveniente de um cruzamento entre *E. grandis* x *E. urophylla* para construção de mapas pela estratégia de pseudo-cruzamento teste (Grattapaglia e Sederoff, 1994; Verhaegen e Plomion, 1996). Os comprimentos totais desses mapas variaram de 1101 a 1552 cM, o que está próximo dos valores 1311 e 1116 cM encontrados nos mapas dos parentais *E. grandis* e *E. urophylla* no presente trabalho.

Esses mapas genéticos gerados para cada parental por meio do programa MapMaker possuem comprimentos totais maiores quando comparados ao mapa integrado gerado pelo JoinMap (950,8 cM). Esse comportamento não era esperado já que em ambos programas foi utilizada a mesma função de mapeamento e nos mapas do pseudo-cruzamento teste foram utilizados um número menor de marcadores, já que alguns não segregaram em um dos parentais e outros foram descartados para garantir o suporte estatístico para o ordenamento. Essa diferença nas frequências de recombinação entre os locos pode ser causada por uma diferença nos algoritmos de análise multiloco utilizados no cálculo das distâncias genéticas.

A colinearidade entre os marcadores completamente informativos localizados nos mapas de ambos parentais, visualizada no alinhamento dos grupos de ligação (Figura 3), demonstra que os mapas gerados por meio da estratégia de pseudo-cruzamento teste foram bem ordenados. Somente duas inversões de ordem, uma no g.l. 2 e outra no g.l. 9, foram observados nesses mapas.

O fato de haver um maior número de marcadores (16% a mais) segregando no parental masculino em relação ao feminino é um indicativo de uma maior heterozigiosidade no genitor *E. urophylla*. Essa maior heterozigiosidade pode explicar o maior número de QTLs identificados por intervalo composto nesse parental. Outra explicação seria uma maior cobertura do genoma pelo mapa genético do *E. urophylla* devido ao maior número de locos segregantes. Porém, o alinhamento dos mapas dos dois parentais, indica que esse parece não ser o caso. A avaliação da heterozigiosidade dos indivíduos poderia ser conduzida *a priori* para auxiliar na escolha dos genitores a serem utilizados em cruzamentos para a detecção de QTLs.

Muitos dos caracteres fenotípicos utilizados para a detecção de QTLs tiveram baixa variabilidade na família de irmãos-completos deste trabalho. Os caracteres teor de xilana, teor de ácido metilglucurônico, teor de ácido galactourônico, teor de lignina e rendimento depurado, tiveram coeficientes de variação (CV) menores do que 5,0. Os caracteres densidade básica da madeira e teor de glicana foram ainda menos variáveis, com CV menores do que 2,0. A baixa variabilidade em caracteres quantitativos pode ser indicativo de uma menor heterozigiosidade nos QTLs, o que dificultaria suas detecções. Porém, apesar da baixa variabilidade encontrada nesses caracteres, foi possível a detecção de QTLs, tanto pela análise de marcas individuais como pelo mapeamento por intervalo composto, para todas as 14 características fenotipadas na família de irmãos-completos. Isso demonstra que uma porção dessa pequena variabilidade é devido a efeitos genéticos, ou seja, há heterozigiosidade nos QTLs e os alelos desses locos possuem diferenças de efeitos médios suficientemente grandes para

permitir a detecção do QTL em uma família de 188 irmãos-completos com um nível de 5% de significância.

O fato de se ter detectado QTLs para todas as características também surpreende devido à forma como os dados fenotípicos foram coletados. As análises das características foram feitas uma única vez, em árvores individuais, dispostas no campo sem um delineamento estatístico. A inexistência de repetições nas fenotipagens tende a dificultar a detecção de QTLs devido ao excesso de variação ambiental. A detecção de QTLs com grande significância estatística e que explicam grande porção da variabilidade fenotípica, fazem com que nesse cruzamento seja potencialmente interessante a realização de um mapeamento de maior resolução, diminuindo as distâncias entre marcadores e regiões genômicas de interesse para eventuais clonagens posicionais de genes. Nesse sentido, essa população foi clonada e plantada, pelo projeto Genolyptus, com delineamentos experimentais em três diferentes regiões de relevância para a eucaliptocultura nacional. Esses plantios estão com três anos de idade, e as primeiras coletas de dados fenotípicos estão sendo conduzidas. Assim, as genotipagens aqui realizadas serão aproveitadas para mapeamento de QTLs com dados potencialmente mais acurados, que refletem de maneira mais precisa as diferenças genotípicas entre os indivíduos. Será interessante fazer uma comparação entre o número, posição e magnitude de efeito dos QTLs mapeados neste trabalho com aqueles mapeados com base nas populações dos experimentos do Genolyptus. Com isso, espera-se mapear QTLs com maior precisão tendo em vista a maior herdabilidade das características avaliadas em nível de média de clone e não apenas de indivíduo único. Esse delineamento experimental, também permitirá as análises da estabilidade do efeito dos QTLs nesses diferentes ambientes, informação extremamente útil para utilização dos alelos desses QTLs na prática do melhoramento florestal.

Ainda com relação ao melhoramento florestal, vale destacar alguns QTLs que explicam grande proporção da variabilidade fenotípica encontrada em caracteres de interesse para a indústria de celulose e papel. Como os genitores da família de irmãos completos desse trabalho são árvores elite, provavelmente

utilizados em populações de melhoramento clássico da Votorantim Celulose e Papel (VCP), as informações de mapeamento de QTLs podem ser extremamente úteis para propor experimentos de seleção assistida por marcadores em descendências derivadas destes genitores. Assim, levando em conta a importância da densidade básica da madeira no processo de extração da celulose, o QTL identificado no g.l. 6 do *E. urophylla*, que explica 15,4% das variações na penetração do Pilodyn, tem potencial importante para auxiliar o melhoramento. Para o teor de lignina da madeira foram identificados dois QTLs com grande efeito, um no g.l. 4 e outro no g.l. 10 do parental *E. urophylla*, que explicam 13% e 17% da variação fenotípica. Com relação aos carboidratos xilana e ácido metilglucurônico, principais constituintes da fração hemicelulósica da madeira de eudicotiledôneas, QTLs de grande efeito também foram identificados no g.l. 10 do *E. urophylla*. Nesse mesmo g.l. 10 do parental masculino também foi encontrado um QTL para rendimento depurado que explica 13% da sua variabilidade na população. Outro QTL interessante para a indústria de celulose foi localizado no g.l. 10 do parental *E. grandis* e explica 16% da variação na porcentagem de álcali efetivo utilizado na polpação. Outros dois QTLs, identificados no g.l. 5 e g.l. 10 do parental *E. grandis* para viscosidade da polpa celulósica, explicam uma grande proporção da variabilidade fenotípica. Pela importância desses caracteres na definição da qualidade da madeira para o processo de extração da celulose, os microssatélites flanqueadores desses QTLs podem ser utilizados como guias em seleções assistidas por marcadores. Os alelos favoráveis desses QTLs podem ser positivamente selecionados ou, alternativamente, os alelos desfavoráveis podem ser negativamente selecionados com base nos microssatélites, auxiliando os processos seletivos do melhoramento florestal clássico. É importante destacar que o tamanho da progênie do presente trabalho é relativamente pequeno. Essas populações tendem a superestimar os efeitos dos QTLs, como foi demonstrado e discutido por Brown et al. (2003) em populações de *Pinus*. Com isso, muitos desses QTLs aqui identificados, deverão ter o seu nível de significância diminuído em populações de mapeamento maiores.

Do ponto de vista das análises estatísticas, em geral, nas regiões onde foram localizados QTLs pelo mapeamento por intervalo composto também foram identificados marcadores significativamente ligados a QTLs pela análise de variância das marcas individualmente. Isso só não ocorreu com alguns poucos QTLs de efeito extremamente pequeno ou em grupos de ligação com QTLs geneticamente ligados, cujos alelos de efeitos opostos estão no mesmo cromossomo homólogo. Esses QTLs só puderam ser localizados com a inclusão de co-fatores em regressão múltipla. Por outro lado, muitos dos marcadores identificados como significativamente ligados a QTLs pela análise de variância foram localizados em regiões onde o valor de LOD não ultrapassou o limiar estatístico do mapeamento por intervalo composto, seja no genoma do parental masculino ou feminino. A primeira explicação para isso pode estar no fato de que os efeitos da interação entre os alelos dos dois parentais (dominância) estão sendo testados na análise de variância, já no mapeamento de QTLs por intervalo composto este efeito está confundido com a aditividade, uma vez que a segregação dos marcadores e, portanto, dos QTLs está sendo avaliada no genoma de cada parental separadamente. Outro fato que pode contribuir para uma maior ocorrência de erros do tipo I nas análises de marcas individuais é que a maioria das características fenotípicas avaliadas apresentou desvios de normalidade pelo teste de Lilliefors com um nível de 5% de significância (dados não mostrados). As únicas características cuja hipótese H_0 de normalidade dos dados não foi descartada foram: teor de xilana, teor de ácido metilglucurônico, relação siringil/guaiacil, teor de lignina, rendimento depurado e viscosidade da polpa. Os desvios de normalidade tornam imprecisa a definição do nível de significância da ANOVA através da distribuição F. No caso do mapeamento de QTLs por intervalo composto, como o nível de significância foi definido por meio de permutações dos próprios dados fenotípicos, os desvios de normalidade não afetam a proporção esperada de erros do tipo I. A maior probabilidade de erros do tipo I pode explicar a grande quantidade de regiões genômicas com um único marcador ligado a QTL pela análise de variância.

Alguns dos caracteres analisados possuem alta associação linear. Muitos desses caracteres correlacionados possuem QTLs co-localizados. Os caracteres teor de lignina, álcali efetivo e viscosidade da polpa celulósica foram altamente correlacionados, o que já era esperado uma vez que quanto maior o teor de lignina na madeira, maior a quantidade de álcali necessária na polpação e, com isso, mais as fibras de celulose serão degradadas, diminuindo a viscosidade da polpa. Esses três caracteres tiveram QTLs co-localizados no g.l. 10 do parental feminino e os caracteres álcali efetivo e viscosidade tiveram outros dois QTLs co-localizados nos grupos de ligação 6 e 11 do parental masculino. Outra co-localização ocorreu no g.l. 10 do parental masculino para os caracteres relação siringil/guaicil, porcentagem de álcali efetivo e teor de ácido metilglucurônico. Esses três caracteres também são correlacionados entre si. A correlação entre relação siringil/guaicil e porcentagem de álcali efetivo é negativa, o que é plausível uma vez que quanto maior a relação siringil/guaiacil, maior será a reatividade da lignina e, portanto, menor a quantidade de álcali necessário para sua remoção.

Outros caracteres correlacionados e que também tiveram QTLs co-localizados foram altura e diâmetro das árvores, teor de lignina e de ácido metilglucurônico, teor de lignina e relação siringil/guaiacil, densidade básica e teor de glicana, densidade básica e teor de extrativos e, por fim, teor de xilana e de ácido galactourônico. A co-localização de QTLs para caracteres altamente correlacionados sugere que um único gene, com efeito pleiotrópico, esteja controlando parte da variabilidade em diferentes caracteres. Alternativamente, não se pode destacar a hipótese de que genes ligados, em que a resolução do mapeamento não permite separá-los, estejam controlando caracteres correlacionados. Independentemente do tipo de controle genético desses caracteres, é importante destacar que se os alelos favoráveis de QTLs co-localizados estão no mesmo cromossomo homólogo, a seleção assistida por marcadores pode ser realizada para ambos caracteres simultaneamente. Do contrário, se o alelo favorável para um caractere atua desfavoravelmente para outro ou possui um alelo desfavorável ligado, a seleção assistida para ambos caracteres se torna difícil nessa região genômica, devendo-se buscar outros QTLs

para assistir o melhoramento. No caso dos caracteres teor de lignina, álcali efetivo e viscosidade da polpa, os QTLs co-localizados no g.l. 10 do parental feminino possuem alelos favoráveis para todos os caracteres localizados no mesmo homólogo, o que era esperado tendo em vista que o sentido da correlação entre esses caracteres também é favorável. Isso permite com que a seleção do alelo que diminua o teor de lignina da madeira nessa região, automaticamente selecione o alelo que diminui a quantidade de álcali utilizada na polpação e o alelo que aumente a viscosidade da polpa celulósica.

Uma correlação esperada e que não ocorreu neste trabalho foi entre os caracteres profundidade de penetração da haste do Pilodyn e densidade básica da madeira. A não ocorrência de associação linear entre essas duas características pode ter duas causas. A primeira é que nessa família de irmãos completos esses caracteres podem realmente não ser correlacionados por algum motivo, como por exemplo uma grande variabilidade na espessura da casca das árvores. Um excesso de casca atrapalharia a penetração do Pilodyn, mas não seria problema para a mensuração da densidade, que foi feita indiretamente pelo Espectrofotômetro (NIRS) em baguetas retiradas do tronco com um instrumento perfurante. Um excesso de madeira de compressão ou nós também poderia contribuir para diminuir a correlação entre Pilodyn e densidade básica da madeira. Outra possibilidade é que para a densidade básica da madeira o NIRS não foi calibrado de forma precisa, impedindo a mensuração precisa dessa característica.

As análises de co-localização de QTLs para os diferentes caracteres, também permitiram verificar a existência de pontos quentes de QTLs nos genomas dos parentais *E. grandis* (feminino) e *E. urophylla* (masculino). Foram 3 os grupos de ligação que contiveram uma grande quantidade de QTLs: g.l. 4, g.l. 6 e g.l. 10. Os dois primeiros foram pontos quentes somente no parental masculino e o último nos dois parentais. Nesses grupos de ligação talvez possam ser realizados maiores investimentos de recursos em mapeamento de alta resolução para buscar genes de interesse para as indústrias de base florestal. O mapeamento de QTLs em outros genótipos utilizando esses mesmos marcadores

microssatélites é importante para confirmar ou não essas regiões como pontos quentes de QTLs para caracteres relacionados à qualidade da madeira.

Até hoje foram poucos os trabalhos de mapeamento utilizando marcadores microssatélites em *Eucalyptus*, o que dificulta a avaliação da manifestação dos QTLs aqui identificados em outros cruzamentos. Grattapaglia et al. (1996), também mapearam QTLs para diâmetro das árvores e densidade básica da madeira. Apesar deste trabalho ter sido conduzido com a genotipagem de marcadores RAPD, posteriormente, Brondani et al. (2002) mapeou cerca de 50 microssatélites nessa mesma população. Alguns desses microssatélites também foram genotipados neste trabalho, permitindo-nos estabelecer as relações de homologia entre os grupos de ligação dos nossos mapas com os de Grattapaglia et al. (1996). Com isso, foi possível verificar que não houve coincidência de posicionamento genômico dos QTLs identificados para diâmetro das árvores e densidade básica em ambos trabalhos. Thamarus et al. (2004), utilizaram um mapa contendo 40 microssatélites, alguns também mapeados no presente trabalho. Nesse trabalho foram mapeados QTLs para caracteres relacionados à qualidade da madeira, dentre os quais estão a densidade básica da madeira, o rendimento depurado e o teor de celulose. Não houve coincidência na localização genômica dos QTLs mapeados para teor de celulose (glicana) em ambos trabalhos. Para densidade básica da madeira, Thamarus et al. (2004) mapearam um QTL em um grupo de ligação homólogo ao grupo de ligação 08 do mapa referência. No mapa gerado para o *E. grandis* em nosso trabalho, foram identificados, em posições distintas do grupo de ligação 08, um QTL para densidade básica e outro para profundidade de penetração do Pilodyn. Para rendimento de celulose, Thamarus et al. (2004) localizaram um QTL em um grupo de ligação homólogo ao g.l. 10 do mapa referência. Em nosso trabalho também foi identificado um QTL para rendimento depurado no grupo de ligação 10 do genitor *E. urophylla*. Porém, devido à escassez de microssatélites comuns, mapeados em ambos trabalhos, não foi possível verificar se os QTLs, localizados em grupos de ligação homólogos tanto para densidade quanto para rendimento de celulose, foram localizados nas mesmas regiões genômicas dentro desses grupos. Mais

recentemente, Missiaggia et al. (2005), construíram um mapa genético de *Eucalyptus* utilizando exclusivamente marcadores microssatélites, muitos dos quais também foram mapeados em nosso trabalho. Nesse trabalho, dentre outras características, foram mapeados QTLs para profundidade de penetração do Pilodyn, rendimento depurado, teor de lignina da madeira e diâmetro das árvores. De todos os QTLs mapeados, apenas um, para penetração do Pilodyn, foi mapeado na mesma região genômica onde foi identificado um QTL para a mesma característica com os nossos dados.

