

JULIANA STIVAL SENA

**MAPEAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROSSATÉLITES
DERIVADOS DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS (EST) E ANÁLISE DE
COINCIDÊNCIA DE QTL EM *Eucalyptus* spp. EM DOIS AMBIENTES
CONTRASTANTES**

Dissertação 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
2009**

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

T

S474m
2009

Sena, Juliana Stival, 1985-

Mapeamento e caracterização de microssatélites derivados de seqüências expressas (EST) e análise de coincidência de QTL em *Eucalyptus* spp. em dois ambientes contrastantes / Juliana Stival Sena. – Viçosa, MG, 2009.
xi, 137f. : il. ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Melhoramento genético. 2. Microssatélites (Genética). 3. Mapeamento cromossômico. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

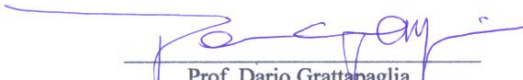
CDD 22.ed. 634.91653

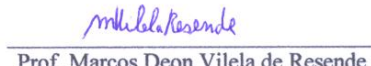
JULIANA STIVAL SENA

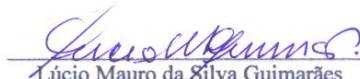
MAPEAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROSSATÉLITES DERIVADOS
DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS (EST) E ANÁLISE DE COINCIDÊNCIA DE QTL
EM *EUCALYPTUS* SPP. EM DOIS AMBIENTES CONTRASTANTES

Dissertação 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*.

APROVADA EM: 06 de agosto de 2009


Prof. Dario Grattapaglia
(Co-orientador)


Prof. Marcos Deon Vilela de Resende
(Co-orientador)


Lúcio Mauro da Silva Guimarães


Danielle Assis de Faria Paiva


Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

Dedico aos meus pais e ao meu irmão por serem minha luz, paz, alegria,
inspiração e essência.

AGRADECIMENTOS

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

À CAPES 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 em nível mundial.

Ao Professor Acelino Couto Alfenas, pela confiança, orientação e ensinamentos.

Ao Professor Dario Grattapaglia pelo exemplo de pessoa e de profissional, pelo apoio incondicional no meu desenvolvimento acadêmico desde a iniciação científica e pela condução na elaboração deste trabalho.

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

À Professora Elza, pela amizade e ensinamentos.

Ao Professor Marcos Deon pela ajuda neste trabalho.

À equipe da Cenibra pela ajuda na coleta das folhas e mensuração dos caracteres de campo nas famílias de irmãos-completos utilizadas nesse trabalho, em especial a Elizabete por ter me acompanhado pessoalmente.

Aos colegas do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa/Cenargen, Eva, Marília, Tati, Talyta, Leo, Leandro, Laís, César e Carol, pela amizade, troca de conhecimentos, apoio e ajuda.

À Dany em especial pela amizade, apoio, ensinamentos e pela indispensável ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus melhores amigos de Goiânia, Cecília, Giselle e Batatinha, pelos vários anos de amizade, torcida, conselhos e confiança.

A todos os colegas do curso de Genética e Melhoramento, especialmente às amigas Lôreta, Águida, Dani, e Jacque pela amizade, pelos estudos em grupo e pelos bons momentos em Viçosa.

Às companheiras de república em Viçosa, Patrícia, Michelle, Raquel, Andréia e Márcia pela amizade e apoio.

Às minhas grandes amigas e companheiras de república em Brasília desde a graduação, Sara, Lira, Ana, Bia e Rê pela companhia, incentivo e ótimos momentos juntas.

À Ana em especial, pela grande amizade, ajuda, risadas e principalmente por ter sido a melhor companhia neste último ano de mestrado.

Às amigas da UnB, Angélica, Vânia e Delanna, por serem ótimas amigas e sempre estarem na torcida.

Ao Henrique, meu namorado, por me acompanhar, apoiar, incentivar e ajudar nestes dois anos. Por ter feito dos meus dias em Viçosa mais legais e os em Brasília mais agitados.

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

Às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, Francisco e Luely, e ao meu irmão Pedro Ivo, pelo amor, carinho, dedicação e por terem sido fundamentais na formação do meu caráter e no meu desenvolvimento acadêmico.

BIOGRAFIA

Juliana Stival Sena, filha de Francisco de Assis Sena e Luely Stival Faria Sena, nasceu no dia 22 de março de 1985, em Uberaba - MG.

Em 2003, iniciou o Curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Goiás (UFG). Em 2005 mudou-se para Brasília e em 2007 concluiu o curso de Ciências Biológicas na Universidade de Brasília (UnB). Nesse período, foi bolsista de Iniciação Científica sob a orientação do Professor Dario Grattapaglia.

Em agosto de 2007, iniciou o mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa sob a orientação do Professor Acelino Couto Alfenas e co-orientação do Professor Dario Grattapaglia e Marcos Deon, submetendo-se à defesa da dissertação em agosto de 2009.

CONTEÚDO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS	6
<i>CAPÍTULO 1</i>.....	9
RESUMO	10
1 - INTRODUÇÃO.....	12
2 - MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. Triagem de microssatélites derivados de EST, extração de DNA e PCR.....	14
2.2. Mapeamento genético	15
2.3. Caracterização genética.....	17
3 – RESULTADOS.....	18
3.1. Triagem de microssatélites derivados de EST	18
3.2. Mapeamento genético	25
3.3. Caracterização genética.....	29
4 - DISCUSSÃO	31
5 – REFERÊNCIAS	34
<i>CAPÍTULO 2</i>.....	37
RESUMO	38
1 - INTRODUÇÃO.....	40
2 - MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1. Populações segregantes, conectividade genética e extração de DNA.....	44
2.2. Avaliações fenotípicas	45
2.3. Genotipagem e mapeamento genético	46
2.4. Detecção dos QTLs por marca simples, intervalo simples e intervalo composto..	48
2.5. Mapeamento comparativo de QTLs e análise de coincidência de QTLs para os dois ambientes contrastantes	50
3 – RESULTADOS.....	51
3.1. Análise dos locos que segregaram em cada parental e construção dos mapas genéticos pela estratégia de pseudo-cruzamento teste	51
3.2. Análise comparativa entre os mapas genéticos gerados neste trabalho (ambiente Guanhães-Cenibra) e mapas genéticos gerados anteriormente (Ambiente Guaíba-Aracruz)	53
3.3. Estatísticas descritivas e análise da correlação entre os caracteres	60
3.4. Análises de QTL	64
3.4.1. QTLs para diâmetro das árvores à altura do peito (DAP).....	65
3.4.1.1. Cruzamento C1 x UGL	65

3.4.1.3. Cruzamento DG x U2	67
3.4.1.4. Cruzamento DG x UGL	70
3.4.2. QTLs para altura	73
3.4.2.1. Cruzamento C1 x UGL	73
3.4.2.2. Cruzamento DG x U2	75
3.4.2.3. Cruzamento DG x UGL	77
3.4.3. QTLs para volume	78
3.4.3.1. Cruzamento C1 x UGL	79
3.4.3.2. Cruzamento DG x U2	82
3.4.3.3. Cruzamento DG x UGL	84
3.4.4. QTLs para teor de lignina total da madeira.....	85
3.4.4.1. Cruzamento C1 x UGL	85
3.4.4.2. Cruzamento DG x U2	86
3.4.4.3. Cruzamento DG x UGL	88
3.4.5. QTLs para relação Siringil/Guaiacil da madeira (RSG)	89
3.4.5.1. Cruzamento C1 x UGL	89
3.4.5.2. Cruzamento DG x U2	90
3.4.5.3. Cruzamento DG x UGL	93
3.4.6. QTLs para rendimento depurado de celulose (RD)	93
3.4.6.1. Cruzamento C1 x UGL	94
3.4.6.2. Cruzamento DG x U2	94
3.4.6.3. Cruzamento DG x UGL	97
3.4.7. QTLs para Densidade básica da madeira (DB).....	100
3.4.7.1. Cruzamento C1 x UGL	100
3.4.7.2. Cruzamento DG x U2	100
3.4.7.3. Cruzamento DG x UGL	101
3.4.8. Análise de QTLs para profundidade de penetração do Pilodyn.....	104
3.4.8.1 Cruzamento C1 x UGL	105
3.4.8.2. Cruzamento DG x U2	107
3.4.8.3. Cruzamento DG x UGL	109
3.4.9. Sumário de todos os QTLs detectados pela metodologia de mapeamento por intervalo	111
3.5. Análise de coincidência de QTLs entre os dois ambientes contrastantes	113
3.6. Análise de coincidência de QTLs entre diferentes <i>backgrounds</i> genéticos	117
4 – DISCUSSÃO.....	118
6 – REFERÊNCIAS	124
CONCLUSÕES GERAIS.....	129
ANEXO	131

RESUMO

SENA, Juliana Stival. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2009.
Mapeamento e caracterização de microssatélites derivados de sequências expressas (EST) e análise de coincidência de QTL em *Eucalyptus* spp. em ambientes contrastantes Orientador: Acelino Couto Alfenas. Co-orientadores: Dario Grattapaglia e Marcos Deon Vilela de Resende.

No primeiro capítulo desta tese, foi desenvolvido e geneticamente mapeado um novo conjunto de microssatélites para *Eucalyptus* spp. derivados de EST (Expressed Sequence Tag). Foi feita uma triagem de 232 microssatélites derivados de EST utilizando-se um painel de 12 indivíduos correspondendo aos parentais das populações segregantes do projeto Genolyptus. Dentre os locos amplificados com sucesso, 78% foram polimórficos e apresentaram um nível elevado de transferibilidade interespecífica. Trinta e seis locos foram selecionados para mapeamento com base no tamanho dos segmentos amplificados (< 400 pb), motivos de repetição e BLAST positivo com genes de interesse em bancos públicos de dados. Com o objetivo de mapeamento, os 36 locos foram avaliados quanto ao polimorfismo e a segregação em uma população de referência envolvendo os parentais *E. grandis* x *E. urophylla*, verificando-se que a quantidade de locos totalmente informativos foi cerca de 40% menor quando comparados com microssatélites derivados de bibliotecas genômicas enriquecidas. Apesar da menor hipervariabilidade estes locos são interessantes para mapeamento, pois correspondem a regiões gênicas, possibilitando mapeamento comparativo e potencial colocalização de genes com QTLs. Dos locos em configuração informativa de segregação, 20 foram mapeados com sucesso. Estes locos mapeados foram caracterizados quanto ao seu conteúdo de informação para análise genética. Embora os microssatélites derivados de EST sejam menos polimórficos que os microssatélites derivados de sequências não codificantes,

ainda assim eles podem ser utilizados com eficiência na discriminação de indivíduos, estudos de parentesco, avaliação de diversidade genética, mapeamento genético e seleção assistida por marcadores. O segundo capítulo teve como objetivo a verificação da coincidência de detecção de QTLs por meio da comparação da posição genômica e magnitude de efeito de QTLs para características silviculturais de crescimento e de qualidade da madeira em amostras de descendentes de três famílias segregantes de *Eucalyptus* spp. em dois locais experimentais contrastantes (Guanhães- MG e Guaíba- RS). As famílias estudadas foram: (*E. camadulensis*) x (*E. urophilla* x *E. globulus*), C1 x UGL, (*E. dunii* x *E. grandis*) x (*E. urophilla* x *E. globulus*), DG x U2, e (*E. dunii* x *E. grandis*) x (*E. urophilla*), DG x UGL. Primeiramente foram selecionados marcadores microssatélites flanqueantes e internos às regiões de QTL mapeados em experimentos anteriores para estas três famílias oriundas do ambiente de Guaíba-RS. Posteriormente mapeou-se estes marcadores utilizando-se diferentes indivíduos destas mesmas três famílias oriundos do ambiente de Guanhões-MG. Foram estudados QTLs para oito características quantitativas relacionadas com desempenho silvicultural e qualidade da madeira. Detectou-se dois QTLs (altura e profundidade de penetração do Pilodyn) em comum para os dois ambientes, no genitor UGL da família C1 x UGL; dois QTLs (teor de lignina e rendimento depurado) nos genitores DG e U2 respectivamente, do cruzamento DG x U2 e quatro QTLs (dois para diâmetro à altura do peito, um para altura e um para volume) no genitor UGL, do cruzamento DG x UGL, sendo que dois destes se colocaram com QTLs para características biologicamente correlacionadas ($r > 0,8$). Ainda, três QTLs (diâmetro à altura do peito, altura e profundidade de penetração do Pilodyn) localizados no grupo de ligação 6 do genitor UGL se mostraram estáveis entre os diferentes *backgrounds* genéticos e ambientes. Os resultados indicam que QTLs de maior efeito para características de qualidade da madeira são detectados em ambientes contrastantes e/ou entre diferentes *backgrounds* genéticos, sugerindo que a variabilidade ambiental e de background genético não teve impacto detectável sobre a expressão dos genes presentes nestes QTLs. Estes resultados inéditos para *Eucalyptus* são relevantes, pois fornecem regiões alvo interessantes para a seleção assistida dentro de famílias via seleção para QTLs ou ainda como ponto de partida para estudos de genética de associação.

ABSTRACT

SENA, Juliana Stival. Msc., Universidade Federal de Viçosa, August 2009.
Mapping and characterization of microsatellites derived from EST and analysis of coincidence of QTL in *Eucalyptus* in contrasting environments. Adviser: Acelino Couto Alfenas. Co-Advisers: Dario Grattapaglia and Marcos Deon Vilela de Resende.

The first part of this work involved the development and genetic mapping of a new battery of microsatellites for *Eucalyptus* derived from ESTs. Screening of 232 microsatellites derived from ESTs was carried out using a panel of 12 individuals corresponding to the parents used for population development in the Genolyptus project. Among the successfully amplified loci, 78% were polymorphic and showed complete inter-specific transferability. Thirty six loci were selected for mapping based on the amplicon size (< 400 pb), repeat motif and positive BLAST with interesting genes in public databases. With the objective of mapping, 36 loci were evaluated with regard to polymorphism and segregation in a reference segregating population derived from a cross between *E. grandis* x *E. urophylla*. The proportion of loci segregating in a fully informative configuration was about 40% lower than the one seen for microsatellites derived from genomic-enriched libraries. In spite of a relatively lower genetic information content, these loci are interesting for mapping, as they correspond to genes, allowing comparative mapping and potential co-location with QTL. Among the informative loci, 20 were successfully mapped in the particular reference mapping population. These mapped loci were characterized for polymorphism information content. Although EST derived microsatellites are generally less informative than those derived from non coding genomic regions they can be effectively used for individual identification, paternity analysis, evaluation of genetic diversity, certification of controlled crosses, genetic mapping and marker-assisted selection.

In the second part of this work the coincidence in QTL detection was investigated by comparing the position and magnitude of effect of QTLs for wood and growth properties in three partially connected segregating populations of *Eucalyptus* spp. in two contrasting environments (Guanhães-MG and Guaíba-RS) over 3,000 km apart in a north-south latitude gradient. The families studied were: (*E. camadulensis*) x (*E. urophylla* x *E. globulus*), C1 x UGL, (*E. dunnii* x *E. grandis*) x (*E. urophylla* x *E. globulus*), DG x U2, and (*E. dunnii* x *E. grandis*) x (*E. uropyilla*), DG x UGL. Microsatellite markers flanking QTLs mapped in previous studies in these three families in Guaíba-RS were selected for the coincidence study. These markers were mapped using different sets of individuals from the same three families planted in Guanhões-MG. QTLs for eight quantitative traits related to wood and growth properties were studied. Two QTL (height and depth of pilodyn penetration, i.e. wood density) were detected in common for the two environments in the UGL parent (cross C1 x UGL); two (lignin content and pulp yield) in parents DG and U2 respectively (cross DG x U2) and four QTLs (two for diameter at breast height, one for height and one for volume), two of them co-localized with QTLs for biologically correlated traits ($r > 0.8$), in the parent UGL (cross DG x UGL). Furthermore, three QTLs (diameter at breast height, height and pilodyn penetration depth) located on linkage group 6 of the parent UGL were stable across the different genetic backgrounds and environments. Results indicate that QTLs of major effect for wood property traits are consistently detected in contrasting environments and/or different genetic backgrounds, suggesting that environmental variability and genetic background did not have a detectable impact on the action of the genes or genomic regions underlying these QTL, while other QTLs detected only in one of the environments are possibly under strong environmental interaction. These novel results are relevant, given that they provide target regions for marker assisted selection within families and starting point for association genetics studies.

INTRODUÇÃO GERAL

O melhoramento florestal envolve a aplicação dos princípios genéticos aliados a uma boa silvicultura, a fim de desenvolver plantações florestais de alto rendimento, saudáveis e sustentáveis. O impacto dos programas de melhoramento florestal, em uma escala global, consiste em aumentar a produtividade e o valor das plantações para satisfazer a crescente procura por produtos florestais, reduzindo a pressão sobre as florestas naturais. Os programas de melhoramento visam, então, desenvolver variedades geneticamente melhoradas de uma maneira economicamente eficiente, maximizando o ganho genético por unidade de tempo ao menor custo possível (White et al., 2007).

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, boas características silviculturais e grande variabilidade inter e intra-específica para características físico-químicas da madeira, tornando-as úteis para diversas finalidades (energia, celulose e produtos sólidos). Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF, 2008), esse é o gênero mais utilizado em plantios florestais homogêneos no Brasil, cobrindo uma área de 4.258.704 ha. Com destaque histórico, as áreas de florestas plantadas no Brasil acumularam em 2008 o total estimado de 6.126.000 ha com eucalipto e Pinus. Esse total representa um acréscimo de cerca de 282.000 ha plantados em relação ao total estimado do ano anterior (5.844.367 ha). Constata-se, assim, um crescimento de 7,3% na área plantada com eucalipto e queda de 0,4% no Pinus, o que resulta em aumento de 4,4% da área com florestas plantadas acumulada até 2008, em relação a 2007. Ainda segundo os dados da ABRAF, o setor de florestas plantadas é responsável pelo faturamento anual de mais de US\$ 21 bilhões (4% do

Produto Interno Bruto), gera mais de 4 milhões de empregos e exporta US\$ 6 bilhões por ano (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 florestais.

Nos últimos anos, percebeu-se um crescente interesse das empresas florestais na utilização de ferramentas moleculares baseadas na identificação de polimorfismos no DNA, envolvidos no controle genético de fenótipos de interesse. Estas ferramentas prometem fornecer novas oportunidades para a seleção de características de crescimento, forma e propriedades da madeira de árvores cultivadas (Grattapaglia, 2007).

Os marcadores moleculares vêm sendo utilizados em espécies florestais desde os anos 80, quando isoenzimas permitiram realizar os primeiros estudos de sistemas de cruzamento em pomares de sementes e produzir as primeiras versões de mapas genéticos de coníferas (Adams, 1983; Adams & Joly, 1980; Moran & Bel, 1983). Desde então, a análise genética de espécies florestais progrediu essencialmente em razão do desenvolvimento de novas técnicas moleculares, começando com marcadores RFLP no final dos anos 80 e início dos anos 90 (Bradshaw & Grattapaglia, 1994; Byrne et al., 1995; Devey et al., 1991), seguidos dos marcadores RAPD (Carlson et al., 1991; Grattapaglia e Sederoff, 1994) e AFLP (Gaiotto et al. 1997; Marques et al., 1998), microssatélites (Brondani et al., 1998; Byrne, 1996) e mais recentemente os polimorfismos de base individual (single nucleotide polymorphisms-SNP) (Brown et al., 2004; Gonzalez-Martinez et al., 2006; Williams et al., 2000).

Os marcadores mais utilizados hoje nas análises genéticas são os microssatélites em razão de seu elevado conteúdo informativo, sua robustez analítica e transferibilidade. Os atributos que fazem estes marcadores altamente informativos e de fácil utilização para análise genética em espécies florestais são: herança codominante, multi-alelismo, abundância e distribuição uniforme nos genomas de eucariotos, análise de polimorfismo relativamente simples e econômica quando comparada a outros métodos, elevada transferibilidade entre indivíduos dentro de uma espécie e frequentemente entre espécies taxonomicamente próximas. Hoje, a análise de marcadores microssatélites é a tecnologia de rotina para a resolução de diversas questões de identificação de

individual, verificação de parentesco, quantificação da taxa de cruzamento e estimativa de variabilidade e distância genética (Grattapaglia, 2007).

A utilização de microssatélites na construção de mapas genéticos também têm se revelado como um recurso de grande valor em diversos aspectos da pesquisa e aplicações genômicas. 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 à clonagem posicional dos genes ou regiões regulatórias envolvidas no controle do caráter. Ainda, o mapeamento de microssatélites derivados de EST (*Expressed sequence tag*) pode auxiliar no mapeamento dos genes correspondentes, pois muitos desses genes podem vir ser candidatos para uma determinada característica caso eles se colocalizem com os QTLs nos mapas de ligação.

O mapeamento genético em espécies perenes não é trivial. O cálculo da frequência 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*, 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) entre outros, que podem ser verificados na revisão de Grattapaglia & Kirst (2008).

Experimentos de mapeamento de QTL em *Eucalyptus* têm mostrado, sem exceção, alguns locos de maior efeito, embora o número e a proporção da variância fenotípica explicada pelos QTLs detectados tenham sido geralmente menores do que aqueles encontrados nas espécies anuais (Grattapaglia, 2004). Razões para isso incluem: (i) a impossibilidade de utilizar *pedigrees* previamente

planejados, visando maximizar a segregação fenotípica (ex. cruzamento entre linhagens contrastantes) – com isso, os únicos QTLs que podem ser potencialmente detectados são aqueles que, por acaso, se encontram em heterozigose nos genitores do cruzamento e onde o efeito diferencial entre os alelos alternativos aos QTLs é suficientemente grande para permitir detecção estatística com o tamanho amostral e a precisão experimental praticados; (ii) o fato de as populações utilizadas serem relativamente pequenas, em geral com pouco mais de 100 indivíduos, pela dificuldade de se gerar e manter progênes maiores – populações pequenas tendem a não permitir a detecção ou, ao contrário, levam à superestimação de efeitos de QTL (Beavis, 1998); e (iii) a precisão experimental é limitada na avaliação dos fenótipos, por não ser possível ou muito difícil replicar genótipos.

O relativo sucesso obtido, apesar dessas limitações, deve-se, provavelmente, à ampla variabilidade genética existente e ao fato de que muitos experimentos se basearam em cruzamentos interespecíficos, envolvendo *pools* gênicos distintos. Esses experimentos permitiram iniciar uma nova fase de investigação da arquitetura genética de características quantitativas em espécies florestais e quebrar um tabu previsto por alguns pesquisadores (Strauss et al., 1992) em relação à real possibilidade de se identificar locos de maior efeito em árvores, da mesma forma que havia sido feito em espécies anuais.

As propriedades dos QTLs controlando as principais características quantitativas de interesse do melhoramento florestal ainda são pouco compreendidas. Ainda há várias questões a serem investigadas quanto à variabilidade existente e o comportamento interativo de QTLs específicos com ambientes, *backgrounds* genéticos distintos e idades. Esses dados são cruciais para que informações de mapeamento possam ser usadas operacionalmente na prática do melhoramento genético (Bradshaw & Grattapaglia, 1994).

A aplicação de SAM (Seleção Assistida por Marcadores) para características quantitativas em espécies florestais é um desafio, principalmente pela extensão limitada do desequilíbrio de ligação (DL) nas populações tipicamente utilizadas no melhoramento (Neale & Williams, 1991; Strauss et al., 1992). As implicações da baixa extensão do DL em populações de melhoramento é que o marcador específico de um alelo pode estar ligado a um alelo favorável do QTL em uma família, mas a um alelo desfavorável do QTL em outra família. Por

estas razões a SAM em espécies florestais tem potencial de aplicação imediata dentro da mesma família em que os QTLs foram detectados (Grattapaglia, 2007)

Alelos favoráveis aos QTLs previamente mapeados nos genitores da família e também verificados em outras populações quanto a sua estabilidade, podem ser eficientemente marcados e rastreados com marcadores co-dominantes microssatélites que estiverem em desequilíbrio de ligação com os polimorfismos funcionais relevantes e utilizados para a seleção de indivíduos superiores dentro de famílias (Grattapaglia et al., 1995). Marcadores ligados aos QTLs poderiam assim ser utilizados para praticar seleção precoce, reduzindo o tempo necessário para a primeira seleção, principalmente para características de qualidade da madeira. Ao mesmo tempo, os marcadores permitiriam aumentar a intensidade de seleção dentro de famílias e potencialmente reduzir o número de plantas a serem resgatadas, clonadas e submetidas a teste clonal (Grattapaglia & Kirst, 2008). No contexto do melhoramento, tendo em vista as rotações relativamente curtas e a possibilidade de plantar clones, o eucalipto é uma das espécies florestais em que a SAM tem as melhores perspectivas de aplicação utilizando uma abordagem de seleção assistida dentro de família.

Com base no exposto o capítulo 1 deste trabalho teve como objetivo o desenvolvimento mapeamento e caracterização de novos marcadores microssatélites derivados de ESTs no âmbito do projeto Genolyptus. E o capítulo 2, a verificação da coincidência de detecção de QTLs, por meio da comparação da posição genômica e magnitude de efeito de QTLs para características silviculturais de crescimento e de qualidade da madeira em amostras de descendentes de três populações segregantes de *Eucalyptus* spp. em dois locais experimentais contrastantes.

REFERÊNCIAS

- Adams WT (1983) Application of isozymes in tree breeding. In: Tanksley SD & Orton TJ (Eds). *Isozymes in plant genetics and breeding*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers. pp 60-64.
- Adams WT & Joly RJ (1980) Allozyme studies in loblolly pine seed orchards: Clonal variation and frequency of progeny due to self fertilization. *Silvae Genetica* 29:1-4.
- Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. Anuário estatístico da ABRAF: ano base 2008/ ABRAF. Brasília, 2009.
- Beavis WD (1998) QTL analyses: power, precision, and accuracy. In: Patterson AH (ed). *Molecular dissection of complex traits*. Florida, CRC Publishing, Boca Raton. pp 145-162.
- Bradshaw HDJ & Grattapaglia D (1994) QTL Mapping in Interspecific Hybrids of Forest Trees. *Forest Genetics (Zvolen)* 1(4):191-196.
- Bradshaw HD & Stettler RF (1994) Molecular genetics of growth and development in *Populus* .2: Segregation distortion due to genetic load. *Theoretical Applied Genetics* 89:551-558.
- Brondani RPV; Brondani C; Tarchini R. & Grattapaglia D (1998) Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theoretical Applied Genetics* 97:816-827.
- Brown GR, Gill GP, Kuntz RJ, Langley CH & Neale DB (2004) Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in loblolly pine. *Proceedings National Academy Science USA* 101:15255-15260.
- Byrne M, Murrell JC, Allen B & Moran GF (1995) An integrated genetic linkage map for *Eucalypts* using RFLP, RAPD and isozyme markers. *Theoretical Applied Genetics* 91:869-875.
- Byrne M, Marquez-Garcia MI, Uren T, Smith DS, & Moran GF (1996) Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. *Aust J Bot* 44:331-341

- Byrne M, Murrell JC, Owen JV, Kriedemann P, Williams ER & Moran GF (1997a) Identification and mode of action of quantitative trait loci affecting seedling height and leaf area in *Eucalyptus nitens*. *Theoretical Applied Genetics* 94:674-681.
- Byrne M, Murrell JC, Owen JV, Kriedemann P, Williams ER & Moran GF (1997b) Mapping of quantitative trait loci influencing frost tolerance in *Eucalyptus nitens*. *Theoretical Applied Genetics* 95:975-979.
- Carlson JE, Tulsieram LK, Glaubitz JC, Luk VWK, Kauffeldt C & Rutledge R (1991) Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theoretical Applied Genetics* 83:194-200.
- Devey ME, Jermstad KD, Tauer GC & Neale DB (1991) Inheritance of RFLP loci in a loblolly pine 3- generation pedigree. *Theoretical Applied Genetics* 83:238-242.
- Gaiotto FA, Bramucci M & Grattapaglia D (1997) Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. *Theoretical Applied Genetics* 95:842- 849.
- Gonzalez-Martinez SC, Ersoz E; Brown GR, Wheeler NC & Neale DB (2006) DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. *Genetics* 172:1915-1926.
- Grattapaglia D. & Sederoff RR (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137:1121-1137.
- Grattapaglia D, Berlucchi FL, Sederoff RR (1995) Genetic Mapping Of Quantitative Trait Loci Controlling Vegetative Propagation in *Eucalyptus Grandis* and *E. Urophylla* using a Pseudo-Testcross Mapping Strategy and Rapd Markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90:933-947.
- Grattapaglia D, Bertolucci FL, Penchel R & Sederoff RR (1996) 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.
- Grattapaglia D (2004) Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. *Genetics and Molecular Research* 3:369-379.
- Grattapaglia D (2007). Mapas genéticos, QTLs e seleção assistida por marcadores em espécies florestais. In: Borém A (Ed). *Biotecnologia Florestal*. Viçosa, Editora UFV. pp. 201-230.
- Grattapaglia D & Kirst M (2008) *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. *New Phytologist* 179:911-929.

- Junghans D, Alfenas AC, Brommonschenkel SH, Oda S, Mello EJ & Grattapaglia D (2003) Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. *Theoretical Applied Genetics* 108:175-180.
- Marques CM, Araujo JA, Ferreira JG, Whetten R, O'malley DM, Liu BH & Sederoff RR (1998) AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. *Theoretical Applied Genetics* 96:727- 737.
- Marques CM, Vasquez-Kool J, Carocha VJ, Ferreira JG, O'Malley DM, Liu BH. & Sederoff R (1999) Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*. *Theoretical Applied Genetics* 99:936-946.
- Moran GF & Bell JC (1983) *Eucalyptus*. In: Tanksley SD & Orton TJ (Eds). *Isozymes in plant genetics and breeding*. Amsterdam, Elsevier. p.423-441.
- Neale DB & Williams CG (1991) Restriction fragment length polymorphism mapping on conifers and applications to forest tree genetics and tree improvement. *Canadian Journal of Forest Research* 21:545-554.
- Strauss SH, Lande R, Namkoong G (1992) Limitations of molecular-marker-aided selection in forest tree breeding. *Canadian Journal of Forest Research* 22:1050-1061.
- Thamarus K, Groom K, Bradley A, Raymond CA, Schimleck LR, Williams ER. & Moran GF (2004) Identification of quantitative trait loci for wood and fibre properties in two full-sib properties of *Eucalyptus globulus*. *Theoretical Applied Genetics* 109:856-864.
- Verhaegen D, Plomion C, Gion JM, Poitel M, Costa P & Kremer A (1997) Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers: 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression across different ages. *Theoretical Applied Genetics* 95:597-608.
- White TL, Adams WT & Neale DB (2007) *Forest genetics*. CAB International, Cambridge, MA, USA. 688p
- Williams CG, Elsik CG, Barnes RD (2000) Microsatellite analysis of *Pinus taeda* L. *Zimbabwe Heredity* 84 (Pt 2):261-268.

CAPÍTULO 1

MAPEAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROSSATÉLITES DERIVADOS DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS (EST) DE *EUCALYPTUS*.

RESUMO

Este trabalho descreve a caracterização e o mapeamento genético de uma nova bateria de microssatélites derivados de sequências de genes expressos (EST - Expressed Sequence Tag). O desenvolvimento iniciou com uma triagem de um conjunto de 232 pares de iniciadores (primers) para locos microssatélites utilizando um painel de 12 indivíduos de diferentes espécies correspondendo aos parentais das populações segregantes estudadas no projeto Genolyptus. No total, 103 pares de iniciadores (44,8%) amplificaram produtos de PCR discretos e interpretáveis, sendo que destes, 81 revelaram microssatélites polimórficos (78,6%) e 22 pares (21,4%) monomórficos. Observou-se um nível elevado de transferibilidade (77,7%) interespecífica o que era esperado, considerando que as sequências dos iniciadores foram desenhadas a partir de sequências consenso interespecíficas de ESTs correspondendo a regiões mais conservadas do genoma. Dos 103 locos selecionados em triagem com resolução preliminar em de géis de agarose, 36 locos foram selecionados para mapeamento com base no tamanho dos segmentos amplificados (< 400 pb), motivos de repetição (di e trinucleotídeos) e BLAST positivo com genes de interesse em bancos públicos de dados. Posteriormente, com o objetivo de mapeamento, os 36 locos foram avaliados quanto ao polimorfismo e à segregação em uma população de referência envolvendo os parentais *E. grandis* x *E. urophylla*. Do total, 72% (26 locos) segregaram em configuração informativa para mapeamento. Os demais locos não foram polimórficos nesta população ou apresentaram difícil interpretação, ou ainda apresentam alelos nulos impossibilitando a identificação correta das classes genóticas na descendência. Comparando-se estes locos derivados de EST com outros derivados de bibliotecas genômicas enriquecidas para microssatélites, a proporção de locos totalmente informativos, i.e. com três ou quatro alelos

segregando na descendência foi cerca de 40% menor. Apesar deste menor conteúdo de informação polimórfica, a utilização de locos derivados de EST para mapeamento é interessante, pois estes correspondem a regiões gênicas, possibilitando mapeamento comparativo e potencial co-localização de genes com QTLs. Dos 27 locos informativos, 20 foram genotipados na população segregante e mapeados em 10 dos 11 grupos de ligação definidos com base no mapa referência. Os 20 locos mapeados foram caracterizados quanto ao seu conteúdo de informação para análise genética. Para isso, foram analisados 32 indivíduos não aparentados, sendo 16 de *E.grandis* e 16 *E. globulus*. O número de alelos detectados variou de 2 a 10 alelos para *E.globulus* e de 3 a 10 para *E.grandis*. A média da heterozigosidade observada para *E.grandis* foi 0,6 e de 0,56 para *E.globulus*. A média da heterozigosidade esperada é em geral maior que a observada, para as duas espécies. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,08 a 0,86 para *E. globulus* e de 0,25 a 0,85 para *E. grandis*. De maneira geral, comparando-se os microssatélites derivados de EST com microssatélites derivados de sequências genômicas não codificantes observa-se que os ESTs são menos polimórficos, possivelmente como resultado da maior conservação das sequências de DNA em regiões transcritas. Não foi encontrada correlação significativa entre tamanho e o motivo de repetição do SSR e o PIC. Embora os microssatélites derivados de EST sejam menos polimórficos que os microssatélites derivados de sequências não codificantes, ainda assim eles podem ser utilizados com eficiência na discriminação de indivíduos, estudos de parentesco, avaliação de diversidade genética, mapeamento genético e seleção assistida por marcadores.