Ainda com relação à avaliação da detecção de QTLs em diferentes genótipos, é importante destacar os três caracteres para os quais foram mapeados QTLs em regiões homólogas de ambos genitores da família de irmãos-completos deste trabalho. Esses caracteres foram diâmetro a altura do peito, teor de lignina da madeira e viscosidade da polpa celulósica. Esses resultados representam uma validação indireta da presença do efeito desses QTLs em diferentes genomas. A identificação de um mesmo QTL em diferentes genótipos depende fundamentalmente da heterozigosidade desse loco nos genitores utilizados nas famílias de mapeamento e do fato de que os alelos desse loco tenham diferença de efeito médio suficientemente grande para poderem ser detectados com os tamanhos de populações utilizados nos mapeamentos. Interações epistáticas podem dificultar a detecção dos QTLs em diferentes cruzamentos, na medida em que podem diminuir a diferença do efeito médio dos seus alelos. No caso de espécies florestais, devido à grande heterozigosidade e, portanto, grande variabilidade alélica aos QTLs, espera-se um grande número de QTLs sendo detectados nos diferentes cruzamentos. A natureza das famílias utilizadas em mapeamentos genéticos de espécies florestais dificulta sobremaneira a verificação dos QTLs em diferentes “backgrounds” genéticos, já que nem todos os marcadores e QTLs são polimórficos em todos os cruzamentos. Também vale destacar que os QTLs detectados em uma mesma região em cruzamentos independentes podem, na verdade, se tratar do efeito dos alelos de dois genes diferentes que estão geneticamente muito ligados. Portanto, somente a realização de um mapeamento de alta resolução poderá confirmar se esses QTLs

identificados em diferentes genótipos são de fato devido aos efeitos dos alelos de um mesmo gene. Apesar de laborioso, a avaliação do efeito dos QTLs em cruzamentos recíprocos e em cruzamentos com outros genitores, ou seja, em outros “backgrounds” genéticos, é extremamente importante. Esse conhecimento é fundamental não só para se melhorar o entendimento do controle dos caracteres quantitativos, como para utilização dos QTLs na prática do melhoramento florestal. Se um QTL de grande efeito for detectado sistematicamente em diferentes cruzamentos, a clonagem posicional do gene ou região regulatória responsável por este efeito é extremamente interessante. O genitor *E. grandis* deste trabalho faz parte de um dialelo incompleto do projeto Genolyptus que conta com várias espécies de *Eucalyptus*. O mapeamento de QTLs nessas famílias será importante para verificar se os QTLs identificados com os nossos dados nesse genitor também se manifestam quando este é cruzado com outros genótipos.

A comparação da estratégia de análise dos mapas de cada parental separadamente através do mapeamento de QTLs por intervalo simples e composto com a estratégia de mapeamento de QTLs por intervalo no mapa integrado através da regressão de pares de irmãos, demonstrou haver uma boa congruência dos efeitos e localizações dos QTLs identificados por ambas estratégias. De forma geral, os QTLs de maior significância foram identificados de forma precisa com as duas estratégias e os QTLs identificados por apenas uma dessas metodologias possuíram baixa significância estatística. Alguns QTLs identificados através da estratégia de pares de irmãos só puderam ser localizados pela estratégia de pseudo-cruzamento teste através da inclusão de co-fatores no mapeamento por intervalo composto. Tal resultado poderia nos levar a conclusão de que a regressão de pares de irmão tem um maior poder de detecção de QTLs em comparação com o mapeamento por intervalo simples, mas os níveis de significância empregados em ambas estratégias de análise não são diretamente comparáveis. Trabalhos de simulação comparando as duas estratégias serão importantes na definição de qual método possui maior poder estatístico na detecção dos QTLs. Uma desvantagem da estratégia de pares de irmãos em relação à de pseudo-cruzamento teste é a não identificação direta da origem

parental dos QTLs. Uma vantagem da estratégia de pares de irmãos é o aproveitamento dos marcadores que segregam na proporção 1:2:1, descartados no pseudo-cruzamento teste, nas análises de mapeamento e detecção de QTLs.

O mapeamento de QTLs através da estratégia de pares de irmãos é muito utilizado em genética humana, onde a obtenção de grandes famílias para mapeamento genético é bastante difícil. Nossos resultados demonstraram, assim como outros trabalhos de simulação (Prof. Cosme D. Cruz, comunicação pessoal), ser possível a detecção de QTLs em uma única família de irmãos-completos. Através de uma breve revisão de literatura, percebe-se que esta estratégia não tem sido utilizada em espécies vegetais. Esta metodologia pode ser melhor explorada, não só em espécies vegetais perenes, para as quais a obtenção de delineamentos clássicos de mapeamento é pouco factível. Também em espécies anuais, múltiplas famílias com várias gerações de melhoramento poderiam ser utilizadas em novas estratégias de mapeamento de QTLs empregando a regressão de pares de irmãos. A principal dificuldade dessa estratégia seria o estabelecimento de um mapa consenso que melhor explica as frequências de recombinação dos marcadores nos diferentes conjuntos meióticos (cruzamentos). Análises de marcas individuais empregando a estratégia de pares de irmãos poderiam ser utilizadas mais diretamente. Para o sucesso da estratégia de pares de irmãos também é necessário a utilização de marcadores co-dominantes e multialélicos para estimativas precisas do número de alelos idênticos por descendência (IBD) compartilhados pelos irmãos nos diferentes marcadores. Nesse sentido, os microssatélites são a opção óbvia nesses estudos. Estudos envolvendo populações simuladas e reais são necessários para comprovar a aplicabilidade do método de mapeamento de QTLs pela regressão de pares de irmãos em múltiplas famílias. Em teoria, o mapeamento de QTLs em múltiplas famílias teria um menor poder de detecção para aqueles QTLs que manifestam efeito somente em cruzamentos específicos. Por outro lado, os QTLs que manifestam efeito em múltiplos cruzamentos (“backgrounds” genéticos), presumivelmente, seriam mais facilmente detectados por meio do mapeamento de várias famílias através da estratégia de pares de irmãos.

5 - CONCLUSÃO

O número de marcadores microssatélites genotipados permitiu uma cobertura adequada dos genomas dos parentais com comprimentos totais de mapa da ordem de 1100 a 1300 cM, na mesma faixa dos mapas publicados anteriormente com outras classes de marcadores.

Foram detectados QTLs para todos os caracteres fenotípicos avaliados independentemente da metodologia estatística utilizada. Os QTLs de maior significância foram consistentemente detectados pelas análises de marcas individuais, análises de intervalo composto nos mapas do pseudo-cruzamento teste e análises de intervalo no mapa integrado pela estratégia de pares de irmãos.

Esses QTLs de maior significância encontrados nesse cruzamento fornecem pistas posicionais muito interessantes para programas de melhoramento de empresas de base florestal. A posição de mapa destes QTLs poderá ser utilizada para dirigir experimentos de validação de QTLs em “backgrounds” genéticos distintos bem como de seleção assistida precoce dentro de famílias para características de expressão tardia tais como densidade e propriedades químicas da madeira.

Alguns QTLs mapearam de forma co-localizada para caracteres correlacionados, sugerindo que um único gene com efeito pleiotrópico ou que um conjunto de genes altamente ligados seja responsável por esses QTLs. Para muitos desses QTLs os alelos favoráveis estão localizados no mesmo

cromossomo homólogo, o que facilitaria a seleção assistida simultânea para os diferentes caracteres por eles controlados.

QTLs para três caracteres foram identificados nas mesmas posições genômicas em ambos genitores da família de irmãos-completos deste trabalho. Três outros QTLs também foram identificados em grupos de ligações homólogos construídos a partir de cruzamentos de trabalhos independentes. Esses resultados fornecem uma evidência preliminar da validação desses QTLs em outros genótipos.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brondani, R.P.V.; Brondani, C.; Tarchini, R. & Grattapaglia, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor Appl Gene.* **97**, 816-827. 1998.

Brondani, R.P.V. & Grattapaglia, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. *Biotechniques* **31**, 793-5. 2001.

Brondani, R.P.V.; Brondani, C. & Grattapaglia, D. Towards the construction of a genus wide reference linkage map for *Eucalyptus* based on microsatellite markers. *Molecular and General Genomics* **267**, 338-347. 2002.

Brown, G.R.; Bassoni, D.L.; Gill, G.P. et al. Identification of quantitative trait loci influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). III. QTL Verification and candidate gene mapping. *Genetics* **164**, 1537-46. 2003.

Butcher, A.; Williams, R.; Whitaker, D.; Ling, S.; Speed, P. & Moran, F. Improving linkage analysis in outcrossed forest trees - an example from *Acacia mangium*. *Theoretical and Applied Genetics*, **104**, 1185 – 1191. 2002.

Byrne M.; Murrell J.C.; Allen, B. & Moran, G.F. An integrated linkage genetic linkage map for *Eucalyptus* using RFLP, RAPD and isozyme markers. *Theor Appl Genet* **91**, 869 – 875. 1995.

Byrne M.; Murrell J.C.; Owen J.V.; Kriedemann, P.; Williams E.R. & Moran, G.F. Identification and mode of action of quantitative trait loci affecting seedling height and leaf area in *Eucalyptus nitens*. *Theor Appl Genet* **94**, 674-681. 1997a.

Byrne M.; Murrell J.C.; Owen J.V.; Williams E.R. & Moran, G.F. Mapping of quantitative trait loci influencing frost tolerance in *Eucalyptus nitens*. *Theor Appl Genet* **95**, 975-979. 1997b.

Churchill, G.A. & Doerge, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**, 963-71. 1994.

Cruz, C.D. & Schuster, I. GQMOL: Programa para análise de genética quantitativa molecular. Versão 2004.2.1. Desenvolvido pelo setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: www.ufv.br/dbq/gqmol/gqmol.htm (10 nov. 2004)

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

Fisher, R. A. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans Roy Soc Edinb* **52**, 399-433. 1918.

Fulker, D.W. & Cardon, L.R. A sib-pair approach to interval mapping of quantitative trait loci. *Am J Hum Genet* **54**, 1092-103. 1994.

Gan, S.; Shi, J.; Li, M.; Wu, K.; Wu, J. & Bai, J. Moderate-density molecular maps of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake and *E. tereticornis* Smith genomes based on RAPD markers. *Genetica* **118**, 59-67. 2003.

Gomide, J.L. & Demuner, B.J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método klason modificado. *O Papel* **47**, 36-38. 1986.

Gomide, J.L.; Colodette, J.L.; Oliveira, R.C. & Silva, C.M. Caracterização tecnológica, para produção de celulose, da nova geração de clones de *Eucalyptus* do Brasil. *Revista Árvores* **29**, 129-137. 2005.

Grattapaglia, D. & Sederoff R.R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers, *Genetics* **137**, 1121-1137. 1994.

Grattapaglia, D.; Bertolucci, F.L. & Sederoff, R.R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Theor Appl Genet* **90**, 933-947. 1995.

Grattapaglia, D.; Bertolucci F.L.; Penchel R. & Sederoff R.R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers, *Genetics* **144**, 1205-1214. 1996.

Grattapaglia, D. Molecular breeding of *Eucalyptus* - State of the art, operational applications and technical challenges. **Molecular Biology of Woody Plants**, v.1, p.451-474, 2000.

Grattapaglia, D. Genômica Florestal. In: Luiz Mir. (Org.). Genômica. 1 ed. São Paulo, v. 1, p. 917-934, 2004.

Grattapaglia, D.; Falcão, C.L.; Alonso, A.; Pappas, M.C.R.; Lourenço, R.T.; Pádua, J.G.; Mamani, E.M.; Pappas Jr, G.J. Development and mapping of EST-derived microsatellites in *Eucalyptus*. Proceedings of the IUFRO Tree Biotechnology Conference, 2005. Poster abstract S5.33.

Haley, C. S. & Knott, S. A. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in the line crosses using flanking markers. *Heredity* **69**, 315-324. 1992.

Haseman, J.K. & Elston, R.C. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav Genet* **2**, 3-19. 1972.

Jansen, R.C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* **135**, 205-211. 1993.

Kirst, M.; Myburg, A. A.; De Leon, J. P.; Kirst, M. E.; Scott, J. & Sederoff, R.. Coordinated genetic regulation of growth and lignin revealed by quantitative trait locus analysis of cDNA microarray data in an interspecific backcross of *Eucalyptus*. *Plant Physiol* **135**, 2368-78. 2004.

Kirst, M.; Basten, C. J.; Myburg, A. A.; Zeng, Z. B. & Sederoff, R. R. Genetic architecture of transcript-level variation in differentiating xylem of a *Eucalyptus* hybrid. *Genetics* **169**, 2295-303. 2005.

Lander, E.S.; Green, P.; Abrahamson, J.; Barlow, A.; Daly, M. J.; Lincoln, S. E. & Newburg, L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**, 174-81. 1987.

Lander, E.S. & Botstein, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**, 185-99. 1989.

Lourenço, R.T. Estrutura genômica de três megabases de DNA genômico e seqüenciamento por fragmentação randômica de DNA ("shotgun") de *Eucalyptus*: conteúdo nucleotídico, seqüências repetitivas e genes. Campinas, SP, 2004. 164p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Campinas.

Maliepaard, C.; Jansen, J. & Van Ooijen, J. W. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. *Genet. Res., Camb.* **70**, 237-250. 1997.

Marques, C.M.; Araujo, J.A.; Ferreira, J.G.; Whetten, R.; O'malley, D.M.; Liu, B.H. & Sederoff, R. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. *Theor Appl Genet* **96**, 727-737. 1998.

Marques, C.M.; Vasquez-Kool, J.; Carocha, V.J.; Ferreira, J.G.; O'Malley, D.M.; Liu, B.H. & Sederoff, R. Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*. *Theor Appl Genet* **99**, 936-946. 1999.

Marques, C.M.; Brondani, R.P.V.; Grattapaglia, D. & Sederoff, R. Conservation and synteny of SSR loci and QTLs for vegetative propagation in four *Eucalyptus* species. *Theor Appl Genet* **105**, 474-478. 2002.

Missiaggia, A.A. Mapeamento genético de QTL para qualidade da madeira e florescimento precoce e estudos de expressão gênica alelo específica em *Eucalyptus* spp. Piracicaba, SP, 2005. 236p. Dissertação (Doutorado) - Universidade de São Paulo.

Morgante, M.; Hanafey, M. & Powell, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* **30**, 194-200. 2002.

Myburg, A. A.; Griffin, A. R.; Sederoff, R. R. & Whetten, R. W. Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F1 hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach. *Theor Appl Genet* **107**, 1028-1042. 2003.

Sax, K. The association of size difference with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* **8**, 552-560. 1923.

Sjöström, E. Wood chemistry: fundamentals and applications. 2^a ed. San Diego: Academic Press, Inc. 1993. 293 p.

Stam, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *The Plant Journal* **3**, 739 – 744. 1993.

Tanksley, S.D. Mapping polygenes. *Annu Rev Genet* **27**, 205-33. 1993.

Thamarus, K. A.; Groom, K.; Murrell, J.; Byrne, M. & Moran, G. F. A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre, and floral traits. *Theor Appl Genet.* **104**, 379-387. 2002.

Thamarus, K.; Groom, K.; Bradley, A.; Raymond, C. A.; Schimleck, L. R.; Williams, E. R. & Moran, G. F. Identification of quantitative trait loci for wood and fibre properties in two full-sib properties of *Eucalyptus globulus*. *Theor Appl Genet.* **109**, 856-864. 2004.

Van Ooijen, J.W. & Voorrips, R.E. JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands. 2001.

Verhaegen, D. & Plomion, C. Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers, *Genome* **39**, 1051-1061. 1996.

Verhaegen D.; Plomion, C.; Gion, J.M.; Poitel, M.; Costa, P. & Kremer, A. Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers: 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression across different ages. *Theor Appl Genet* **95**, 597-608. 1997.

Voorrips, R.E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The Journal of Heredity* **93**, 77-78. 2002.

Wang, S.; Basten, C. J. & Zeng, Z.-B. (2005). Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>)

Zeng, Z.-B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10972-6. 1993.