1 - INTRODUÇÃO

Os microssatélites são os marcadores mais utilizados atualmente nas análises genéticas em seres vivos. Vários são os atributos que fazem dos microssatélites, marcadores moleculares altamente informativos e de fácil utilização: (1) são codominantes, sendo possível visualizar na eletroforese ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto, se não houver alelos nulos; (2) são multi-alelicos, devido ao processo recorrente de expansão e contração do número de unidades repetitivas ao longo das gerações; (3) estão distribuídos uniformemente nos genomas eucariotos; (4) a análise de polimorfismos de microssatélites é relativamente simples e econômica quando comparada a diversos outros métodos de detecção de variabilidade de sequência no DNA; (5) e por fim, são altamente transferíveis entre indivíduos de uma mesma espécie e frequentemente entre espécies taxonomicamente próximas. (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Grattapaglia, 2007).

Para o gênero *Eucalyptus* todas essas vantagens levam ao uso dos marcadores microssatélites para a resolução de identidade clonal, na determinação de parentesco, para a análise de variabilidade em bancos de germoplasma, para quantificação de taxa de fecundação cruzada em populações e também fornecendo descritores moleculares para a proteção varietal (Grattapaglia, 2007).

Marcadores microssatélites também são os mais indicados para a construção de mapas genéticos de alta resolução e cobertura em *Eucalyptus*. O projeto Genolyptus, montou uma coleção de mais de 130 mil sequências ESTs (Expressed Sequence Tag) cobrindo os estimados 25 mil genes do eucalipto, bem como mapas genéticos com centenas de microssatélites e posições de QTLs para as principais características de importância econômica em *Eucalyptus* (Correia et al. 2008; Faria et al. 2008; Grattapaglia, 2004; Mammani & Grattapaglia., 2006; Missiaggia, 2005; Sena et al., 2007).

Os microssatélites derivados de ESTs têm a vantagem adicional de estarem associados a genes. Portanto ao mapeá-los, automaticamente genes são mapeados. Alguns destes genes mapeados podem constituir potenciais candidatos para funções importantes devido a sua co-localização com QTLs para características fenotípicas de importância econômica. Além disso, por serem derivados de regiões transcritas, mais conservadas, têm aplicabilidade para mapeamento comparativo. As informações de QTL associadas às informações de genes posicionados em mapas potencializam o uso da informação genômica para o descobrimento de genes importantes envolvidos no controle de características quantitativas e qualitativas relevantes ao melhoramento do Eucalipto.

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento, a caracterização e o mapeamento genético de uma nova bateria de microssatélites derivados de sequências de genes expressos (EST - Expressed Sequence Tag). O trabalho envolveu a triagem de 232 microssatélites derivados de sequências de ESTs e a seleção de locos polimórficos para mapeamento com base no tamanho dos segmentos amplificados (< 400 pb), motivos de repetição (di e trinucleotídeos) e BLAST positivo com genes de interesse em bancos públicos de dados. Estes microssatélites selecionados foram em seguida mapeados geneticamente em uma população de referência de *E. grandis* x *E. urophylla* e caracterizados para conteúdo informativo nas duas principais espécies de *Eucalyptus* plantadas comercialmente no Brasil.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Triagem de microssatélites derivados de EST, extração de DNA e PCR

A partir de aproximadamente 105.000 sequências válidas de ESTs geradas pelo Projeto Genolyptus, foram montados poucos mais de 21.000 sequências consenso. Estas foram submetidas a uma mineração de microssatélites que resultou no desenho de várias centenas de pares de iniciadores de PCR, doravante denominados *primers*, com potencial de amplificar marcadores polimórficos e únicos no genoma de *Eucalyptus*. Este trabalho envolveu a avaliação de 232 destes pares de *primers*. Para esta avaliação foram utilizadas 12 parentais geneticamente não relacionados de cinco espécies diferentes de *Eucalyptus* (*E. urophylla*, *E. grandis*, *E. globulus*, *E. calmadulensis*, *E. dunnii*) respectivamente identificados com as letras U, G, GL, C e D seguidos de uma eventual numeração para identificação individual e dois híbridos (*E. dunnii* x *E. grandis* e *E. urophylla* x *E. globulus*) identificados como sendo DxG e UxGL. O DNA utilizado foi extraído pelo método CTAB de acordo com o protocolo proposto por Doyle & Doyle (1987).

A amplificação dos microssatélites foi feita via PCR, utilizando-se: 2,94 µl H₂O milli-Q; tampão 1X (Phoneutria); 0,25 µg/µl de BSA; 0,20 mM de dNTP; 1,5 mM de MgCl₂; 0,30 µM de primer; 1 U Taq DNA polimerase (Phoneutria); e 4 ng de DNA. O programa de amplificação consiste em uma etapa inicial de desnaturação a 94° C por 5 min, seguida de 10 ciclos com os seguintes passos: 94° C por 1 min, 58° C por 1 min para anelamento do *primer* e 72° C por 1 min para extensão de novas cadeias de DNA; mais 20 ciclos de 94° C por 1 min, 56° C por 1 min para anelamento do *primer* e 72° C por 1 min para extensão das novas cadeias de DNA, para finalizar, um último passo de 72° C por 10 min.

Nesta etapa de triagem de simples amplificação, as eletroforeses foram conduzidas em géis de agarose 3% corados com brometo de etídeo (1mg/ml), a 200 V (4 V/cm) por 1 hora e 30 minutos. Juntamente com as amostras adicionou-se uma alíquota de 10 µl de ladder 1kb para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados. Os registros fotográficos foram feitos utilizando-se o equipamento de fotodocumentação Eagleye (BioRad).

Com base na qualidade e no tamanho dos segmentos amplificados, buscando produtos discretos e claramente distinguíveis com tamanho < 400 pb, presença de polimorfismo de tamanho dos segmentos amplificados, motivos de repetição (di e trinucleotídeos) e BLAST positivo com genes de interesse em bancos públicos de dados, 36 locos foram selecionados para a etapa posterior de mapeamento e caracterização. O primer direto para estes 36 locos foi resintetizado com marcação fluorescente (6-FAM ou HEX), que fluorescem nos comprimentos de onda das cores azul e verde respectivamente, visando à avaliação de polimorfismo e segregação em eletroforese de alta resolução em sequenciador automático. Estes 36 locos foram avaliados quanto ao polimorfismo e à segregação em uma população envolvendo os parentais *E. grandis* x *E. urophylla*, para fins de mapeamento.

2.2. Mapeamento genético

Primeiramente foi feita uma triagem envolvendo os parentais (U15 e G38) e dois indivíduos da progênie do cruzamento *E. grandis* e *E. urophylla* (EGU) visando avaliar a qualidade de amplificação, polimorfismo e segregação dos 36 locos marcados com fluorescência. Posteriormente os *primers* foram arranjados em painéis multiplex de acordo com o sugerido pelo *software* Multiplexer que busca o agrupamento de locos não complementares (não formam dímeros), facilitando a amplificação conjunta. Nas reações de PCR para o mapeamento utilizou-se DNA de 188 indivíduos do cruzamento EGU além dos parentais.

A amplificação dos microssatélites foi via PCR em placas de 96 poços utilizando-se o Kit Multiplex PCR (Qiagen®). O volume final de cada reação foi de 5 µl, contendo 2,5µl de PCR Master Mix 2x, 0,5µl de Q-solution, 0,1 µM de primer, 1µl de DNA a 25ng/µl e água Milli-q para completar o volume final. O

programa de amplificação consiste em uma etapa inicial de desnaturação a 95° C por 15 min, seguida de 35 ciclos de 94° C por 30 seg, 57° C por 1 min e 30 seg para anelamento do *primer* e 72° C por 1 min para extensão de novas cadeias de DNA, e um último passo de 60° C por 30 min. As reações de PCR foram otimizadas na forma de multiplex variando de sete a quatro marcadores por multiplex, de acordo com as melhores combinações entre pares de primers diferentes.

Após a reação de PCR, 1µl da reação foi adicionada a 8µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), 1µl do padrão de segmentos de DNA de tamanho conhecido em pares de base marcados com fluorescência ROX (Brondani & Grattapaglia, 2001). As placas foram mantidas a 94° C por 5 minutos e, posteriormente, colocadas em contato com gelo para desnaturação dos fragmentos amplificados. Por fim, as placas foram submetidas à eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

Os dados brutos gerados (eletroferogramas) foram analisados com os programas GeneScan e Genotyper, ambos da Applied Biosystems, que possibilitam a obtenção de tabelas para cada loco, contendo os genótipos com base no tamanho estimado em pares de bases dos alelos. Os arredondamentos das estimativas de cada alelo foram feitos pelo programa Allelobin (Indury & Cardon, 2006).

Os marcadores microssatélites desenvolvidos foram mapeados sobre um mapa de referência no qual já haviam sido mapeados outros 194 microssatélites (Mammani et al., 2006). As análises de mapeamento foram realizadas utilizando o software Joinmap utilizando critérios de mapeamento de LOD 10,0 e fração de recombinação < 0,40.

2.3. Caracterização genética

Os vinte locos mapeados geneticamente foram caracterizados quanto ao seu conteúdo de informação para análise genética. Para isso, foram utilizadas amostras de 32 árvores adultas e não aparentadas, sendo 16 *E. grandis* e 16 *E. globulus*. Foram calculados: número de alelos por loco (Na) para as duas espécies, heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He) e conteúdo de informação polimórfica (PIC). As análises de caracterização genética dos vinte locos mapeados foram feitas pelo software PowerMarker V3.25 (Liu & Muse, 2004).

A quantidade de heterozigose de um determinado loco (Ho) seguiu os procedimentos de Brown & Weir (1983). A quantidade de heterozigose estimada (He) teve como base Nei (1978).

$$H_o = 1 - \sum P_{ii}$$

Sendo P_{ii} - a frequência observada de genótipos homocigotos do alelo i .

$$\hat{H}_e = 1 - \sum P_i^2$$

Sendo P_i - a frequência estimada do i -ésimo alelo.

O conteúdo médio de informação polimórfica (PIC) (Botstein et al., 1980) foi calculado por:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

em que p_i e p_j é a frequência do i -ésimo e j -ésimo alelo do loco estudado.

3 – RESULTADOS

3.1. Triagem de microssatélites derivados de EST

O resultado da análise dos 232 locos revelou que 49% (103 pares) amplificaram algum produto de PCR (Figura 1), sendo 78,6% (81 locos) polimórficos e 21,4% (22 locos) não polimórficos. Observou-se um nível elevado de transferibilidade interespecífica completa (79%) destes microssatélites. Na tabela 1 constam os resultados da triagem, no caso dos 103 locos que amplificaram, apresentando o tamanho aproximado em pares de base do loco, se o loco apresentou boa amplificação ou amplificação inespecífica, porcentagem de transferibilidade entre os 12 parentais utilizados na triagem e entre parênteses, os parentais para os quais não houve amplificação, e por fim se o loco é polimórfico e quantos alelos foram observados. As figuras 2 e 3 mostram de forma mais detalhada os resultados da tabela 1. A figura 2 apresenta a porcentagem de marcadores em que foram identificados 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 alelos e os marcadores não polimórficos. A figura 3 apresenta a porcentagem de marcadores que amplificou para os 12 parentais (100% transferíveis), que amplificou em 2 a 6 parentais (transferibilidade entre 15 e 50%) e que amplificou em 8 a 11 parentais (62 a 95% de transferibilidade).

Tabela 1. Triagem dos microssatélites derivados de ESTs envolvendo os 12 parentais do projeto Genolyptus. Na coluna de transferibilidade, quando esta foi inferior a 100% são indicados os indivíduos nos quais foi observada amplificação consistente de produtos de PCR.

Loco	Tam. Aprox.(bp)	Amplificação	Transferibilidade	Polimorfismo	Nºalelos
Embra997	298	ok	100%	polimórfico	6
Embra981	<200	ok	100%	polimórfico	3
Embra969	<200	ok	100%	polimórfico	4
Embra964	298	ok	100%	polimórfico	2
Embra962	396	ok	91,66%(GL1)	polimórfico	2
Embra953	220	ok	100%	polimórfico	5
Embra944	298	ok	100%	polimórfico	3
Embra938	220	ok	100%	polimórfico	5
Embra934	220	ok	100%	polimórfico	5
Embra928	<200	ok	100%	polimórfico	3
Embra923	<200	ok	100%	polimórfico	3
Embra922	200	ok	100%	polimórfico	7
Embra892	298	ok	100%	não polimórfico	-
Embra891	344	ok	100%	polimórfico	4
Embra880	220	ok	75%(GL2, UxGL, DxG)	polimórfico	3
Embra878	200	ok	100%	polimórfico	6
Embra877	344	ok	91,66%(G2)	polimórfico	3
Embra876	300	ok	100%	polimórfico	2
Embra869	344	ok	100%	não polimórfico	-
Embra865	298	ok	100%	polimórfico	2
Embra859	350	ok	100%	não polimórfico	-
Embra852	220	ok	75%(C2, GL1, GL2)	polimórfico	2
Embra850	280	ok	83,33%(GL1, GL2)	polimórfico	6
Embra849	220	ok	100%	polimórfico	4
Embra836	200	ok	100%	polimórfico	4
Embra835	200	ok	100%	polimórfico	5
Embra832	400	ok	100%	não polimórfico	-
Embra807	220	ok	75%(G2,UxGL, DxG)	polimórfico	3
Embra2060	220	ok	100%	polimórfico	4
Embra2059	<200	ok	83,3%(G1, G2)	polimórfico	5
Embra2042	250	ok	100%	polimórfico	3
Embra2005	344	ok	66,6%(G2, D2, GL1,UxGL)	polimórfico	2
Embra1958	400	ok	100%	polimórfico	2
Embra1952	800	ok	100%	polimórfico	3
Embra1916	506	ok	100%	polimórfico	2
Embra1875	250	ok	100%	polimórfico	2
Embra1833	600	ok	100%	polimórfico	3
Embra1832	400	ok	100%	polimórfico	2
Embra1820	800	ok	100%	polimórfico	2

Embra1802	<200	ok	100%	polimórfico	5
Embra1794	<200	ok	100%	polimórfico	2
Embra1790	1018	ok	50%(G1,G2,D1,GL2,UxGL,DxG)	polimórfico	2
Embra1789	400	ok	50%(G1,G2,D1,GL2,UxGL,DxG)	polimórfico	2
Embra1752	120	ok	100%	polimórfico	7
Embra1703	1018	ok	100%	polimórfico	2
Embra1692	<200	ok	75%(U2,C1, GL2)	polimórfico	3
Embra1690	200	ok	100%	polimórfico	4
Embra1645	320	ok	100%	polimórfico	4
Embra1615	220	ok	100%	polimórfico	3
Embra1613	310	ok	100%	polimórfico	5
Embra1603	600	ok	100%	polimórfico	2
Embra1602	130	ok	100%	polimórfico	5
Embra1601	240	ok	83,33%(G1, C1)	polimórfico	3
Embra1515	506	ok	75%(C2, D2, UxGL)	polimórfico	4
Embra1509	344	ok	91,66%(DxG)	polimórfico	2
Embra1500	310	ok	75%(G1, G2, GL1)	polimórfico	3
Embra1499	180	ok	66,66%(G1, G2, U2, DxG)	polimórfico	2
Embra1495	270	ok	100%	polimórfico	6
Embra1494	220	ok	100%	polimórfico	4
Embra1488	<200	ok	100%	polimórfico	11
Embra1487	280	ok	16,66%(G1, G2, U1, U2, D1, D2, GL1, GL2,UxGL, DxG)	não polimórfico	-
Embra1470	344	ok	100%	polimórfico	7
Embra1441	298	ok	100%	polimórfico	3
Embra1429	<200	ok	91,66%(DxG)	polimórfico	4
Embra1427	298	ok	100%	polimórfico	3
Embra1414	344	ok	41,66%(G2, C1, C2, D1, GL2, UxGL, DxG)	não polimórfico	-
Embra1379	200	ok	100%	não polimórfico	-
Embra1368	450	ok	100%	polimórfico	3
Embra1363	300	ok	100%	polimórfico	12
Embra1362	300	ok	100%	polimórfico	6
Embra1335	344	ok	100%	polimórfico	4
Embra1333	<500	ok	100%	polimórfico	2
Embra1312	298	ok	91,66%(C1)	não polimórfico	-
Embra1310	<500	ok	100%	polimórfico	8
Embra1300	300	ok	100%	não polimórfico	-
Embra1296	298	ok	100%	polimórfico	3
Embra1290	<201	ok	100%	não polimórfico	-
Embra1279	<201	ok	100%	não polimórfico	-
Embra1243	300	ok	100%	polimórfico	5
Embra1196	344	ok	66,66%(G1, G2, U1, DxG)	não polimórfico	-
Embra1188	800	Inspecif.	100%	não polimórfico	-
Embra1142	344	ok	100%	polimórfico	5

Embra1128	190	ok	100%	polimórfico	2
Embra1122	280	ok	100%	polimórfico	4
Embra1114	220	ok	100%	polimórfico	3
Embra1104	290	ok	100%	não polimórfico	-
Embra1102	<200	ok	100%	polimórfico	5
Embra1098	344	ok	100%	polimórfico	3
Embra1097	800	ok	100%	não polimórfico	-
Embra1096	<200	ok	100%	não polimórfico	-
Embra1095	320	ok	100%	polimórfico	3
Embra1094	344	ok	100%	polimórfico	3
Embra1093	<200	ok	100%	polimórfico	3
Embra1077	270	ok	100%	polimórfico	4
Embra1054	800	ok	100%	polimórfico	2
Embra1042	298	ok	100%	não polimórfico	-
Embra1034	344	ok	100%	não polimórfico	-
Embra1030	250	ok	100%	não polimórfico	-
Embra1026	420	ok	100%	não polimórfico	-
Embra1020	200	ok	100%	polimórfico	7
Embra1013	250	ok	100%	não polimórfico	-
Embra1011	800	ok	75%(G1,D1,D2)	não polimórfico	-
Embra1007	220	ok	100%	polimórfico	2

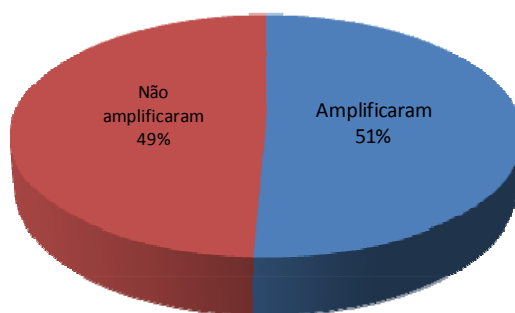


Figura 1. Sucesso de amplificação de produtos de PCR discretos dos 232 pares de primers nas condições únicas de PCR utilizadas.

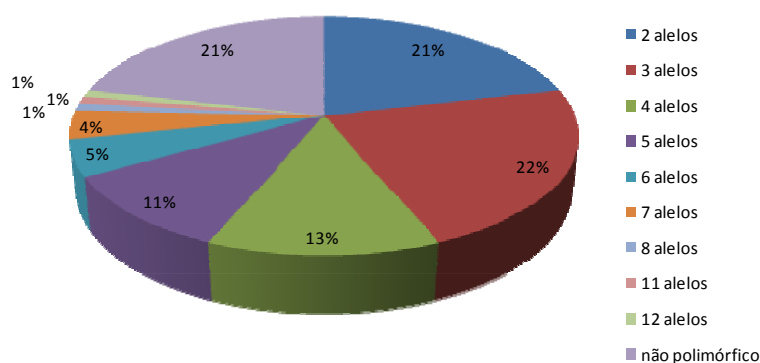


Figura 2. Número de alelos identificados para os microssatélites amplificados.

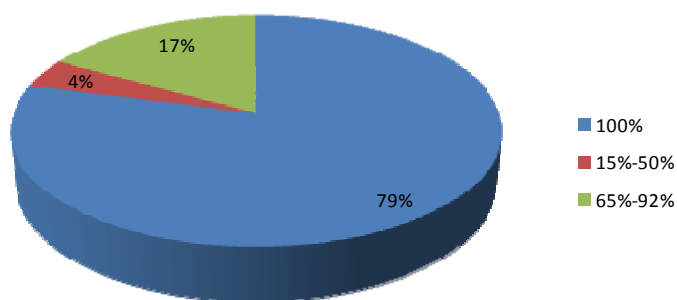


Figura 3. Transferibilidade interespecífica observada entre os 12 indivíduos das cinco espécies distintas utilizados na triagem (veja texto para detalhes).

Ainda a respeito dos 103 microssatélites que amplificaram produtos discretos de PCR, a maioria é dimérico e trimérico e apenas três locos são hexaméricos (Figura 4). A grande parte dos diméricos apresentava mais do que dez repetições e a maioria dos triméricos cinco repetições na sequência consenso utilizada para o desenho dos *primers*.

A porcentagem acima de cada barra dos histogramas refere-se aos locos polimórficos dentro das classes de número de repetições. Por exemplo, 75% dos locos diméricos com seis repetições que amplificaram são polimórficos. Observa-se que nem sempre a classe que apresenta maior porcentagem de locos polimórficos é a que tem maior número de repetições da sequência repetitiva (motif) (Figura 4).

Para fins de desenvolvimentos subsequentes o objetivo foi selecionar dentre estes 103 locos 36 que apresentassem um elevado polimorfismo e transferibilidade interespecífica para utilização ampla na análise genética de espécies de *Eucalyptus*.

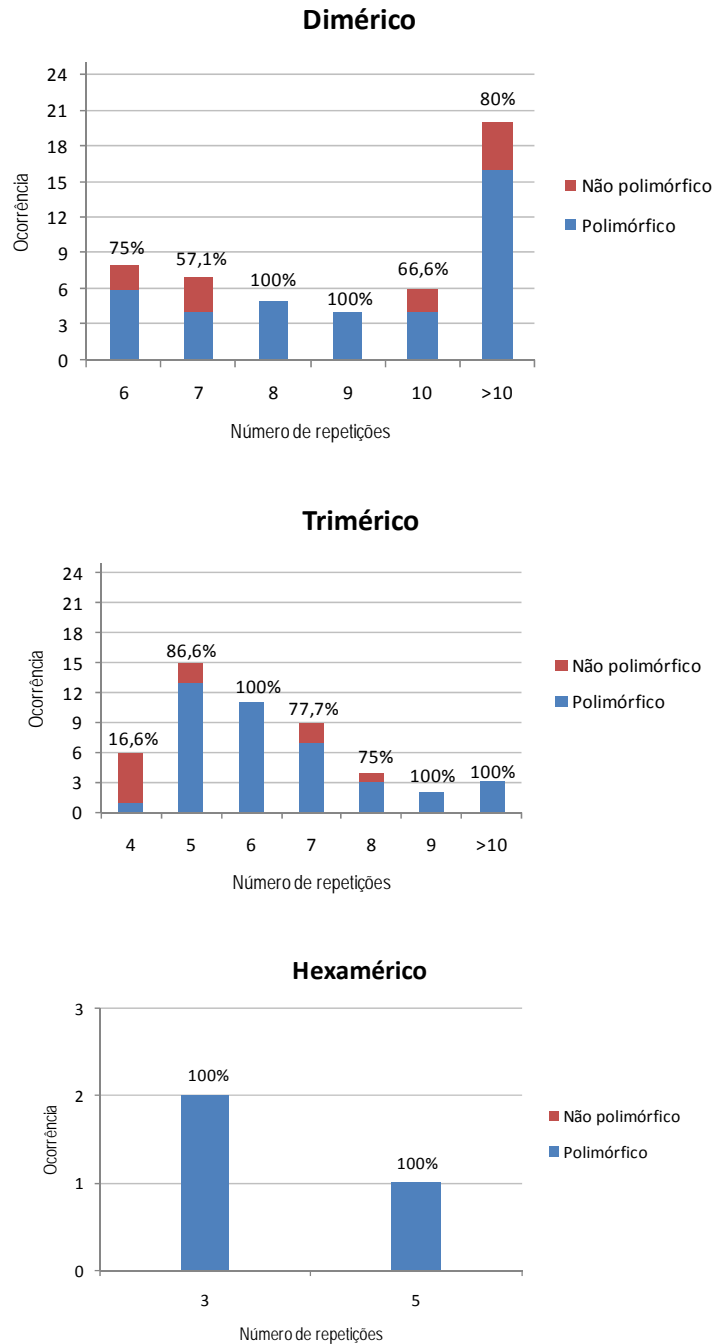


Figura 4. Relação entre número de repetições da sequência repetitiva (motif) do microssatélite e polimorfismo, para os 103 locos que amplificaram produtos específicos de PCR.

3.2. Mapeamento genético

A tabela abaixo se refere aos dados da triagem dos 36 locos microssatélites derivados de EST envolvendo os dois parentais e dois descendentes da população de referência assim como o tipo de segregação de cada loco.

Tabela 2. Triagem dos microssatélites derivados de EST envolvendo os parentais e dois descendentes do cruzamento *E. grandis* e *E. urophylla* (EGU).

Locos	Fluorescência	Polimorfismo	Genitores		Descendentes	
			U15	G38	1	2
embra 1007	6-fam	abxcd	280/283	282/284	283/284	283/284
embra 1102	hex	abxcd	154/168	151/156	151/154	154/156
embra 1122	hex	abxaa	227/23	227/227	227/23	227/227
embra 1142	hex	abxcd	313/327	321/337	327/337	313/321
embra 1296	hex	difícil interpretação	*	*	*	*
embra 1310	6-fam	duplicado	*	*	*	*
embra 1333	6-fam	abxaa	329/333	329/329	329/329	329/329
embra 1335	hex	abxaa	328/342	342/342	342/342	342/342
embra 1362	hex	abxcd	280/294	286/291	286/294	291/294
embra 1363	hex	duplicado	*	*	*	*
embra 1427	6-fam	abxab	255/256	255/256	255/255	255/256
embra 1441	6-fam	abxab	255/256	255/256	255/255	255/256
embra 1470	6-fam	abxcd	326/328	323/327	323/326	323/326
embra 1488	hex	difícil interpretação	*	*	*	*
embra 1494	hex	abxab	202/208	202/208	202/208	202/202
embra 1499	hex	abx00	166/175	0/0	175/0	175/0
embra 1515	hex	difícil interpretação	*	*	*	*
embra 1602	6-fam	abxab	150/157	150/157	150/15	150/157
embra 1690	6-fam	abxac	183/191	183/189	183/191	183/189
embra 1752	6-fam	abxac	101/123	106/123	101/123	101/106
embra 1875	6-fam	duplicado	*	*	*	*
embra 2042	6-fam	abxac	238/24	236/238	236/24	238/238
embra 2059	6-fam	difícil interpretação	*	*	*	*
embra 835	6-fam	abxac	191/202	193/202	191/193	202/202
embra 836	6-fam	abxcc	234/242	230/23	230/242	230/234
embra 850	hex	aaxab	271/271	271/282	271/282	271/271
embra 878	hex	abxaa	205/211	211/211	211/211	211/211
embra 922	6-fam	abxac	123/125	119/125	119/123	119/125
embra 923	6-fam	aaxbc	147/147	146/149	147/149	147/149
embra 928	6-fam	abxcd	144/145	140/142	142/145	140/145
embra 934	6-fam	abxc0	203/209	177/0	177/209	177/203
embra 938	hex	abxcd	218/221	224/24	221/24	218/224

embra 944	hex	difícil interpretação	*	*	*	*
embra 953	hex	não polimórfico	218/218	215/215	215/218	215/218
embra 969	hex	difícil interpretação	*	*	*	*
embra 997	hex	abxcd	291/293	272/277	277/291	272/293

Dos 36 locos analisados, 26 locos (72%) segregaram em configuração informativa para mapeamento (Figura 5). Os 10 locos restantes foram classificados como sendo não informativos (28%) por não serem polimórficos especificamente na população de referência, duplicados ou de difícil interpretação devido à amplificação de produtos inespecíficos.

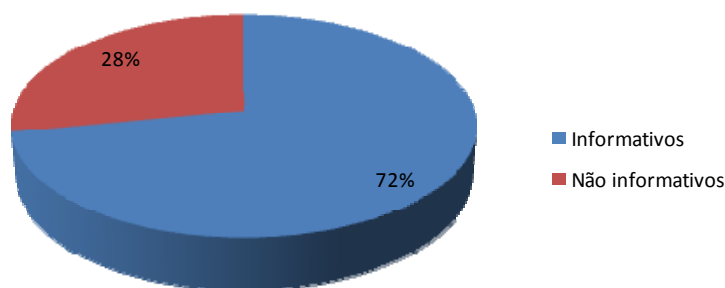


Figura 5. Porcentagem de locos amplificados que segregam em configuração informativa.

Destes 26 locos informativos, 48% são altamente informativos, ou seja, para os quais foram observados 3 ou 4 alelos distintos, 15% têm segregação tipo F2 (ambos os parentais igualmente heterozigotos), 26% segregaram apenas no parental feminino (U15) e 11% segregaram apenas no parental masculino (G38) (Figura 6).

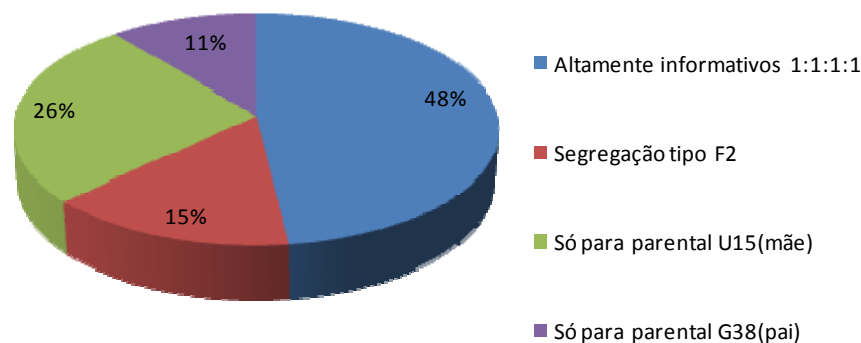


Figura 6. Distribuição dos locos quanto ao tipo de segregação.

Dos 26 locos informativos (72%), 20 foram genotipados. Os outros seis não amplificaram bem em sistemas multiplex e posteriormente serão objeto de análise individual fora do âmbito deste trabalho. Aos 20 locos genotipados foi aplicado o teste do χ^2 , indicando que apenas dois (10%) apresentaram distorção das proporções esperadas para a segregação de acordo com a primeira lei de Mendel.

Os novos locos incorporados ao mapa de referência se distribuíram ao longo de 10 dos 11 grupos de ligação definidos para *Eucalyptus*, enriquecendo principalmente o grupo de ligação 8 no qual, até o momento, não havia sido mapeado nenhum loco derivado de EST. Os grupos de ligação 3, 6, 8, 10 e 11 foram os acrescidos de mais marcas (3 locos em cada) em oposto ao grupo 9 que não teve nenhuma marca acrescentada. Os grupos de ligação foram definidos com base no mapa referência de Brondani et al. (2006).

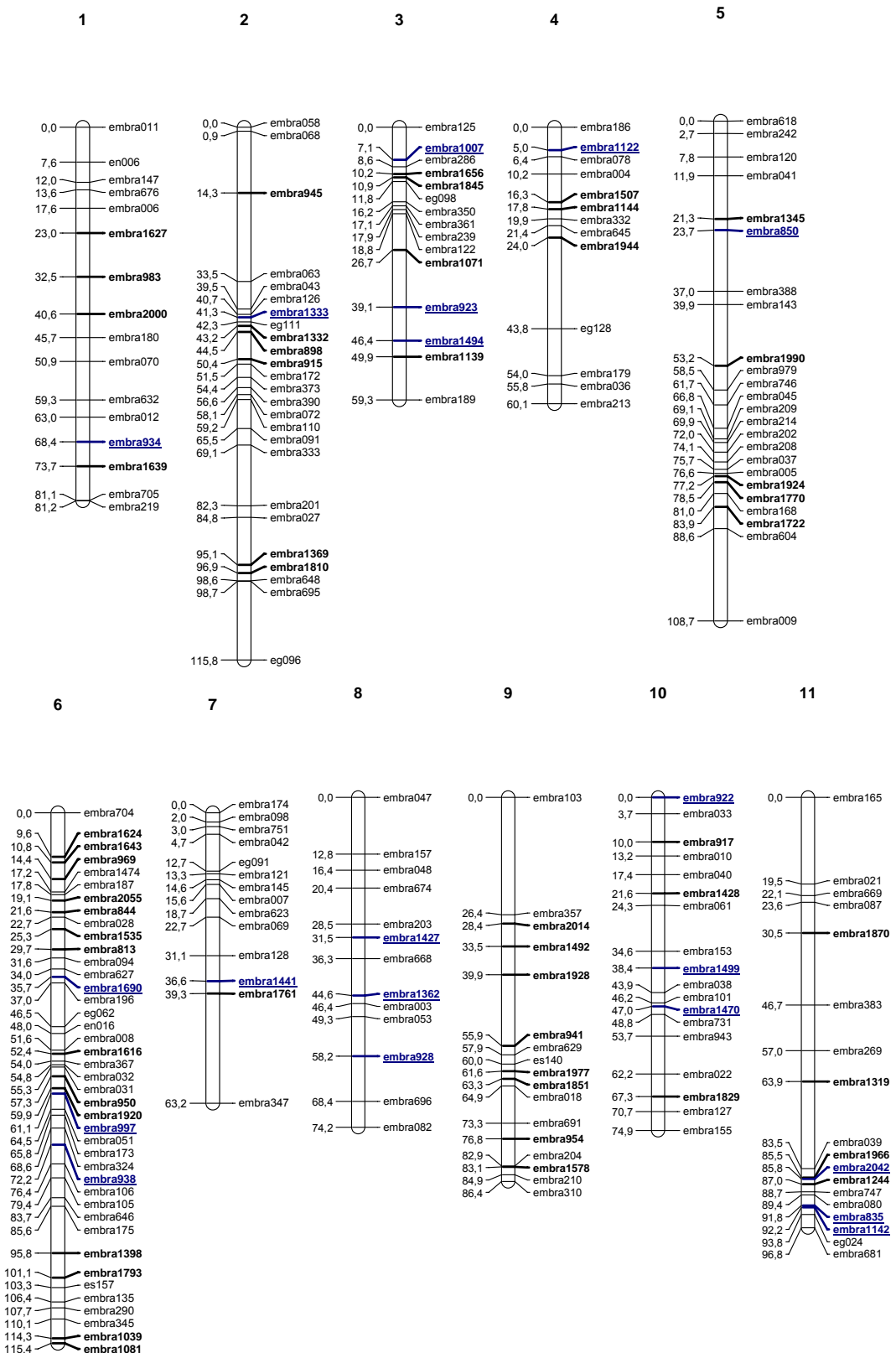


Figura 7. Mapa genético integrado gerado a partir da família de 188 irmãos completos do cruzamento de *E. grandis* e *E. urophylla*. Em azul e sublinhado estão os marcadores acrescidos ao mapa referência de Mamani et al. (2006).

3.3. Caracterização genética

Os 20 locos mapeados foram caracterizados quanto ao seu conteúdo de informação para análise genética. Para isso, foram analisadas amostras de 32 árvores adultas e não aparentadas, sendo 16 *E. grandis* e 16 *E. globulus*. O número de alelos detectados variou de 2 a 10 alelos para *E. globulus* e de 3 a 10 para *E. grandis*. A média da heterozigosidade observada para *E. grandis* foi 0,6 e 0,56 para *E. globulus*. A média da heterozigosidade esperada é em geral maior que a observada, para as duas espécies. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,08 a 0,86 para *E. globulus* e de 0,25 a 0,85 para *E. grandis* (Tabela 3)

Tabela 3. Estatísticas descritivas para os 20 locos microssatélites mapeados. Número de alelos (Na), Heterozigosidade esperada (He), Heterozigosidade observada (Ho) e Conteúdo de informação polimórfica (PIC).

Locos SSR	<i>E. globulus</i>				<i>E. grandis</i>			
	Na	Ho	He	PIC	Na	Ho	He	PIC
embra997	3	0,47	0,45	0,39	4	0,44	0,48	0,44
embra938	6	0,69	0,80	0,77	8	0,50	0,80	0,78
embra934	4	0,27	0,55	0,51	5	0,15	0,57	0,53
embra928	7	0,56	0,81	0,79	10	0,87	0,85	0,84
embra923	6	0,69	0,76	0,72	4	0,56	0,51	0,46
embra922	2	0,38	0,38	0,30	5	0,47	0,48	0,45
embra850	4	0,56	0,68	0,62	4	0,80	0,70	0,66
embra835	2	0,09	0,09	0,08	6	0,50	0,65	0,61
embra2042	8	0,88	0,76	0,73	7	0,69	0,73	0,69
embra1690	12	0,79	0,88	0,87	8	0,73	0,76	0,73
embra1499	4	0,25	0,37	0,35	4	0,33	0,51	0,48
embra1494	7	0,73	0,83	0,81	6	0,46	0,73	0,68
embra1470	3	0,57	0,56	0,48	3	0,15	0,27	0,26
embra1441	8	0,81	0,79	0,76	4	0,88	0,68	0,62
embra1427	4	0,53	0,62	0,55	5	0,73	0,76	0,73
embra1362	5	0,27	0,68	0,61	6	0,79	0,72	0,68
embra1333	10	0,87	0,82	0,80	5	0,60	0,51	0,47
embra1142	6	0,21	0,80	0,77	9	0,87	0,87	0,85
embra1122	5	0,92	0,68	0,63	3	1,00	0,53	0,42
embra1007	6	0,75	0,73	0,69	7	0,50	0,70	0,66
Média	6±2,58	0,56±0,25	0,65±0,20	0,61±0,20	6±1,98	0,60±0,24	0,64±0,15	0,60±0,16

Foram calculadas correlações de Pearson para motivo de repetição e número de repetições x PIC. A correlação foi não significativa para motivo de repetição x PIC e número de repetições x PIC para as duas espécies. Por meio dos gráficos de dispersão é possível observar que não existe uma relação linear entre motivo de repetição, número de repetições e PIC (Figura 8).

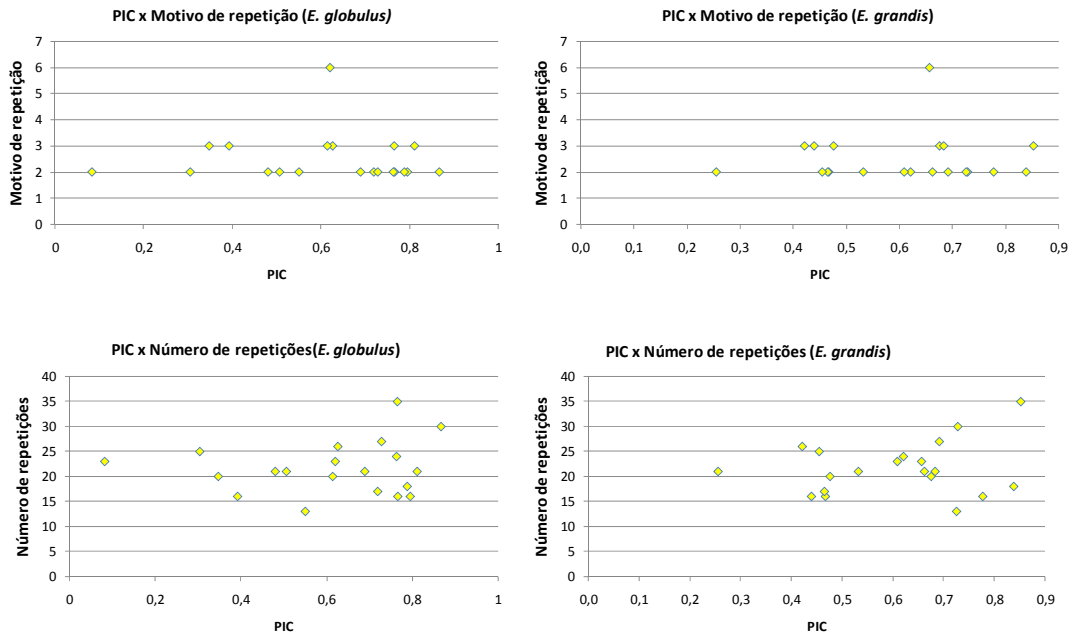


Figura 8. Gráfico de dispersão de motivo de repetição x PIC e número de repetições x PIC para as duas espécies (*E. grandis* e *E. globulus*).

4 - DISCUSSÃO

Dentre os 232 microssatélites derivados de ESTs, 103 locos amplificaram com sucesso, em grande parte não foi detectado polimorfismo, ou foram detectados apenas de dois a três alelos diferentes. É um resultado esperado, por se tratar de microssatélites derivados de regiões transcritas, ou seja, de regiões mais conservadas do genoma. Além disso, a triagem foi realizada em eletroforese de agarose, que não fornece uma boa resolução para distinção dos alelos, principalmente para alelos de tamanho aproximado, logo o número de diferentes alelos identificados entre os 12 parentais deve ser considerado apenas aproximado.

Detectou-se uma alta transferibilidade interespecífica da grande maioria dos microssatélites que amplificaram com sucesso entre os 12 indivíduos utilizados na triagem inicial, sendo que 79% dos microssatélites que amplificaram foram 100% transferíveis. Estes resultados coincidem com resultados anteriores para microssatélites derivados de sequências genômicas não codificantes (Byrne et al., 1996; Kirst et al., 1997) e reforçam o alto grau de conservação genômica e consequentemente das sequências de DNA que flanqueiam as regiões de microssatélite. Vale destacar que todas as espécies estudadas pertencem ao mesmo subgênero *Symphyomyrtus* e tem origem relativamente recente. A compatibilidade observada de cruzamentos entre estas espécies é completa e os híbridos apresentam plena fertilidade. Esses resultados de alta transferibilidade interespecífica indicam que as perspectivas de utilização destes marcadores para várias espécies em *Eucalyptus* são excelentes.

Ainda a respeito dos 103 microssatélites amplificados (figura 4), observa-se que nem sempre a classe que apresenta maior porcentagem de locos polimórficos é a que tem maior número de repetições de sequência repetitivas (motif), mostrando que os locos polimórficos são de tamanhos variados (motivo

de repetição e número de repetições). Este resultado sugere que a prática muitas vezes adotada de se fazer uma seleção previa *in silico* de microssatélites com maior número de unidades repetitivas pode não ser plenamente justificada.

A triagem dos 36 locos marcados envolvendo os parentais (U15 e G38) e dois indivíduos do cruzamento *E. grandis* e *E. urophylla*, mostra que 49% dos locos mostraram-se completamente informativos. Comparando-se estes locos derivados de EST com outros derivados de bibliotecas genômicas enriquecidas para microssatélites (Brondani et al., 1998), o número de locos totalmente informativos, i.e. com três ou quatro alelos segregando na descendência foi cerca de 40% menor. Apesar deste menor conteúdo de informação, a utilização de locos derivados de EST para mapeamento é interessante, pois estes correspondem a regiões gênicas que possibilitam o mapeamento comparativo e potencial co-localização de genes com QTLs.

Os dois locos que apresentaram distorção das proporções esperadas para a segregação de acordo com a primeira lei de Mendel foram mapeados com sucesso. Ferreira e Grattapaglia (1998) ressaltam atribuições às distorções nas proporções mendelianas esperadas podem ser devido à classificação errônea de genótipos, ligação de marcadores com locos deletérios levando a uma seleção pré ou pós zigótica.

Quanto aos estudos de caracterização genética, o número de alelos detectados para *E. globulus* variou de 2 a 10 alelos e de 3 a 10 para *E. grandis*. Em estudos realizados por Brondani et al, (1998) utilizando-se microssatélites genômicos foi encontrado um maior número de alelos, variando de 5-18 para *E. urophylla* e de 7-17 para *E. grandis*. Como já citado, os microssatélites derivados de EST são menos polimórficos, mas isto não impede sua utilização para distinção de indivíduos, em estudos de parentesco, avaliação de diversidade genética, certificação de cruzamentos controlados e identidade clonal, basta se fazer a escolha correta dos marcadores a serem utilizados, buscando os mais polimórficos para as espécies envolvidas no cruzamento em questão.

A média da heterozigosidade observada para *E. grandis* foi 0,6 e 0,56 para *E. globulus*. A média da heterozigosidade esperada é em geral maior que a observada, para as duas espécies. A diferença entre heterozigosidade esperada e observada pode ser atribuída à existência de um nível baixo, porém significativo de endocruzamento na população amostrada e ao número reduzido de indivíduos

utilizados para estimar as frequências alélicas, o que limita a observação de várias classes de heterozigotos, especialmente envolvendo alelos raros (Brondani et al., 1998). Quanto maior a heterozigosidade esperada dos microssatélites maior será a possibilidade que estes segreguem em configuração totalmente informativa em qualquer população segregante.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,08 a 0,86 para *E. globulus* e de 0,25 a 0,85 para *E. grandis*. Os valores de PIC (Conteúdo de informação polimórfica) observados mostram que alguns microssatélites são mais informativos para uma espécie que para outra, enquanto outros são informativos para as duas espécies. Com base nessas informações podem-se montar painéis de microssatélites para diferentes cruzamentos visando redução de custos e esforços para o mapeamento.

As correlações de Pearson para motivo de repetição x PIC e número de repetições x PIC para as duas espécies (*E. globulus* e *E. grandis*) não foram significativas. Em outros trabalhos para *Eucalyptus*, *Pinus* e *Populus* também não se encontrou uma relação entre motivo de repetição, número de repetições e nível de polimorfismo (Brondani et al., 2002; Echt et al., 1996; Dayanandan et al., 1998). Logo, a estrutura do motivo de repetição não é um indicador de polimorfismo.

De maneira geral os microssatélites derivados de EST são menos polimórficos que os microssatélites genômicos, possivelmente como resultado da maior conservação das sequências de DNA em regiões transcritas. Ainda assim podem ser utilizados na distinção de indivíduos, em estudos de parentesco, avaliação de diversidade genética, certificação de cruzamentos controlados, identidade clonal, mapeamento genético e seleção assistida por marcadores. Para mapeamento genético, os microssatélites gênicos e genômicos são complementares, sendo os microssatélites derivados de ESTs menos polimórficos, porém concentrados em regiões ricas em genes (Varshney et al., 2005).

5 – REFERÊNCIAS

- Botstein D, White RL, Skolnick M & Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Brondani RPV, Brondani C, Tarchini R & Grattapaglia D (1998) Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E.urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics* 97:816-827.
- Brondani RPV & Grattapaglia D (2001) Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. *Biotechniques* 31, 793-5.
- Brondani RPV & Grattapaglia D (2002) Towards the construction of a genus wide reference linkage map for *Eucalyptus* based on microsatellite markers. *Molecular Genetics and Genomics* 267:338-347.
- Brondani, RPV, Williams ER, Brondani C. & Grattapaglia D (2006) A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. *BMC Plant Biology* 6:20.
- Brown DH & Weir BS (1983) Measuring genetic variability in plant population. In: Tanksley SD & Orton TJ (Eds.). *Isoenzymes in plant genetics and breeding. Part A.* Amsterdam: Elsevier Science 219-239.
- Byrne M & Marquez Garcia M (1996) Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus of *Eucalyptus*. *Australian Journal of Botany* 44:331-341.
- Correia LQ, Faria DA, Grattapaglia D (2008) Mapeamento de QTL para características da Madeira em uma família segregante do gênero *Eucalyptus*. *Proceedings XIII Encontro do Talento Estudantil da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia.*
- Dayanandan S, Rajora OP & Bawa KS (1998) Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Theoretical and Applied Genetics* 96:950-956.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.

- Echt CS, May-Marquardt, Hseih M, Zahorchak R (1996) Characterization of microsatellite markers in Eastern white pine. *Genome* 39:1102-1108.
- Faria DA, Neves LG, Correia LQ, Mamani ECM & Grattapaglia D (2008) Mapeamento de QTLs para qualidade da madeira em uma população segregante envolvendo quatro espécies de *Eucalyptus*. Proceedings, XIII Encontro do Talento Estudantil da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- Ferreira ME & Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª Edição. Brasília. Embrapa Cenargen. 220p.
- Grattapaglia D (2007) Mapas genéticos, QTLs e seleção assistida por marcadores em espécies florestais In: Borém A (Ed). Biotecnologia Florestal. Viçosa. Editora UFV. pp. 201 - 230.
- Grattapaglia D (2004) Integrating genomics into Eucalyptus breeding. *Genetics and Molecular Research* 3:369-379.
- Indury RM & Cardon LR (2006) A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. *Genome Research* 7:1104-1109.
- Liu K and Muse S (2004) PowerMarker: new genetic data analysis software, Version 3.25 (<http://www.powermarker.net>)
- Mammani ECM & Grattapaglia D (2006) Integração de locos ESTs-SSR e localização de QTLs para qualidade da madeira em um mapa genético de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Proceedings, 52º Congresso Brasileiro de Genética.
- Missiaggia AA (2005) Mapeamento genético de QTL para qualidade da madeira e florescimento precoce e estudos de expressão gênica alelo específica em *Eucalyptus* spp. Piracicaba, Esalq/USP. 236p. Tese de Doutorado.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:438-443.
- Kirst M, Brondani RPV, Brondani C, Grattapaglia D (1997) Screening of Designed Primer Pairs for Recovery of Microsatellite Markers and their Transferability among Species of Eucalyptus. In: Proceedings of the IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalyptus 2:167-171.
- Sena JS, Mammani ECM, Grattapaglia D & Pappas GJ Jr (2007) Mapeamento e caracterização genética de novos microssatélites derivados de ESTs em *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Proceedings, 53º Congresso Brasileiro de Genética.
- Varshney RK et, Graner A & Sorrels ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends in biotechnology* 23(1):48-55.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DE COINCIDÊNCIA DE QTL EM *EUCALYPTUS* SPP. EM AMBIENTES CONTRASTANTES

RESUMO

Um passo essencial para a implementação da seleção assistida por marcadores dentro de famílias é a avaliação da estabilidade dos QTLs detectados em diferentes ambientes e idades. Apesar da publicação de vários estudos descrevendo a localização de QTLs de maior efeito para várias características quantitativas em *Eucalyptus* e espécies florestais em geral, trabalhos que tenham abordado esta questão são muito raros e em geral limitados. Por esta razão, o presente trabalho teve como objetivo a verificação da coincidência de detecção de QTLs por meio da comparação da posição genômica e magnitude de efeito de QTLs para características silviculturais de crescimento e de qualidade da madeira em amostras de descendentes de três populações segregantes de *Eucalyptus* spp., em dois locais experimentais contrastantes (Guanhães-MG e Guaíba-RS). As famílias estudadas foram: (*E. camadulensis*) x (*E. urophilla* x *E. globulus*), C1 x UGL, (*E. dunii* x *E. grandis*) x (*E. urophilla* x *E. globulus*), DG x U2, e (*E. dunii* x *E. grandis*) x (*E. urophilla*), DG x UGL. Diferentes indivíduos das mesmas famílias foram analisados com conjuntos de marcadores SSRs flanqueantes e internos às regiões de QTL cobrindo a região genômica alvo. Os marcadores definindo os QTLs foram selecionados a partir de experimentos anteriores nos quais foram mapeados QTLs para essas três populações em Guaíba-RS. Os mapas genéticos localizados em regiões de QTLs foram construídos para cada parental separadamente utilizando a metodologia de *pseudo-testcross*, com o auxílio do programa MapMaker. Foram estudados QTLs para oito características quantitativas relacionadas com desempenho silvicultural e qualidade da madeira. O mapeamento de QTLs foi realizado utilizando três estratégias: (1) mapeamento por marca simples; (2) mapeamento de QTLs por intervalo simples; (3) finalmente, mapeamento por intervalo composto, todos implementados no programa QTL Cartographer versão 2.5. Detectou-se dois QTLs (altura e

profundidade de penetração do Pilodyn) em comum para os dois ambientes, no genitor UGL da família C1 x UGL; dois QTLs (teor de lignina e rendimento depurado) nos genitores DG e U2 respectivamente, do cruzamento DG x U2 e quatro QTLs (dois para diâmetro à altura do peito, um para altura e um para volume) no genitor UGL, do cruzamento DG x UGL, sendo que dois destes se colocalizaram com QTLs para características biologicamente correlacionadas ($r > 0,8$). Ainda, três QTLs (diâmetro à altura do peito, altura e profundidade de penetração do Pilodyn) localizados no grupo de ligação 6 do genitor UGL se mostraram estáveis entre os diferentes *backgrounds* genéticos e ambientes. Os resultados deste trabalho indicam que QTLs de maior efeito para características de crescimento volumétrico e densidade da madeira são detectados em ambientes contrastantes em latitude, altitude, solos e clima. As regiões genômicas específicas contendo QTLs para características biologicamente correlacionadas também tendem a apresentar conservação entre ambientes distintos. Os QTLs para DAP, altura e profundidade de penetração do Pilodyn, localizados no grupo de ligação 6 do genitor UGL, são altamente estáveis entre diferentes ambientes e *backgrounds* genéticos. Estes QTLs podem representar alvos importantes de investigações futuras, principalmente com a disponibilização da sequência completa do genoma de *Eucalyptus*. Também foi observado que o QTL para DAP detectado no genitor DG para os cruzamentos DG x UGL e DG x U2 se expressa exclusivamente no ambiente de Guanhões e neste ambiente é estável entre diferentes *backgrounds*. Estes resultados inéditos têm grande relevância, pois fornecem regiões alvo interessantes para a seleção assistida dentro de famílias via seleção para QTLs ou ainda como ponto de partida para estudos de associação.

1 - INTRODUÇÃO

A maioria das características de importância econômica, alvo do melhoramento florestal, tem herança quantitativa e distribuição contínua. A variação fenotípica observada nessas características complexas é influenciada por múltiplos locos genéticos de efeito relativamente pequeno os quais interagem entre si e com o meio ambiente. O mapeamento de locos controladores de características quantitativas (QTL) é uma abordagem experimental que visa decompor as características de herança complexa em fatores genéticos discretos com comportamento mendeliano. O número e a localização de regiões genômicas que afetam a variação da característica e a magnitude relativa de seus efeitos podem ser determinados pela associação entre genótipos a marcadores moleculares de herança monofatorial simples a fenótipos quantitativos numa população segregante com estrutura definida.

A disponibilidade de marcadores moleculares cobrindo grande parte do genoma torna possível a construção de mapas genéticos para várias espécies por meio da estimativa das frequências de recombinação entre marcadores e o ordenamento relativo dos mesmos. Estes mapas genéticos, por sua vez, possibilitam a estimativa da localização e magnitude do efeito de QTLs por meio de múltiplas abordagens de mapeamento de QTLs por intervalo (Lander & Botstein, 1989; Haley & Knott, 1992), nas quais os genótipos de marcadores que determinam um intervalo são tomados simultaneamente aumentando a precisão da declaração dos QTLs. Nova evolução do ponto de vista estatístico ocorreu com a proposição do mapeamento por intervalo composto (Zeng et al., 1993; Jansen et al., 1993; Zeng et al., 1994), em que marcadores ligados a QTLs são incluídos como variáveis independentes no modelo de regressão múltipla, diminuindo a variância residual e, com isso, aumentando o poder de detecção de novos QTLs.

Em *Eucalyptus*, vários trabalhos relataram o mapeamento de QTL para diversas características como: capacidade de enraizamento em diferentes espécies (Grattapaglia et al., 1995; Marques et al., 1999), propriedades da madeira, incluindo densidade (Grattapaglia et al., 1996; Verhaegen et al., 1997; Thamarus et al., 2004), crescimento (Grattapaglia et al., 1996; Verhaegen et al., 1997) e forma (Verhaegen et al., 1997), altura da plântula e área foliar (Byrne et al., 1997a), tolerância a geada (Byrne et al., 1997b) entre outros revisados em Grattapaglia & Kirst (1998).

Os trabalhos de mapeamento de QTL permitem obter estimativas do número mínimo de locos envolvidos no controle dos caracteres, a localização genômica desses locos, a quantificação de suas contribuições para a variação fenotípica e a avaliação de seus efeitos em diferentes ambientes e genótipos, permitindo uma compreensão substancialmente melhor da arquitetura desses caracteres complexos (Neale & Savolainen, 2004).

Para o melhoramento florestal, além da compreensão da arquitetura das características complexas, existe um interesse maior na aplicação desses conhecimentos: a detecção de QTLs visando a seleção assistida por marcadores (SAM). Espera-se que, por meio da SAM, possa haver um aumento da acurácia de seleção para características de baixa herdabilidade, assim como uma diminuição do tempo e custo necessários para a seleção de árvores superiores, principalmente para características da madeira que, em geral, apresentam expressão tardia. Potenciais benefícios da SAM já foram sugeridos nos programas de melhoramento para *Eucalyptus* spp. e *Pinus radiata* (Kerr et al., 1996; Kumar & Garrick, 2001) e, ainda, um trabalho de simulação de seleção assistida por marcadores (Marker-based selection- MBS) para *Pinus radiata* concluiu que ganhos genéticos e financeiros podem ser obtidos mesmo quando a seleção é baseada em apenas poucos locos de efeito relativamente pequeno (Wilcox et al., 2001)

O principal desafio da aplicação da informação de QTLs na prática da seleção é o fato que populações de melhoramento florestal em geral encontram-se em equilíbrio de ligação (Strauss et al., 1992). Com isso os marcadores moleculares que delimitam um QTL em geral são mapeados a distâncias de recombinação da ordem de algumas unidades ou dezenas de centiMorgans dos polimorfismos efetivamente responsáveis pela variação quantitativa. A

informação de associação entre alelos a marcadores moleculares e alelos favoráveis a QTLs varia, portanto, de indivíduo para indivíduo o que dificulta ou mesmo impossibilita a aplicação da informação de QTLs mapeados em uma família para outras famílias geneticamente não relacionadas. Entretanto a informação de QTLs gerada para um determinado par de genitores pela análise de co-segregação entre marcadores e fenótipos nos seus descendentes é considerada, em princípio, plenamente aplicável para a seleção dentro da mesma família na qual os QTLs foram originalmente mapeados uma vez que forte desequilíbrio de ligação é gerado entre alelos a marcadores e alelos a QTLs dentro desta família. Ou seja, uma vez determinados os marcadores que co-segreguem com alelos favoráveis, ou seja, em forte desequilíbrio de ligação, estes podem ser utilizados para a seleção de descendentes superiores dentro da mesma família que consolidem um grande número de alelos favoráveis para diversas características. Tendo em vista as rotações relativamente curtas e a possibilidade de plantar clones, o eucalipto é uma das espécies florestais em que a SAM tem as melhores perspectivas de aplicação utilizando uma abordagem de seleção assistida dentro de família. Esta abordagem permitiria assim aumentar a intensidade de seleção dentro da família e potencialmente reduzir o número de plantas a serem resgatadas, clonadas e submetidas a teste clonal visando à seleção final de clones elite para plantio em larga escala (Grattapaglia & Kirst, 2008).

A avaliação da estabilidade dos QTLs em diferentes *backgrounds* e ambientes é importante porque as árvores respondem às condições variáveis do ambiente ao longo do seu ciclo de vida, o que pode implicar em uma maior ou menor contribuição do ambiente para a variância fenotípica, influenciando, assim, a importância da contribuição relativa dos QTLs o que pode ser mensurado pela capacidade de detecção dos mesmos. A investigação da importância relativa de alelos a QTLs previamente mapeados para um determinado indivíduo ao se variar o *background* genético, isto é, o outro genitor com o qual este indivíduo é intercruzado, é também muito importante, dada a maneira como os programas de melhoramento florestal são conduzidos. Enquanto o melhoramento de espécies anuais em geral se fundamenta numa base genética estreita e na utilização de linhagens puras, o melhoramento florestal explora ampla variabilidade genética em populações grandes e heterogêneas, amostrando, possivelmente, maior multialelismo aos QTLs. Torna-se, portanto, essencial, avaliar a expressão dos

QTLs descobertos em árvores individuais frente a uma ampla diversidade genética, seja para confirmar a posição do QTL, e principalmente para avaliar o efeito relativo do alelo no fenótipo final dos seus descendentes.

Apesar da publicação de vários estudos sobre a localização de QTLs de maior efeito para várias características quantitativas em *Eucalyptus* e espécies florestais em geral, trabalhos que tenham abordado esta questão (estabilidade de QTLs) são muito raros e em geral limitados (Grattapaglia & Kirst, 2008; Grattapaglia et al., 2009). Com a utilização crescente de marcadores microssatélites, mapas consenso e melhores e maiores delineamentos experimentais baseados em múltiplas famílias segregantes conectadas, espera-se agora caminhar rumo a um esforço de validação da posição genômica e classificação da variabilidade alélica aos QTLs, principalmente para características de qualidade da madeira e resistência a doenças.

O presente trabalho teve como objetivo a verificação da coincidência de detecção de QTLs por meio da comparação da posição genômica e magnitude de efeito de QTLs para características silviculturais de crescimento e de qualidade da madeira em amostras de descendentes de três populações segregantes de *Eucalyptus* spp. em dois locais experimentais contrastantes. Os objetivos específicos foram: (1) Construção de mapas genéticos localizados em regiões genômicas flanqueantes a QTLs detectados para três populações segregantes em um local (Rio Grande do Sul) para as mesmas três populações segregantes em outro local (Minas Gerais); (2) Mapeamento de QTLs para características silviculturais (crescimento volumétrico e diâmetro) e de qualidade da madeira nessas três populações em Minas Gerais utilizando exclusivamente marcadores flanqueantes a QTLs; (3) Análise comparativa de QTLs entre os dois locais para as três populações segregantes pela estimativa da posição e magnitude de efeito dos QTLs.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Populações segregantes, conectividade genética e extração de DNA

As três populações segregantes utilizadas neste trabalho foram geradas via cruzamento controlado em 2002, totalizando cerca de 800 a 1200 indivíduos para cada uma das três populações. Aproximadamente 400 indivíduos de cada uma das três populações foram plantados em setembro de 2003 no município de Guaíba (RS) (Latitude $-30^{\circ} 06' 50''$, Longitude $51^{\circ} 19' 30''$, clima subtropical úmido) e outros 300 no município de Guanhões em Minas Gerais (Latitude $-18^{\circ} 46' 30''$, Longitude $42^{\circ} 55' 57''$, clima tropical de savana). Em ambos os locais, os indivíduos foram plantados em delineamento experimental de parcelas de árvores individuais (single tree plot) em um delineamento de blocos incompletos.

Para o presente trabalho estudaram-se os descendentes das três populações plantadas em Guanhões-MG na propriedade da Cenibra. Todas as três famílias são oriundas do intercrossamento envolvendo parentais híbridos. A família DGxUGL é a família central do experimento e é derivada do cruzamento de um híbrido F1 entre *E. dunnii* x *E. grandis* (DG) e um híbrido F1 de *E. urophylla* x *E. globulus* (UGL). A segunda família envolve novamente o parental DG, porém cruzado com um parental de *E. urophylla* (U2) e a terceira família envolve o parental de *E. urophylla* x *E. globulus* (UGL) cruzado com um parental de *E. camaldulensis* (C1). Dessa forma, as três famílias são conectadas geneticamente sendo que os parentais DG e UGL participam cada um deles em duas das três famílias segregantes estudadas.

Amostras de casca viva de 220 indivíduos de cada população foram coletadas em campo, ao acaso, e conservadas em tubos falcon contendo tampão

CTAB 2x para preservação do tecido. O protocolo utilizado para extração de DNA a partir de amostras do tecido de câmbio foi a mesma descrita por Doyle & Doyle (1987), com pequenas modificações (menor tempo de precipitação em isopropanol e maior número de lavagens do pellet em etanol), na tentativa de se obter um DNA com menos impurezas. Para maceração do tecido das amostras, utilizou-se o equipamento TissueLyser da Qiagen. Após extração, os pellets foram ressuspensos em 100 µl de Tris/EDTA (TE) pH 8,0 com Ribonuclease A (RNase) e submetidos à temperatura de 37° por 20 minutos para ação da enzima. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrometria em equipamento NanoDrop e diluídas a 2,5 ng/µl.

2.2. Avaliações fenotípicas

A mensuração nas populações segregantes 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.

As análises físico-químicas da madeira dessas árvores foram realizadas no Laboratório de Celulose e Papel da Universidade Federal de Viçosa. Para isso, amostras de serragem retiradas à altura do peito foram enviadas ao laboratório da UFV para processamento em moinho visando atingir granulometria adequada para leitura de espectros em um Espectrofotômetro de Infra-Vermelho Próximo (NIRS). Equações de predição de características físico-químicas de interesse já haviam sido geradas anteriormente no âmbito do projeto Genolyptus pela análise laboratorial das várias características e pela leitura dos espectros de NIRs das mesmas amostras. As características para as quais haviam sido geradas equações de predição foram: teor de lignina total extraído com ácido conforme Gomide e Demuner (1986) e relação siringil/guaiacil (RSG) aferida por cromatografia líquida após a oxidação com nitrobenzeno e teor de extrativos solúveis em diclorometano. Além disso, toretes foram submetidos a uma simulação de cozimento pelo processo Kraft, permitindo gerar equações para a predição do rendimento depurado (DP). Também foi medida a densidade básica (DB) da madeira dos toretes conforme a norma ABTCP (Associação Brasileira Técnica de Celulose e Papel).

Com base nas leituras dos espectros de NIRs das 188 amostras de cada uma das três populações, as equações de predição foram utilizadas para estimar os valores destas características na progênie segregante.

A partir dos dados gerados foram estimados os valores genotípicos (VG) para todas as características fenotípicas em estudo. A análise foi realizada por meio de um modelo misto no qual foram considerados os seguintes fatores: super bloco- efeito aleatório; bloquinho dentro de super blocos – efeito aleatório; falhas nas linhas, colunas e diagonais – efeito aleatório; famílias – efeito fixo; genótipos dentro de famílias – efeito aleatório. Estas análises foram realizadas pelo Professor Alexandre Coelho, UFG.