Zeng, Z.-B. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* **136**, 1457-68. 1994.

CAPÍTULO 2

ANCORAGEM DE CLONES BAC NO MAPA GENÉTICO DE *Eucalyptus*.

RESUMO

A clonagem de fragmentos de DNA genômico em vetores bacterianos facilitou sobremaneira a manipulação física de genomas. A ordenação desses clones, no chamado mapeamento físico, busca reconstituir o genoma em segmentos contíguos contendo insertos sobrepostos em alguma extensão. Tal mapeamento é importante por fornecer uma trilha mínima para o seqüenciamento genômico, seja total ou localizado em regiões que controlam caracteres de interesse. As informações de mapeamento por recombinação genética de locos controladores de caracteres quantitativos (QTLs) podem ser utilizadas como guias para se buscar, em nível físico os genes candidatos responsáveis pelo controle da variabilidade fenotípica na característica de interesse. A integração do mapa genético com clones BAC e finalmente com o mapa físico completo é um passo decisivo para a clonagem posicional de QTLs. Além disso, essa integração também é importante na montagem do mapa físico, uma vez que os marcadores atuam como “âncoras” para orientar a posição e eventualmente unir os contíguos pertencentes ao mesmo grupo de ligação. Mapas genéticos com algumas centenas de microssatélites vem sendo construídos no âmbito do projeto Genolyptus e utilizados para o posicionamento de QTLs para diversas características de importância silvicultural e industrial em *Eucalyptus*. No presente trabalho foram selecionados 47 microssatélites regularmente distribuídos em

mapa genético, visando a sua localização em clones de uma biblioteca de 20.160 clones BAC, perfazendo uma cobertura do genoma de *Eucalyptus* de 4x. Esses clones BAC foram agrupados de forma hierárquica para diminuir o número de PCRs necessárias para se chegar àqueles contendo os microssatélites. Além disso, um dos iniciadores que flanqueiam os locos microssatélites foi marcado com três diferentes fluorescências, permitindo que a triagem da biblioteca fosse realizada de forma eficiente através da multiplexagem das reações de PCR e visualização dos produtos amplificados no analisador ABI 3100. Foi identificado pelo menos um clone positivo para 38 dos 47 microssatélites selecionados. Esses clones serão utilizados para ancorar o mapa genético no mapa físico a ser construído no âmbito do Projeto Genolyptus, etapa fundamental para a clonagem posicional dos genes responsáveis pelas características quantitativas. Além disso, esses clones BAC serão utilizados em hibridizações fluorescentes *in situ* para estabelecer as correspondências numéricas entre grupos de ligação e cromossomos, informação indisponível até o momento para este gênero. Neste trabalho também foi proposta uma nova configuração para a hierarquização da biblioteca genômica do Genolyptus. Esta estratégia de reunião dos clones diminuirá em cerca de 60% o número de PCRs necessário em triagens de locos alvo.

1 - INTRODUÇÃO

O setor florestal tem enorme relevância para a economia brasileira. Segundo a Sociedade Brasileira de Silvicultura (SBS, 2001) somente no ano de 2000 esse setor faturou U\$\$ 21 bilhões (4% do PIB nacional). Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF), estimativas indicam que a área plantada com *Eucalyptus* e *Pinus* chegou em 6,1 milhões de ha em 2005 (www.celuloseonline.com.br). O *Eucalyptus* é o gênero de maior relevância para o setor florestal brasileiro, notadamente para a indústria de celulose, um segmento de destaque que gerou somente em 2004 um saldo para a balança comercial de U\$\$ 2,2 bilhões, 6,5% do saldo total da economia nacional nesse ano (Bracelpa, 2005). Para a manutenção dessa competitividade, a pesquisa florestal vem assumindo papel de grande relevância.

A genômica, ciência relativamente recente, promete melhorar sobremaneira a compreensão do controle genético dos caracteres de interesse florestal e, com isso, auxiliar o melhoramento clássico (Grattapaglia, 2004). A genômica propõe estudar os genomas de forma completa, buscando entender suas estruturas, funções e histórias evolutivas, através da integração de métodos e abordagens de diferentes disciplinas de genética (mendeliana, quantitativa e de populações), citogenética, biologia molecular e biologia computacional (Liu, 1998). As ferramentas para o estudo dos genomas como um todo compreendem desde o mapeamento genético, baseado no cálculo da frequência de recombinações entre locos marcadores, a análise citológica dos cromossomos em células metafásicas,

até o maior nível de resolução que seria a seqüência completa dos nucleotídeos componentes de suas moléculas de DNA.

Uma técnica de resolução intermediária para estudos genômicos é o mapeamento físico, onde grandes fragmentos de DNA (da ordem de vários kb), clonados em vetores bacterianos ou de leveduras, são ordenados de forma a reconstituir o genoma em segmentos contíguos contendo insertos sobrepostos em alguma extensão (Meyers et al., 2004). O ordenamento dos clones de uma biblioteca genômica pode ser feito basicamente de duas maneiras. Na primeira, seqüências específicas do DNA podem ser utilizadas como etiquetas para buscar os clones que as contenham e que, portanto, se sobrepõem. Essa estratégia é muito laboriosa e geralmente é utilizada somente para ordenar clones de uma determinada região, como por exemplo, num processo de “chromosome walking” para clonagem posicional de genes (Meyers et al., 2004). A segunda estratégia, que vem sendo amplamente utilizada para a construção de mapas físicos do genoma como um todo, é a avaliação da sobreposição dos clones pela técnica de “fingerprinting”. Nesse método uma impressão digital (“fingerprinting”) de cada clone é obtida a partir da eletroforese dos fragmentos de DNA gerados a partir da sua digestão com enzimas de restrição (Marra et al., 1999; Mozo et al., 1999; McPherson et al., 2001). Clones derivados de uma mesma região genômica e que se sobrepõem total ou parcialmente produzirão fragmentos com as mesmas mobilidades eletroforéticas, enquanto clones que não se sobrepõem produzirão perfis eletroforéticos (“fingerprints”) díspares. A aplicação mais direta do mapeamento físico é o fornecimento de uma trilha mínima (“minimal tiling path”) para o seqüenciamento genômico, seja total (Marra et al., 1999; Mozo et al., 1999; McPherson et al., 2001; Chen et al., 2002) ou localizado em regiões que controlam caracteres de interesse (Brommonschenkel et al., 2000; Frary et al., 2000; Takahashi et al., 2001). Os mapas físicos também podem ser úteis para estudos de genômica comparativa (O’Neill e Bancroft, 2000; Draye et al., 2001).

Um grande desafio em estudos genômicos é a união das informações dos diferentes tipos de representação linear do genoma (mapas genético, físico e citológico e, em última instância, a seqüência completa do genômica). Segundo

Korenberg et al. (1999b), como cada tipo de mapa representa um aspecto diferente da estrutura, conteúdo e comportamento dos cromossomos, essas propriedades fundamentais podem ser integradas para entender a função de genes e o papel dos rearranjos cromossômicos na evolução dos genomas. O estabelecimento das relações entre os mapas físico e genético é fundamental não só para a clonagem posicional de genes, como também para garantir a qualidade desses mapas. Contíguos quiméricos podem ser identificados caso contenham marcadores de grupos de ligação diferentes em um mapa genético bem saturado (Chen et al., 2002). Da mesma maneira, o limiar estatístico para união de contíguos com base no “fingerprinting” pode ser levemente reduzido se houver marcadores genéticos que suportam a sobreposição de dois ou mais clones (Chen et al., 2002). Se as relações entre grupos de ligação e cromossomos estão estabelecidas, marcadores genéticos podem ser utilizados para alocar, ordenar e orientar os contíguos nos diferentes cromossomos da espécie (Cheung et al., 2001; Aerts et al., 2005). Problemas de ordenamento de marcadores em mapas genéticos também podem ser resolvidos através da avaliação da disposição deles no mapa físico (Nievergelt et al., 2004). Essa integração também possibilita o estabelecimento das relações entre distâncias física e genética para as diferentes regiões do genoma, identificando pontos quentes (“hot spots”) de recombinação e regiões onde as permutas são suprimidas (Yu et al., 2001; Chen et al., 2002). O conhecimento das relações entre distâncias física e genética é de fundamental importância para a clonagem posicional de genes e para estudos de associação em populações naturais, já que essa relação é um dos fatores que afetam a extensão do desequilíbrio de ligação.

Para o gênero *Eucalyptus* ainda não se conhecem as relações entre grupos de ligação e cromossomos. A integração dos mapas genéticos com o mapa citológico é realizada através de hibridizações fluorescentes *in situ* (FISH) utilizando sondas contendo os locos marcadores. O mapa físico desempenha um papel fundamental na escolha dos clones que servirão como sondas a serem utilizadas nas hibridizações *in situ* (Aerts et al., 2005). O estabelecimento das relações entre grupos de ligação e cromossomos é fundamental para tentar

encontrar respostas no nível molecular para questões geradas a partir de alterações genômicas visualizadas num nível cromossômico (Korenberg et al., 1999b). Também, a cobertura do mapa genético pode ser inferida através do posicionamento dos marcadores das extremidades dos grupos de ligação no mapa citológico (Korenberg et al., 1999a). Em genomas onde os cromossomos não são facilmente distinguíveis, as hibridizações fluorescentes *in situ* com marcadores genéticos podem resolver muitas dúvidas do mapa citológico (Romanov et al., 2005). A ancoragem de marcadores no mapa citológico pode contribuir para a identificação de regiões duplicadas no genoma; informação extremamente útil na montagem das seqüências em projetos de seqüenciamento genômico (Cheung et al., 2001).

Para ancoragem do mapa genético no mapa físico e mapa citológico, é de fundamental importância a seleção de clones que contenham os locos marcadores. Essa triagem dos locos marcadores na biblioteca genômica pode ser feita basicamente através de reações da polimerase em cadeia (PCR) ou de hibridizações com sondas radioativas em membranas de alta densidade. Essa última estratégia, apesar da desvantagem de detecção baseada em radioatividade, apresenta grande eficiência e, com isso, tem sido preterida em trabalhos de triagens em larga escala não só para marcadores (Mozo et al., 1999; McPherson et al., 2001; Chen et al., 2002) como também para genes (Gardiner et al., 2004). A utilização de PCR em triagens pode ter sua eficiência bastante aumentada com a reunião hierarquizada dos clones da biblioteca em conjuntos (*pools*). Essa organização também pode beneficiar a triagem por meio de hibridização, mas, devido à alta densidade das membranas, a redução de etapas é menos efetiva nessa estratégia. A reunião dos clones de uma biblioteca genômica em conjuntos hierarquizados foi primeiramente utilizada por Evans & Lewis (1989) e posteriormente analisada de forma teórica por Barillot et al. (1991) para estabelecimento de configurações ótimas. As configurações dizem respeito à forma como os clones são reunidos, ou seja, quantos e como são construídos os conjuntos e sub-conjuntos (número de dimensões) utilizados para diminuir o número de reações ou hibridizações necessárias nas triagens. Diferentes

estratégias de agrupamento estão disponíveis na literatura (Amemiya et al., 1992; Asakawa et al., 1997). Uma estratégia frequentemente utilizada é a reunião dos clones em três dimensões: *pool* de placa, *pools* de linha e *pools* de coluna. O número de dimensões depende basicamente do tamanho e da redundância da biblioteca (Barillot et al., 1991).

As informações disponíveis sobre o genoma do *Eucalyptus* até o momento são provenientes de mapas genéticos (Grattapaglia e Sederoff, 1994; Byrne et al., 1995; Verhaegen e Plomion, 1996; Marques et al., 1998; Thamarus et al., 2002; Gan et al., 2003; Myburg et al., 2003). A maioria desses mapas utilizou marcadores dominantes (RAPD e AFLP) que não podem ser diretamente utilizados como sítios seqüência-etiquetada (STSs - "sequence-tagged sites") para integrar seus grupos de ligação aos cromossomos e, no futuro, à seqüência completa do genoma, cujo projeto tem previsão de término para abril de 2007 (<http://www.ieugc.up.ac.za/>). A partir do desenvolvimento de microsatélites para *Eucalyptus* (Brondani et al., 1998; Brondani et al., 2002), mapas genéticos utilizando esses marcadores vem sendo construídos em múltiplas famílias no âmbito do projeto Genolyptus. Os microsatélites, por serem amplificados por PCR com iniciadores seqüência-específica, podem ser utilizados como etiquetas na integração das diferentes escalas de informação genômica (Breen et al., 1997). Um outro recurso, também gerado no projeto Genolyptus e de grande valor para o gênero, é uma biblioteca genômica de clones BAC com cobertura de 4x. Essa biblioteca tem sido útil para o seqüenciamento completo de genes de interesse e de suas seqüências regulatórias (Brommonschenkel et al., 2005). A partir da análise de "fingerprinting" dos clones dessa biblioteca está em curso a construção de um mapa físico, que facilitará sobremaneira o seqüenciamento de regiões de interesse e a integração do mapa genético com o citológico. Tal conhecimento melhorado do genoma do *Eucalyptus* abrirá oportunidades únicas de entendimento das relações entre as variações no nível molecular e a diversidade fenotípica.

O presente trabalho teve como objetivo identificar clones BAC, da biblioteca genômica de *Eucalyptus*, que contenham locos microsatélites regularmente

distribuídos no mapa genético referência para espécies deste gênero. Este trabalho é parte de um esforço conjunto no âmbito do projeto Genolyptus visando à integração dos diferentes mapas genéticos de microssatélites com os mapas citológico e físico em construção. Com isso, pretende-se estabelecer as relações entre grupo de ligação, contíguos de BACs e cromossomos, permitindo maior compreensão da organização e funcionalidade do genoma desse gênero, facilitando a busca por genes de interesse econômico e os estudos evolutivos.

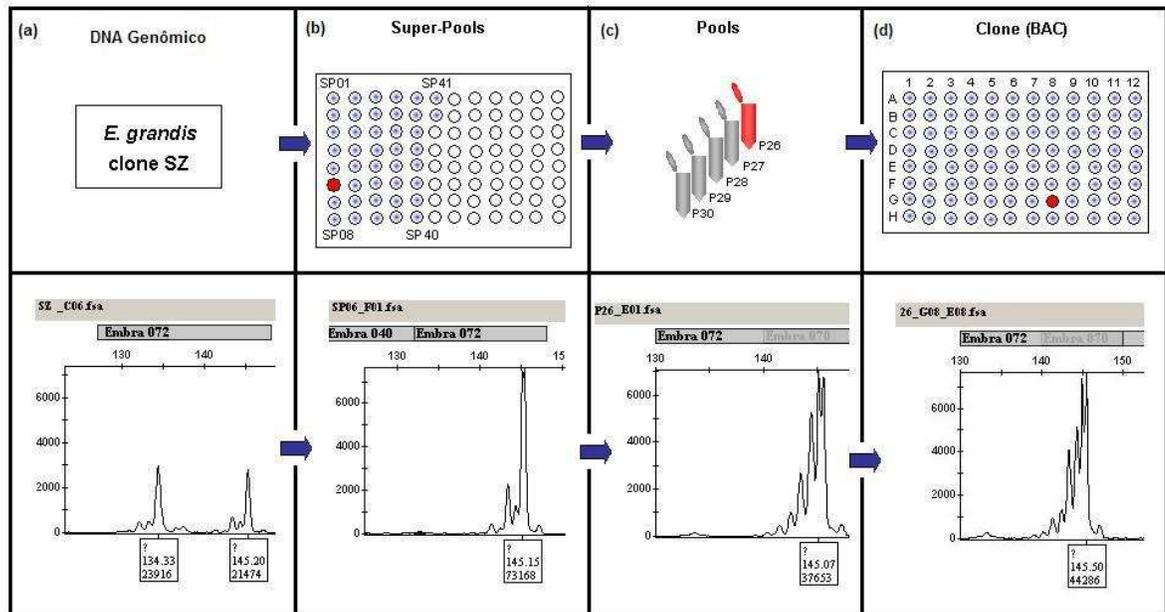
2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Organização da biblioteca de clones BAC e esquema da triagem

A ancoragem do mapa genético foi realizada sobre uma biblioteca genômica identificada pelo código EUGR_BC_02, constituída por 20.160 clones. Os insertos foram clonados em vetor BAC Copycontrol (Epicentre Technologies), gerados a partir da digestão parcial do DNA de alto peso molecular do clone SZ (*Eucalyptus grandis*) da Suzano-Bahia Sul. O DNA dos clones BAC dessa biblioteca foi purificado na forma de *pools* (conjuntos) de 96 clones cada (1 placa). Os 210 *pools*, que representam toda a biblioteca (210 x 96 = 20.160), foram reunidos de cinco em cinco formando 42 *superpools*, cada um contendo o DNA de 480 clones BAC. Esse agrupamento hierarquizado do DNA dos clones da biblioteca, cuja cobertura estimada é de quatro vezes, tem por objetivo reduzir drasticamente o número de PCRs a serem feitas para encontrar os clones positivos nas triagens feitas via PCR seja para marcadores microssatélites, seja para genes específicos.

Tendo em vista essa hierarquização da biblioteca, as etapas utilizadas para encontrar os clones positivos contendo as sequências dos marcadores microssatélites na biblioteca foram: (a) avaliação do tamanho dos alelos de cada microssatélite no DNA genômico do clone SZ; (b) identificação dos *superpools* positivos; (c) análise dos cinco *pools* individuais que constituem o *superpool* positivo, para identificar qual(is) dele(s) contém o microssatélite; (d) análise

individual dos 96 clones que constituem o *pool* positivo para identificação do clone BAC alvo (Figura 1).



2.2. Seleção dos locos microssatélites

Os microssatélites foram selecionados para a triagem com base nas informações do mapeamento genético (capítulo 1), possibilitando a escolha de locos regularmente distribuídos em todos os grupos de ligação, buscando uma cobertura homogênea em termos de recombinação no genoma de *Eucalyptus*.

Inicialmente, os oligonucleotídeos (“primers”) de cada microssatélite foram utilizados em uma PCR com o DNA genômico do clone SZ (*Eucalyptus grandis*). Essa reação serviu para identificar os alelos de cada microssatélite, bem como para selecionar aqueles que amplificam locos únicos e com alelos bem distintos, facilitando a análise dos dados.

A reação de PCR foi realizada em placas de 96 poços, num volume final de 6 µL contendo 1 ng de DNA, 0,2 mM de dNTP, 1,5 µg de BSA, 0,6 µL de tampão de PCR 10x, 2,0 mM de MgCl₂, 0,1 µM do par de iniciadores e 1 u de enzima Taq DNA polimerase. Os ciclos de PCR foram realizados em Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) e incluíram uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos com os seguintes passos: 94 °C por 1 minuto para desnaturação, 56 °C por 1 minuto para o anelamento do “primer” e 72 °C por 1 minuto para extensão das novas cadeias de DNA; e, para finalizar, um último passo de extensão a 72 °C por 15 minutos.

Um dos iniciadores de cada par, que flanqueiam o loco SSR, teve seu terminal 5' marcado com um dos fluorocromos 6-FAM, NED ou HEX (Applied Biosystems). Os fragmentos amplificados foram detectados semi-automaticamente no analisador de DNA ABI 3100 (Applied Biosystems), que detecta a fluorescência dos fragmentos marcados e os separa através de uma eletroforese em capilar contendo uma matriz polimérica.

Para a detecção dos fragmentos amplificados tomou-se 1 µL de cada reação (PCR) e adicionou-se 8 µL de formamida deionizada e 0,9 µL de padrão com fragmentos de tamanho conhecido marcados com fluorocromo ROX (Brondani e Grattapaglia, 2001). A seguir, as amostras foram mantidas a 94 °C por 3 minutos e colocadas em contato com gelo para desnaturarem. Por fim, as placas contendo as amostras foram submetidas à eletroforese no ABI 3100. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado com auxílio do programa GeneMapper (Applied Biosystems).

2.3. Triagem dos microssatélites nos *superpools*

Uma vez avaliado o tamanho dos alelos do microssatélite no clone SZ, realizou-se a triagem dos locos selecionados no nível dos *superpools*. Como um dos iniciadores de cada par, que flanqueiam o loco SSR, teve seu terminal 5' marcado com um dos três diferentes fluorocromos, a reação de PCR para triagem

dos *superpools* foi feita em triplex (amplificação de 3 locos marcados com diferentes fluorescências de uma só vez). Além dos 42 *superpools* foram incluídos em cada reação dois controles positivos, constituídos pelo DNA genômico do clone SZ e de outro genótipo de *Eucalyptus*, e um controle negativo sem DNA. As reações de PCR e o programa de termociclagem foram realizados nas mesmas condições previamente descritas (item 2.1.), com a diferença de que aqui foram adicionados três pares de “primers” na reação.

Para detecção dos fragmentos amplificados nos *superpools*, foram reunidos os produtos de duas reações para que em cada eletroforese fossem realizadas triagens de 6 locos simultaneamente (hexaplex), melhorando a eficiência dessa etapa. A detecção dos fragmentos amplificados também foi feita no ABI 3100 segundo as mesmas condições já descritas (item 2.1.).

2.4. Triagem dos microssatélites nos *pools*

A biblioteca genômica tem cobertura estimada de 4x, com isso, espera-se encontrar mais de um *superpool* positivo para a maioria dos locos microssatélites. Como o mapa físico, a ser construído futuramente com essa biblioteca, permitirá encontrar os clones sobrepostos, procurou-se encontrar apenas um clone positivo para cada microssatélite. Nesse sentido, foi possível escolher a menor quantidade possível de *superpools* a serem analisados, de tal maneira que todos os microssatélites estivessem representados e que esses pudessem ser detectados, nos *pools*, através de reações em multiplex. Nessa triagem de *pools* foram utilizadas as mesmas condições de PCR e detecção já descritas (item 2.1.).

2.5. Triagem dos microssatélites nos BACs

O DNA dos *pools* corresponde à reunião do DNA de 96 clones organizados em uma placa. Assim, para encontrar o clone positivo referente a cada *pool* foram

necessárias 96 reações de PCR. Como não há DNA isolado de cada clone separadamente, uma alíquota das próprias colônias foi amostrada com a utilização do replicador 96 Pin Replicator (Nalge Nunc International) e adicionada diretamente no MIX da reação. As condições da reação de PCR foram as mesmas já descritas (item 2.1.), apenas aumentando o volume da reação para 9 uL e reduzindo a concentração de dNTP para 0,14 mM.

A detecção do clone positivo também foi realizada na plataforma ABI 3100, porém para diminuir o número de eletroforeses necessárias para encontrar esse clone, os produtos da reação de PCR contidos na placa de 96 poços foram organizados em 12 *pools* de linha e 8 *pools* de coluna tomando-se para isso 2 uL de cada reação. Assim, o clone positivo foi identificado pela interpolação da linha com a coluna positiva (Figura 2). Posteriormente, uma re-confirmação foi feita a partir de PCR com o DNA isolado dos BACs positivos. A purificação do DNA dos BACs foi realizado através do método de lise alcalina, descrito por Sambrook et al. (2001).

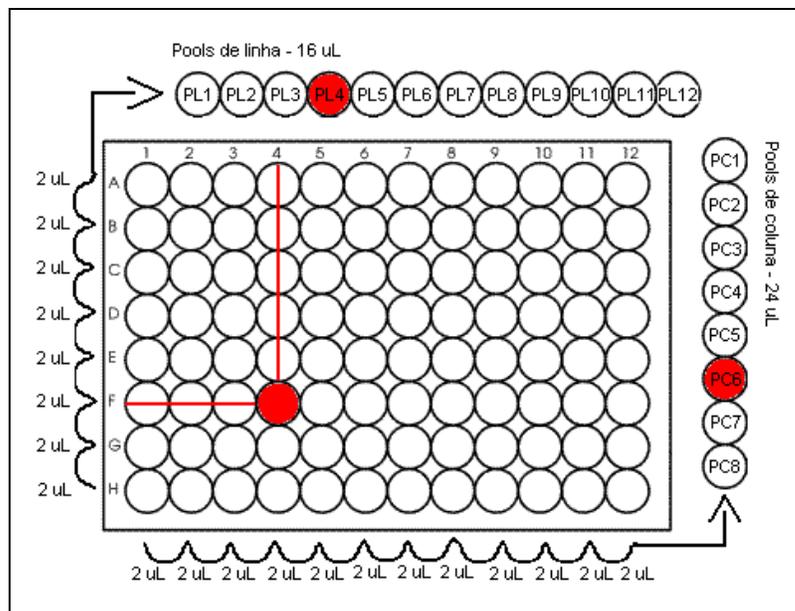


Figura 2. Representação do método para identificação dos clones positivos a partir dos *pools* de linhas e colunas. Em vermelho está um exemplo de *pool* de linha (PL4) e *pool* de coluna (PC6) positivos, bem como a identificação do respectivo clone positivo (F04).

3 - RESULTADOS

Foram testados 53 marcadores microssatélites, regularmente distribuídos no mapa genético (Capítulo 1), em reações de PCR com o DNA genômico do clone SZ. Desses, 47 amplificaram um loco individual, produziram fragmentos de fácil interpretação e, portanto, foram selecionados para a realização da ancoragem do mapa na biblioteca de BAC.

Na triagem dos *superpools* utilizando esses 47 locos foram identificados em média 3,7 *superpools* positivos para cada microssatélite, sendo encontrado um máximo de 15 *superpools* para o Embra038 e um mínimo de um *superpool* positivo para 10 locos diferentes (Tabela 1).

Para cada um dos 47 locos escolheu-se apenas um *superpool* positivo para dar continuidade à triagem (cédulas marcadas em cinza na Tabela 1). Em todas as análises de *pools* componentes dos *superpools* positivos, encontrou-se apenas um *pool* positivo, com exceção de 4 locos microssatélites (Embra019, Embra138, Embra155 e Embra692) onde foram identificados 2 *pools* positivos no mesmo *superpool*. Na análise dos clones constituintes dos *pools* positivos foi encontrado um clone positivo para a maioria dos locos. Somente para 3 microssatélites (Embra158, Embra219 e Embra340) foram identificados dois clones positivos (Tabela 2).

Tabela 1. Relação dos *superpools* positivos (marcados com X) para os 47 locos selecionados para a triagem e daqueles analisados para triagem dos *pools* (cédulas marcadas em cinza). Na última coluna à direita é listado o número de *superpools* positivos encontrados para cada loco microssatélite.

Loco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	Posit.				
EG 076												X								X										X										X	4						
EG Aldolase																																							X				2				
Embra 002										X	X					X																											3				
Embra 003	X		X																							X					X												4				
Embra 006												X														X			X														5				
Embra 011																										X																	1				
Embra 019													X																										X				2				
Embra 021																			X																				X				4				
Embra 027							X				X																													X				3			
Embra 028																																												1			
Embra 038								X		X						X	X							X	X	X	X												X	X	X		15				
Embra 040	X								X							X										X	X	X	X											X	X	X		3			
Embra 045														X			X																								X			3			
Embra 046		X									X																															X		3			
Embra 047			X	X												X			X												X											X		8			
Embra 049	X							X	X	X						X		X												X		X												9			
Embra 068		X																																											2		
Embra 070													X										X	X	X																			4			
Embra 072				X		X						X		X							X																			X	X			7			
Embra 087																																													1		
Embra 097	X														X											X	X																	4			
Embra 098					X		X					X									X																			X				5			
Embra 109				X																																									1		
Embra 115																																													1		
Embra 121																																													1		
Embra 138		X	X				X																																						3		
Embra 155		X																								X																			3		
Embra 158					X	X	X	X		X	X			X											X																				8		
Embra 159													X			X								X	X																				6		
Embra 168																																														2	
Embra 204			X												X									X	X				X																6		
Embra 213				X	X																																									4	
Embra 219		X	X	X			X		X	X					X																															7	
Embra 227							X																																							1	
Embra 241																																														1	
Embra 332																																														1	
Embra 340														X																																5	
Embra 618			X																																											2	
Embra 627													X																																		5
Embra 646											X								X																												4
Embra 648																																															1
Embra 651							X			X																																		X			4
Embra 659			X					X																																							5
Embra 661												X									X																										2
Embra 662					X																		X																								2
Embra 692					X										X																																3
Embra 746											X																																				3

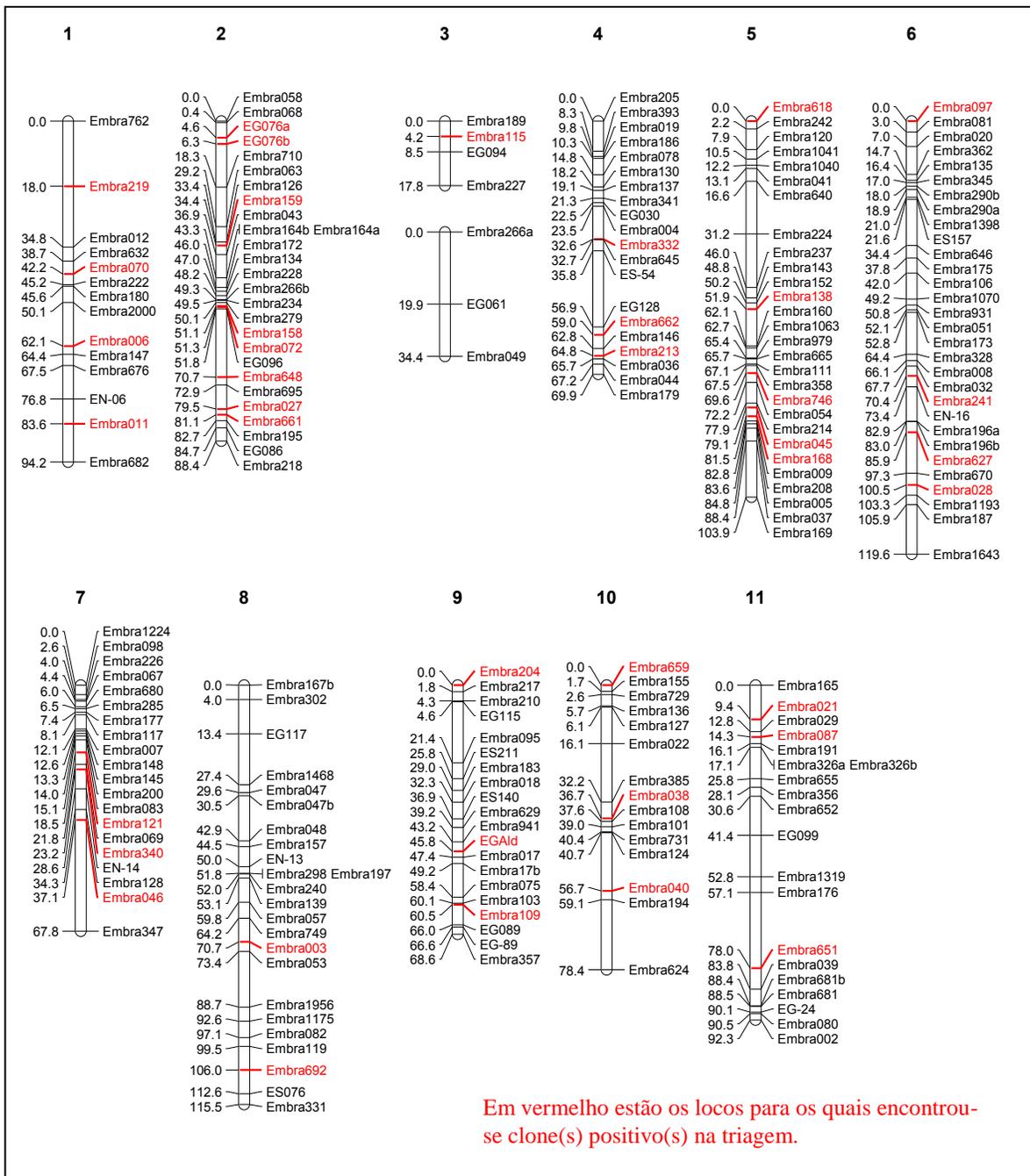
Tabela 2. Relação dos *pool/s* (Pool +) e clones (BAC +) positivos para cada microssatélite (Loco), com o respectivo grupo de ligação (G.L.) onde cada loco foi mapeado e o tamanho do alelo em pb (Alelo pb) amplificado no clone positivo.