Foram calculadas as correlações de Pearson entre as oito características fenotípicas para as três famílias, para isso utilizou-se os valores genotípicos e o programa Genes (Cruz, 1997)

2.3. Genotipagem e mapeamento genético

Em trabalhos anteriores (Correia et al., 2008; Petrolí et al. não publicado; Faria et al., 2008), foram gerados mapas genéticos para as mesmas três populações deste trabalho (C1 x UGL, DG x U2 e DG x UGL). Para a construção destes mapas, foram utilizados 188 indivíduos de cada população oriundos do experimento plantado em Guaíba-RS, na propriedade da Aracruz Celulose, e em média 120 marcadores microssatélites e alguns genes candidatos foram mapeados. Em seguida foi feito o mapeamento de QTLs para as mesmas características silviculturais e de qualidade da madeira descritas anteriormente.

Para o presente trabalho foram selecionados conjuntos de marcadores flanqueantes e internos às regiões de QTL identificados nos trabalhos anteriores para duas das populações (C1 x UGL e DG x U2), de forma a cobrir adequadamente toda a região genômica de suporte estatístico a cada QTLs. Para a terceira população, DG x UGL, fez-se uma seleção de marcadores também com base no mapa gerado anteriormente, mas de forma a cobrir todo o genoma e não apenas as regiões de QTL. Esses conjuntos de marcadores foram genotipados em 188 indivíduos de cada uma das três populações oriundas do campo experimental de Guanhães - Minas Gerais.

A amplificação dos microssatélites foi via PCR em placas de 96 poços utilizando-se o Kit Multiplex PCR (Qiagen®). O volume final de cada reação foi de 5 µl, contendo 2,5µl de PCR Master Mix 2x, 0,5µl de Q-solution, 0,1 µM de primer, 1µl de DNA a 25ng/µl e água Milli-q para completar o volume final. O programa de amplificação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 95° C por 15 min, seguida de 35 ciclos de 94° C por 30 seg, 57° C por 1 min e 30 seg para anelamento do primer e 72° C por 1 min para extensão de novas cadeias de DNA, e um último passo de 60° C por 30 min. As reações de PCR foram otimizadas na forma de multiplex variando de sete a quatro marcadores por multiplex, de acordo com as melhores combinações entre pares de primers diferentes.

Após a reação de PCR, 1µl da reação foi adicionada a 8µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), 1µl do padrão de segmentos de DNA de tamanho conhecido em pares de base marcados com fluorescência ROX (Brondani & Grattapaglia, 2001). As placas foram mantidas a 94° C por 5 minutos e, posteriormente, colocadas em contato com gelo para desnaturação dos fragmentos amplificados. Por fim, as placas foram submetidas à eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

Os dados brutos gerados (eletroferogramas) foram analisados com os programas GeneScan e Genotyper, ambos da Applied Biosystems, que possibilitam a obtenção de tabelas para cada loco, contendo os genótipos com base no tamanho estimado em pares de bases dos alelos. Os arredondamentos das estimativas de cada alelo foram feitos pelo programa Allelobin (Indury & Cardon, 2006).

As tabelas de genotipagem dos microssatélites foram recodificadas para análise da segregação de cada parental, separadamente, de acordo com a estratégia de pseudo-cruzamento teste (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Assim, os locos foram separados em dois grupos: um com aqueles marcadores que segregaram no parental feminino e outro com aqueles que segregaram no parental masculino, sendo que os marcadores que segregam para os dois parentais estão em ambos os grupos. Em cada grupo, os alelos segregantes ao loco foram codificados como 1 ou 2. Como não se dispõe da informação do genótipo dos avôs dessa família e, portanto, não se conhece a fase de ligação dos marcadores, para que ligação

pudesse ser detectada e a frequência de recombinação estimada entre marcadores em repulsão, cada loco foi duplicado, invertendo-se os códigos dos seus genótipos (1 passou a ser 2 e vice-versa) de acordo com a metodologia descrita na abordagem de pseudo-cruzamento teste (Grattapaglia & Sederoff 1994).

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 ligação de cada grupo. Os critérios utilizados para declarar a ligação entre os marcadores foram máxima frequência de recombinação de 40% e mínimo valor de LOD igual a 5,0. Após o agrupamento dos marcadores, esses foram permutados dentro de cada grupo de ligação (comando “ripple”) para verificar a consistência do ordenamento.

As distâncias entre os marcadores foram estimadas em centiMorgans, utilizando-se a função de mapeamento Kosambi. Para desenhar os mapas genéticos e compará-los com os mapas dos trabalhos realizados anteriormente utilizou-se o programa MapChart (Voorrips, 2002).

2.4. Detecção dos QTLs por marca simples, intervalo simples e intervalo composto

Após a realização da genotipagem e construção dos mapas genéticos para as regiões de QTLs, as análises de QTLs foram feitas com base nos dados fenotípicos dos indivíduos genotipados oriundos do campo experimental de Guanhães – MG.

Para o mapeamento de QTLs utilizaram-se três estratégias: (1) mapeamento por marca simples a partir do mapa (2) mapeamento de QTLs por intervalo simples; (3) finalmente, mapeamento por intervalo composto. Todas as análises foram realizadas pelo programa QTL Cartographer versão 2.5 para Windows (Wang et al., 2007).

Na análise por marca simples, os marcadores foram testados individualmente quanto à ligação aos QTLs por meio de uma análise de variância em que os tratamentos foram os diferentes genótipos encontrados na população para cada marcador. Para cada característica fenotípica marcadores significativamente ligados a QTLs, com um nível de significância de 5%, 1% e 0,1% pelo teste F, foram posicionados nos mapas dos genitores.

O mapeamento por intervalo, desenvolvido por Lander & Bostein (1989), utiliza um par de marcadores como unidade de análise ao invés de um marcador somente. O mapeamento por intervalo simples (IS) delimita um intervalo entre dois marcadores onde o programa realiza as análises na busca de um QTL. Escores de LODs (Log of odds ratio) são gerados dentro do intervalo a cada 2 cM e comparados com o LOD obtido por meio das permutações. Já no mapeamento por intervalo composto (IC), além do intervalo considerado na análise, são considerados também os outros QTLs presentes.

Todas as análises foram conduzidas utilizando-se o modelo de retrocruzamento do programa QTL Cartographer versão 2.5 (Wang et al., 2005). A escolha dos cofatores, marcadores supostamente ligados a QTLs a serem incluídos como variáveis independentes no modelo de regressão múltipla, foi feita mediante uma regressão *stepwise* (método *forward*) realizada pelo próprio QTL Cartographer. O número de cofatores foi variável para cada característica, de acordo com a recomendação de Zeng (1994) de se testarem 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 cofatores utilizando o modelo 6 do QTL Cartographer. Com isso, escolheu-se, para cada característica, o modelo cujo número de cofatores 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 & Doerge (1994) implementado no QTL Cartographer

2.5. Mapeamento comparativo de QTLs e análise de coincidência de QTLs para os dois ambientes contrastantes

Os resultados da análise de QTLs para as populações de Guanhães (MG) foram comparados com os resultados anteriormente descritos que definiram as regiões de QTL alvo deste trabalho. Na análise comparativa de QTL, analisou-se o posicionamento do pico de significância estatística, bem como a magnitude de efeito relativo do QTL nos dois locais. As análises de coincidência de QTLs nos dois ambientes para as famílias C1 x UGL e DG x U2 foram centradas em regiões de QTL previamente mapeadas. Já para a família DG x UGL, além da análise de coincidência de QTLs, foi possível fazer uma análise mais detalhada de QTLs por todo o genoma e verificar a ocorrência de novos QTLs exclusivos do segundo ambiente.

3 – RESULTADOS

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

Para a construção do mapa de cada parental pela estratégia de pseudo-cruzamento teste os locos foram separados em dois grupos de acordo com o parental no qual estavam em heterozigose e do qual, portanto, segregaram. Para a família C1xUGL o primeiro grupo contém 34 marcadores, que segregaram no parental *E. camaldulensis*, e o segundo grupo contém 35 marcadores, que segregaram no parental *E. urophylla* x *E. globulus*, sendo que 32 microssatélites são comuns a ambos os grupos, porque foram completamente informativos nesse cruzamento, ou seja, estavam em heterozigose em ambos os parentais segregando com 3 ou 4 alelos distintos. Para a família DG x U2 o primeiro grupo contém 45 marcadores, que segregaram no parental *E. dunnii* x *E. grandis*, e o segundo grupo contém 44 marcadores, que segregaram no parental *E. urophylla*, sendo que 41 microssatélites são comuns a ambos os grupos, porque foram completamente informativos nesse cruzamento. Para a família DG x UGL o primeiro grupo contém 85 marcadores, que segregaram no parental *E. dunnii* x *E. grandis*, e o segundo grupo contém 90 marcadores, que segregaram no parental *E. urophylla* x *E. globulus*, sendo que 81 microssatélites são comuns a ambos os grupos, porque foram completamente informativos nesse cruzamento (Figura 1).

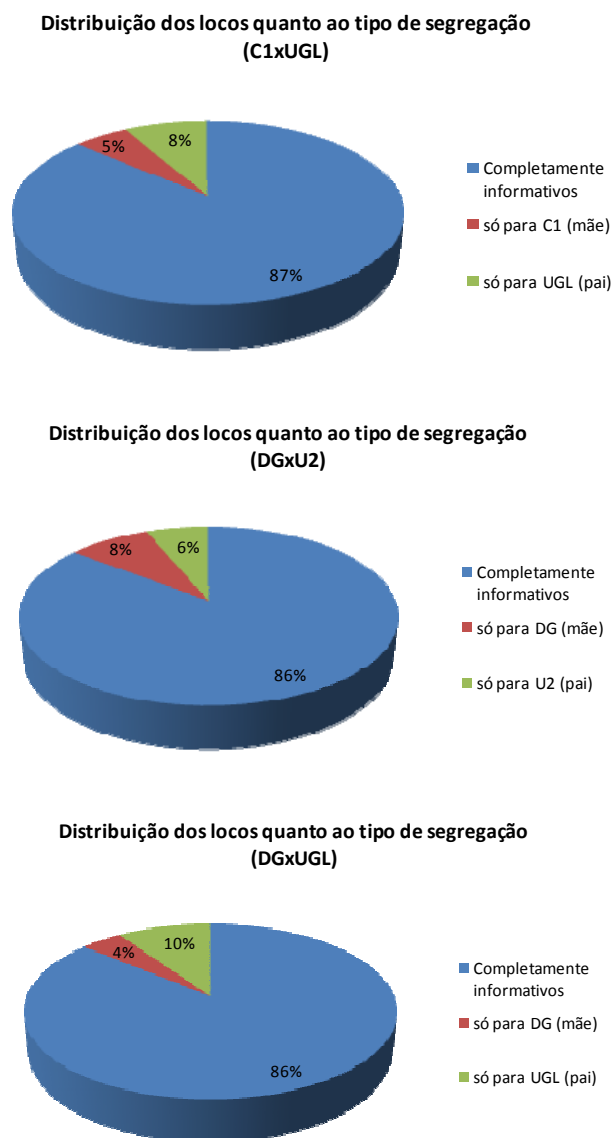


Figura 1. Distribuição dos locos quanto ao tipo de segregação para as três famílias.

Aos 37 locos genotipados para C1 x UGL, 48 locos genotipados para DG x U2 e 94 locos genotipados para DG x UGL foi aplicado o teste do χ^2 ($\alpha=0,05$), indicando que apenas um (2,7 %), três (6,2 %) e dois (2,1 %), respectivamente, apresentaram distorção das proporções esperadas de segregação de acordo com a primeira lei de Mendel. Os locos distorcidos foram: embra37 para o cruzamento C1 x UGL; embra1977, embra2055 e embra629 para o cruzamento DG x U2 e embra1770 e embra646 para o cruzamento DG x UGL. Mesmo assim, esses locos foram incluídos nas análises de ligação.

Todos os marcadores genotipados para as três famílias foram mapeados com sucesso nos seus devidos grupos de ligação conforme os mapas genéticos gerados anteriormente para as três famílias. Entretanto ao LOD limite utilizado de 5,0 e frequência de recombinação máxima de 40%, os marcadores embra81, embra22, embra58, embra210 e embra219, não se agruparam aos grupos de ligação esperados para o genitor DG, e embra5, embra180, embra219, eg96, embra347 e embra 81, não se agruparam aos grupos de ligação esperados para o genitor UGL, ambos os genitores do cruzamento DG x UGL.

Os mapas genéticos construídos para os genitores C1 e UGL (C1 x UGL) abrangem oito grupos de ligação (GL 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10) (Figura 2 e 3); para os genitores DG e U2 (DG x U2) abrangem sete grupos de ligação (GL 2, 4, 5, 6, 8, 9 e 10)(Figuras 4 e 5) e para os genitores DG e UGL do cruzamento DG x UGL abrangem 12 grupos de ligação, que correspondem aos onze grupos de ligação (Figura 6 e 7) de *Eucalyptus* sp., sendo que o grupo de ligação 11 do genitor DG e o grupo de ligação 10 do genitor UGL estão divididos em dois grupos de ligação ao limite de LOD e frequência de recombinação utilizados.

3.2. Análise comparativa entre os mapas genéticos gerados neste trabalho (ambiente Guanhães-Cenibra) e mapas genéticos gerados anteriormente (Ambiente Guaíba-Aracruz)

Nas figuras 2 e 3, estão representadas as comparações dos grupos de ligação gerados neste trabalho (Cen) e os grupos de ligação gerados no trabalho anterior (Ara) para os genitores C1 e UGL, respectivamente. Nas figuras 4, 5, 6 e 7 também estão representadas as comparações entre os grupos de ligação gerados nos dois trabalhos para os genitores DG e U2 (cruzamento DG x U2) e para os genitores DG e UGL (cruzamento DG x UGL) respectivamente. Notam-se diferenças nas estimativas dos comprimentos totais dos grupos de ligação gerados nos dois trabalhos, pois foram mapeados diferentes números de marcadores. Todavia a ordem dos marcadores de modo geral se mantém. Os grupos de ligação para as três famílias, gerados no presente trabalho, apresentam menos marcadores

que os mapas gerados no trabalho anterior uma vez que o foco da análise foi especificamente direcionado às regiões de QTLs.

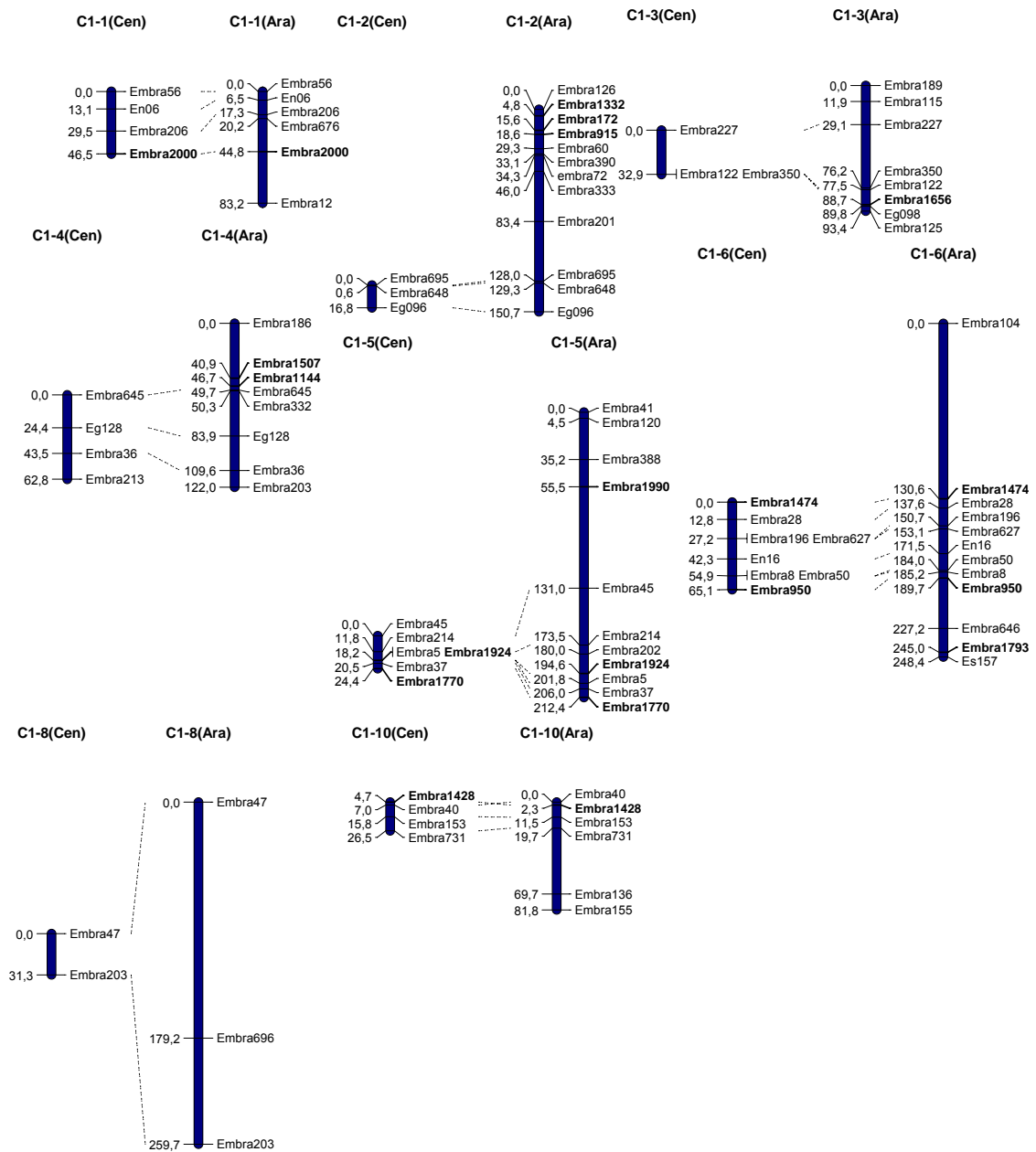


Figura 2. Comparação entre o mapa genético gerado neste trabalho (ambiente Guanhões- Cenibra) e o mapa gerado anteriormente (ambiente Guaíba- Aracruz) para genitor C1, cruzamento C1 x UGL. Linhas pontilhadas ligam microssatélites correspondentes.

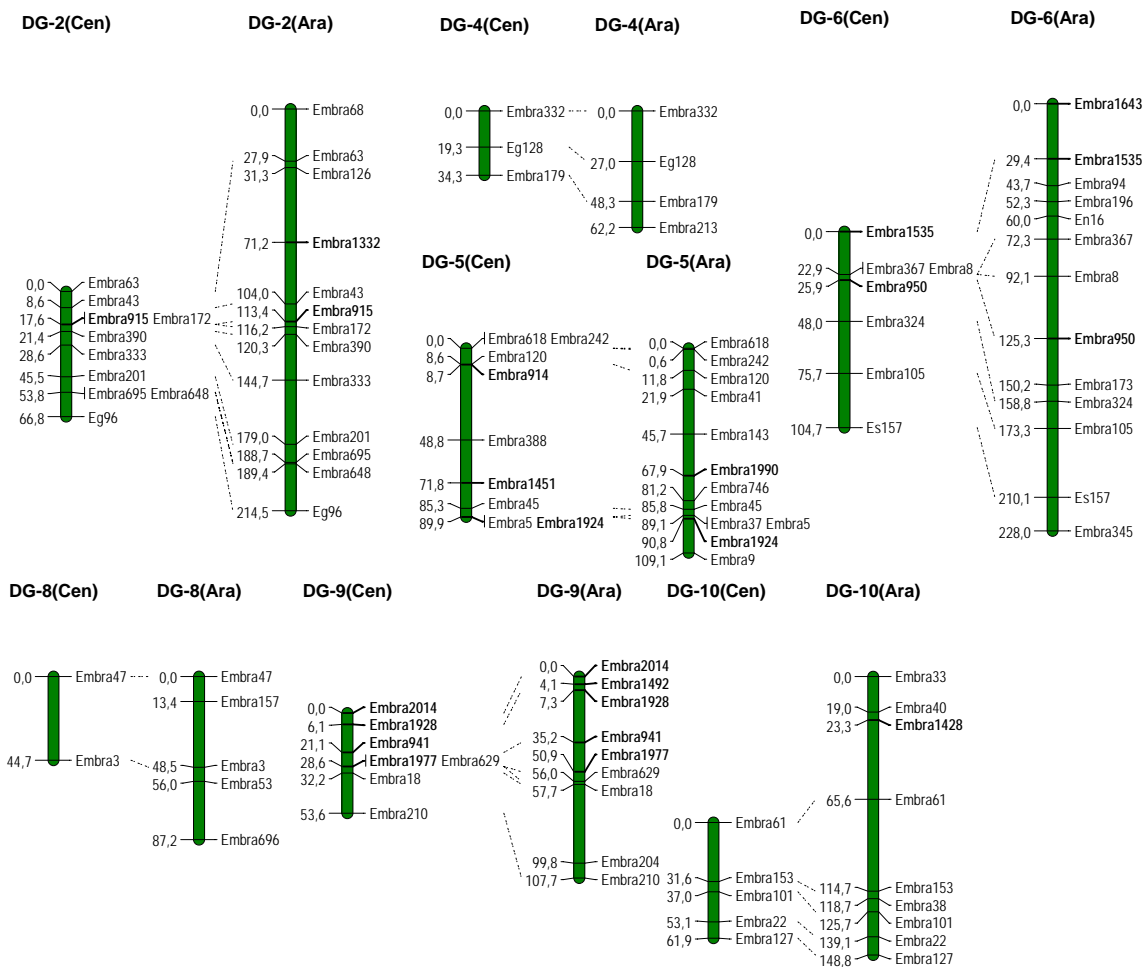


Figura 4. Comparação entre o mapa genético gerado neste trabalho (ambiente Guanhões- Cenibra) e o mapa gerado anteriormente (ambiente Guaíba- Aracruz) para genitor DG, cruzamento DG x U2. Linhas pontilhadas ligam microssatélites correspondentes.

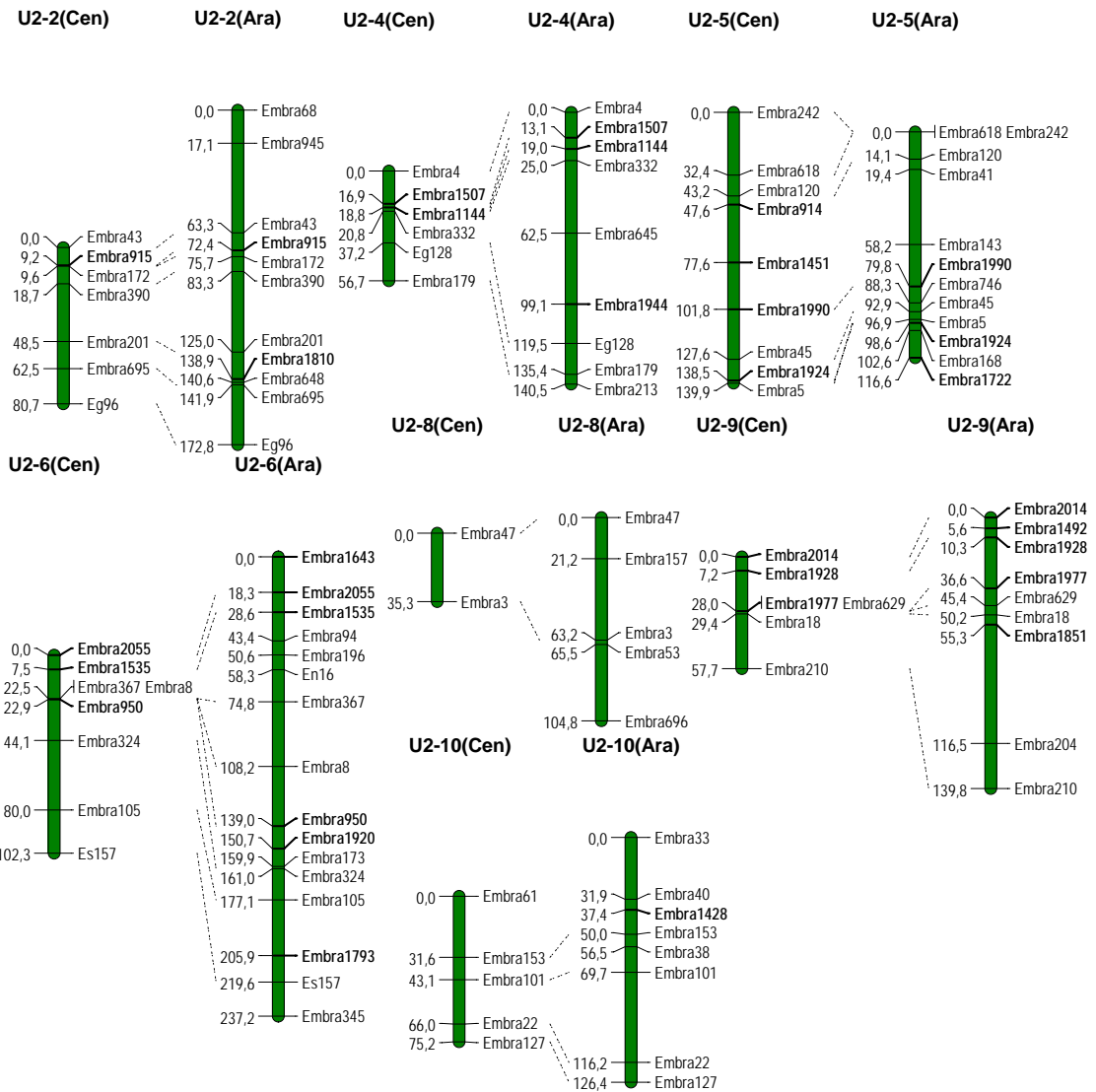


Figura 5. Comparação entre o mapa genético gerado neste trabalho (ambiente Guanhões- Cenibra) e o mapa gerado anteriormente (ambiente Guaíba- Aracruz) para genitor U2, cruzamento DG x U2. Linhas pontilhadas ligam microssatélites correspondentes.

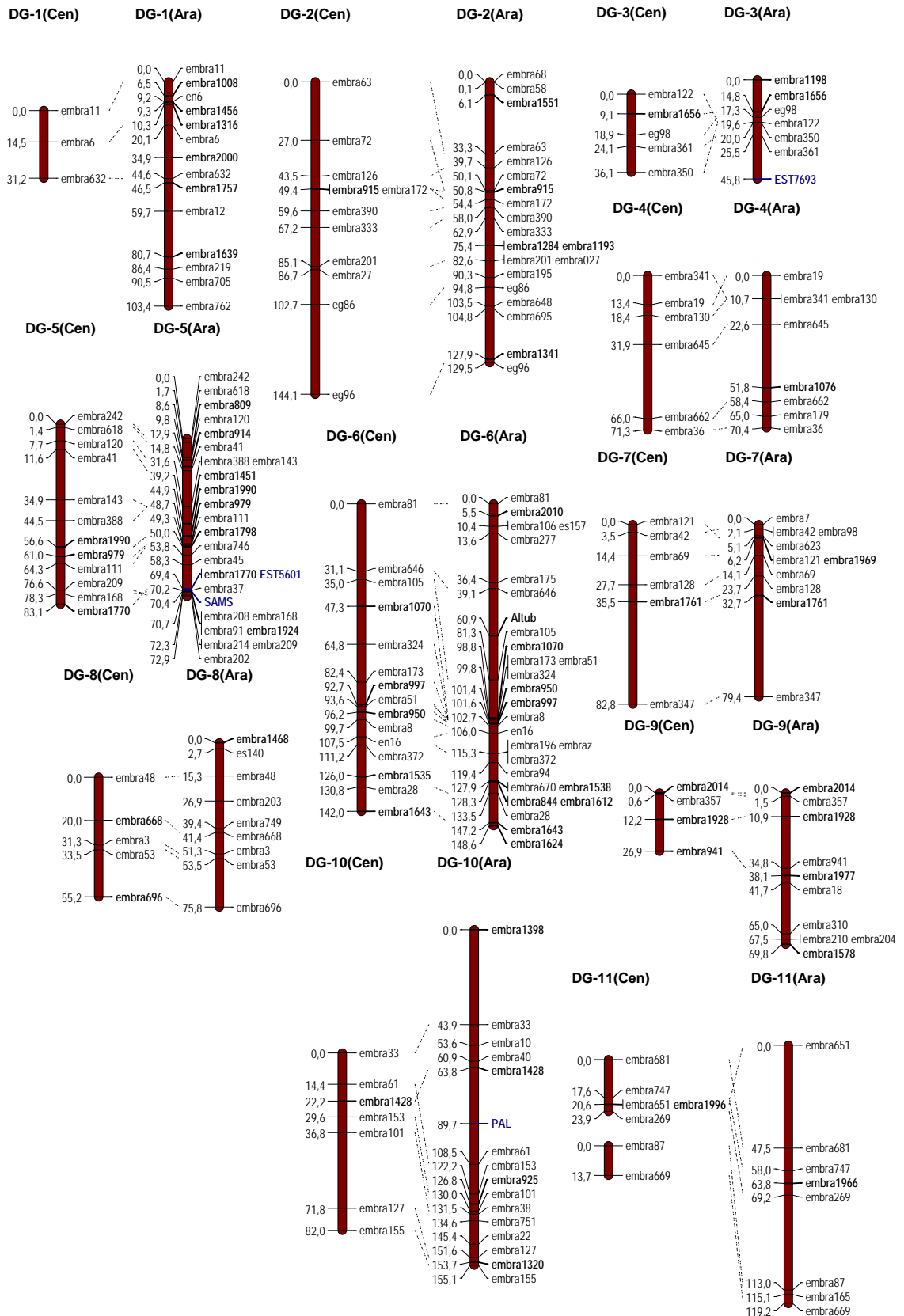
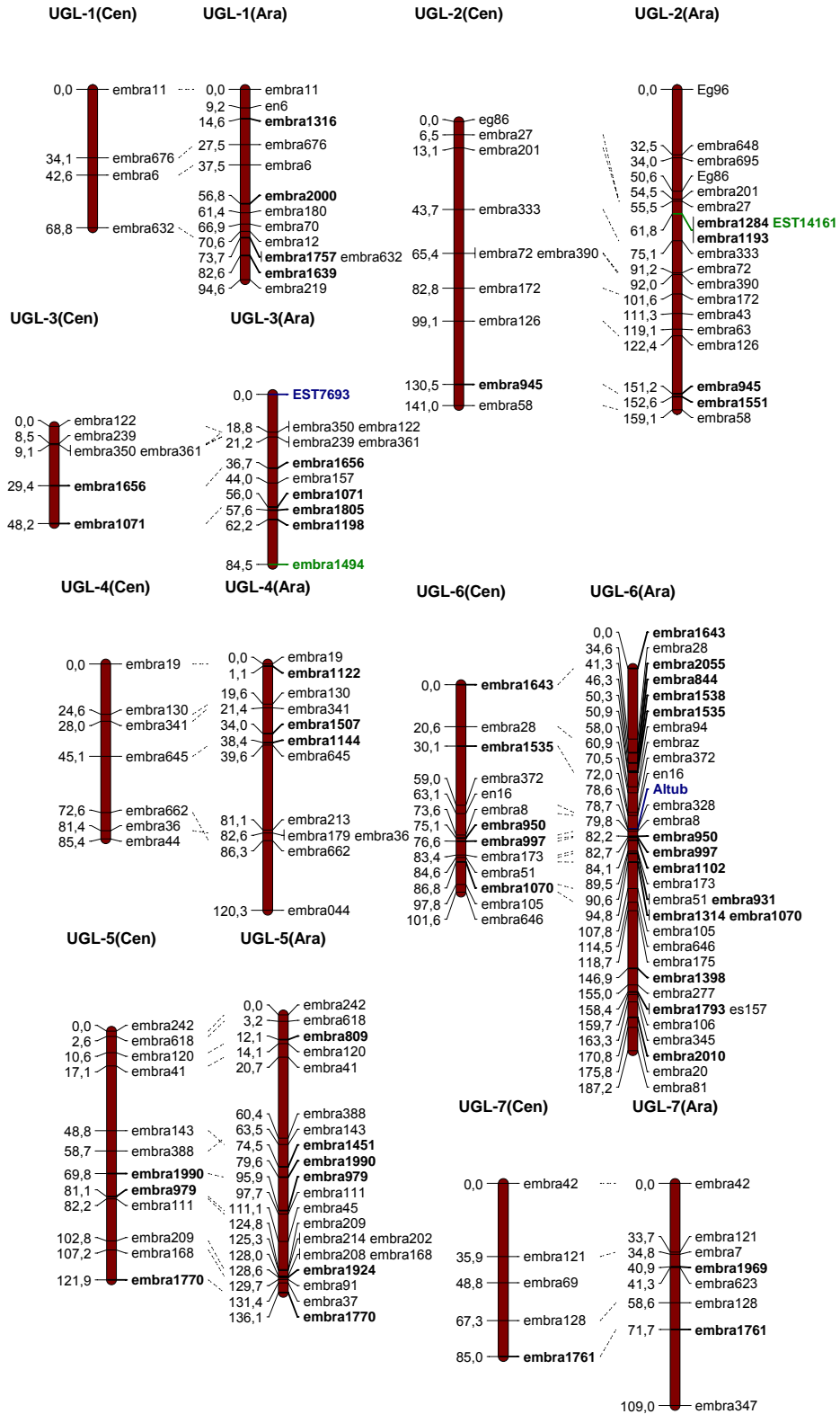


Figura 6. Comparação entre o mapa genético gerado neste trabalho (ambiente Guanhões- Cenibra) e o mapa gerado anteriormente (ambiente Guaíba- Aracruz) para genitor DG, cruzamento DG x UGL. Linhas pontilhadas ligam microssatélites correspondentes.



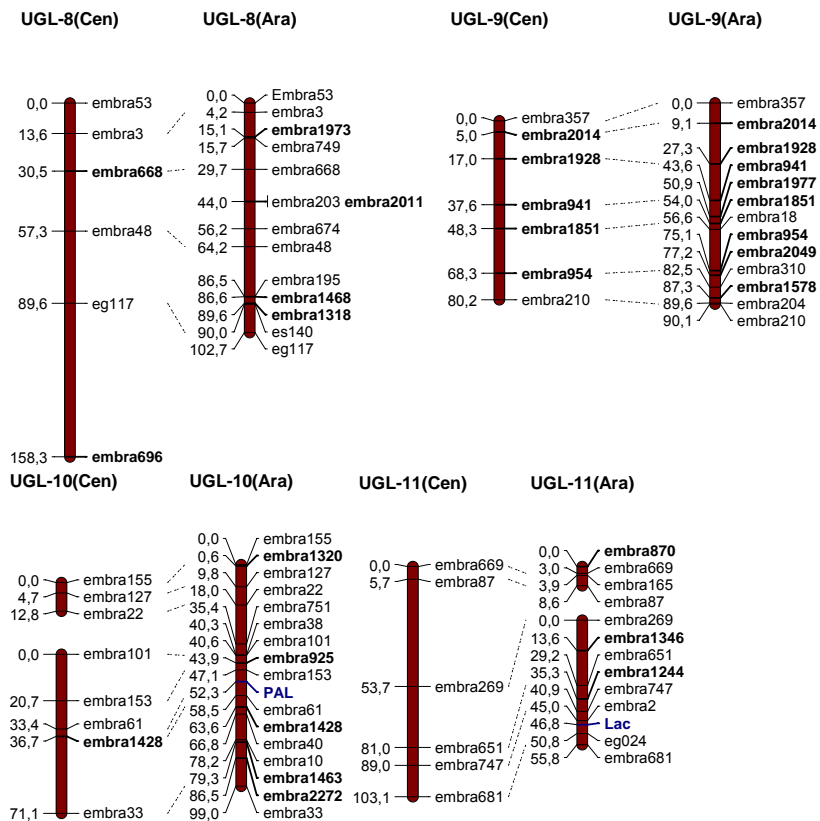


Figura 7. Comparação entre o mapa genético gerado neste trabalho (ambiente Guanhões- Cenibra) e o mapa gerado anteriormente (ambiente Guaíba-Aracruz) para genitor UGL, cruzamento DG x UGL. Linhas pontilhadas ligam microssatélites correspondentes.

3.3. Estatísticas descritivas e análise da correlação entre os caracteres

Nas tabelas 1, 2 e 3, encontram-se as estatísticas descritivas referentes aos oito caracteres analisados nos 188 irmãos-completos para as três famílias. As estatísticas descritivas demonstradas nas tabelas 1, 2 e 3 são: valor máximo e mínimo, variância, desvio padrão, média e coeficiente de variação.

Tabela 1. Valor máximo (MAX) e mínimo (MIN), variância fenotípica ($\hat{\sigma}_F^2$), desvio padrão (DV), média (\bar{X}) e coeficiente de variação (CV) para as oito características fenotipadas nos 188 irmãos-completos de (*E. camaldulensis*) x (*E. urophylla* x *E. globulus*).

C1xUGL						
	MAX	MIN	$\hat{\sigma}_F^2$	DP	\bar{X}	CV
DAP (cm)	12,1	5,1	2,3	1,5	8,4	18,3
Altura (m)	15,1	5,3	2,9	1,7	11,6	14,7
Volume (dcm ³)	104,2	0,4	445	23,5	33	55,5
Pilodyn (mm)	40	6	10,5	3,2	11,4	28,4
DB (Kg/m ³)	510	431	201,9	14,2	464,4	3,1
Lignina (%)	29	22,7	1,1	1,1	26,3	4,1
RSG	3,4	2,2	0,1	0,2	2,7	8,6
RD	57,8	49,1	2,1	1,5	54,8	2,7

Tabela 2. Valor máximo (MAX) e mínimo (MIN), variância fenotípica ($\hat{\sigma}_F^2$), desvio padrão (DV), média (\bar{X}) e coeficiente de variação (CV) para as oito características fenotipadas nos 188 irmãos-completos de (*E. dunnii* x *E. grandis*) x (*E. urophylla*).

DGxU2						
	MAX	MIN	$\hat{\sigma}_F^2$	DP	\bar{X}	CV
DAP (cm)	14,6	5,1	4,6	2,1	10,2	20,9
Altura (m)	15,6	6,4	2,5	1,6	12,9	12,2
Volume (dcm ³)	154,56	0,72	1331,4	36,7	62,3	58,5
Pilodyn (mm)	17,0	7,0	3,2	1,8	11,3	15,9
DB (Kg/m ³)	511,0	440,0	127,9	11,3	468,8	2,4
Lignina (%)	27,6	21,3	1,2	1,1	24,6	4,4
RSG	3,6	2,5	0,0	0,2	3,0	7,2
RD	60,5	48,9	2,3	1,5	55,9	2,7

Tabela 3. Valor máximo (MAX) e mínimo (MIN), variância fenotípica ($\hat{\sigma}_F^2$), desvio padrão (DV), média (\bar{X}) e coeficiente de variação (CV) para as oito características fenotipadas nos 188 irmãos-completos de (*E. dunnii* x *E. grandis*) x (*E. urophylla* x *E. globulus*).

	DGxUGL					
	MAX	MIN	$\hat{\sigma}_F^2$	DP	\bar{X}	CV
DAP (cm)	15,3	5,4	3,6	1,9	10,1	18,8
Altura (m)	16,2	5,2	2,8	1,7	12,5	13,3
Volume (dcm ³)	163,3	0,72	1060,7	32,6	61,0	53,40
Pilodyn (mm)	33,0	4,0	15,0	3,9	13,1	29,6
DB (Kg/m ³)	514,0	433,0	174,4	13,2	461,3	2,9
Lignina (%)	27,4	21,5	1,2	1,1	24,5	4,4
RSG	3,7	2,5	0,1	0,2	3,0	7,4
RD	58,7	53,1	1,5	1,2	56,2	2,2

As análises de correlação de Pearson nas três famílias revelaram caracteres com elevada correlação linear. Como já era esperado, diâmetro das árvores e altura; diâmetro e volume; altura e volume apresentam correlação positiva e maior que 80%. Correlação negativa e acima de 85% ocorreu entre teor de lignina e relação siringil/guaiacil. 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.

As correlações entre todas as oito características fenotípicas analisadas neste trabalho estão demonstradas nas Tabelas 4, 5 e 6

Tabela 4. Valores de correlação de Pearson entre as oito características fenotípicas mensuradas nos 188 irmãos completos de (*E. camaldulensis*) x (*E. urophylla* x *E. globulus*).

C1xUGL	DAP	Altura	Lignina	RSG	RD	DB	Volume	Pilodyn
DAP	X	0,82**	0,28**	-0,20*	-0,39**	0,04ns	0,96**	-0,29**
Altura		X	0,22*	-0,18*	-0,35**	-0,04ns	0,87**	-0,38**
Lignina			X	-0,86**	-0,63**	-0,16*	0,27**	0,04ns
RSG				X	0,43**	0,38**	-0,20*	-0,05ns
RD					X	-0,08ns	-0,39**	0,03ns
DB						X	-0,02ns	-0,12ns
Volume							X	-0,33**
Pilodyn								X

*Correlações significativas ao nível de 5%; **Correlações significativas ao nível de 1%; Células marcadas em cinza contém correlações com valor em módulo acima de 0,80.

Tabela 5. Valores de correlação de Pearson entre as oito características fenotípicas mensuradas nos 188 irmãos completos de (*E. dunnii* x *E. grandis*) x (*E. urophylla*).

DGxU2	DAP	Altura	Lignina	RSG	RD	DB	Volume	Pilodyn
DAP	X	0,82**	0,35**	-0,31**	-0,33**	0,03ns	0,98**	-0,29**
Altura		X	0,24**	-0,21**	-0,26**	0,14ns	0,84**	-0,19*
Lignina			X	-0,86**	-0,75**	0,34**	0,33**	0,10ns
RSG				X	0,56**	-0,10ns	-0,28**	-0,02ns
RD					X	-0,45**	-0,31**	-0,08ns
DB						X	0,07ns	0,08ns
Volume							X	-0,19*
Pilodyn								X

*Correlações significativas ao nível de 5%; **Correlações significativas ao nível de 1%; Células marcadas em cinza contém correlações com valor em módulo acima de 0,80.

Tabela 6. Valores de correlação de Pearson entre as oito características fenotípicas mensuradas nos 188 irmãos completos de (*E. dunnii* x *E. grandis*) x (*E. urophylla* x *E. globulus*).

DGxUGL	DAP	Altura	Lignina	RSG	RD	DB	Volume	Pilodyn
DAP	X	0,82**	-0,05ns	-0,03ns	-0,05ns	-0,25**	0,98**	-0,54**
Altura		X	-0,05ns	-0,07ns	-0,03ns	-0,31**	0,84**	-0,52**
Lignina			X	-0,87**	-0,59**	-0,25**	-0,01ns	0,16*
RSG				X	0,38**	0,46**	-0,08ns	-0,08ns
RD					X	-0,01ns	-0,06ns	-0,14ns
DB						X	-0,30**	0,05ns
Volume							X	-0,52**
Pilodyn								X

*Correlações significativas ao nível de 5%; **Correlações significativas ao nível de 1%; Células marcadas em cinza contêm correlações com valor em módulo acima de 0,80.

3.4. Análises de QTL

As análises de QTL conduzidas no programa QTL Cartographer foram realizadas utilizando-se as distâncias genéticas de cada genitor separadamente.

Os marcadores foram testados quanto à ligação a QTLs por meio de uma análise de variância, em que os tratamentos foram os diferentes genótipos dos marcadores, com três níveis de significância (5%, 1% e 0,1%) pelo teste F. Os marcadores significativamente ligados a QTLs para cada uma das oito características avaliadas nas três famílias encontram-se no anexo – Tabelas 1, 2 e 3.

Também foram localizados QTLs nos diferentes grupos de ligação de cada parental por meio do mapeamento por intervalo simples e composto. A localização dos QTLs foi demonstrada mediante 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 declarados com um nível de significância de 5%, definido por um teste com 1000 permutações dos dados fenotípicos.

Nos itens a seguir, serão descritos os QTLs identificados por essas três estratégias de análise em cada uma das oito características avaliadas nas três famílias de irmãos-completos (C1 x UGL, DG x U2 e DG x UGL).

Nos gráficos dos QTLs foram assinalados os marcadores daquele grupo que também foram significativos pela análise de Marca Simples.

3.4.1. QTLs para diâmetro das árvores à altura do peito (DAP)

A característica diâmetro à altura do peito (DAP) é correlacionada positivamente com o crescimento volumétrico e altura das árvores. Quanto maior o diâmetro das árvores, maior tende a ser a altura e conseqüentemente o volume da árvore. Na população segregante C1 x UGL do presente trabalho, as árvores tiveram um DAP médio de 8,4 cm, com desvio padrão de 1,5 cm; na população DG x U2 um DAP médio de 10,2 cm, com desvio padrão de 2,1 cm e na população DG x UGL um DAP médio de 10,1 cm, com desvio padrão de 1,9 cm.

3.4.1.1. Cruzamento C1 x UGL

Pela análise de Marca Simples para essa característica foram identificados nos genitores do cruzamento C1 x UGL, dois marcadores ligados a QTLs no genitor C1 em dois grupos de ligação e dois marcadores no genitor UGL em dois grupos de ligação (Figura 8).

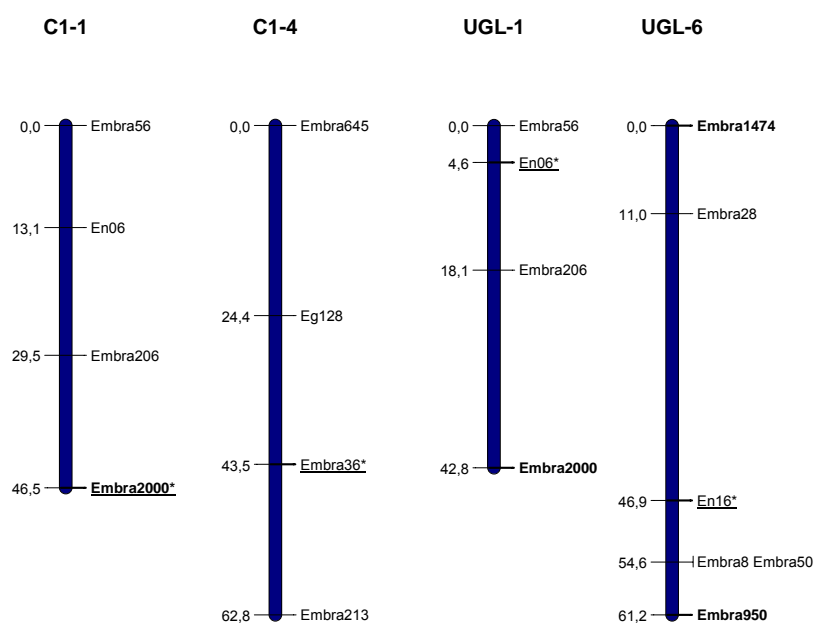


Figura 8. Localização dos marcadores (sublinhados) associados à característica DAP, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

O QTL identificado por intervalo composto no genitor UGL para DAP, localiza-se no grupo de ligação 3 e explica 6,1% da variação genotípica. Utilizando-se cinco cofatores obteve-se o maior LOD (2,36) para este QTL.

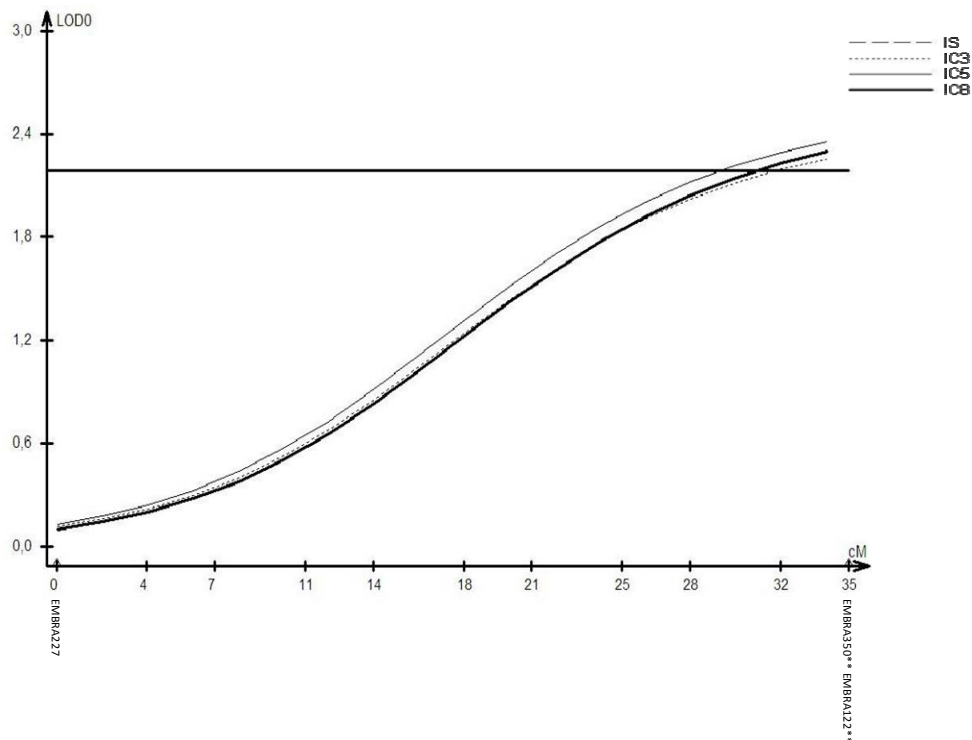


Figura 9 – Gráfico gerado pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para DAP mapeado por intervalo composto no grupo de ligação 3 para o genitor UGL. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica DAP pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,2.

3.4.1.3. Cruzamento DG x U2

Pela análise de marca simples foram identificados um marcador ligado a QTL no genitor DG e sete marcadores no genitor U2 em sete grupos de ligação (Figura 10).

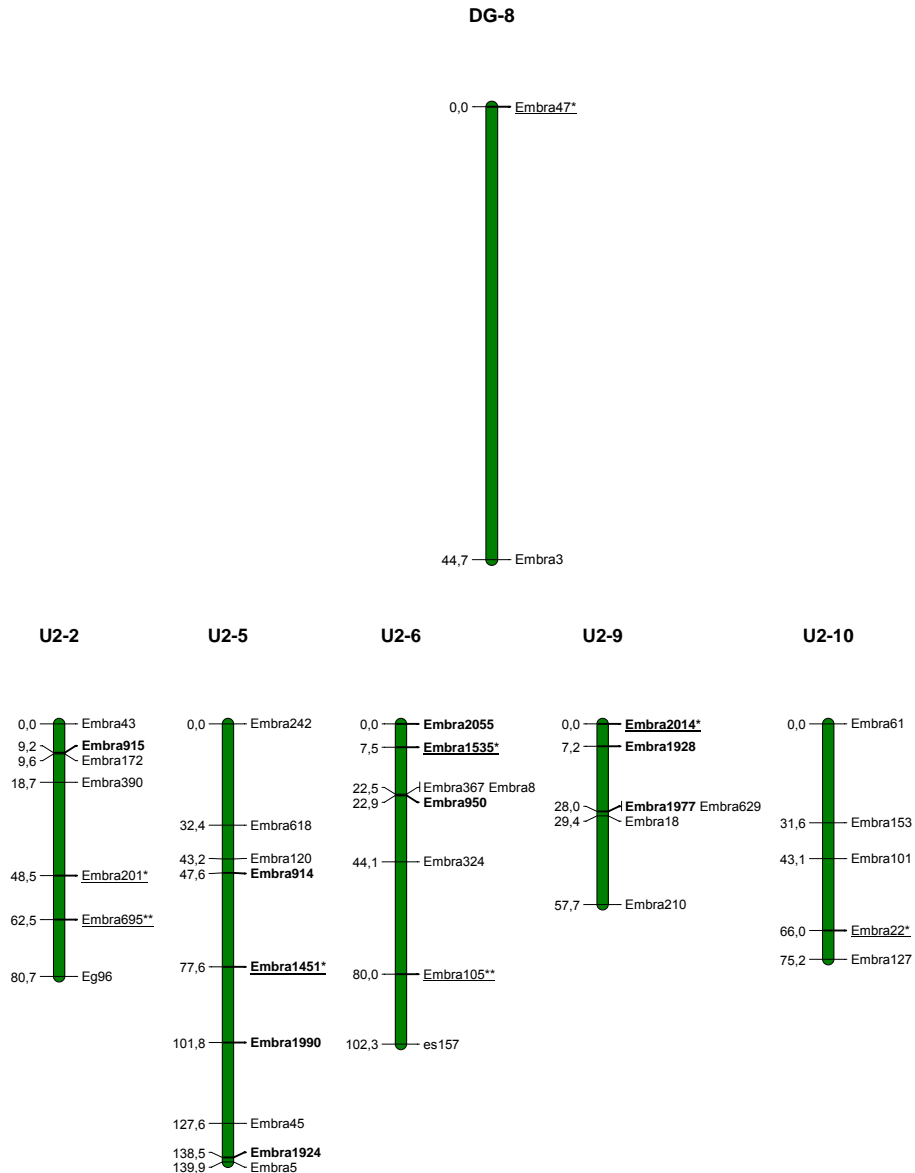


Figura 10. Localização dos marcadores (sublinhados) associados à característica DAP, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foram identificados dois QTLs por intervalo composto no genitor DG para DAP: um localizado no grupo de ligação 5, explicando 16,47% da variação genotípica, e outro no grupo de ligação 9 explicando 15,63% da variação genotípica. Utilizando-se cinco cofatores, obteve-se o maior LOD (6,47) para o QTL no grupo de ligação 5 e utilizando-se oito cofatores, obteve-se o maior LOD (5,29) para o QTL no grupo de ligação 9 (Figura 11).

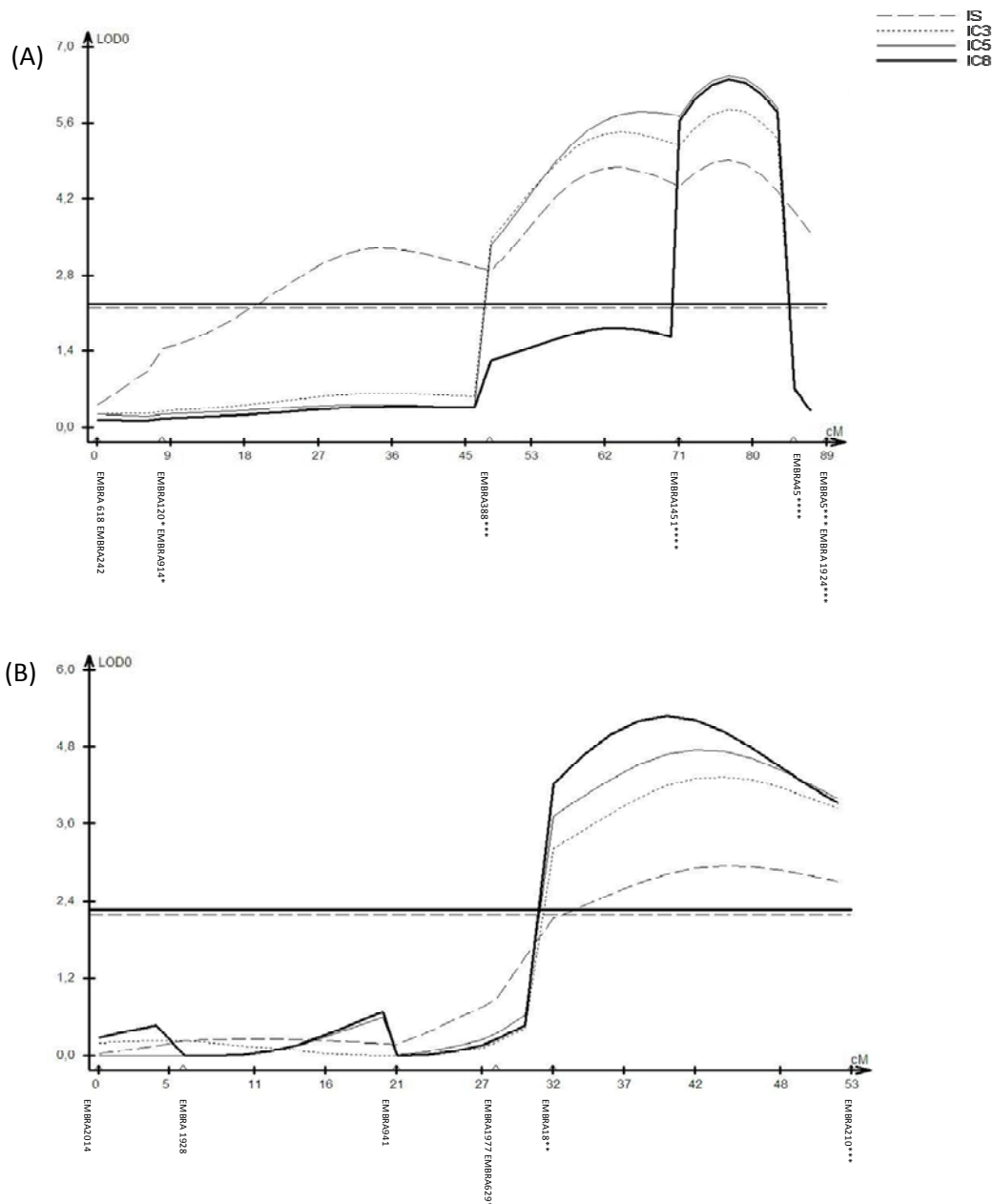


Figura 11 – Gráfico gerado pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para DAP mapeado por intervalo simples e composto no grupo de ligação 5 (A) e no grupo de ligação 9 (B) para o genitor DG. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica DAP pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação à 5% de significância foi de 2,3.

3.4.1.4. Cruzamento DG x UGL

Pela análise de marca simples foram identificados três marcadores ligados a QTL no genitor DG em dois grupos de ligação e dois marcadores no genitor UGL em dois grupos de ligação (Figura 15)

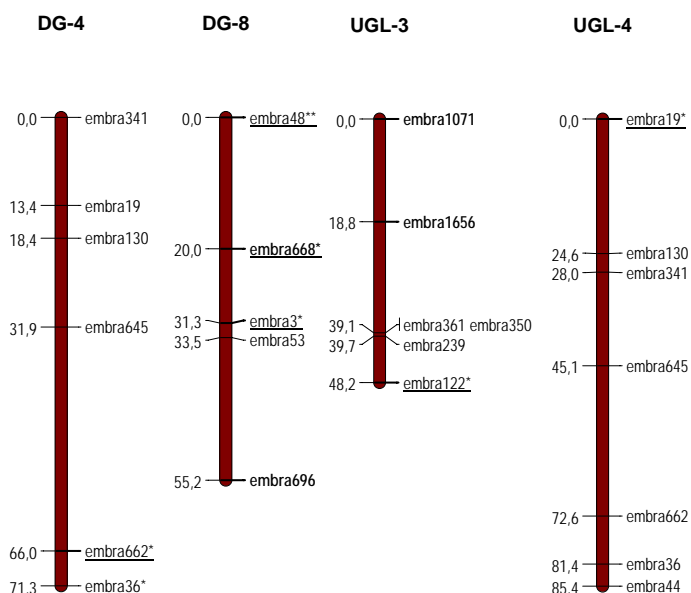


Figura 12. Localização dos marcadores (sublinhados) associados à característica DAP, significativos apenas na análise de Marca Simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foi identificado um QTL por intervalo composto no genitor DG, localizado no grupo de ligação 5, explicando 7,22% da variação genotípica para DAP. Outros três QTLs foram identificados por intervalo composto no genitor UGL, um no grupo de ligação 1, explicando 10,34% da variação genotípica, um no grupo de ligação 6, explicando 6,22% da variação genotípica e um no grupo de ligação 11, explicando 9,12,% da variação genotípica Utilizando-se oito cofatores, obtiveram-se os maiores LOD para estes quatro QTLs (3,38; 3,76; 2,81; 3,61, respectivamente) (Figura 13 e 14).

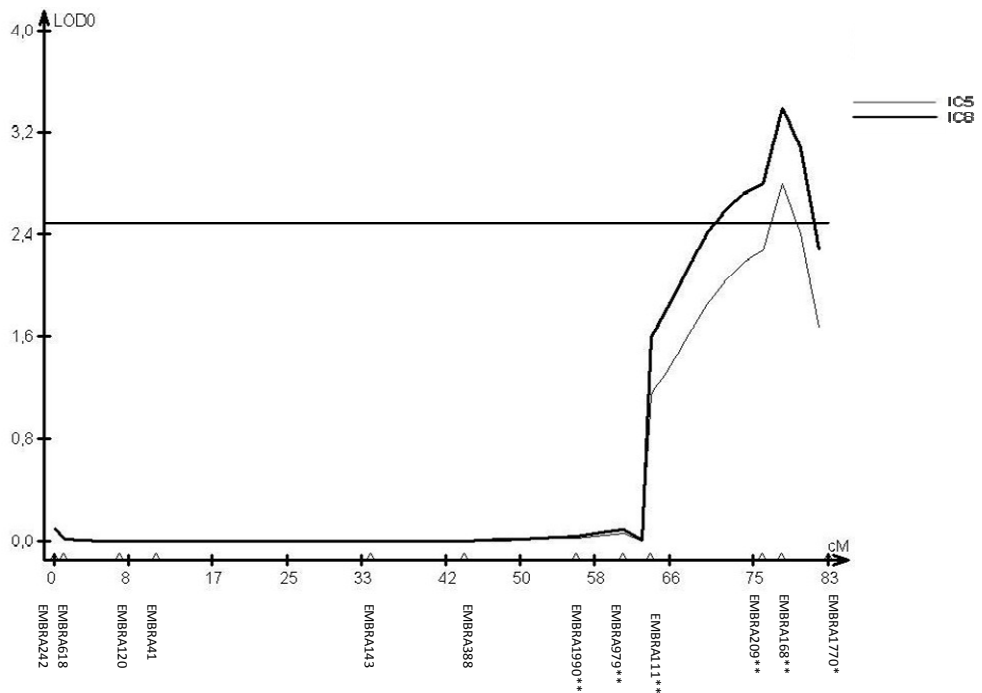


Figura 13. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para DAP mapeado por intervalo composto no grupo de ligação 5 do genoma do genitor DG. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica DAP pela análise de Marca Simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi 2,5.

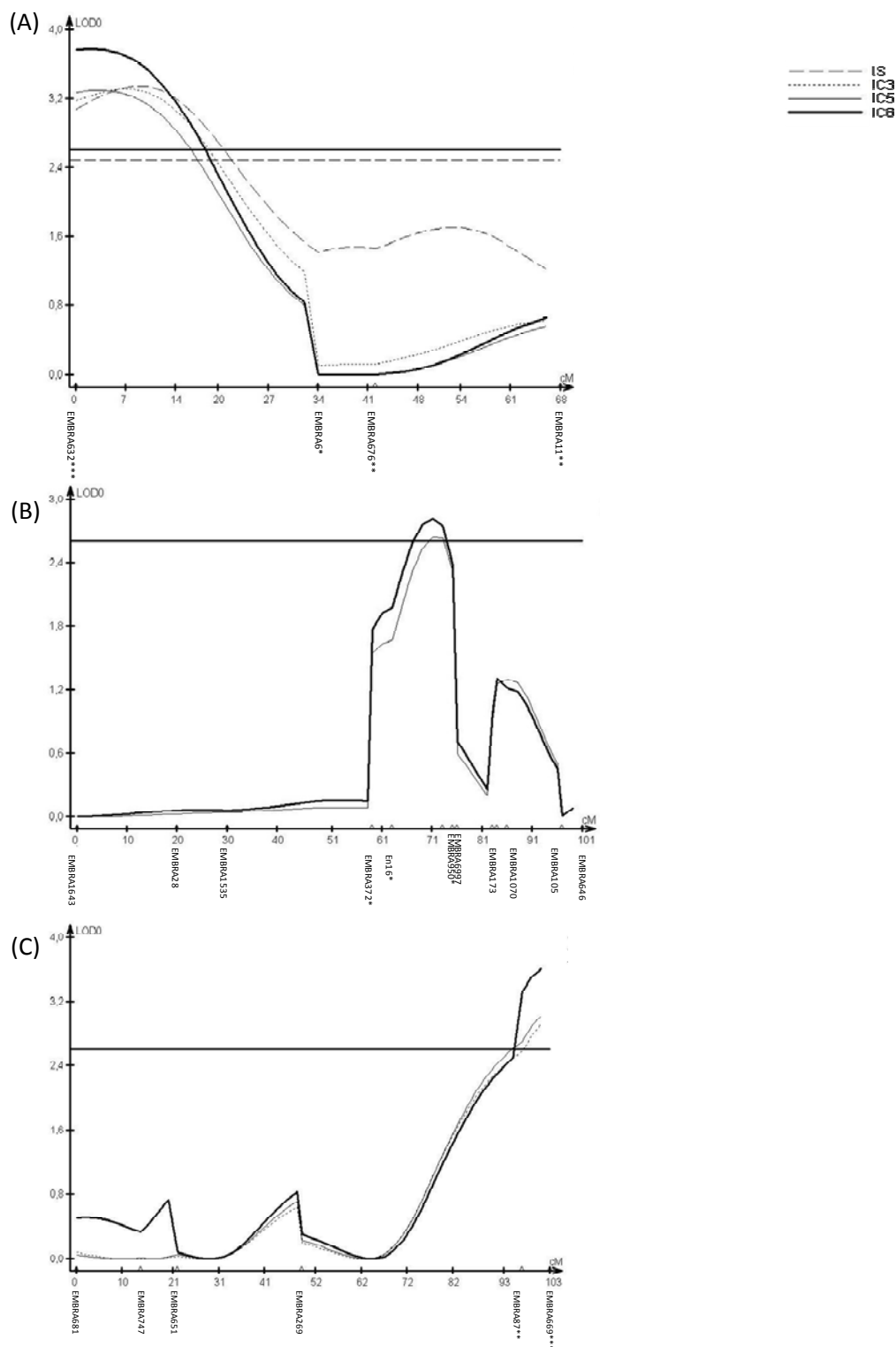


Figura 14. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando os QTLs para DAP mapeados por intervalo composto grupo de ligação 1 (A), grupo de ligação 6 (B) e grupo de ligação 11 (C) do genitor UGL. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica DAP pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,6.

3.4.2. QTLs para altura

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. Na população segregante C1 x UGL do presente trabalho, as árvores tiveram uma altura média de 11,6 m, com desvio padrão de 1,7 m; na população DG x U2 uma altura média de 12,9 m, com desvio padrão de 1,6 m e na população DG x UGL uma altura média de 12,5 m, com desvio padrão de 1,7 m.