Loco	G.L.	Alelo pb	Pool +	BAC +
EG-076	2	125	210	EUGR_BC_210_H09
EG-Aldolase	9	216	195	EUGR_BC_195_E10
Embra 002	11	128	51	X
Embra 003	8	118	150	EUGR_BC_150_F03
Embra 006	1	143	203	EUGR_BC_203_H09
Embra 011	1	132	126	EUGR_BC_126_A06
Embra 019	4	167	191 e 193	X
Embra 021	11	117	193	EUGR_BC_193_C11
Embra 027	2	149	32	EUGR_BC_032_D04
Embra 028	6	202	209	EUGR_BC_209_D01
Embra 038	10	103	50	EUGR_BC_050_A12
Embra 040	10	120	79	EUGR_BC_079_C10
Embra 045	5	141	70	EUGR_BC_070_E07
Embra 046	7	321	207	EUGR_BC_207_E08
Embra 047	8	143	16	X
Embra 049	3	115	47	X
Embra 068	2	103	163	X
Embra 070	1	172	119	EUGR_BC_119_H08
Embra 072	2	134	69	EUGR_BC_069_E10
Embra 087	11	116	86	EUGR_BC_086_D07
Embra 097	6	130	125	EUGR_BC_125_G11
Embra 098	7	240	X	X
Embra 109	9	269	19	EUGR_BC_019_E03
Embra 115	3	99/256	209	EUGR_BC_209_D11
Embra 121	7	130	164	EUGR_BC_164_F10
Embra 138	5	180/206	33 e 35	EUGR_BC_035_H06
Embra 155	10	151	09 e 10	X
Embra 158	2	116	55	EUGR_BC_055_D01/E01
Embra 159	2	107/175	87	EUGR_BC_087_D04
Embra 168	5	73	149	EUGR_BC_149_E02
Embra 204	9	144	118	EUGR_BC_118_F12
Embra 213	4	231	18	EUGR_BC_018_A01
Embra 219	1	265/285	70	EUGR_BC_070_A01/G07
Embra 227	3	313	34	X
Embra 241	6	80	120	EUGR_BC_120_H05
Embra 332	4	365	121	EUGR_BC_121_A03
Embra 340	7	199	206	EUGR_BC_206_D05/E05
Embra 618	5	163	90	EUGR_BC_090_E08
Embra 627	6	242	161	EUGR_BC_161_B10
Embra 646	6	158	166	X
Embra 648	2	167	147	EUGR_BC_147_A03
Embra 651	11	108	205	EUGR_BC_205_B12
Embra 659	10	299	17	EUGR_BC_017_E02
Embra 661	2	250	96	EUGR_BC_096_D11
Embra 662	4	258	21	EUGR_BC_021_H09
Embra 692	8	264	66 e 69	EUGR_BC_069_G12
Embra 746	5	172	205	EUGR_BC_205_D10

Não foi obtido sucesso na triagem de 9 locos. Apenas para um loco (Embra098) não foi possível a identificação de um *pool* positivo, para os outros 8 locos (Embra002, Embra 019, Embra047, Embra049, Embra068, Embra155, Embra227 e Embra646) não foi possível identificar o clone positivo (Tabela 2).

A maioria dos locos microssatélites amplifica apenas um fragmento na PCR com o clone positivo. Quatro locos (Embra115, Embra138, Embra159 e Embra219) produzem dois fragmentos quando utilizados em PCR com seus respectivos clones positivos.

Por fim, dos 47 locos selecionados para a triagem, obteve-se pelo menos um clone positivo para 38 desses microssatélites. Esses locos estão distribuídos de forma relativamente regular no mapa genético e, portanto, possivelmente no genoma do *Eucalyptus*, como demonstra a presença deles em todos os grupos de ligação do mapa genético construído no capítulo 1 desse trabalho (Figura 3).



Em vermelho estão os locos para os quais encontrou-se clone(s) positivo(s) na triagem.

Figura 3. Distribuição dos 38 locos no mapa genético para os quais foi confirmada a identificação de clone(s) BAC(s) positivo(s) na triagem da biblioteca EUGR_BC_02. O mapa foi construído no Capítulo 1 desse trabalho e os grupos de ligação estão numerados de acordo com o mapa genético referência para o gênero *Eucalyptus* (Brondani et al., 2002).

4 – DISCUSSÃO

O número médio de *superpools* positivos encontrados para os 47 locos microssatélites corrobora a cobertura da biblioteca EUGR_BC_02, estimada originalmente em 4x em função do tamanho médio dos clones em kb e do número de clones que perfazem a biblioteca. O valor encontrado (3,7 *superpools* positivos por loco) está subestimado em relação ao número de clones positivos, já que mais de um clone contendo o microssatélite pode estar presente nos *superpools* positivos. De fato, para 7 locos, o *superpool* positivo escolhido para dar continuidade à triagem demonstrou conter mais de um clone positivo. Assim, o número médio de clones positivos para esses 47 locos deve ser ainda mais próximo do valor estimado da cobertura da biblioteca genômica (4x).

Como próxima etapa no âmbito do projeto Genolyptus, além da triagem de centenas de outros microssatélites, seria importante encontrar os outros clones positivos para os locos avaliados nesse trabalho. O fato de se ter encontrado ao menos um clone positivo para 38 microssatélites, não garante que esses marcadores estejam em contíguos do mapa físico em construção. É possível que muitos desses clones positivos não estejam agrupados em nenhum segmento contíguo. A busca por outros clones positivos para os microssatélites aumentaria a probabilidade de ancoragem de contíguos do mapa físico no mapa genético.

Esse trabalho demonstra que a biblioteca EUGR_BC_02 está bem organizada, tendo em vista que não houve problemas durante a execução das triagens que pudessem evidenciar erros de identificação nos diferentes níveis de hierarquização da biblioteca. Em geral, foi possível encontrar os *pools* e clones

positivos para os *superpools* selecionados para serem analisados. Para a grande maioria dos locos onde a triagem não obteve sucesso, não foi possível a identificação do clone positivo, o que é plausível porque nessa etapa foram necessárias PCR utilizando uma alíquota das colônias. Essas reações com as colônias podem resultar em problemas na amplificação do DNA devido ao excesso de conteúdo celular na reação. Também não pode ser descartada a possibilidade de que os *superpools* e *pools* positivos, para os 9 locos microssatélites onde a triagem não obteve sucesso, sejam na verdade falsos positivos. Para verificar isso são necessárias repetições das reações de PCR, preferencialmente com um único par de primers, nos níveis de *pools* e *superpools*. As PCRs com os 96 clones componentes de cada *pool* positivo onde a triagem não obteve sucesso também devem ser repetidas e, em última instância, essa repetição deve ser feita com o DNA isolado desses clones.

A amplificação de dois fragmentos em PCRs com os clones positivos para quatro diferentes microssatélites (Embra115, Embra138, Embra159 e Embra219) provavelmente é o resultado de uma duplicação *in tandem* nesses locos. Esses fragmentos também são amplificados com o DNA do clone SZ. Apesar de não ter sido avaliado a segregação desses fragmentos em progênie, esses não podem ser alélicos a esses microssatélites uma vez que na clonagem apenas o DNA de um dos cromossomos homólogos insere-se no vetor BAC.

A metodologia de triagem da biblioteca de BAC foi eficiente devido à hierarquização da biblioteca em um sistema de *superpools* e *pools* e ao uso de primers marcados com diferentes fluorescências nas análises eletroforéticas. Assim, aproximadamente 150 PCRs foram necessárias para a triagem de um clone positivo para cada loco, sendo que no nível de *superpool* e *pool* as PCRs e eletroforeses foram realizadas em sistema multiplex (amplificação e análise simultânea de vários locos).

É importante destacar a existência de estratégias ainda mais eficientes. A triagem através da hibridização de sondas de interesse em membranas contendo clones da biblioteca EUGR_BC_02 em alta densidade pode ser aplicável para um projeto da envergadura do Genolyptus, que possui o objetivo de integrar o maior

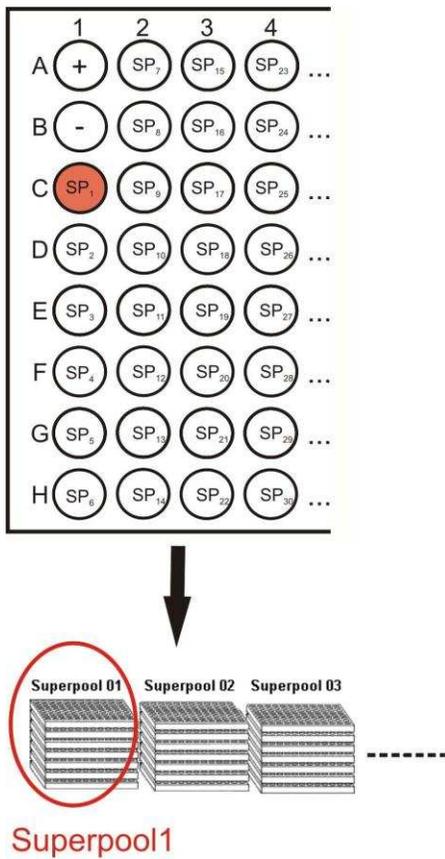
número possível de segmentos contíguos do mapa físico, em construção, no mapa genético. Apesar dos problemas advindos da marcação radioativa da sonda, seria recomendável a construção de membranas piloto para testar a eficiência dessa metodologia.

Melhorias também podem ser propostas no atual esquema de triagem baseado em PCRs dos conjuntos hierarquizados de clones da biblioteca EUGR_BC_02. Uma primeira melhoria poderia ser conseguida otimizando a organização dos *superpools* para análise dos locos microssatélites na plataforma ABI3100. Como nesse sistema a detecção dos fragmentes tem sido feita através da eletroforese em 16 capilares, ao invés de unir as placas para formar um total de 42 *superpools*, como no presente trabalho, seria mais eficiente a união dos clones de sete em sete placas. Assim, ter-se-ia um total de 30 *superpools* que poderiam ser avaliados, juntamente com um controle positivo e um negativo, em apenas duas eletroforeses no ABI3100. Estratégias de triagem dos *superpools* positivos em agrupamentos de quatro dimensões (*pools* de placas, linhas, colunas e diagonais) diminuiria sensivelmente o número de PCRs necessários para encontrar o clone ou clones positivos para cada *superpool*. Para diminuir a probabilidade de identificação de falsos positivos poderia ser adotado o sistema de matriz da Amplicon Express®, onde os *pools* são repetidos duas ou mais vezes, exigindo a amplificação de mais de um fragmento para declaração do *pool* positivo.

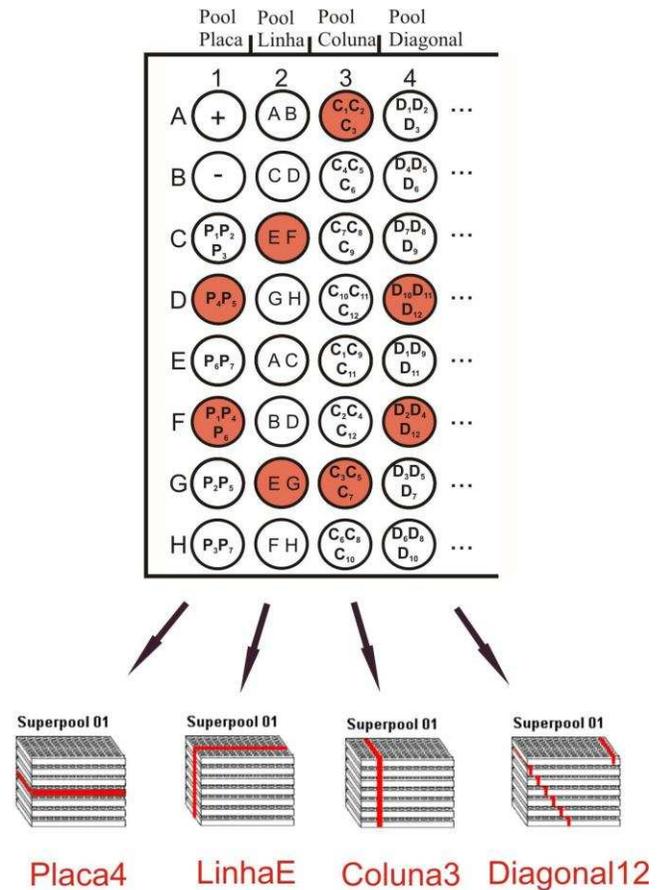
Nesse sentido, propõe-se uma nova organização da biblioteca, para que seja possível a identificação de um clone positivo para um determinado loco com 60 PCRs. Isso representa uma redução da ordem de 60% em relação as atuais 143 PCRs necessárias para encontrar o clone alvo. Além disso, a partir desta estratégia de reunião dos clones haverá maior possibilidade de multiplexagem em todas etapas da triagem. Como já proposto as 210 placas que compõem toda a biblioteca EUGR_BC_02 teriam os seus DNAs reunidos de sete em sete placas formando 30 *superpools*. Para cada *superpool* seria organizada uma placa contendo os 7 *pools* de placa na coluna 01, os 8 *pools* de linha na coluna 02, os 12 *pools* de coluna na coluna 03 e os 12 *pools* de diagonal na coluna 04 (Figura

4). Os *pools* de placa são formados pela reunião do DNA dos 96 clones de cada placa. Os *pools* de linha são formados pela união do DNA de cada linha das 7 placas que compõem o *superpool*, assim o *pool* de linha A é formado pelos 84 clones da linha A das sete placas. Da mesma maneira, o *pool* de coluna é formado pela reunião do DNA de cada coluna nas sete placas. O *pool* de diagonal é essencial para a correta identificação dos clones positivos, quando mais de um é encontrado em diferentes placas dentro de um *superpool*. Quando dois ou mais clones positivos estão contidos em uma mesma placa com coordenadas diferentes, mesmo com a estratégia proposta, não é possível identificar suas localizações individuais. Os *pools* de diagonal são constituídos pela união de colunas diferentes em cada placa. O *pool* de diagonal D1, por exemplo, é formado pela união da coluna 1 da placa 1, coluna 2 da placa 2, coluna 3 da placa 3 e assim por diante. O *pool* de diagonal D2 é formado pela coluna seguinte de cada placa, ou seja, coluna 2 da placa 1, coluna 3 da placa 2 e assim por diante. Os *pools* devem ser reunidos em duplicada com *pools* diferentes (matriz) para diminuir a ocorrência de falsos positivos. Um exemplo de triagem na biblioteca EUGR_BC_02 hierarquizada dessa maneira está representado na Figura 4.

Triagem de Superpools



Triagem em 4-dimensões



Clone Positivo = EUGR_BC_004_E03

Figura 4. Esquema de triagem na biblioteca EUGR_BC_02 organizada segundo o esquema proposto para diminuir o número de PCRs. A triagem é realizada em duas etapas: triagem de *superpools* e triagem do clone positivo em 4 dimensões. Numa primeira etapa a triagem é conduzida nos 30 *superpools* que contêm todos os clones da biblioteca. A partir do superpool positivo, são analisados os sete *pools* de placa (P1 a P7), oito *pools* de linha (A a H), 12 *pools* de coluna (C1 a C12) e 12 *pools* de diagonal (D1 a D12) que compõem o superpool. Nesse exemplo a triagem dos *pools* de diagonais é dispensável, porém se houvessem dois clones positivos para o *superpool* 1, essa quarta dimensão serviria para identificar o clone positivo de cada placa positiva. O clone positivo do exemplo é o EUGR_BC_004_E03.

Por fim, os 38 locos microssatélites para os quais foi obtido clone(s) positivo(s) estão distribuídos em todos os grupos de ligação do mapa genético apresentado no Capítulo 1 desse trabalho. Os clones positivos para esses microssatélites atuarão como “âncoras” do mapa genético no mapa físico, em construção com base na biblioteca EUGR_BC_02. Essa integração é um passo inicial para a clonagem posicional de genes e será útil para garantir a qualidade do mapeamento físico, permitindo a união e ordenação de segmentos contíguos de um mesmo grupo de ligação e também a separação de eventuais segmentos contíguos quiméricos. Além disso, os clones identificados serão utilizados em hibridizações fluorescente *in situ* (FISH), estabelecendo as relações entre grupos de ligação, contíguos de BACs e cromossomos (integração mapa genético, físico e citológico – Figura 5). As relações entre os grupos de ligação do mapa genético referência (Brondani et al., 2002) com os cromossomos de *Eucalyptus* ainda não foram estabelecidas. A integração das diferentes escalas de informação genômica aumentará sobremaneira o entendimento da organização, estrutura e funcionalidade do genoma do *Eucalyptus*, possibilitando oportunidades únicas para compreender as relações entre as variações no nível molecular e a diversidade fenotípica.