3.4.2.1. Cruzamento C1 x UGL

Foi identificado um QTL por intervalo composto no genitor C1, localizado no grupo de ligação 4, explicando 7,21% da variação genotípica para altura (Figura 15). Utilizando-se oito cofatores, obteve-se o maior LOD para este QTL (2,3). Outros três QTLs foram identificados por intervalo simples no genitor UGL, um no grupo de ligação 3, explicando 8,14% da variação genotípica, um no grupo de ligação 4, explicando 9,0% da variação genotípica e um no grupo de ligação 6, explicando 21,9% da variação genotípica (Figura 16).

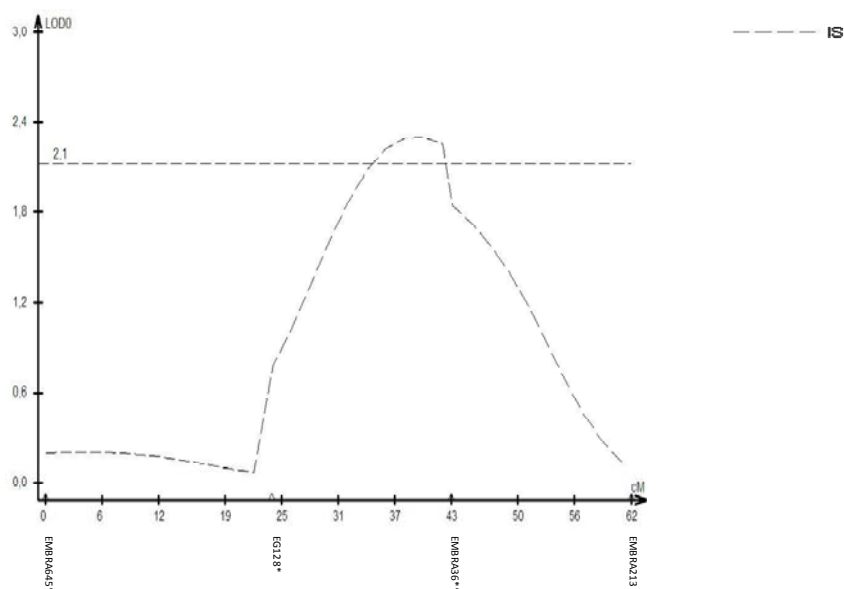


Figura 15. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer, demonstrando o QTL para altura, mapeado por intervalo simples no grupo de ligação 4 para o genitor C1. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica altura pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,1.

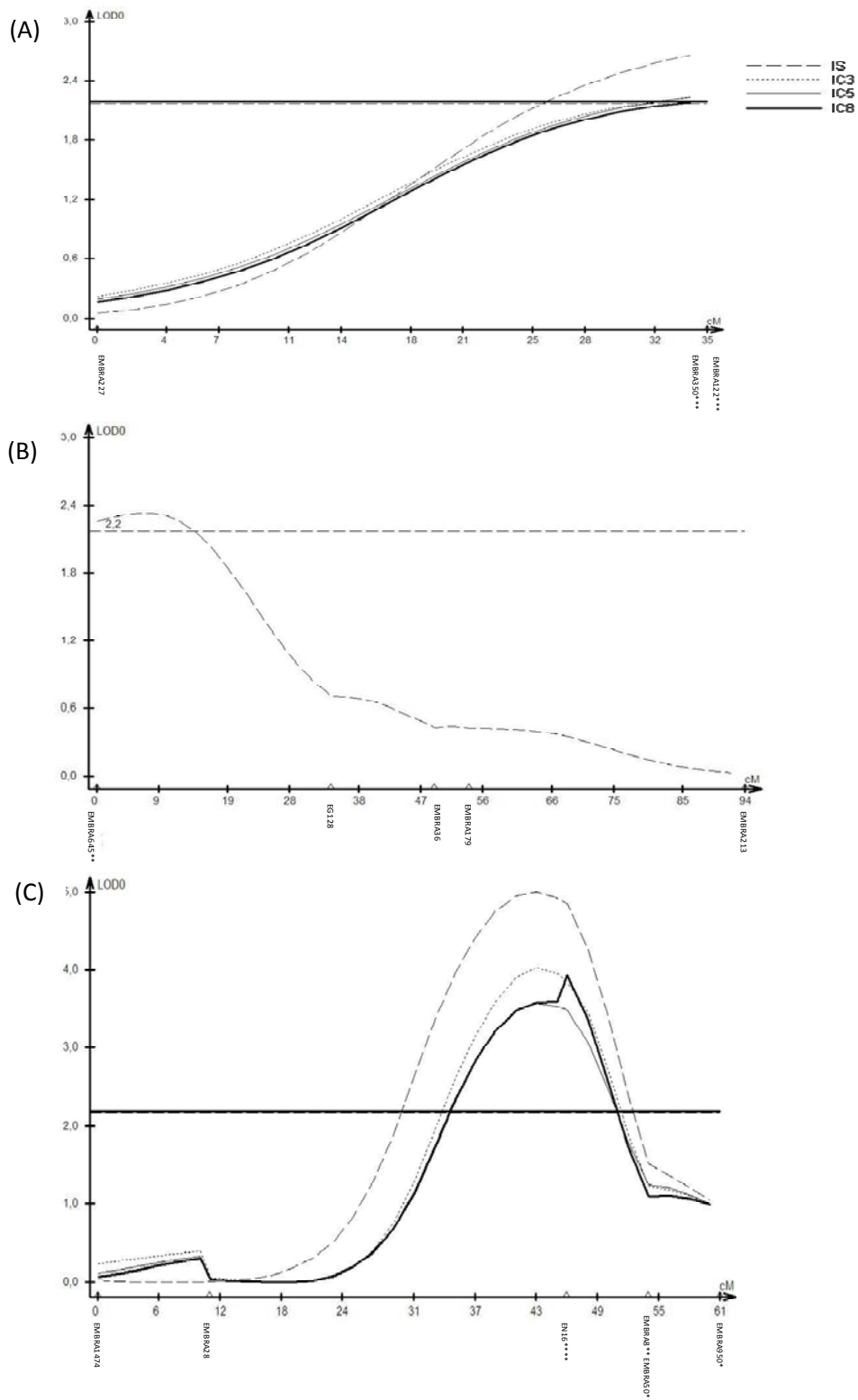


Figura 16. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para altura, mapeado por intervalo simples e composto no grupo de ligação 3 (A), 4 (B) e 6 (C) para o genitor UGL. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica altura pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,2.

3.4.2.2. Cruzamento DG x U2

Pela análise de marca simples foram identificados seis marcadores ligados a QTL no genitor U2 em dois grupos de ligação (Figura 17).

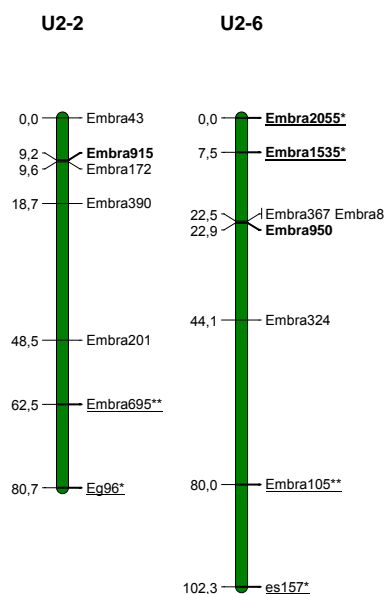


Figura 17. Localização dos marcadores (sublinhados) associados à característica altura, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foram identificados dois QTLs por intervalo composto no genitor DG, localizados no grupo de ligação 5, explicando 8,62% da variação genotípica para altura e no grupo de ligação 8, explicando 8,0% da variação genotípica. Utilizando-se três e oito cofatores respectivamente, obtiveram-se os maiores LOD (2,81 e 3,27 respectivamente) (Figura 18).

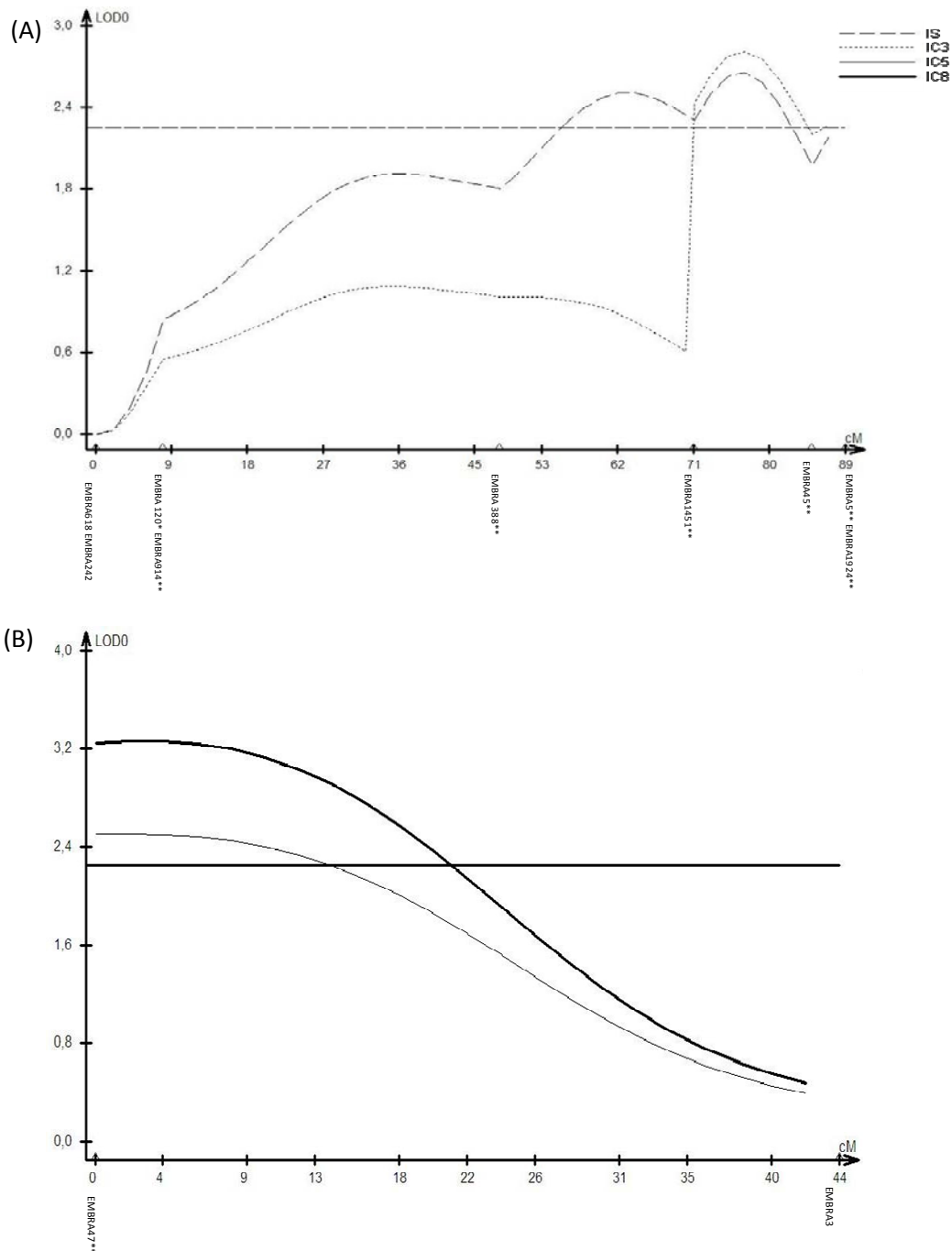


Figura 18. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para altura, mapeado por intervalo simples e composto no grupo de ligação 5 (A) e 8 (B) para o genitor DG. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica altura pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,3.

3.4.2.3. Cruzamento DG x UGL

Pela análise de marca simples foram identificados oito marcadores ligados a QTL no genitor DG em dois grupos de ligação e seis marcadores ligados a QTL no genitor UGL em três grupos de ligação (Figura 19).

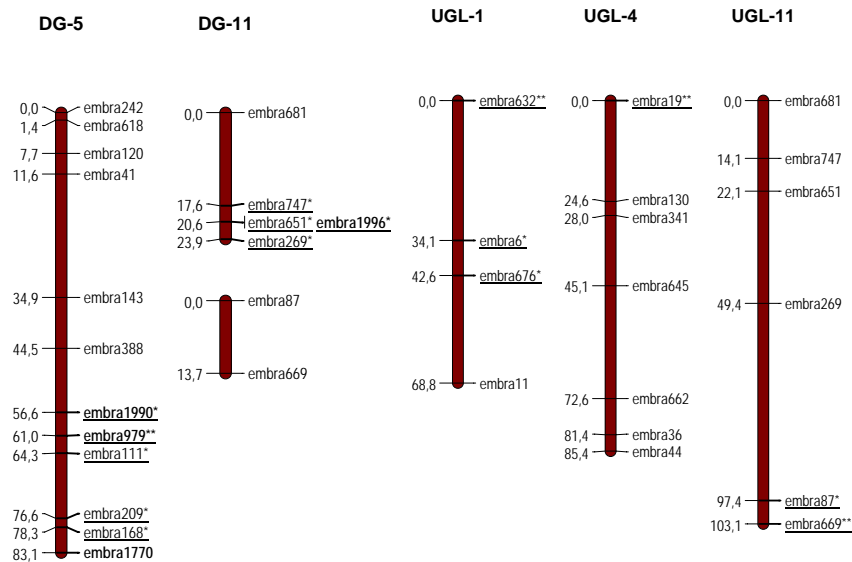


Figura 19. Localização dos marcadores (sublinhados) associados à característica altura, significativos apenas na análise de Marca Simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foi identificado um QTL por intervalo composto no genitor DG, localizado no grupo de ligação 6, explicando 7,67% da variação genotípica para altura e outro também no grupo de ligação 6 do genitor UGL, explicando 11,76% da variação genotípica para altura. Utilizando-se oito cofatores, obtiveram-se os maiores LOD (3,0 e 4,0 respectivamente) (Figura 20).

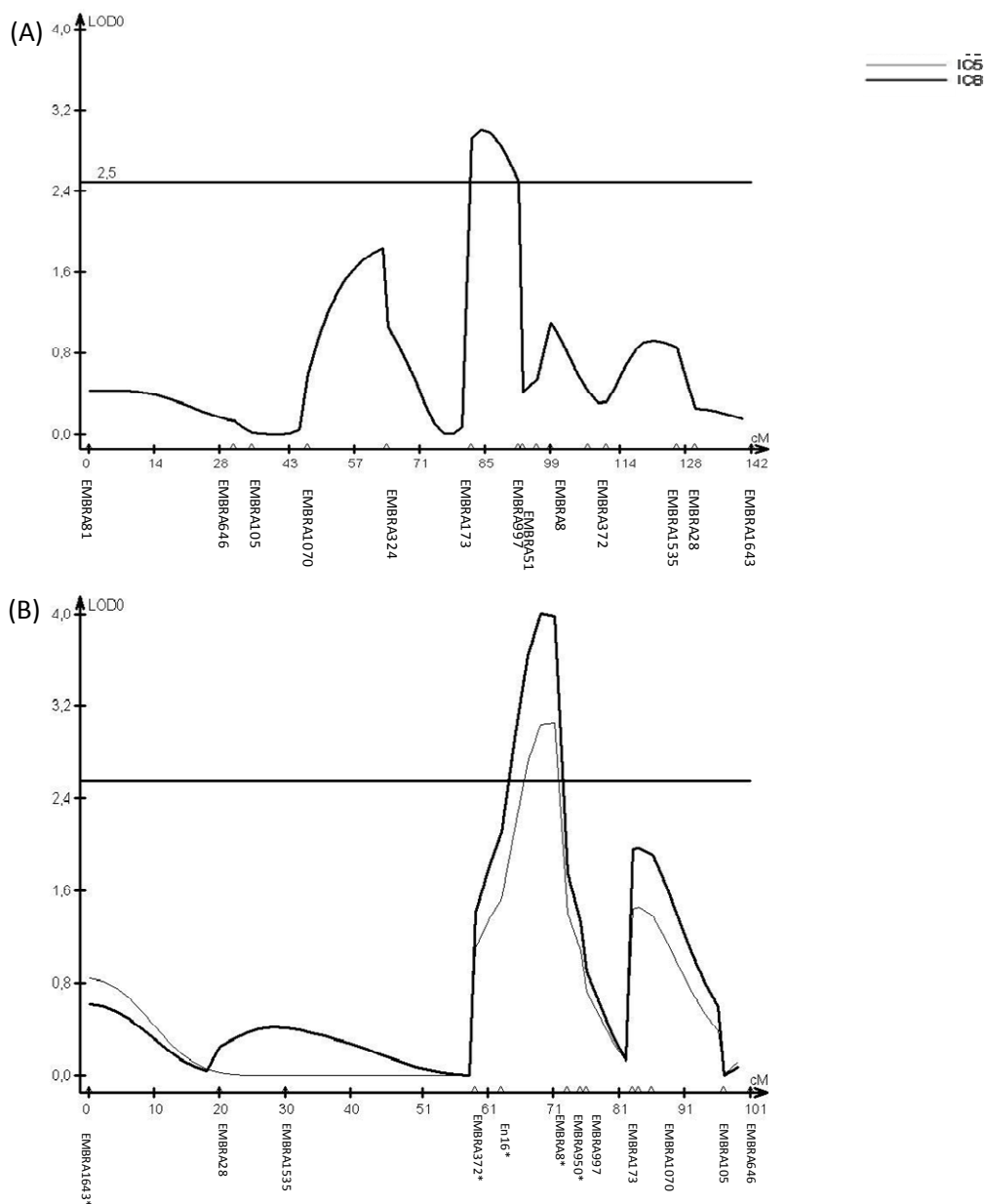


Figura 20. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para altura, mapeado por intervalo composto no grupo de ligação 6 (A) do genitor DG e também no grupo de ligação 6 (B) para o genitor UGL. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica altura pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foram de 2,5 e 2,6 respectivamente.

3.4.3. QTLs para volume

Na população segregante C1 x UGL do presente trabalho, as árvores apresentaram um volume médio de 33 dm^3 , com desvio padrão de 23,5 dm^3 ; na

população DG x U2 um volume médio de 62,3 dcm³, com desvio padrão 36,7 dcm³ e na população DG x UGL um volume médio de 61,0 dcm³, com desvio padrão de 32,6 dcm³. Esta característica é positivamente correlacionada com DAP e altura, por suas mensurações serem diretamente proporcionais.

3.4.3.1. Cruzamento C1 x UGL

Pela análise de marca simples foram identificados dois marcadores ligados a QTL no genitor C1 em dois grupos de ligação e dois marcadores ligados a QTL no genitor UGL em dois grupos de ligação (Figura 21).

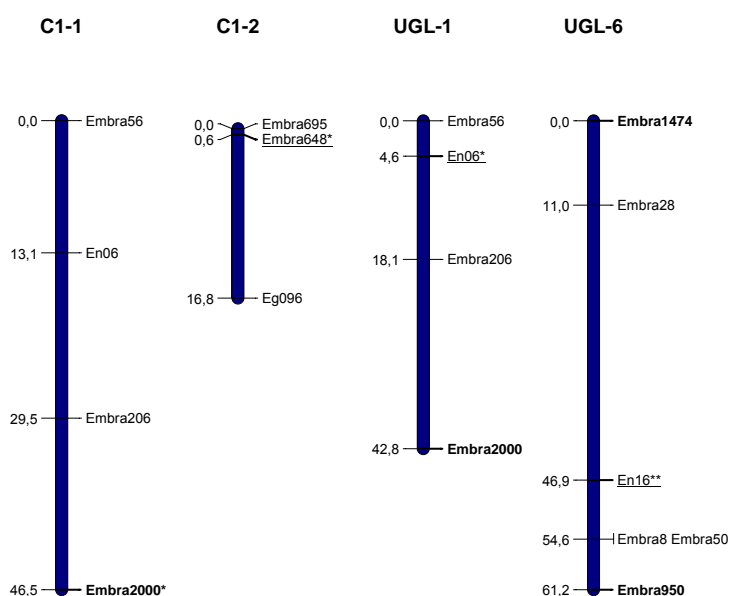


Figura 21. Localização dos marcadores associados à característica volume, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foi identificado um QTL por intervalo composto no genitor C1, grupo de ligação 4, explicando 10,48% da variação genotípica para volume. Com oito cofatores obteve-se o maior LOD de 3,88 para este QTL (Figura 24). Foram identificados também dois QTLs por intervalo composto no genitor UGL, localizados no grupo de ligação 3, explicando 10,11% da variação genotípica para volume e outro no grupo de ligação 10, explicando 4,0% da variação genotípica. Utilizando-se cinco e oito cofatores respectivamente, obtiveram-se os maiores LOD (3,48 e 3,0 respectivamente) (Figura 22).

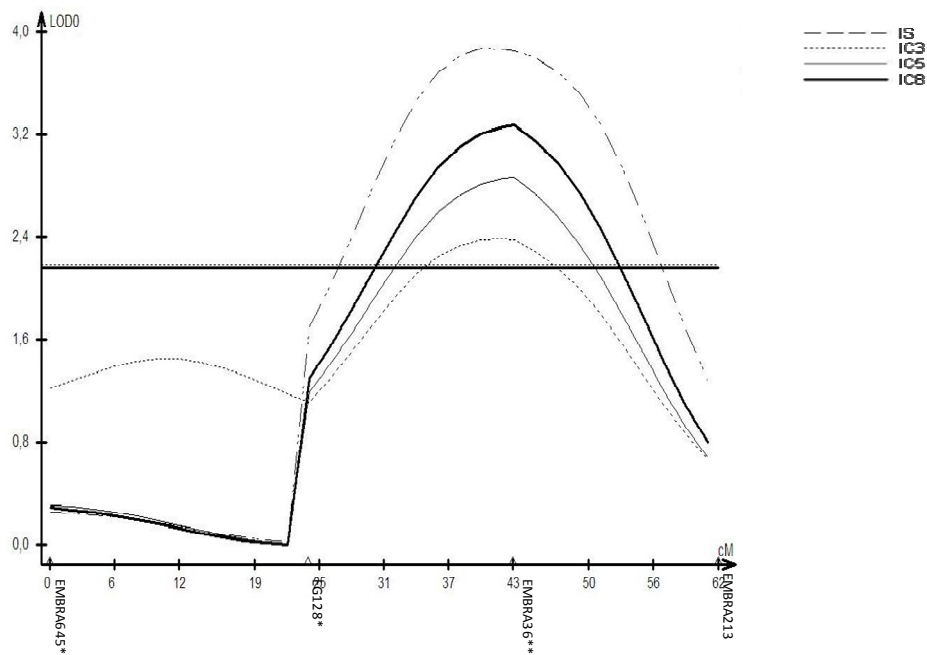


Figura 22. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer, demonstrando o QTL para volume mapeado por intervalo simples e composto no grupo de ligação 4 para o genitor C1. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica volume pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,1.

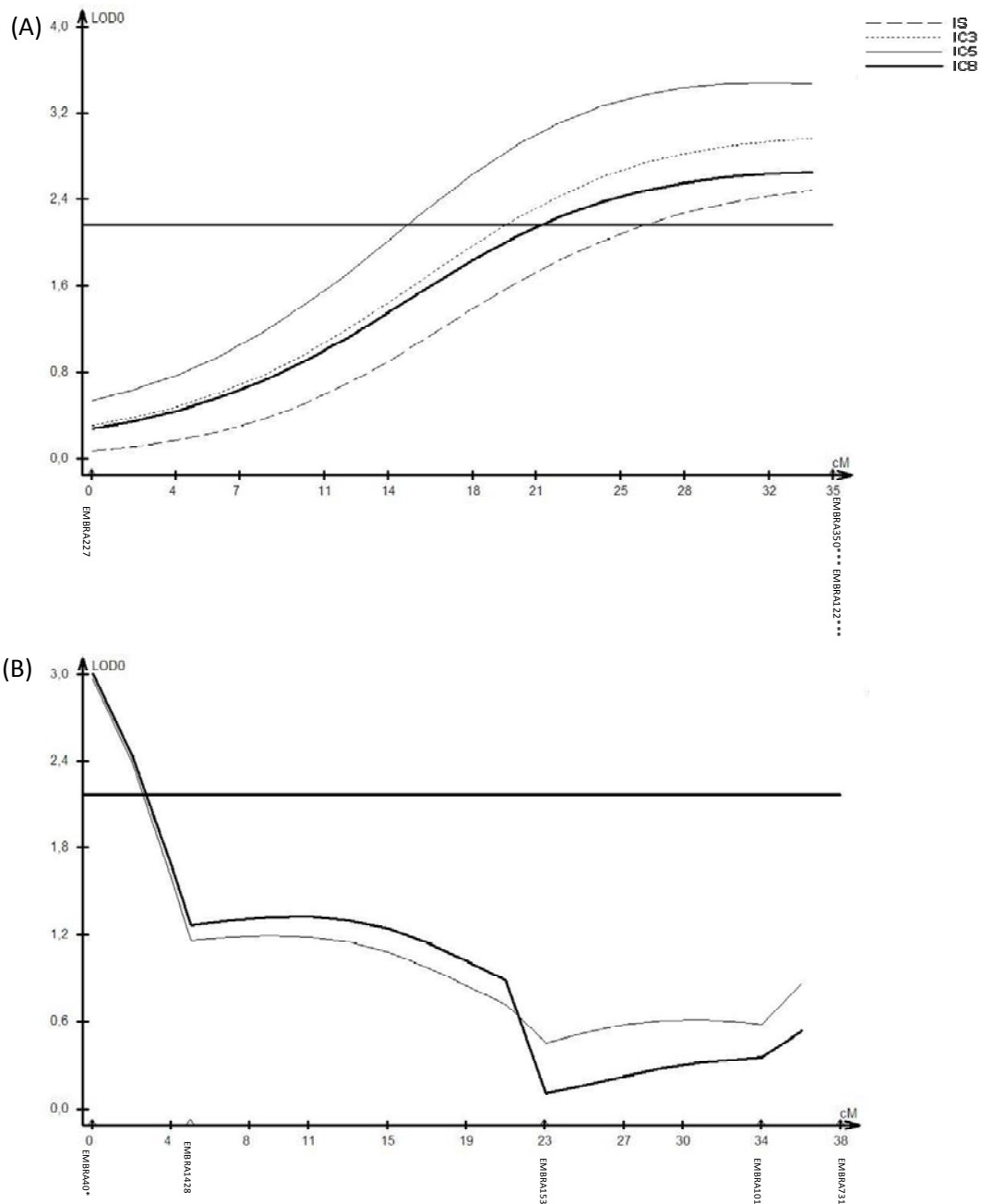


Figura 23. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para volume mapeado por intervalo simples e composto no grupo de ligação 3 (A) e 10 (B) para o genitor UGL. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica volume pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,2.

3.4.3.2. Cruzamento DG x U2

Pela análise de marca simples foi identificado um marcador ligado a QTL no genitor DG e seis marcadores em quatro grupos de ligação ligados a QTL no genitor U2 (Figura 24).

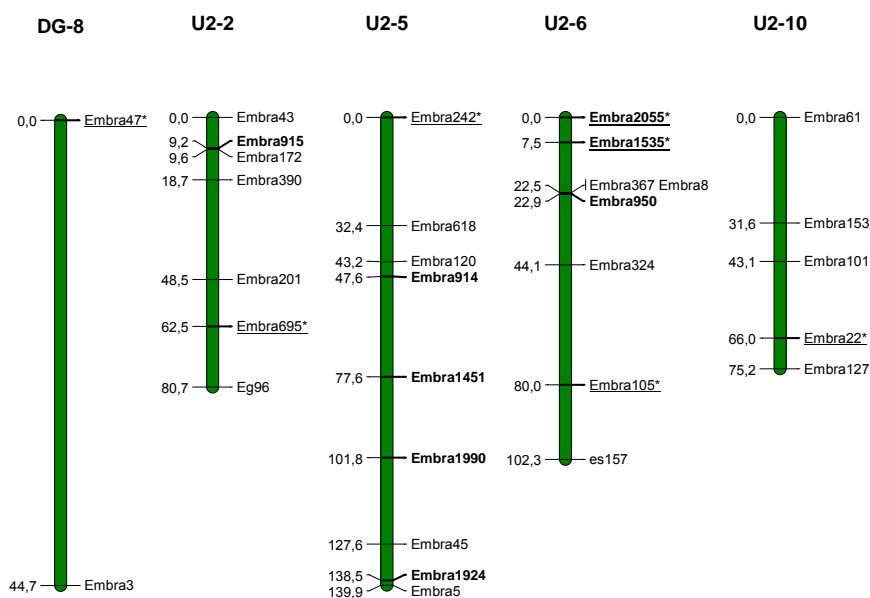


Figura24. Localização dos marcadores associados à característica volume, significativos apenas na análise de Marca Simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foram identificados dois QTLs por intervalo composto no genitor DG, um no grupo de ligação 5, explicando 13,73% da variação genotípica para volume e outro no grupo de ligação 9, explicando 19,74% da variação genotípica para essa característica (Figura 25). Utilizando-se cinco e oito cofatores, respectivamente, obtiveram-se os maiores LOD (5,89 e 7,08 respectivamente).

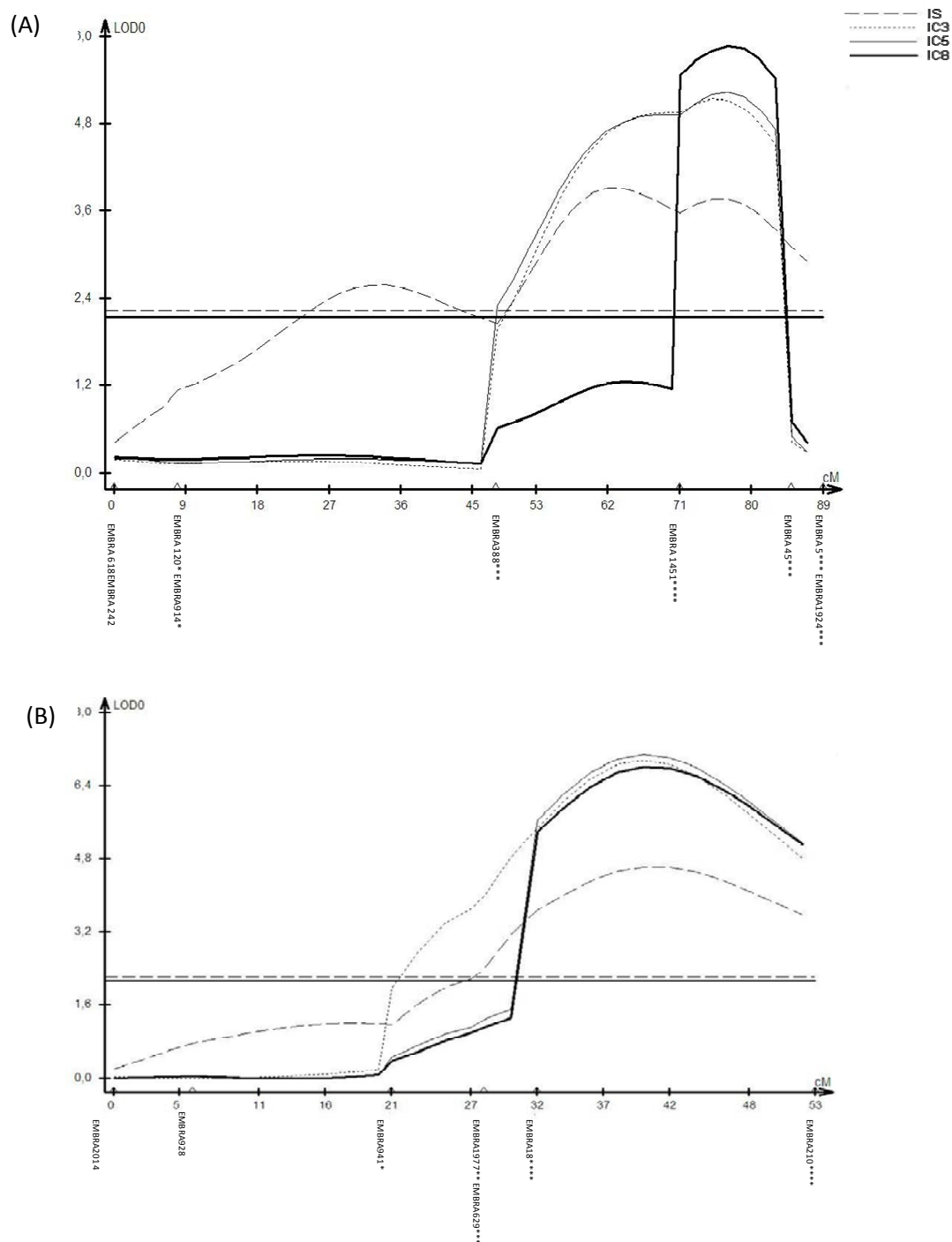


Figura 25. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer, demonstrando os dois QTLs para volume, mapeados por intervalo simples e composto no grupo de ligação 5 (A) e no grupo de ligação 9 (B) para o genitor DG. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica volume pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,2.

3.4.3.3. Cruzamento DG x UGL

Pela análise de marca simples foram identificados nove marcadores ligados a QTL no genitor DG em dois grupos de ligação e oito marcadores ligados a QTL no genitor UGL em três grupos de ligação (Figura 26).