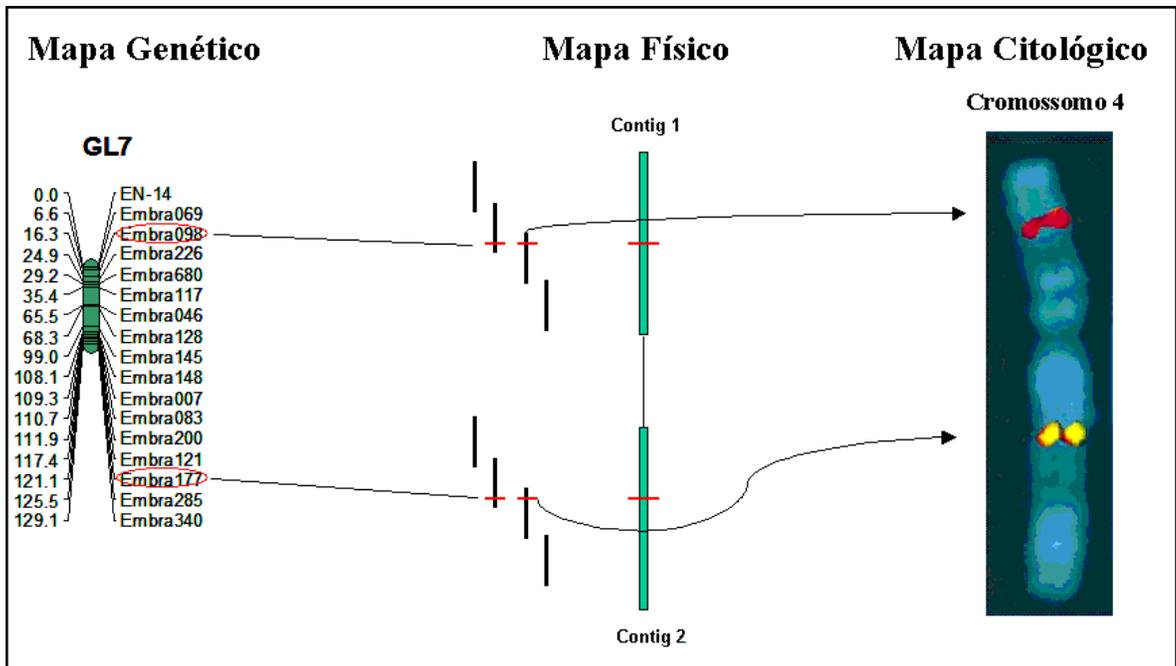


Figura 5. Diagrama esquemático da integração das informações genômicas de mapeamento genético, físico e citológico. Através desse exemplo de integração foi possível verificar o posicionamento de dois contíguas e estabelecer as relações numéricas entre o cromossomos 4 e grupo de ligação 7, que deverá ser numerado com 4.

5 – CONCLUSÃO

A metodologia de triagem da biblioteca de BAC foi eficiente devido à hierarquização da biblioteca em um sistema de *superpools* e *pools* e ao uso de primers marcados com diferentes fluorescências na análise eletroforética. Assim, aproximadamente 150 PCRs foram necessárias para a triagem de um clone positivo para cada loco, sendo que no nível de *superpool* e *pool* as PCRs e eletroforeses foram realizadas em sistema multiplex (amplificação e análise simultânea de vários locos).

Nova organização da biblioteca poderia diminuir ainda mais o número de PCRs necessárias em cada triagem e, além disso, aumentaria a possibilidade de utilização de sistema multiplex em todas as etapas da busca do clone alvo. Uma estratégia foi proposta para diminuir para 60 o número de PCRs necessárias em cada triagem.

Os 38 locos microssatélites, para os quais foram identificados pelo menos um clone BAC positivo, estão distribuídos em todos os grupos de ligação do mapa genético de *Eucalyptus*, fornecendo, portanto, uma ancoragem de todo o mapa genético na biblioteca de BAC que atualmente está sendo utilizada para a construção de um mapa físico.

Esse trabalho representa uma importante contribuição para o esforço conjunto, no âmbito do projeto Genolyptus, de estabelecer as relações entre grupos de ligação, segmentos contíguos de BAC e cromossomos em *Eucalyptus*.

A integração dos mapas genético, físico e citológico, melhorará sobremaneira o conhecimento da organização, estrutura e funcionalidade do

genoma de *Eucalyptus*, oferecendo oportunidades únicas de estabelecer as complexas relações entre genótipo e fenótipo para caracteres de interesse florestal.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aerts, J.A., Veenendaal, T., van der Poel, J.J., Crooijmans, R.P. & Groenen, M.A. Chromosomal assignment of chicken clone contigs by extending the consensus linkage map. *Anim Genet* **36**, 216-22. 2005.

Amemiya, C.T.; Alegria-Hartman, M. J.; Aslanidis, C.; Chen, C.; Nikolic, J.; Gingrich, J. C. & de Jong, P. J. et al. A two-dimensional YAC pooling strategy for library screening via STS and Alu-PCR methods. *Nucleic Acids Res* **20**, 2559-63. 1992.

Asakawa, S.; Abe, I.; Kudoh, Y.; Kishi, N.; Wang, Y.; Kubota, R.; Kudoh, J.; Kawasaki, K.; Minoshima, S. & Shimizu, N. Human BAC library: construction and rapid screening. *Gene* **191**, 69-79 (1997).

Barillot, E., Lacroix, B. & Cohen, D. Theoretical analysis of library screening using a N-dimensional pooling strategy. *Nucleic Acids Res* **19**, 6241-7. 1991.

Bracelpa – Associação Brasileira de Celulose e Papel. Desempenho do setor em 2004. <http://www.bracelpa.org.br/> (12 jun. 2005)

Breen, M.; Lindgren, G.; Binns, M. M.; Norman, J.; Irvin, Z.; Bell, K.; Sandberg, K. & Ellegren, H. Genetical and physical assignments of equine microsatellites--first

integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mamm Genome* **8**, 267-73. 1997.

Brommonschenkel, S.H., Frary, A. & Tanksley, S.D. The broad-spectrum tospovirus resistance gene Sw-5 of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene Mi. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1130-8. 2000.

Brommonschenkel, S.H.; Brondani, R.P.V.; Bucelli, R.F. et al. A BAC library of *Eucalyptus grandis*: characterization, fingerprinting, BAC-end sequencing and shotgun assembly of lignification's genes. In: IUFRO Tree Biotechnology, 2005, Pretoria, South Africa. Apresentação oral no Simpósio 3: Breakthrough and high-throughput technologies for functional and structural genomics in trees. 2005.

Brondani, R.P.V.; Brondani, C.; Tarchini, R. & Grattapaglia, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor Appl Gene*. **97**, 816-827. 1998.

Brondani, R.P.V. & Grattapaglia, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. *Biotechniques* **31**, 793-5. 2001.

Brondani, R.P.V.; Brondani, C. & Grattapaglia, D. Towards the construction of a genus wide reference linkage map for *Eucalyptus* based on microsatellite markers. *Molecular and General Genomics* **267**, 338-347. 2002.

Byrne M.; Murrell J.C.; Allen, B. & Moran, G.F. An integrated linkage genetic linkage map for *Eucalyptus* using RFLP, RAPD and isozyme markers. *Theor Appl Genet* **91**, 869 – 875. 1995.

Chen, M.; Presting, G.; Barbazuk, W. B.. et al. An integrated physical and genetic map of the rice genome. *Plant Cell* **14**, 537-45. 2002.

Cheung, V. G.; Nowak, N.; Jang, W. et al. Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature* **409**, 953-8. 2001.

Draye, X.; Lin, Y. R.; Qian, X. Y. et al. Toward integration of comparative genetic, physical, diversity, and cytomolecular maps for grasses and grains, using the sorghum genome as a foundation. *Plant Physiol* **125**, 1325-41. 2001.

Evans, G.A. & Lewis, K.A. Physical mapping of complex genomes by cosmid multiplex analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5030-4. 1989.

Frary, A.; Nesbitt, T. C.; Grandillo, S.; Knaap, E.; Cong, B.; Liu, J.; Meller, J.; Elber, R.; Alpert, K. B. & Tanksley, S. D. fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* **289**, 85-8. 2000.

Gan, S.; Shi, J.; Li, M.; Wu, K.; Wu, J. & Bai, J. Moderate-density molecular maps of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake and *E. tereticornis* Smith genomes based on RAPD markers. *Genetica* **118**, 59-67. 2003.

Gardiner, J.; Schroeder, S.; Polacco, M. L. et al. Anchoring 9,371 maize expressed sequence tagged unigenes to the bacterial artificial chromosome contig map by two-dimensional overgo hybridization. *Plant Physiol* **134**, 1317-26. 2004.

Grattapaglia, D. & Sederoff R.R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers, *Genetics* **137**, 1121-1137. 1994.

Grattapaglia, D. Genômica Florestal. In: Luiz Mir. (Org.). Genômica. 1 ed. São Paulo, v. 1, p. 917-934. 2004.

Korenberg, J. R.; Chen, X. N.; Devon, K. L.; Noya, D.; Oster-Granite, M. L. & Birren, B. W. Mouse molecular cytogenetic resource: 157 BACs link the chromosomal and genetic maps. *Genome Res* **9**, 514-23. 1999a.

Korenberg, J. R.; Chen, X. N.; Sun, Z.. et al. Human genome anatomy: BACs integrating the genetic and cytogenetic maps for bridging genome and biomedicine. *Genome Res* **9**, 994-1001. 1999b.

Liu, B. H. Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis. CRC Press, 1998. 611p.

Marques, C.M.; Araujo, J.A.; Ferreira, J.G.; Whetten, R.; O'malley, D.M.; Liu, B.H. & Sederoff, R. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. *Theor Appl Genet* **96**, 727-737. 1998.

Marra, M.; Kucaba, T.; Sekhon, M. et al. zA map for sequence analysis of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nat Genet* **22**, 265-70. 1999.

McPherson, J. D.; Marra, M.; Hillier, L. et al. A physical map of the human genome. *Nature* **409**, 934-41 2001.

Meyers, B.C., Scalabrin, S. & Morgante, M. Mapping and sequencing complex genomes: let's get physical! *Nat Rev Genet* **5**, 578-88. 2004.

Mozo, T.; Dewar, K.; Dunn, P. et al. A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nat Genet* **22**, 271-5. 1999.

Myburg, A. A.; Griffin, A. R.; Sederoff, R. R. & Whetten, R. W. Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F1 hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach. *Theor Appl Genet* **107**, 1028-1042. 2003.

Nievergelt, C.M., Smith, D.W., Kohlenberg, J.B. & Schork, N.J. Large-scale integration of human genetic and physical maps. *Genome Res* **14**, 1199-205. 2004.

O'Neill, C.M. & Bancroft, I. Comparative physical mapping of segments of the genome of *Brassica oleracea* var. *alboglabra* that are homoeologous to sequenced regions of chromosomes 4 and 5 of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **23**, 233-43. 2000.

Romanov, M.N., Daniels, L.M., Dodgson, J.B. & Delany, M.E. Integration of the cytogenetic and physical maps of chicken chromosome 17. *Chromosome Res* **13**, 215-22. 2005.

Sambrook, J. & Russell, D. W. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SBS – Sociedade Brasileira de Silvicultura. Setor florestal brasileiro: área plantada com pinus e eucaliptos no Brasil (ha) – 2001. <http://www.sbs.org.br> (05 abr. 2005)

Takahashi, Y., Shomura, A., Sasaki, T. & Yano, M. Hd6, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the alpha subunit of protein kinase CK2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7922-7. 2001.

Thamarus, K. A.; Groom, K.; Murrell, J.; Byrne, M. & Moran, G. F. A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre, and floral traits. *Theor Appl Genet.* **104**, 379-387. 2002.

Verhaegen, D. & Plomion, C. Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers, *Genome* **39**,1051-1061. 1996.

Yu, A.; Zhao, C.; Fan, Y.; Jang, W.; Mungall, A. J.; Deloukas, P.; Olsen, A.; Doggett, N. A.; Ghebranious, N.; Broman, K. W. & Weber, J. L. Comparison of human genetic and sequence-based physical maps. *Nature* **409**, 951-3. 2001.

ANEXO

Anexo 1. Quadro de saída do programa GQMOL com os dados referente à análise de variância para testar a ligação dos marcadores a QTLs. Estão demonstrados somente os marcadores significativos a 1% pelo teste F. Para cada marcador constam o tipo de segregação, o genótipo dos descendentes com suas respectivas médias fenotípicas e número de indivíduos amostrados e os resultados da análise de variância, como quadrado médio de tratamento, quadrado médio do resíduo, valor de F e seu valor de significância.

```

=====
Programa GQMOL                      Análise QTL - Marca Simples - Pop FIC
Número de marcadores :              226
Número de caracteres :              24
Número de Pais + FIC :              190
=====

```

Análise da característica DAP (cm)

Marca	Pais	Descendente/Média/Núm. Indiv.				QMT/GL	QMR/GL	F/SIG
EG128	12x33	A1A3	A2A3					
		14.7343	15.6265			34.5235	3.5543	9.7132
		70	114			1	182	.0021 **
Embra008	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		14.3691	15.0206	16.2698	15.4997	31.9157	3.1906	10.0031
		53	49	48	34	3	180	.0 **
Embra021	12x33	A1A3	A2A3					
		14.7182	15.7365			47.6066	3.4324	13.87
		88	96			1	182	.0003 **
Embra032	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		14.3246	15.0322	16.3248	15.7059	31.9414	3.358	9.512
		46	46	40	41	3	169	.0 **
Embra051	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		14.83	14.6645	16.0318	15.547	18.9325	3.4377	5.5074
		50	42	49	43	3	180	.0012 **
Embra072	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3			
		16.4263	15.2159	14.8813	14.7593	24.7922	3.2708	7.5798
		43	56	38	44	3	177	.0001 **
Embra082	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		14.8473	16.0382	15.0584	14.9753	14.081	3.5218	3.9982
		45	49	45	38	3	173	.0088 **
Embra1070	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		16.0953	15.4583	14.8781	14.519	21.2012	3.2957	6.433
		47	47	48	40	3	178	.0004 **
Embra158	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3			
		16.5521	15.1848	14.837	14.7895	28.9508	3.2497	8.9087
		43	54	37	43	3	173	.0 **
Embra172	24x13	A1A2	A1A4	A2A3	A3A4			
		14.7694	14.9246	15.2096	16.186	18.049	3.4338	5.2563
		48	35	55	45	3	179	.0017 **
Embra173	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		16.0883	15.4591	14.7982	14.687	20.2537	3.4324	5.9007
		52	43	49	40	3	180	.0007 **
Embra175	12x33	A1A3	A2A3					
		14.8841	15.654			26.782	3.6071	7.4247
		87	94			1	179	.0071 **
Embra196a	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		16.1167	15.8376	15.0894	14.3421	28.3934	3.4147	8.315
		45	34	50	47	3	172	.0 **
Embra196b	12x23	A1A2	A1A3	A2A2	A2A3			

		15.0894	14.3421	16.093	15.7614	26.9367	3.3979	7.9275	
		50	47	44	37	3	174	.0001	**
Embra228	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3				
		16.3498	15.0702	14.9326	14.73	24.7692	3.3733	7.3428	
		47	57	34	46	3	180	.0001	**
Embra234	11x12	A1A1	A1A2						
		15.6524	14.8186			32.3082	3.4933	9.2487	
		104	84			1	186	.0027	**
Embra241	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		15.7059	16.0415	15.0933	14.2429	25.6723	3.2886	7.8064	
		41	41	51	41	3	170	.0001	**
Embra266b	11x23	A1A2	A1A3						
		14.8175	15.6175			27.3439	3.6341	7.5243	
		77	96			1	171	.0067	**
Embra279	12x12	A1A1	A1A2	A2A2					
		16.3368	14.9923	14.7893		35.636	3.3016	10.7937	
		47	96	45		2	185	.0	**
Embra326a	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3				
		15.6569	15.11	15.6821	14.4423	15.6756	3.5351	4.4342	
		42	36	61	43	3	178	.0049	**
Embra326b	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		15.6569	15.6821	15.11	14.4423	15.6756	3.5351	4.4342	
		42	61	36	43	3	178	.0049	**
Embra328	12x11	A1A1	A1A2						
		15.9809	14.6167			84.5862	3.2683	25.8807	
		88	94			1	180	.0	**
Embra332	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		14.49	15.1973	15.6687	15.6644	15.2336	3.5507	4.2903	
		48	30	52	52	3	178	.006	**
Embra341	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		14.5863	15.1006	15.5962	15.8038	14.2652	3.5662	4.0001	
		49	35	52	47	3	179	.0087	**
Embra627	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		15.1504	14.2184	15.9672	15.7361	26.8535	3.3223	8.0828	
		52	45	46	36	3	175	.0	**
Embra645	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		14.49	15.1973	15.702	15.6682	15.6416	3.5428	4.415	
		48	30	51	51	3	176	.0051	**
EN-16	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		14.406	14.9324	16.0951	15.9374	29.4855	3.3057	8.9196	
		48	50	39	46	3	179	.0	**

Análise da característica Altura (m)

Marca	Pais	Descendente/Média/Núm. Indiv.				QMT/GL	QMR/GL	F/SIG
EG030	12x33	A1A3	A2A3					
		20.8677	20.2949			14.3143	1.5849	9.0318
		99	78			1	175	.003
EG076a	12x22	A1A2	A2A2					
		20.401	20.8988			11.2358	1.5668	7.1711
		103	81			1	182	.0081
EG128	12x33	A1A3	A2A3					
		20.29	20.8228			12.3119	1.5609	7.8877
		70	114			1	182	.0055
Embra008	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		20.2113	20.5102	21.0417	20.8	6.3588	1.5272	4.1637
		53	49	48	34	3	180	.007
Embra021	12x33	A1A3	A2A3					
		20.2591	20.9198			20.0422	1.504	13.3261
		88	96			1	182	.0003
Embra032	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		20.1435	20.5587	21.0325	20.8561	6.566	1.5364	4.2736
		46	46	40	41	3	169	.0061
Embra047	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		20.069	20.7451	21.0357	20.6192	6.0774	1.5533	3.9127
		42	51	28	52	3	169	.0098

Embra047b	12x34	A1A3 20.1159 44	A1A4 20.9574 47	A2A3 21.0586 29	A2A4 20.6417 48	7.2683 3	1.4481 164	5.0194 .0023 **
Embra048	12x23	A1A2 20.7315 54	A1A3 20.022 41	A2A2 20.6538 52	A2A3 21.0394 33	7.0508 3	1.5178 176	4.6454 .0038 **
Embra058	13x22	A1A2 20.3474 95	A2A3 20.9429 77			15.0811 1	1.583 170	9.5271 .0024 **
Embra063	12x23	A1A2 21.1205 44	A1A3 20.9333 24	A2A2 20.198 51	A2A3 20.4333 48	8.0414 3	1.5128 163	5.3157 .0016 **
Embra068	13x22	A1A2 20.351 104	A2A3 20.947 83			16.3984 1	1.5114 185	10.8499 .0012 **
Embra072	12x13	A1A1 21.1767 43	A1A2 20.5946 56	A1A3 20.6132 38	A2A3 20.2455 44	6.4514 3	1.4691 177	4.3913 .0052 **
Embra126	12x34	A1A3 21.1787 47	A1A4 20.7171 35	A2A3 20.2213 61	A2A4 20.535 40	8.3223 3	1.4598 179	5.701 .0009 **
Embra134	12x22	A1A2 20.4119 101	A2A2 20.9038 78			10.652 1	1.5505 177	6.8701 .0095 **
Embra158	12x13	A1A1 21.2116 43	A1A2 20.5093 54	A1A3 20.5081 37	A2A3 20.2512 43	7.3415 3	1.4768 173	4.9713 .0025 **
Embra159	12x34	A1A3 20.6441 34	A1A4 21.1913 46	A2A3 20.48 40	A2A4 20.2917 60	7.4226 3	1.5061 176	4.9284 .0026 **
Embra164	12x33	A1A3 20.9321 78	A2A3 20.4229 105			11.6038 1	1.5344 181	7.5622 .0066 **
Embra172	24x13	A1A2 20.3583 48	A1A4 20.5457 35	A2A3 20.4527 55	A3A4 21.1867 45	6.4872 3	1.4998 179	4.3252 .0057 **
Embra205	12x23	A1A2 20.2833 30	A1A3 20.2405 37	A2A2 20.6311 45	A2A3 21.0351 57	6.1848 3	1.5593 165	3.9665 .0092 **
Embra228	12x13	A1A1 21.2468 47	A1A2 20.4018 57	A1A3 20.5706 34	A2A3 20.2826 46	8.8333 3	1.4995 180	5.891 .0007 **
Embra279	12x12	A1A1 21.1681 47	A1A2 20.526 96	A2A2 20.2444 45		10.6565 2	1.4873 185	7.1648 .001 **
Embra328	12x11	A1A1 20.9273 88	A1A2 20.3404 94			15.6527 1	1.5019 180	10.422 .0015 **
Embra652	12x34	A1A3 20.0206 34	A1A4 20.6143 49	A2A3 20.9825 40	A2A4 20.7288 59	6.0574 3	1.5517 178	3.9038 .0099 **
EN-16	12x34	A1A3 20.2083 48	A1A4 20.488 50	A2A3 20.9718 39	A2A4 20.9543 46	6.3112 3	1.5113 179	4.176 .0069 **

Análise da característica Pilodyn (mm)

Marca	Pais	Descendente/Média/Núm. Indiv.		QMT/GL	QMR/GL	F/SIG		
EG117	11x12	A1A1 16.5106 94	A1A2 17.2466 73			22.2544 1	3.0033 165	7.4099 .0072 **
Embra008	12x34	A1A3 16.717 53	A1A4 16.1224 49	A2A3 17.6146 48	A2A4 16.9706 34	18.47 3	2.7895 180	6.6213 .0003 **
Embra028	14x23	A1A2 16.3229	A1A3 16.4271	A2A4 17.4231	A3A4 17.225	14.8732	2.8229	5.2688

Embra032	12x34	48 A1A3 16.7065 46	48 A1A4 16.1413 46	52 A2A3 17.575 40	40 A2A4 16.9512 41	3 15.0946 3	184 2.7384 169	.0016 5.5121 .0012	**
Embra047	12x34	A1A3 17.5833 42	A1A4 16.6471 51	A2A3 16.625 28	A2A4 16.4423 52	11.4868 3	2.7855 169	4.1238 .0075	**
Embra047b	12x34	A1A3 17.5455 44	A1A4 16.7872 47	A2A3 16.7759 29	A2A4 16.3333 48	11.4786 3	2.8124 164	4.0814 .0079	**
Embra051	12x34	A1A3 16.7 50	A1A4 16.3333 42	A2A3 17.5408 49	A2A4 16.6744 43	12.3336 3	2.8511 180	4.3259 .0057	**
Embra072	12x13	A1A1 16.9535 43	A1A2 17.0357 56	A1A3 17.4079 38	A2A3 16.0682 44	13.6996 3	2.7574 177	4.9683 .0025	**
Embra075	12x11	A1A1 16.372 82	A1A2 17.2326 86			31.0894 1	2.86 166	10.8706 .0012	**
Embra106	12x12	A1A1 17.4643 42	A1A2 16.5977 87	A2A2 16.3718 39		14.5006 2	2.7998 165	5.1791 .0066	**
Embra127	12x34	A1A3 16.7444 45	A1A4 16.4018 56	A2A3 17.6765 34	A2A4 16.7927 41	11.6715 3	2.8573 172	4.0849 .0078	**
Embra136	14x23	A1A2 16.7234 47	A1A3 16.4912 57	A2A4 17.75 36	A3A4 16.734 47	12.6268 3	2.8652 183	4.407 .0051	**
Embra1468	12x34	A1A3 16.7018 57	A1A4 17.6444 45	A2A3 16.4818 55	A2A4 16.625 28	12.8414 3	2.851 181	4.5041 .0045	**
Embra158	12x13	A1A1 16.9302 43	A1A2 17.1019 54	A1A3 17.2432 37	A2A3 16.0698 43	11.8597 3	3.0005 173	3.9526 .0093	**
Embra173	12x34	A1A3 17.6442 52	A1A4 16.5581 43	A2A3 16.6837 49	A2A4 16.3375 40	16.1088 3	2.8212 180	5.7099 .0009	**
Embra175	12x33	A1A3 16.3966 87	A2A3 17.1915 94			28.5519 1	2.9057 179	9.8261 .002	**
Embra196a	12x34	A1A3 17.5111 45	A1A4 17.5 34	A2A3 16.24 50	A2A4 16.4894 47	19.547 3	2.678 172	7.2992 .0001	**
Embra196b	12x23	A1A2 16.24 50	A1A3 16.4894 47	A2A2 17.5682 44	A2A3 17.5541 37	21.7228 3	2.6239 174	8.2789 .0	**
Embra240	12x33	A1A3 16.506 83	A2A3 17.2363 91			23.1473 1	2.9588 172	7.8232 .0057	**
Embra241	12x34	A1A3 17.0732 41	A1A4 17.5244 41	A2A3 16.0784 51	A2A4 16.8171 41	17.0024 3	2.7901 170	6.0938 .0006	**
Embra279	12x12	A1A1 17.0 47	A1A2 17.1042 96	A2A2 16.1333 45		15.1841 2	2.8846 185	5.2638 .006	**
Embra298	12x33	A1A3 16.4944 89	A2A3 17.1559 93			19.9023 1	2.9124 180	6.8336 .0097	**
Embra328	12x11	A1A1 17.2045 88	A1A2 16.5372 94			20.2393 1	2.9135 180	6.9466 .0091	**
Embra627	12x34	A1A3 16.1635 52	A1A4 16.4667 45	A2A3 17.5 46	A2A4 17.5139 36	22.1399 3	2.7417 175	8.0752 .0	**
Embra646	12x13	A1A1 17.6667 42	A1A2 16.7105 38	A1A3 16.8 50	A2A3 16.4167 42	12.1207 3	2.831 168	4.2814 .0061	**
Embra659	11x12	A1A1 16.5392 102	A1A2 17.216 81			20.6823 1	2.9216 181	7.0791 .0085	**
EN-16	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				

16.8333	16.2	17.4359	17.1196	12.616	2.8651	4.4034
48	50	39	46	3	179	.0051 **

Análise da característica Densidade Básica (Kg/m3)

Marca	Pais	Descendente/Média/Núm.Indiv.				QMT/GL	QMR/GL	F/SIG
Embra011	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3	292.6655	54.7702	5.3435
		399.3917	405.527	404.2896	401.7425			
Embra106	12x12	A1A1	A1A2	A2A2		287.7544	55.1401	5.2186
		405.7778	403.3288	400.4458				
Embra125	12x33	A1A3	A2A3			775.8996	53.3001	14.5572
		405.6537	401.4308					
Embra646	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3	218.2999	50.7765	4.2992
		404.5669	404.6524	405.0284	400.2439			
ES076	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3	234.8765	53.6153	4.3808
		406.2405	403.7881	400.6343	402.5274			
		46	53	38	46	3	179	.0053 **

Análise da característica Glicana (%)

Marca	Pais	Descendente/Média/Núm.Indiv.				QMT/GL	QMR/GL	F/SIG
Embra011	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3	.691	.1475	4.6837
		49.2175	48.9034	48.9807	49.0611			
Embra046	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	.6122	.149	4.11
		49.0346	48.8787	48.9907	49.1705			
Embra106	12x12	A1A1	A1A2	A2A2		.821	.1489	5.5145
		48.8937	49.0185	49.1781				
Embra125	12x33	A1A3	A2A3			1.4771	.1477	10.0037
		48.9135	49.0978					
Embra213	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	.6238	.1474	4.233
		48.8495	49.071	49.1221	48.9861			
Embra646	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3	.6043	.1415	4.2703
		48.9507	48.9609	48.9209	49.1788			
Embra655	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	.6037	.1494	4.0419
		49.0833	48.8733	49.064	49.1089			
ES076	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3	.6357	.1467	4.3339
		48.8575	49.0019	49.1494	49.0556			
		46	53	38	46	3	179	.0056 **

Análise da característica Xilana (%)

Marca	Pais	Descendente/Média/Núm.Indiv.		QMT/GL	QMR/GL	F/SIG
EG128	12x33	A1A3	A2A3	2.0108	.1104	18.2065
		11.9331	12.1488			
		70	113	1	181	.0 **

Embra036	12x33	A1A3	A2A3						
		12.1447 107	11.9506 70			1.594 1	.1163 175	13.705 .0003	**
Embra038	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		12.1226 53	12.1635 60	11.9202 36	11.9712 34	.6035 3	.1156 179	5.2188 .0018	**
Embra044	12x23	A1A2	A1A3	A2A2	A2A3				
		12.2053 57	12.0704 56	11.9596 36	11.9642 32	.613 3	.1149 177	5.3333 .0015	**
Embra101	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3				
		12.1372 62	11.9638 34	12.1406 52	11.9055 35	.6191 3	.1141 179	5.4279 .0013	**
Embra108	12x22	A1A2	A2A2						
		11.93 71	12.142 115			1.972 1	.109 184	18.0869 .0	**
Embra146	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		12.1977 57	12.0417 54	11.9149 35	11.9715 37	.7046 3	.1038 179	6.7906 .0002	**
Embra175	12x33	A1A3	A2A3						
		12.1471 87	11.9949 93			1.0405 1	.1205 178	8.633 .0037	**
Embra179	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3				
		12.0735 55	12.0174 35	12.2053 48	11.9375 44	.581 3	.1166 178	4.9817 .0024	**
Embra194	12x33	A1A3	A2A3						
		11.9293 69	12.1469 117			2.055 1	.1123 184	18.2974 .0	**
Embra197	12x33	A1A3	A2A3						
		11.9809 77	12.1353 87			.9728 1	.1199 162	8.1139 .005	**
Embra213	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		11.911 40	12.0004 32	12.2186 55	12.0579 55	.7942 3	.1114 178	7.1294 .0001	**
Embra624	12x11	A1A1	A1A2						
		12.1477 89	11.99 90			1.112 1	.1191 177	9.3376 .0026	**
Embra662	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		12.0438 46	12.2042 48	11.9471 30	11.983 32	.527 3	.122 152	4.3199 .0059	**

Análise da característica MeGU (%)

Marca	Pais	Descendente/Média/Núm. Indiv.				QMT/GL	QMR/GL	F/SIG
EG128	12x33	A1A3	A2A3					
		3.5212 70	3.5956 113			.2394 1	.0153 181	15.6395 .0001
Embra011	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3			
		3.5221 32	3.5867 50	3.5941 51	3.5165 39	.0715 3	.0159 168	4.5047 .0046
Embra022	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		3.6146 54	3.5958 54	3.5226 38	3.4882 37	.1568 3	.014 179	11.172 .0
Embra036	12x33	A1A3	A2A3					
		3.5992 107	3.5146 70			.3029 1	.0152 175	19.8913 .0
Embra038	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		3.6221 53	3.5753 60	3.494 36	3.5385 34	.1281 3	.0148 179	8.6686 .0
Embra044	12x23	A1A2	A1A3	A2A2	A2A3			
		3.6057 57	3.5871 56	3.5255 36	3.5005 32	.1036 3	.0152 177	6.8141 .0002
Embra058	13x22	A1A2	A2A3					
		3.5383 94	3.5916 77			.1202 1	.0157 169	7.6762 .0062
Embra101	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3			
		3.567	3.551	3.6233	3.493	.1218	.0148	8.2136