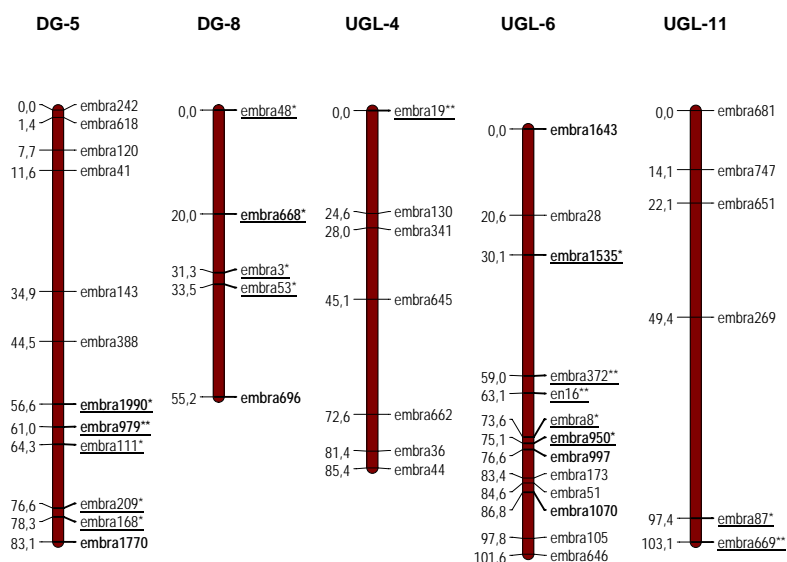


Figura 26. Localização dos marcadores associados à característica volume, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foi identificado um QTL por intervalo composto no genitor UGL, no grupo de ligação 1, explicando 14,45% da variação genotípica para volume (Figura 27). Utilizando-se cinco cofatores, obteve-se o maior LOD (4,52).

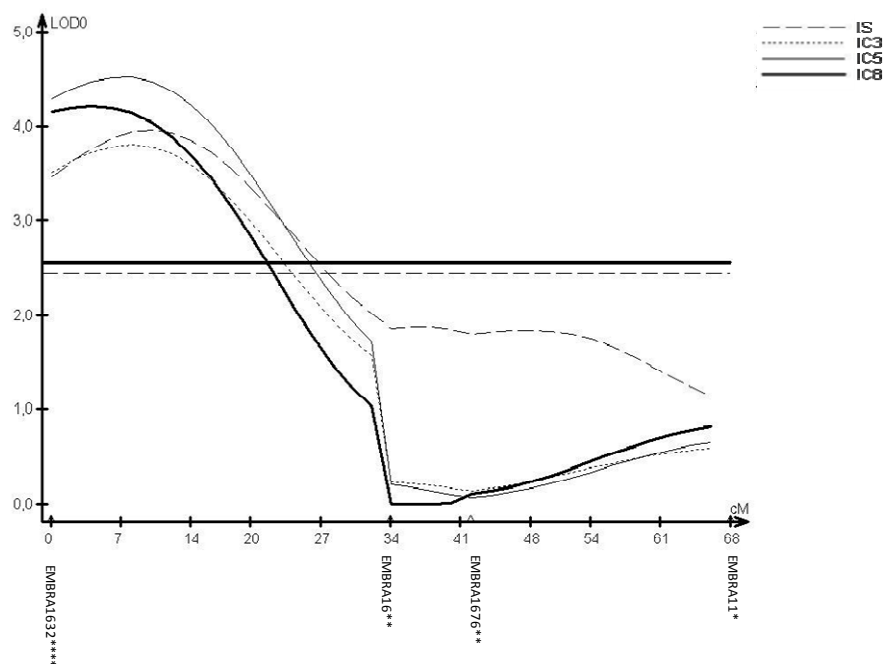


Figura 27. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer, demonstrando o QTL para volume mapeado por intervalo composto no grupo de ligação 1 para o genitor UGL. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica volume pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor crítico de LOD definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,6.

3.4.4. QTLs para teor de lignina total da madeira

Na população segregante C1xUGL do presente trabalho, o teor de lignina total médio foi de 26,3%, com desvio padrão de 1,1%; já na população DG x U2 o teor médio foi de 24,6%, com desvio padrão de 1,1 % e na população DG x UGL teor médio foi de 24,5%, com desvio padrão de 1,1 %.

3.4.4.1. Cruzamento C1 x UGL

Pela análise de marca simples foi identificado um marcador ligado a QTL no genitor C1 e três marcadores ligados a QTLs em três grupos de ligação do genitor UGL (Figura 28).

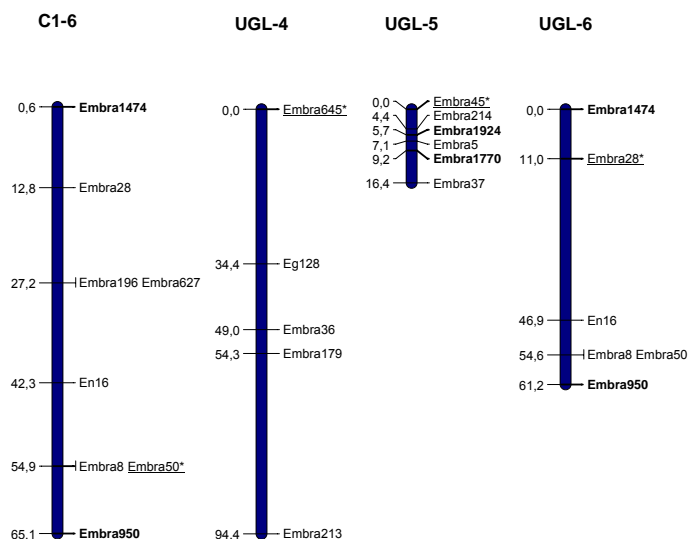


Figura 28. Localização dos marcadores associados à característica teor de lignina para cada parental, significativos apenas na análise de marca simples.
 * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Não foi identificado nenhum QTL por intervalo simples e composto para teor total de lignina nos dois genitores deste cruzamento.

3.4.4.2. Cruzamento DG x U2

Pela análise de marca simples foram identificados dois marcadores ligados a QTL no genitor DG e três marcadores ligados a QTLs em três grupos de ligação do genitor U2 (Figura 29).

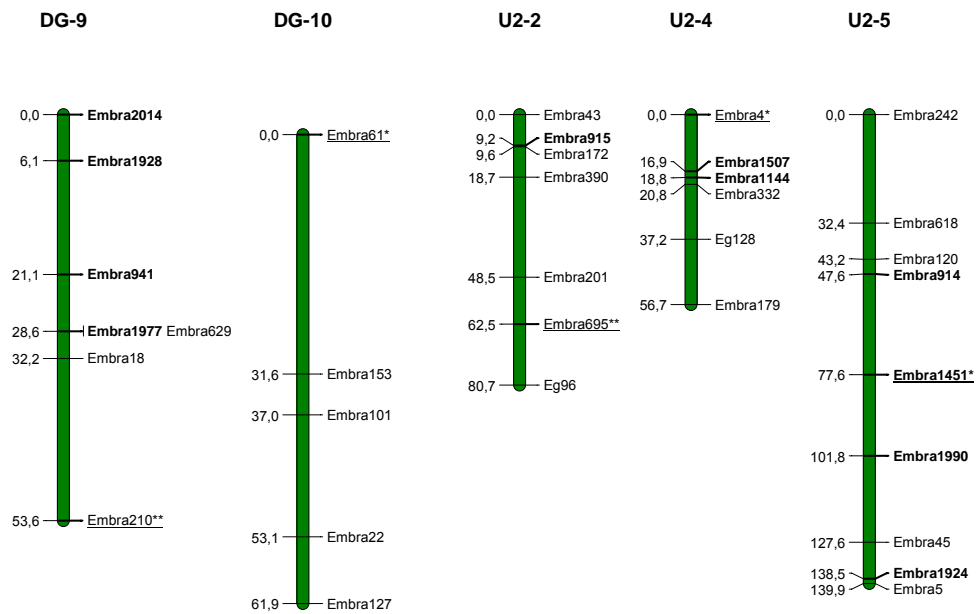


Figura 29. Localização dos marcadores associados à característica teor total de lignina, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foi identificado um QTL por intervalo composto no genitor DG, no grupo de ligação 2, explicando 8,9% da variação genotípica para teor total de lignina (Figura 30). Utilizando-se oito cofatores, obteve-se o maior LOD (3,39).

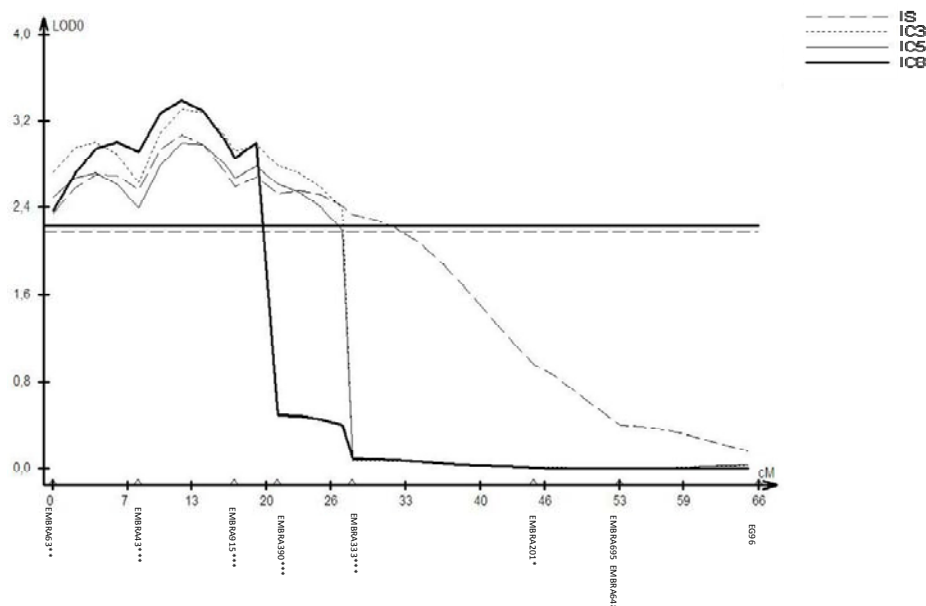


Figura 30. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer, demonstrando o QTL para teor total de lignina mapeado por intervalo simples e composto no grupo de ligação 2 para o genitor DG. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica teor de lignina pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,2.

3.4.4.3. Cruzamento DG x UGL

Pela análise de marca simples foram identificados cinco marcadores ligados a QTL no genitor UGL em dois grupos de ligação (Figura 31).

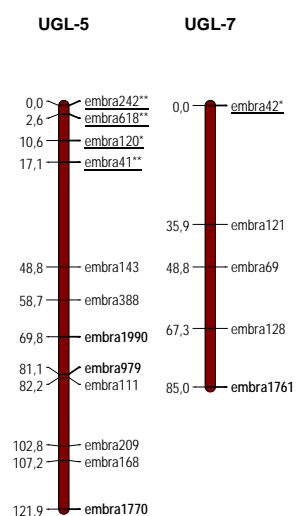


Figura 31. Localização dos marcadores associados à característica teor total de lignina, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foi identificado um QTL por intervalo simples no grupo de ligação 6 do genitor DG, explicando 11,0 % da variação genotípica para teor total de lignina, com LOD de 2,72 (Figura 32).

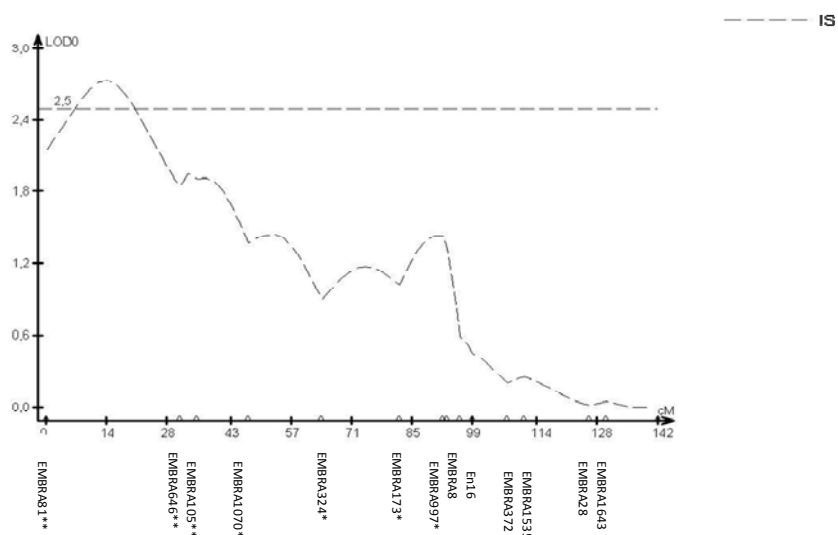


Figura 32. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer, demonstrando o QTL para teor total de lignina mapeado por intervalo simples no grupo de ligação 6 para o genitor DG. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica volume pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,5.

3.4.5. QTLs para relação Siringil/Guaiacil da madeira (RSG)

Na população segregante C1 x UGL do presente trabalho, a relação siringil/guaiacil média foi de 2,7, com desvio padrão de 0,2, já na população DG x U2 e DG x UGL, a relação média foi 3,0 com desvio padrão de 0,2.

3.4.5.1. Cruzamento C1 x UGL

Pela análise de marca simples foram identificados dois marcadores ligados a QTL no genitor UGL em dois grupos de ligação (Figura 33).

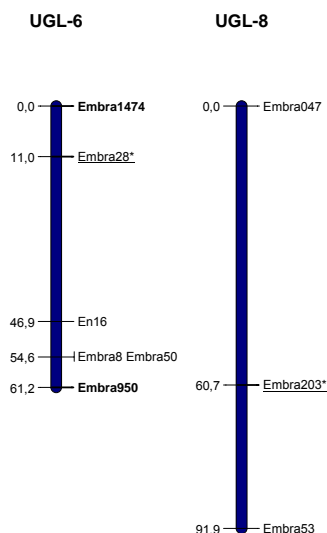


Figura 33. Localização dos marcadores associados à característica RSG para cada parental, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Não foi identificado nenhum QTL por intervalo composto para essa característica nesse cruzamento.

3.4.5.2. Cruzamento DG x U2

Pela análise de marca simples foram identificados três marcadores ligados a QTL no genitor DG em dois grupos de ligação e cinco marcadores ligados a QTL no genitor U2 em quatro grupos de ligação (Figura 34).

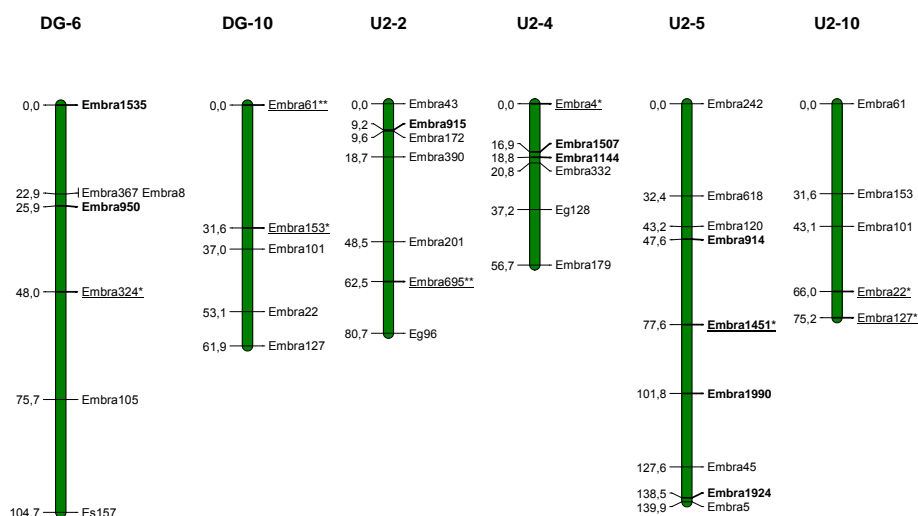


Figura 34. Localização dos marcadores associados à característica RSG, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foram identificados dois QTLs por intervalo composto, um no grupo de ligação 2, explicando 16,92% da variação genotípica, e outro no grupo de ligação 9, explicando 7,32% da variação genotípica para RSG, ambos no genitor DG. Utilizando-se cinco e oito cofatores, respectivamente, obtiveram-se os LODs mais altos, 6,66 e 2,82 (Figura 35).

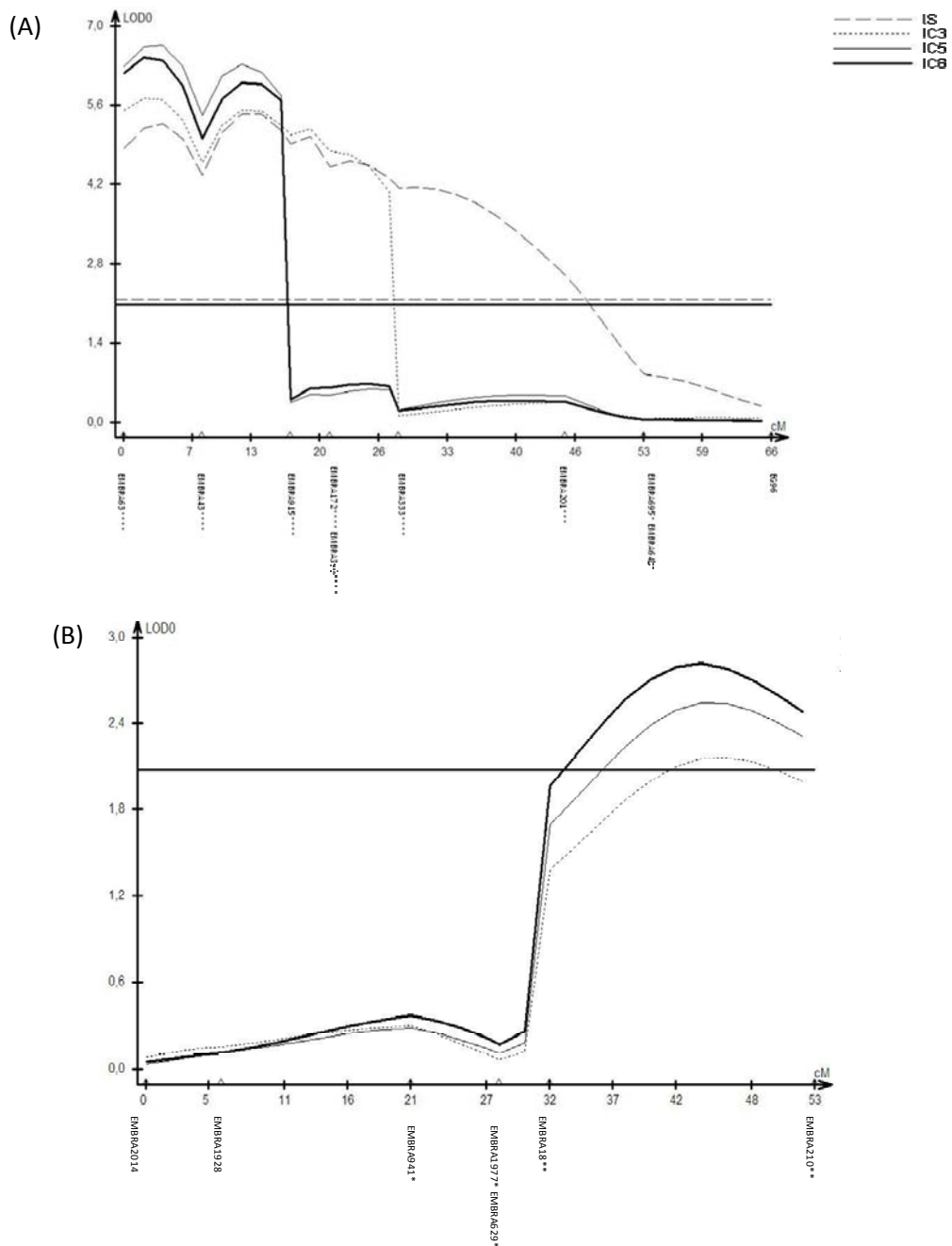


Figura 35. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer, demonstrando o QTL para RSG mapeado por intervalo simples e composto no grupo de ligação 9(A) e 2 (B) no genitor DG. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica RSG pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,1.

3.4.5.3. Cruzamento DG x UGL

Pela análise de marca simples foram identificados dez marcadores ligados a QTL no genitor DG em três grupos de ligação e dois marcadores ligados a QTL no genitor UGL em um grupo de ligação (Figura 36).

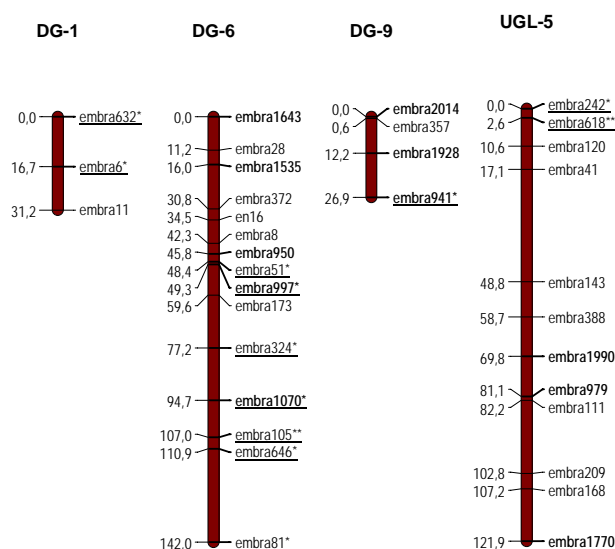


Figura 36. Localização dos marcadores associados à característica RSG, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Pela estratégia de mapeamento de QTLs por intervalo composto não foi identificado nenhum QTL para RSG neste cruzamento

3.4.6. QTLs para rendimento depurado de celulose (RD)

Na população segregante C1 x UGL do presente trabalho, o rendimento depurado médio foi de 54,8%, com desvio padrão de 1,5%, já na população DG x U2, o rendimento médio foi 55,9% com desvio padrão de 1,5% e na população DG x UGL o rendimento médio foi 56,2% com desvio padrão de 1,2%.

3.4.6.1. Cruzamento C1 x UGL

Foi identificado um QTL por intervalo simples no grupo de ligação 6 do genitor UGL, explicando 8,14 % da variação genotípica e LOD de 2,62 (Figura 37).

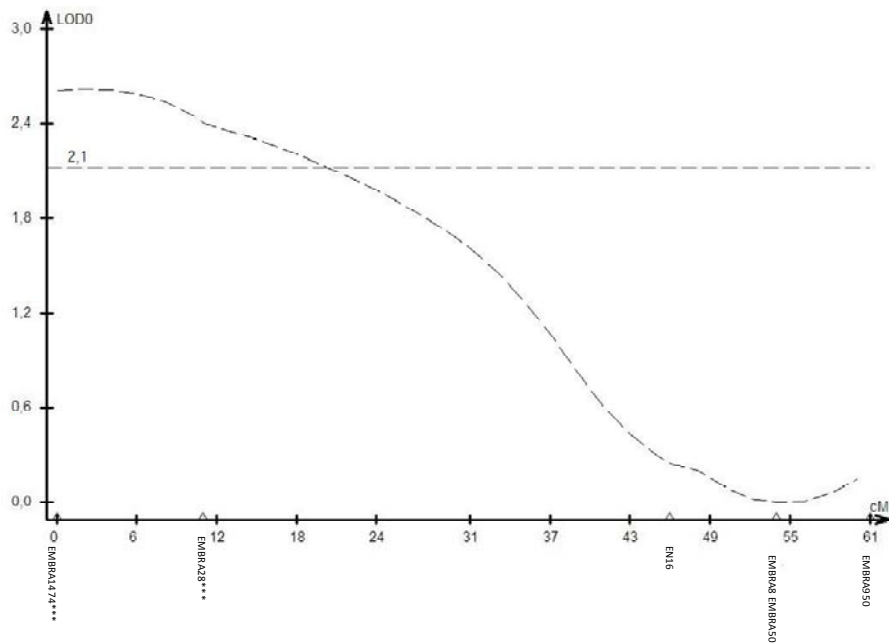


Figura 37. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer demonstrando o QTL para RD mapeado por intervalo simples no grupo de ligação 6 para o genitor UGL. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica RD pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,1.

3.4.6.2. Cruzamento DG x U2

Pela análise de marca simples foram identificados sete marcadores ligados a QTL no genitor DG em quatro grupos de ligação (Figura 38).

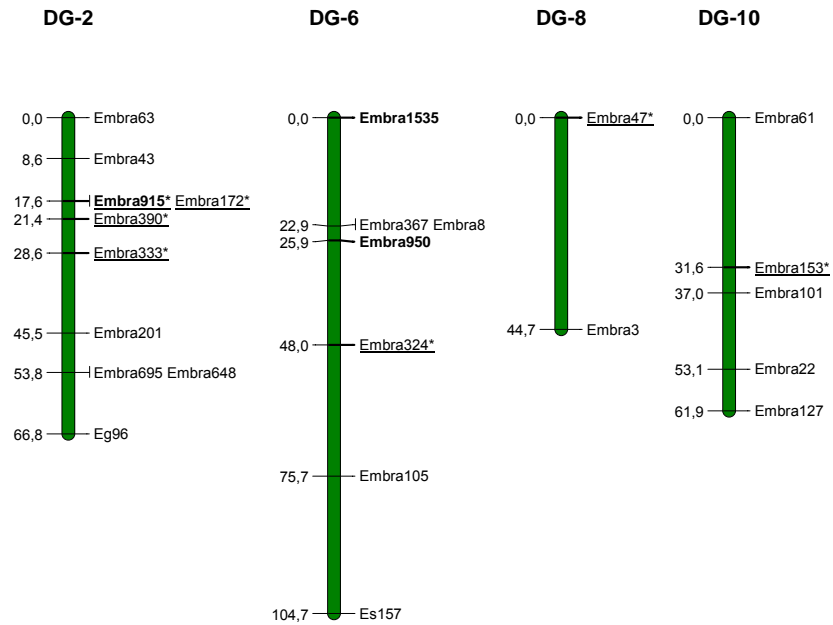


Figura 38. Localização dos marcadores associados à característica RD, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foram identificados dois QTLs por intervalo composto, um no grupo de ligação 2, explicando 5,35% da variação genotípica, e outro no grupo de ligação 9, explicando 7,30% da variação genotípica para RD, ambos no genitor U2. Utilizando-se oito cofatores, obtiveram-se os LODs mais altos, 2,32 e 2,35, respectivamente (Figura 39).

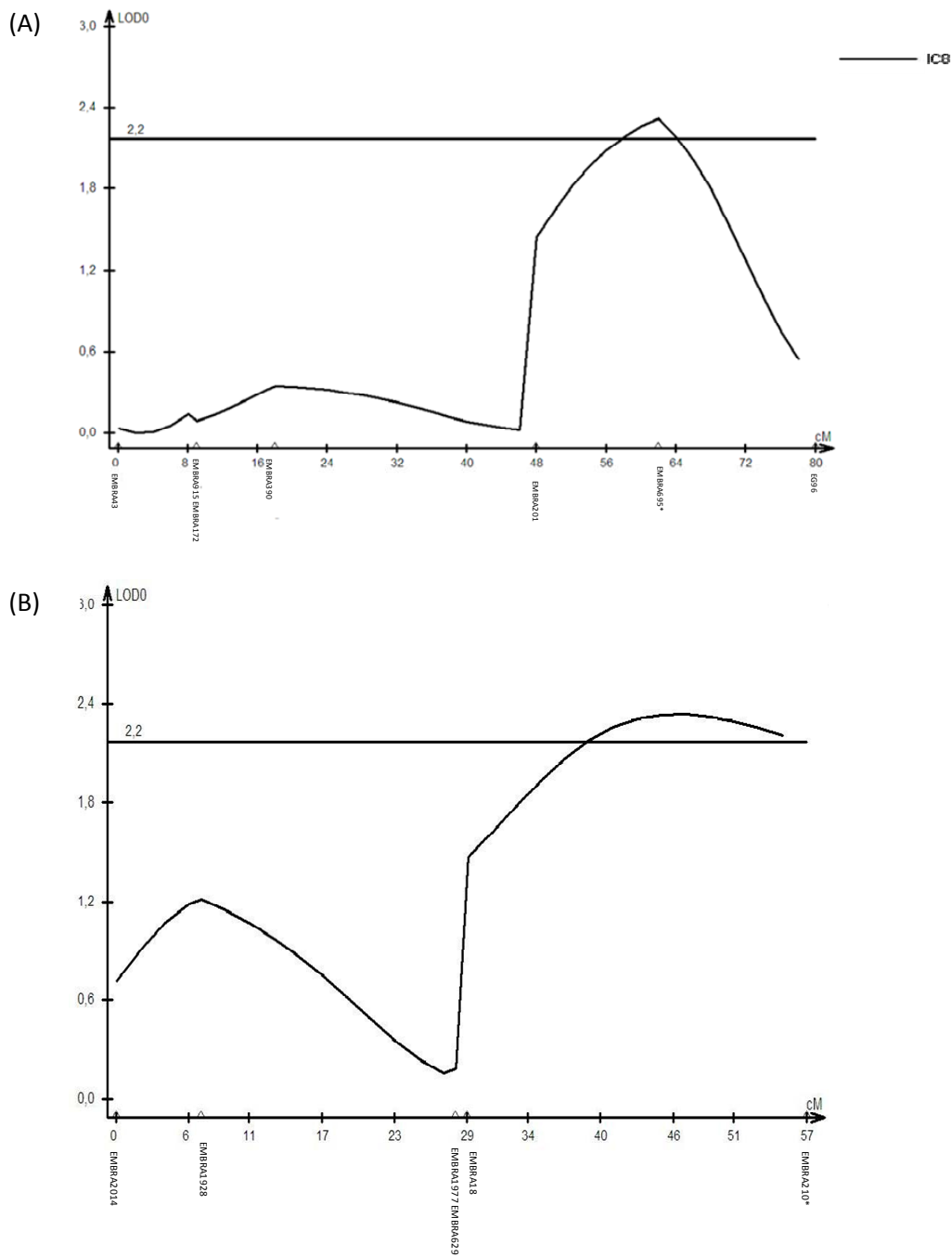


Figura 39. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer demonstrando os QTL para RD mapeados por intervalo composto no grupo de ligação 2 (A) e 9 (B) para o genitor U2. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica RD pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,2.

3.4.6.3. Cruzamento DG x UGL

Pela análise de marca simples foi identificado um marcador ligado a QTL no genitor DG e oito marcadores ligados a QTL, em quatro grupos de ligação do genitor UGL (Figura 40).

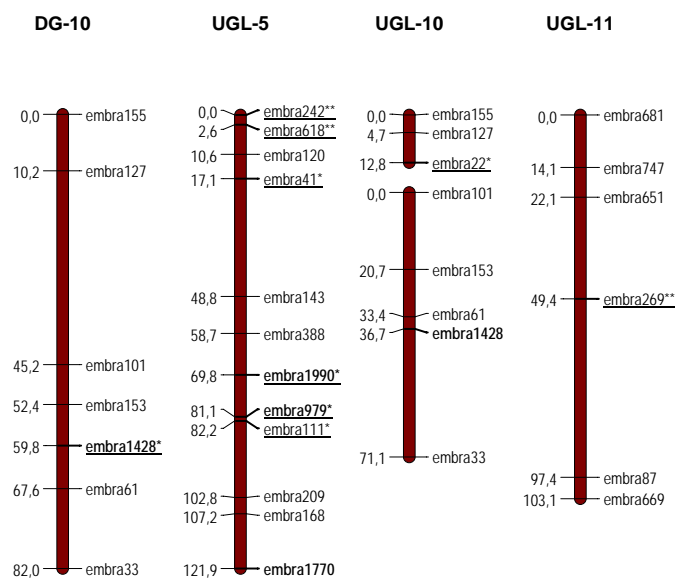


Figura 40. Localização dos marcadores associados à característica RD, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foram identificados dois QTLs por intervalo composto no genitor DG, um no grupo de ligação 2, explicando 13 % da variação genotípica e outro no grupo de ligação 3, explicando 6,8 % da variação genotípica para RD. Utilizando-se três e oito cofatores, respectivamente, obtiveram-se os LODs mais altos, 5,0 e 2,4 (Figura 41).

Também foram identificados dois QTLs por intervalo composto no genitor UGL, um no grupo de ligação 1, explicando 11,89% da variação genotípica, e outro no grupo de ligação 4, explicando 5,4% da variação genotípica. Utilizando-se oito cofatores, obtiveram-se os LODs mais altos, 4,96 e 2,54, respectivamente (Figura 42).