Embra108	12x22	62	34	52	35	3	179	.0	**
		A1A2	A2A2						
Embra125	12x33	3.5204	3.5942			.2393	.0152	15.7474	**
		71	115			1	184	.0001	**
Embra127	12x34	A1A3	A2A3						
		3.5961	3.5327			.1748	.0154	11.3683	**
Embra136	14x23	81	94			1	173	.0009	**
		A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
Embra146	12x34	3.6124	3.5724	3.5331	3.5134	.0809	.0157	5.1598	**
		44	56	34	41	3	171	.0019	**
Embra155	12x11	A1A2	A1A3	A2A4	A3A4				
		3.6167	3.5717	3.5361	3.5316	.0693	.0155	4.4663	**
Embra179	12x13	46	57	36	47	3	182	.0047	**
		A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
Embra194	12x33	3.612	3.576	3.5289	3.5121	.0939	.015	6.2705	**
		57	54	35	37	3	179	.0005	**
Embra213	12x34	A1A1	A1A2						
		3.5325	3.5899			.1466	.0158	9.3083	**
Embra385	12x34	76	107			1	181	.0026	**
		A1A1	A1A2	A1A3	A2A3				
Embra662	12x34	3.5863	3.5197	3.5967	3.534	.0623	.0157	3.9665	**
		55	35	48	44	3	178	.0091	**
Embra729	12x23	A1A3	A2A3						
		3.5191	3.5931			.2377	.0152	15.6629	**
Embra82	12x34	69	117			1	184	.0001	**
		A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
Embra108	12x22	3.5334	3.4959	3.6096	3.5824	.1063	.0148	7.172	**
		40	32	55	55	3	178	.0001	**
Embra125	12x33	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		3.6127	3.581	3.508	3.5247	.0925	.0147	6.2901	**
Embra146	12x34	50	50	32	29	3	157	.0005	**
		A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
Embra175	12x33	3.5746	3.5929	3.4936	3.5367	.07	.0162	4.3308	**
		46	48	30	32	3	152	.0058	**
Embra194	12x33	A1A2	A1A3	A2A2	A2A3				
		3.6102	3.5764	3.5538	3.5177	.0676	.0156	4.3327	**
Embra197	12x33	42	58	33	47	3	176	.0056	**
		A1A3	A2A3						

Análise da característica GaU (%)

Marca	Pais	Descendente/Média/Núm. Indiv.				QMT/GL	QMR/GL	F/SIG	
EG128	12x33	A1A3	A2A3						
		.5703	.5804			.0045	.0003	14.412	
Embra036	12x33	70	113			1	181	.0002	**
		A1A3	A2A3						
Embra082	12x34	.58	.5716			.0029	.0003	8.9423	**
		107	70			1	175	.0032	**
Embra108	12x22	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		.581	.5769	.5791	.5682	.0013	.0003	3.8998	**
Embra146	12x34	44	49	45	38	3	172	.01	**
		A1A2	A2A2						
Embra175	12x33	.5705	.5799			.0038	.0003	12.3559	**
		71	115			1	184	.0006	**
Embra194	12x33	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		.5824	.5752	.5686	.5728	.0015	.0003	5.3102	**
Embra197	12x33	57	54	35	37	3	179	.0016	**
		A1A3	A2A3						
Embra179	12x13	.5804	.5733			.0023	.0003	6.8011	**
		87	93			1	178	.0099	**
Embra194	12x33	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3				
		.5765	.5757	.5832	.5699	.0014	.0003	4.182	**
Embra197	12x33	55	35	48	44	3	178	.0069	**
		A1A3	A2A3						
Embra197	12x33	.5706	.5801			.0039	.0003	12.1349	**
		69	117			1	184	.0006	**
Embra197	12x33	A1A3	A2A3						
		69	117			1	184	.0006	**

		.5718	.5803			.003	.0003	8.882
		77	87			1	162	.0033 **
Embra213	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		.5681	.5756	.5839	.5757	.002	.0003	6.2388
		40	32	55	55	3	178	.0005 **
Embra326a	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3			
		.5828	.5753	.5784	.5693	.0014	.0003	4.3087
		42	35	61	43	3	177	.0058 **
Embra326b	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		.5828	.5784	.5753	.5693	.0014	.0003	4.3087
		42	61	35	43	3	177	.0058 **

Análise da característica Lignina Total (%)

Marca	Pais	Descendente/Média/Núm. Indiv.				QMT/GL	QMR/GL	F/SIG
EG128	12x33	A1A3	A2A3					
		26.6773	26.1435			12.3164	.9325	13.2073
		70	113			1	181	.0004 **
EG-24	12x33	A1A3	A2A3					
		26.1474	26.6381			10.6956	.9363	11.4228
		109	75			1	182	.0009 **
Embra022	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		25.8871	26.1916	26.5744	27.0231	10.534	.8321	12.6598
		54	54	38	37	3	179	.0 **
Embra036	12x33	A1A3	A2A3					
		26.1338	26.7361			15.3535	.9041	16.9817
		107	70			1	175	.0001 **
Embra038	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		25.8263	26.3944	26.7835	26.6349	8.0601	.8776	9.1847
		53	60	36	34	3	179	.0 **
Embra044	12x23	A1A2	A1A3	A2A2	A2A3			
		26.0157	26.2222	26.7112	26.761	5.7962	.9128	6.3501
		57	56	36	32	3	177	.0004 **
Embra075	12x11	A1A1	A1A2					
		26.1734	26.6065			7.8241	.8963	8.7294
		81	86			1	165	.0036 **
Embra101	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3			
		26.4491	26.5645	25.8136	26.7951	8.0205	.8739	9.1778
		62	34	52	35	3	179	.0 **
Embra108	12x22	A1A2	A2A2					
		26.672	26.1462			12.1371	.9195	13.1994
		71	115			1	184	.0004 **
Embra117	12x23	A1A2	A1A3	A2A2	A2A3			
		26.3284	26.6411	26.022	26.422	3.3153	.8371	3.9603
		43	54	48	40	3	181	.0091 **
Embra127	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		25.9313	26.3914	26.4337	26.8248	5.6899	.9096	6.2554
		44	56	34	41	3	171	.0005 **
Embra136	14x23	A1A2	A1A3	A2A4	A3A4			
		25.9154	26.3554	26.3957	26.725	5.1242	.9124	5.6159
		46	57	36	47	3	182	.0011 **
Embra145	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		26.5898	26.3154	26.438	25.966	3.6517	.9191	3.973
		53	35	42	52	3	178	.009 **
Embra146	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		26.027	26.2802	26.6153	26.6994	4.3967	.918	4.7894
		57	54	35	37	3	179	.0031 **
Embra155	12x11	A1A1	A1A2					
		26.6338	26.1503			10.3908	.935	11.1126
		76	107			1	181	.001 **
Embra176	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		26.6167	26.5099	26.0141	26.2626	3.8125	.9333	4.0848
		56	39	55	33	3	179	.0078 **
Embra194	12x33	A1A3	A2A3					
		26.6825	26.1563			12.018	.9201	13.0611
		69	117			1	184	.0004 **

Embra213	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	5.3008	.9216	5.7514
		26.6058	26.7953	26.0137	26.2357			
Embra332	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	5.9602	.915	6.514
		26.5389	26.6068	26.4939	25.8427			
Embra385	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	6.303	.8891	7.0891
		25.854	26.3883	26.6919	26.6632			
Embra645	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	5.1798	.9379	5.5229
		26.5389	26.6068	26.502	25.8878			
Embra659	11x12	A1A1	A1A2			11.1995	.9369	11.9541
		26.5612	26.0614					
Embra662	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	3.653	.9145	3.9945
		26.2924	26.1282	26.8213	26.6218			
Embra681	12x22	A1A2	A2A2			11.9463	.8493	14.0659
		26.6516	26.1164					
Embra681b	12x22	A1A2	A2A2			8.8349	.9188	9.6157
		26.1527	26.6048					
Embra729	12x23	A1A2	A1A3	A2A2	A2A3	6.5853	.8737	7.537
		25.9296	26.3335	26.2888	26.8607			
ES-54	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	5.1254	.9264	5.5328
		26.4857	25.9011	26.5222	26.6477			
		54	52	48	28	3	178	.0012 **

Análise da característica Relação Siringil/Guaicil

Marca	Pais	Descendente/Média/Núm. Indiv.				QMT/GL	QMR/GL	F/SIG
Embra022	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	.3178	.0461	6.8877
		3.1454	3.1246	3.0414	2.9571			
Embra038	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	.2819	.0461	6.1176
		3.1742	3.0796	3.0008	3.0136			
Embra075	12x11	A1A1	A1A2			.3545	.0478	7.4132
		3.1115	3.0193					
Embra101	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3	.317	.045	7.0507
		3.0691	3.0081	3.1802	2.9955			
Embra108	12x22	A1A2	A2A2			.54	.0474	11.3849
		3.0112	3.1221					
Embra127	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	.2328	.0482	4.8253
		3.1588	3.095	3.0486	2.9835			
Embra136	14x23	A1A2	A1A3	A2A4	A3A4	.213	.0473	4.5056
		3.1685	3.0866	3.0543	3.0066			
Embra155	12x11	A1A1	A1A2			.5533	.0474	11.6736
		3.0161	3.1277					
Embra194	12x33	A1A3	A2A3			.6803	.0467	14.5828
		3.0012	3.1264					
Embra385	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	.2906	.0477	6.0962
		3.1838	3.0751	3.0075	3.0045			
Embra659	11x12	A1A1	A1A2			.352	.049	7.1818
		3.0406	3.1293					

Embra729	12x23	102	80			1	180	.008	**
		A1A2	A1A3	A2A2	A2A3				
		3.1616	3.1064	3.0643	2.9719	.2919	.047	6.2162	
		42	58	33	47	3	176	.0005	**

Análise da característica Alkali Efetivo (%)

Marca	Pais	Descendente/Média/Núm. Indiv.				QMT/GL	QMR/GL	F/SIG	
EG099	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		13.2563	13.5106	12.8205	12.9549	4.2426	1.0583	4.0087	
Embra011	12x13	46	51	33	53	3	179	.0086	**
		A1A1	A1A2	A1A3	A2A3				
		13.6801	12.9094	13.0697	13.2849	4.2366	1.0777	3.9311	
Embra022	12x34	32	50	51	39	3	168	.0096	**
		A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		12.788	13.5449	12.718	13.5739	9.7437	.9613	10.1362	
Embra028	14x23	54	54	38	37	3	179	.0	**
		A1A2	A1A3	A2A4	A3A4				
		13.4195	13.408	12.9751	12.7964	4.3937	1.0343	4.2478	
Embra036	12x33	47	48	52	40	3	183	.0063	**
		A1A3	A2A3						
		13.0093	13.4401			7.8528	1.0854	7.2349	
Embra046	12x34	107	70			1	175	.0078	**
		A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		13.0459	12.813	13.2614	13.56	4.3003	1.0561	4.0717	
Embra1193	12x23	53	43	46	41	3	179	.0079	**
		A1A2	A1A3	A2A2	A2A3				
		12.5573	13.0917	13.2557	13.4112	4.455	1.0577	4.2122	
Embra127	12x34	29	45	41	40	3	151	.0068	**
		A1A3	A1A4	A2A3	A2A4				
		12.9085	13.6277	12.6461	13.3814	8.5879	.9935	8.6441	
Embra1319	12x13	44	56	34	41	3	171	.0	**
		A1A1	A1A2	A1A3	A2A3				
		13.1637	13.3658	12.7902	13.4092	4.1943	1.0518	3.9876	
Embra136	14x23	34	40	56	52	3	178	.0088	**
		A1A2	A1A3	A2A4	A3A4				
		12.9029	13.6132	12.6258	13.2845	8.5835	.9684	8.8638	
Embra194	12x33	46	57	36	47	3	182	.0	**
		A1A3	A2A3						
		13.4761	12.981			10.6392	1.038	10.2501	
Embra659	11x12	69	117			1	184	.0016	**
		A1A1	A1A2						
		13.516	12.7047			29.5105	.9413	31.3507	
Embra681	12x22	102	80			1	180	.0	**
		A1A2	A2A2						
		13.4141	12.9513			8.9355	.9479	9.4266	
Embra729	12x23	75	94			1	167	.0025	**
		A1A2	A1A3	A2A2	A2A3				
		12.9457	13.5004	12.5096	13.4363	8.7223	.9834	8.8691	
		42	58	33	47	3	176	.0	**

Análise da característica Rend Depurado (%)

Marca	Pais	Descendente/Média/Núm. Indiv.		QMT/GL	QMR/GL	F/SIG	
EG128	12x33	A1A3	A2A3				
		51.6713	52.2379	13.8809	1.4319	9.6941	
Embra036	12x33	70	113	1	181	.0021	**
		A1A3	A2A3				
		52.2497	51.673	14.0752	1.4775	9.5261	
Embra108	12x22	107	70	1	175	.0024	**
		A1A2	A2A2				

		51.6811	52.1956			11.623	1.3887	8.3699
		71	115			1	184	.0043 **
Embra146	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		52.4171	51.9337	51.6236	51.7467	5.8181	1.3814	4.2118
		57	54	35	37	3	179	.0066 **
Embra194	12x33	A1A3	A2A3					
		51.5992	52.2615			19.0392	1.4073	13.5286
		69	117			1	184	.0003 **
Embra213	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		51.6202	51.7748	52.4819	51.9687	6.73	1.4039	4.7937
		40	32	55	55	3	178	.0031 **
Embra624	12x11	A1A1	A1A2					
		52.2906	51.7601			12.5945	1.47	8.5676
		89	90			1	177	.0039 **

Análise da característica Viscos(cP)

Marca	Pais	Descendente/Média/Núm. Indiv.				QMT/GL	QMR/GL	F/SIG
EG099	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		61.1051	58.0654	64.664	63.8794	410.5464	86.3785	4.7529
		46	51	33	53	3	179	.0033 **
Embra022	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		64.5328	57.2015	65.5696	60.2382	724.7048	81.4704	8.8953
		54	54	38	37	3	179	.0 **
Embra028	14x23	A1A2	A1A3	A2A4	A3A4			
		60.9372	57.9936	63.498	64.6206	398.6646	85.8705	4.6426
		47	48	52	40	3	183	.0037 **
Embra127	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		63.6001	56.9702	67.8016	60.8103	903.1019	78.1781	11.5519
		44	56	34	41	3	171	.0 **
Embra1319	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3			
		62.0768	60.5401	65.4082	58.0823	502.7109	86.3602	5.8211
		34	40	56	52	3	178	.0008 **
Embra136	14x23	A1A2	A1A3	A2A4	A3A4			
		63.4329	57.1967	67.5352	60.7329	854.3395	78.3901	10.8986
		46	57	36	47	3	182	.0 **
Embra138	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		62.0275	65.1624	58.4071	62.219	338.1698	86.1175	3.9268
		53	38	50	42	3	179	.0096 **
Embra143	13x24	A1A2	A1A4	A2A3	A3A4			
		64.2306	62.31	61.9171	57.2554	398.1412	86.0828	4.6251
		49	44	43	44	3	176	.0039 **
Embra160	12x23	A1A2	A1A3	A2A2	A2A3			
		60.8747	58.2766	65.1989	62.5974	412.0355	85.0513	4.8446
		46	52	46	42	3	182	.0029 **
Embra176	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		58.363	60.935	64.6874	63.4689	413.4467	86.8985	4.7578
		56	39	55	33	3	179	.0032 **
Embra187	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4			
		61.1311	58.458	63.5616	65.0147	372.0413	88.5021	4.2038
		39	52	47	36	3	170	.0067 **
Embra659	11x12	A1A1	A1A2					
		58.7692	65.3297			1929.729	83.0745	23.2289
		102	80			1	180	.0 **
Embra729	12x23	A1A2	A1A3	A2A2	A2A3			
		63.7777	57.9822	67.7573	60.1761	767.6324	82.1223	9.3474
		42	58	33	47	3	176	.0 **
Embra746	12x33	A1A3	A2A3					
		59.6162	63.8849			826.572	89.1939	9.2671
		96	86			1	180	.0027 **

Análise da característica Extrativos Diclorometano (%)

Marca	Pais	Descendente/Média/Núm. Indiv.				QMT/GL	QMR/GL	F/SIG
Embra022	12x34	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	.0944	.0186	5.068
		.0595	.1188	.1128	.1718			
Embra106	12x12	A1A1	A1A2	A2A2		.1694	.0195	8.6662 **
		.0369	.1132	.1646				
Embra125	12x33	A1A3	A2A3			.2954	.0189	15.6296
		.067	.1494					
Embra175	12x33	A1A3	A2A3			.1684	.0196	8.5954
		.1455	.0843					
Embra290a	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3	.0781	.0184	4.2523
		.1065	.1726	.077	.1241			
Embra290b	12x33	A1A3	A2A3			.1892	.0181	10.4433
		.0863	.1563					
Embra328	12x11	A1A1	A1A2			.1301	.0191	6.8013
		.0837	.1373					
Embra340	12x11	A1A1	A1A2			.1409	.0192	7.3196
		.1406	.085					
ES076	12x13	A1A1	A1A2	A1A3	A2A3	.1026	.0185	5.5477
		.0561	.0954	.1726	.1274			
		46	53	38	46	3	179	.0012 **