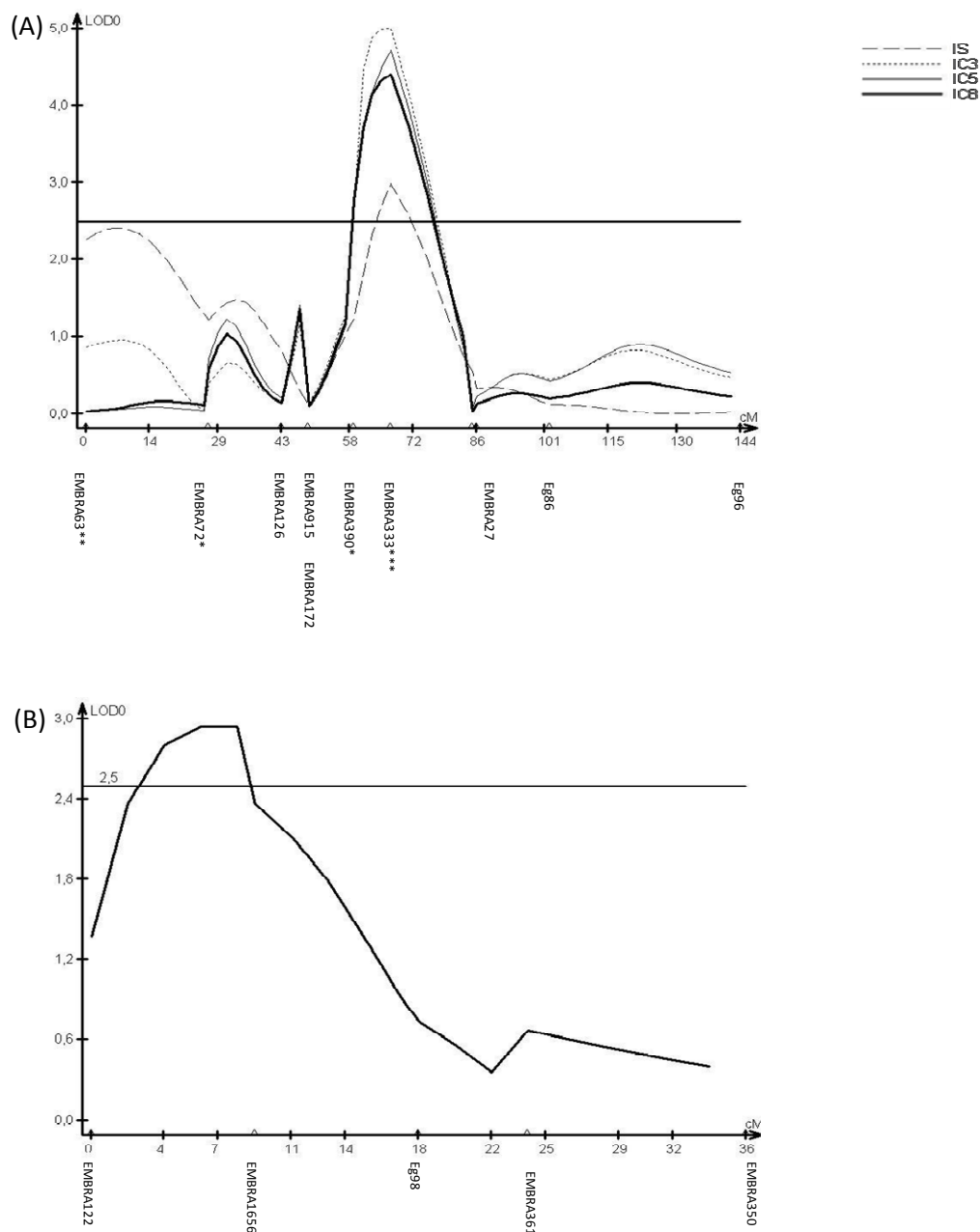


Figura 41. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer, demonstrando os QTLs para RD mapeados por intervalo simples e composto no grupo de ligação 2 (A) e 3 (B) para o genitor DG. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica RD pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,5.

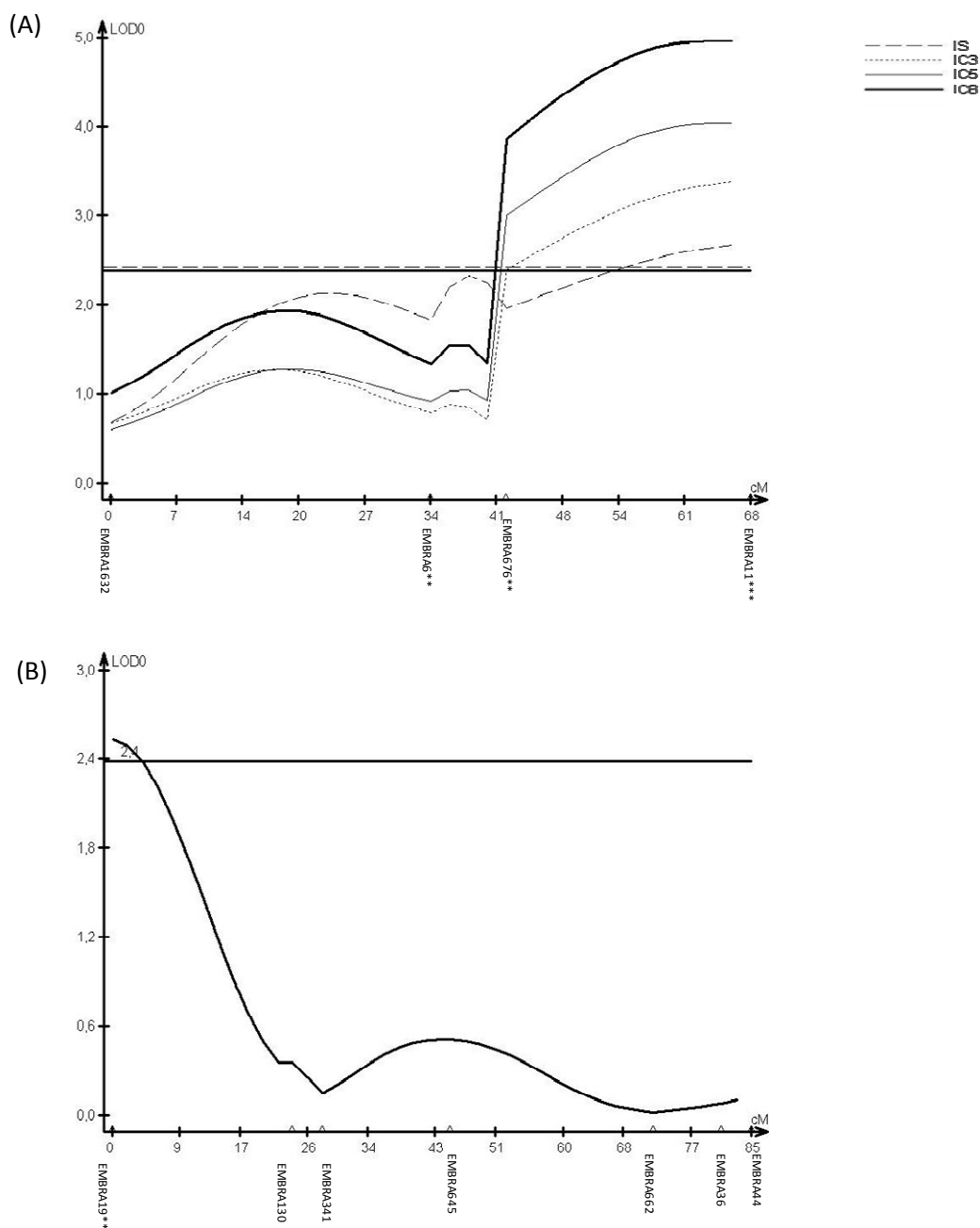


Figura 42. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer, demonstrando os QTLs para RD mapeado por intervalo simples e composto no grupo de ligação 1 (A) e 4 (B) para o genitor UGL. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica RD pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,4.

3.4.7. QTLs para Densidade básica da madeira (DB)

A densidade básica média para a população C1 x UGL foi de 464,4 kg/m³, com desvio padrão de 14,2 kg/m³; para a população DG x U2 a densidade média foi 468,8 kg/m³ com desvio padrão de 11,3 kg/m³ e para a população DG x UGL a densidade básica média foi 461,3 kg/m³ com desvio padrão de 13,2 kg/m³.

3.4.7.1. Cruzamento C1 x UGL

Pela análise de marca simples foram identificados dois marcadores ligados a QTL no genitor C1 em um grupo de ligação (Figura 43).

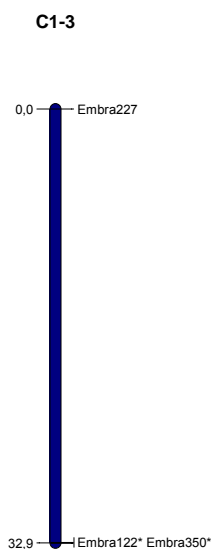


Figura 43. Localização dos marcadores associados à característica DB, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Não foram identificados QTLs para DB pela estratégia de mapeamento por intervalo simples e composto para este cruzamento.

3.4.7.2. Cruzamento DG x U2

Pela análise de marca simples foram identificados seis marcadores ligados a QTL em três grupos de ligação do genitor DG e um marcador ligado a QTL em um grupo de ligação do genitor U2 (Figura 44).

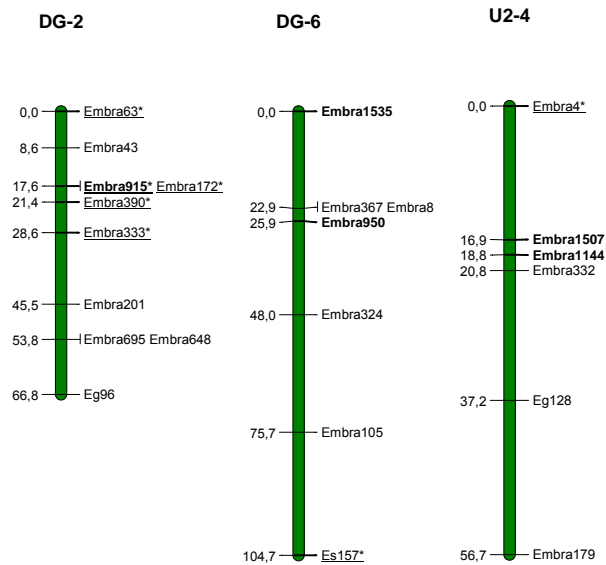


Figura 44. Localização dos marcadores associados à característica DB, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Não foram identificados QTLs para DB pela estratégia de mapeamento por intervalo simples e composto para este cruzamento.

3.4.7.3. Cruzamento DG x UGL

Pela análise de marca simples foram identificados dois marcadores ligados a QTL em dois grupos de ligação do genitor DG e dois marcadores ligados a QTL em um grupo de ligação do genitor UGL (Figura 45).

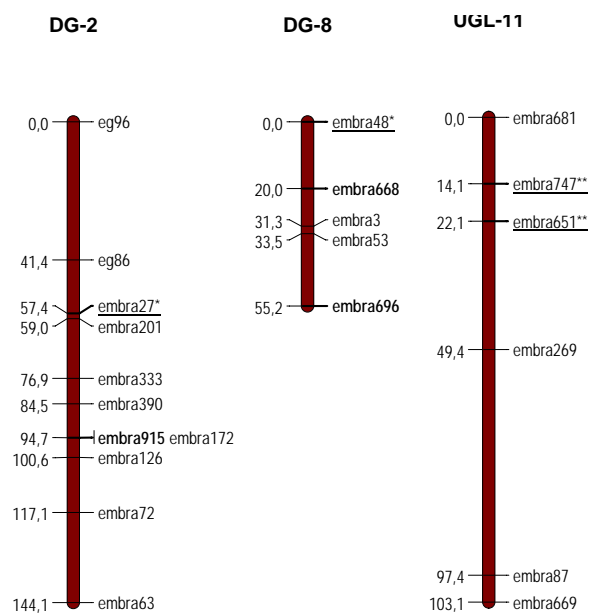


Figura 45. Localização dos marcadores associados à característica DB, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foram identificados dois QTLs por intervalo composto no genitor DG, um no grupo de ligação 2, explicando 7,45 % da variação genotípica e outro no grupo de ligação 10, explicando 5,71 % da variação genotípica para DB. Utilizando-se três e oito cofatores, respectivamente, obtiveram-se os LODs mais altos, 2,87 e 2,47 (Figura 46).

Também foi identificado um QTL por intervalo composto no genitor UGL, grupo de ligação 6, explicando 10,62% da variação genotípica para DB. Utilizando-se oito cofatores obteve-se o maior LOD de 4,01 (Figura 47).

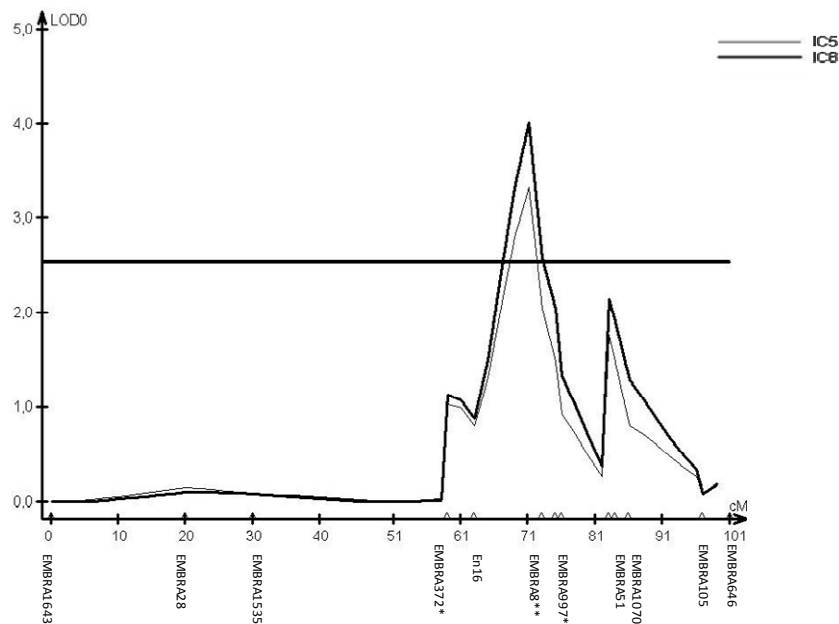


Figura 47. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer, demonstrando o QTL para DB mapeado por intervalo composto no grupo de ligação 6 para o genitor UGL. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica DB pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,6.

3.4.8. 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 C1 x UGL do presente trabalho, a profundidade média de penetração do Pilodyn foi de 11,4 mm, com desvio padrão de 3,2 mm; para a população DG x U2 a profundidade média foi de 11,3 mm com desvio padrão de 1,8 mm e para a população DG x UGL a profundidade média de penetração do Pilodyn foi 13,1 mm com desvio padrão de 3,9 mm.

3.4.8.1 Cruzamento C1 x UGL

Pela análise de marca simples foram identificados dois marcadores ligados a QTL em dois grupos de ligação do genitor C1 e dois marcadores ligados a QTL em um grupo de ligação do genitor UGL (Figura 48).

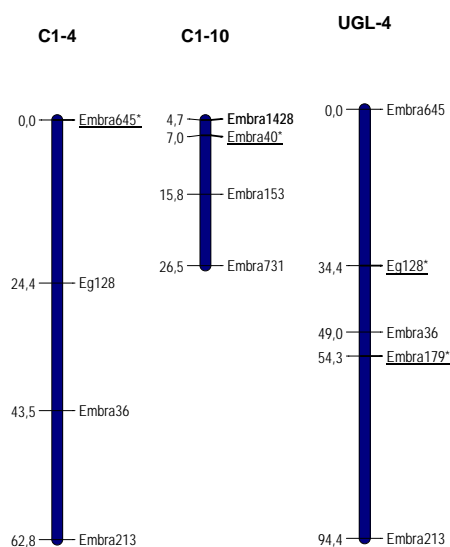


Figura 48. Localização dos marcadores associados à característica Pilodyn, significativos apenas na análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foi identificado um QTL por intervalo composto no genitor C1, grupo de ligação 8, explicando 7,77 % da variação genotípica. Utilizando-se cinco cofatores, obteve-se o LOD mais alto de 1,89 (Figura 49).

Também foi identificado um QTL por intervalo composto no genitor UGL, grupo de ligação 6, explicando 9,18% da variação genotípica para Pilodyn. Utilizando-se oito cofatores obteve-se o maior LOD de 4,0 (Figura 50).

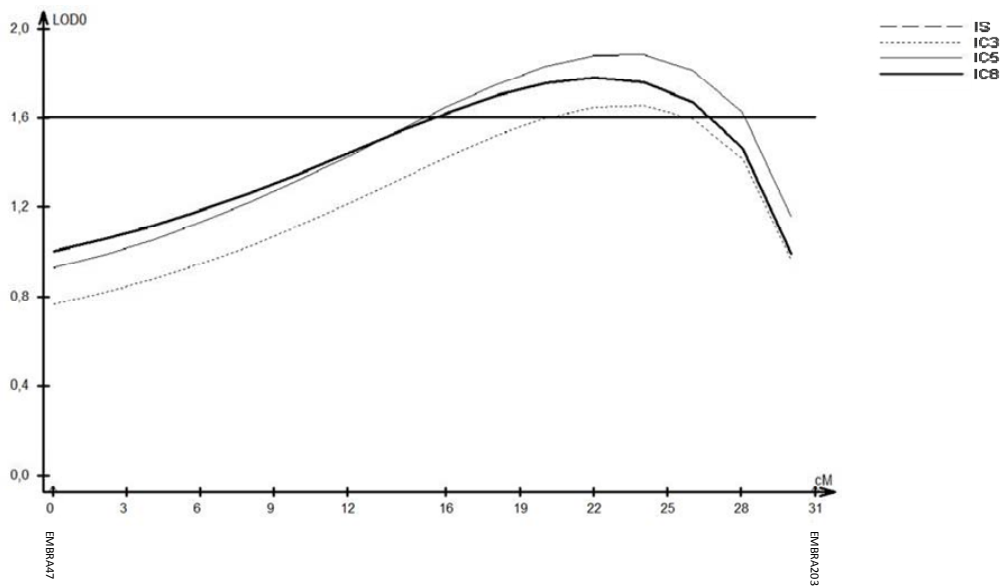


Figura 49. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer, demonstrando o QTL para Pilodyn mapeado por intervalo simples e composto no grupo de ligação 8 para o genitor C1. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica profundidade de penetração do Pilodyn e pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 1,6.

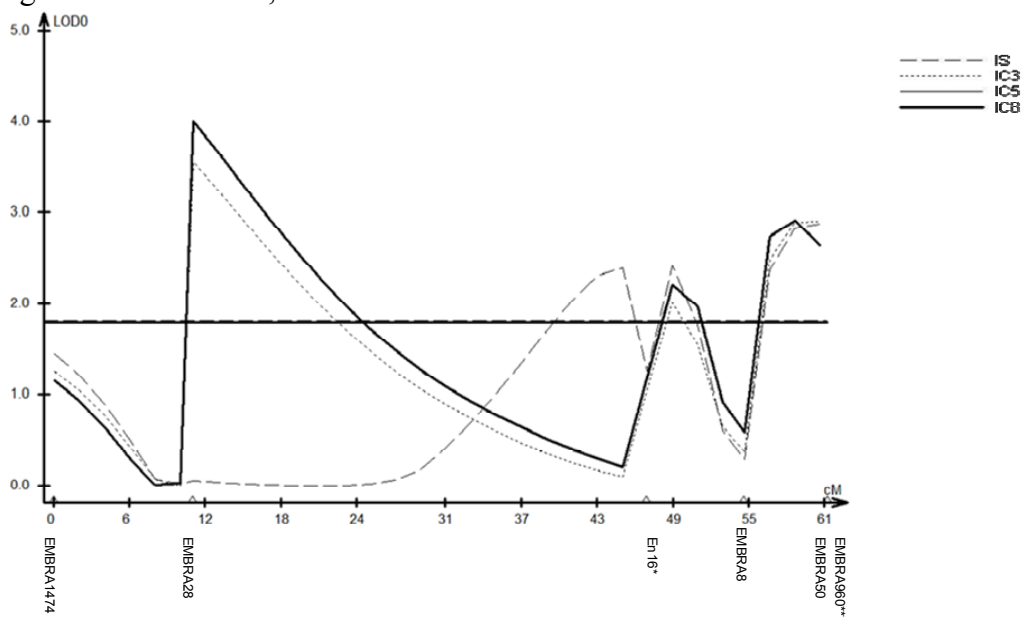


Figura 50. Gráfico gerado pelo QTL Cartographer, demonstrando o QTL para Pilodyn mapeado por intervalo simples e composto no grupo de ligação 6 para o genitor UGL. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica profundidade de penetração do Pilodyn pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 1,8.

3.4.8.2. Cruzamento DG x U2

Pela análise de marca simples foi identificado um marcador ligado a QTL no genitor DG e três marcadores ligados a QTL em um grupo de ligação do genitor UGL (Figura 51).

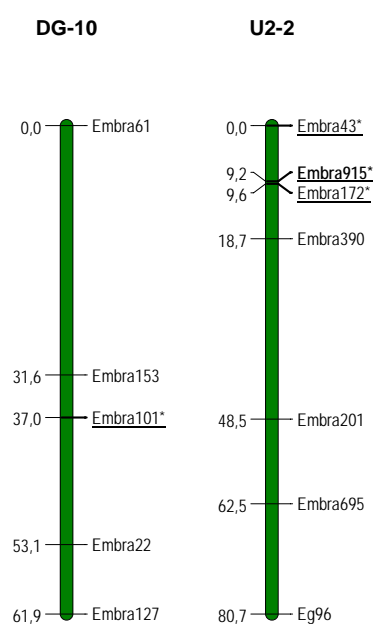


Figura 51. Localização dos marcadores associados à característica profundidade de penetração do Pilodyn, significativos apenas na análise de Marca Simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foram identificados dois QTLs por intervalo composto no genitor U2, um no grupo de ligação 5, explicando 8,96 % da variação genotípica e outro no grupo de ligação 6, explicando 10,38 % da variação genotípica para profundidade de penetração do Pilodyn. Utilizando-se oito e cinco cofatores, respectivamente, obtiveram-se os LODs mais altos, 2,28 e 3,71 (Figura 52).

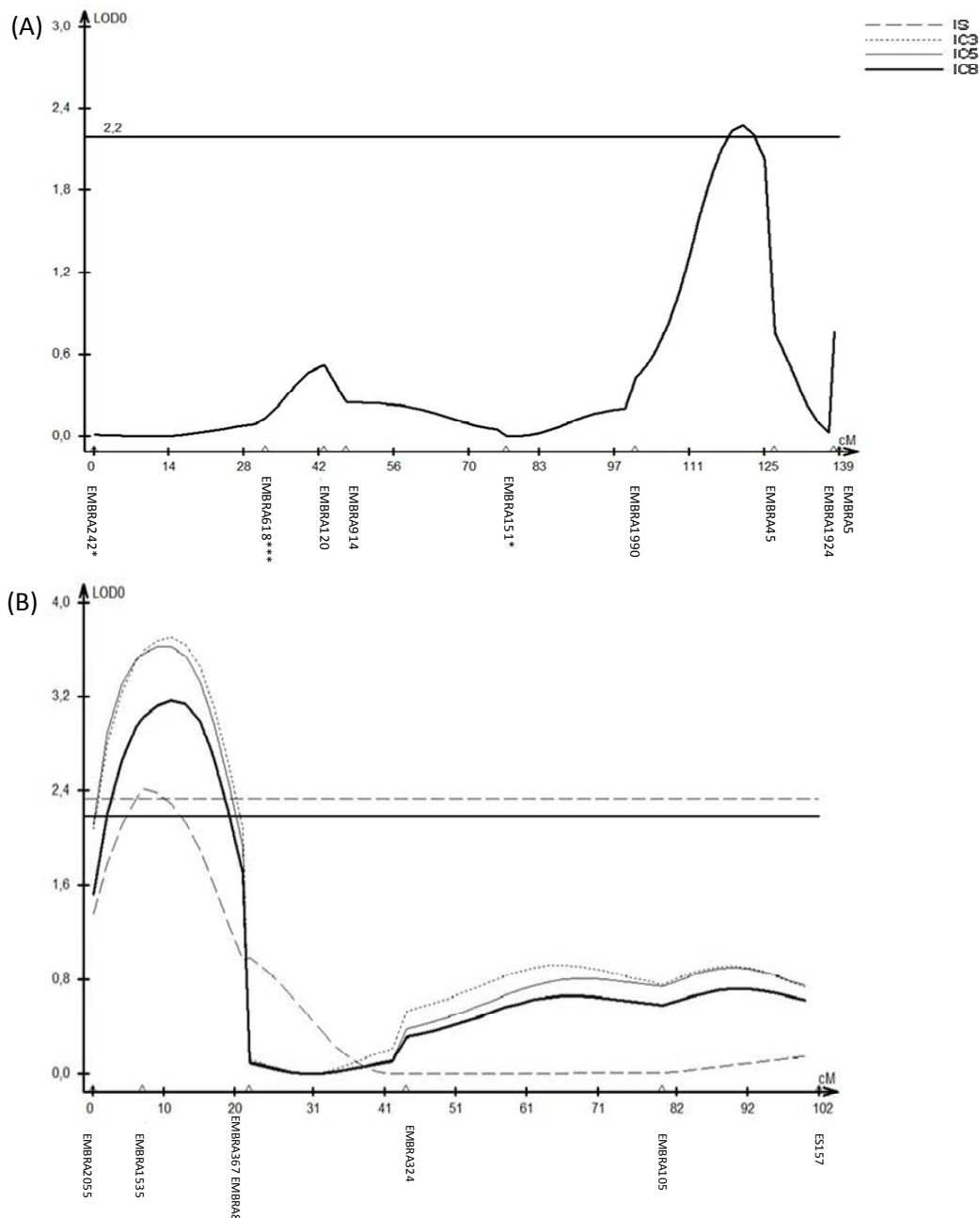


Figura 52. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer, demonstrando o QTL para Pilodyn mapeado por intervalo simples e composto no grupo de ligação 5 (A) e 6 (B) para o genitor U2. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica profundidade de penetração do Pilodyn pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD crítico definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,2.

3.4.8.3. Cruzamento DG x UGL

Pela análise de marca simples foram identificados nove marcadores ligados a QTL em cinco grupos de ligação do genitor DG e oito marcadores ligados a QTL em quatro grupos de ligação do genitor UGL (Figura 53).

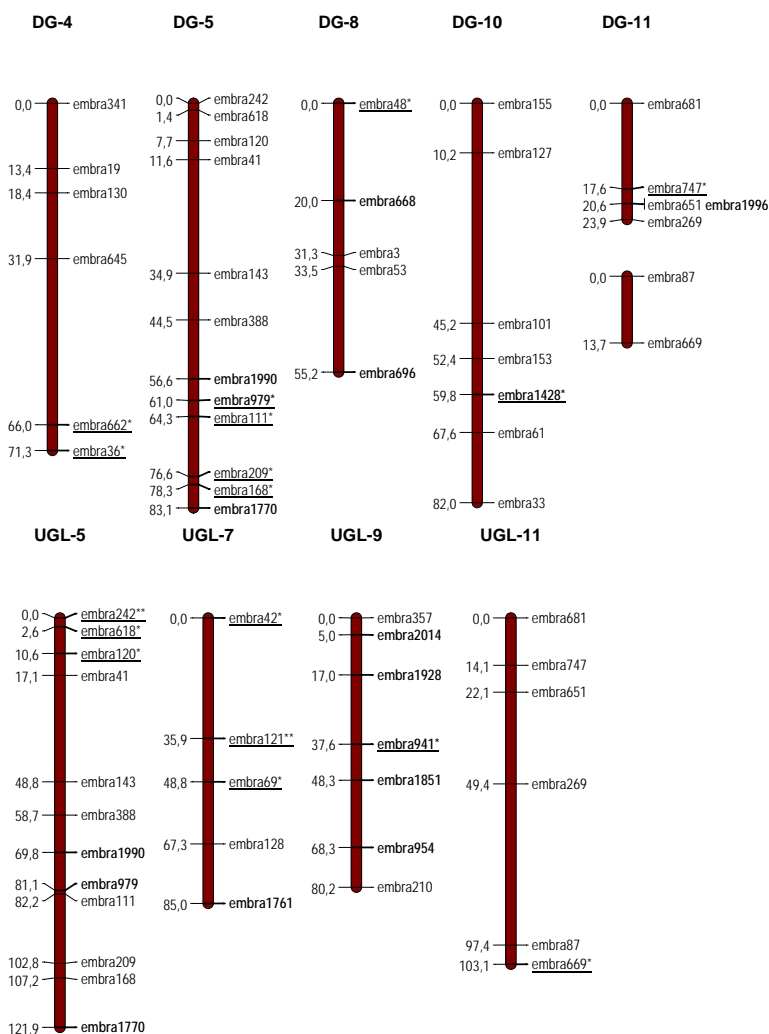


Figura 53. Localização dos marcadores associados à característica profundidade de penetração do Pilodyn, significativos apenas na análise de marca simples.

* Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%.

Foram identificados três QTLs por intervalo composto no genitor UGL, um no grupo de ligação 1, explicando 6,85 % da variação genotípica, um no grupo de ligação 2, explicando 6,08 % da variação genotípica, e ainda um no grupo de ligação 6, explicando 9,02% da variação genotípica. Utilizando-se três e oito cofatores, respectivamente, obtiveram-se os LODs mais altos, 2,87 e 2,47 (Figura 54).

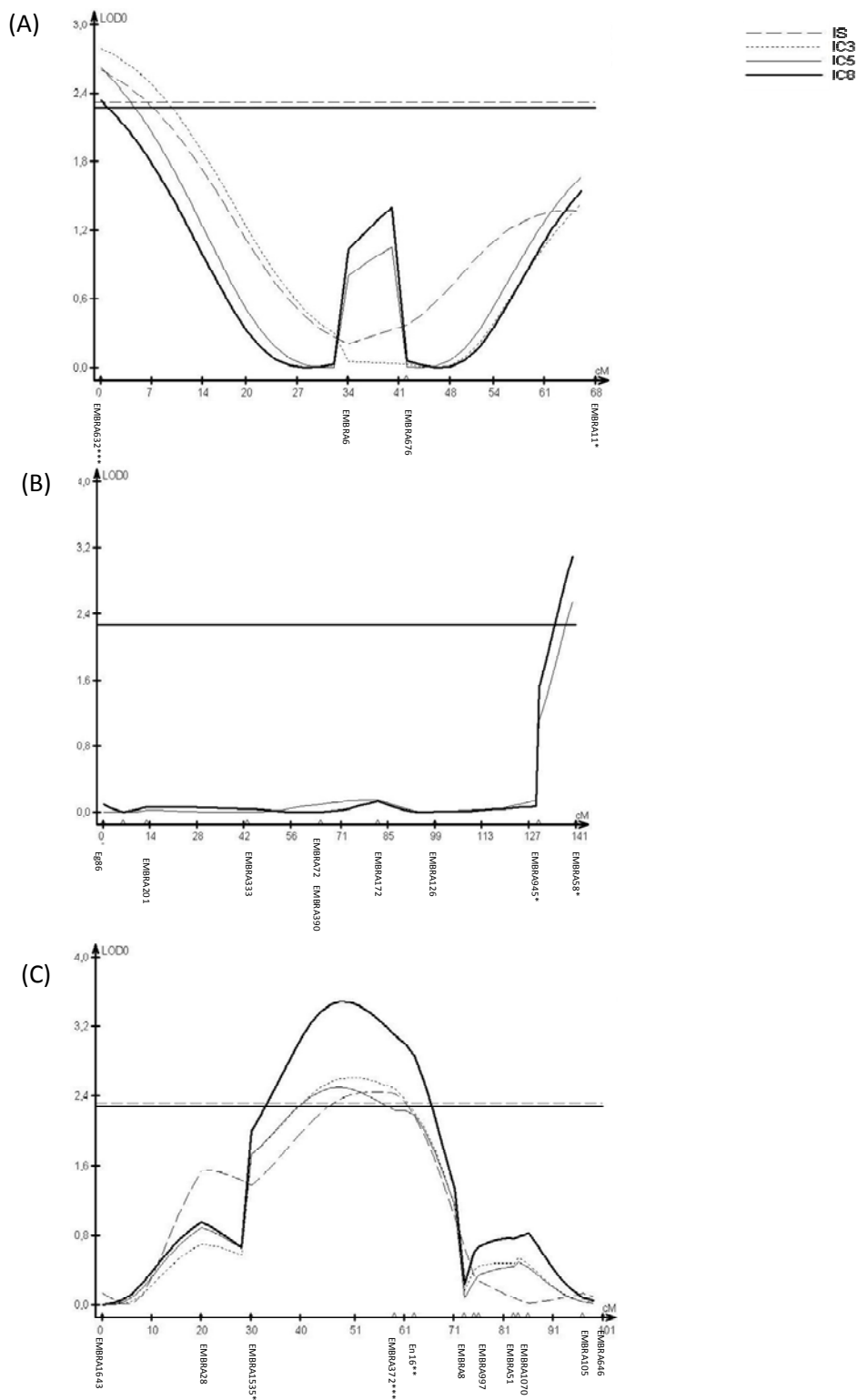


Figura 54. Gráficos gerados pelo QTL Cartographer, demonstrando o QTL para Pilodyn mapeado por intervalo simples e composto no grupo de ligação 1 (A), 2 (B) e 6 (C) para o genitor UGL. Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. Marcadores assinalados apresentam-se significativamente associados à característica profundidade de penetração do Pilodyn pela análise de marca simples. * Significativo a 5%, ** Significativo a 1%, *** Significativo a 0,1%. O valor de LOD definido pelo teste de permutação a 5% de significância foi de 2,3.

3.4.9. Sumário de todos os QTLs detectados pela metodologia de mapeamento por intervalo

Nas tabelas 7, 8 e 9 são apresentados sumários dos QTLs detectados pela metodologia de mapeamento por intervalo pela estratégia de pseudo-cruzamento teste para os três cruzamentos. Nas tabelas 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. A tabela também contém o tipo de análise que detectou o QTL de maior LOD, podendo ser: IS (intervalo simples) ou IC (intervalo composto) com três, cinco ou oito cofatores.

Tabela 7. Sumário dos QTLs detectados pela metodologia de mapeamento por intervalo pela estratégia de pseudo-cruzamento teste para o cruzamento C1 x UGL

Característica	Genitor	Grupo de Ligação	Análise	LOD	Varição explicada(%)	Marcadores dos flancos
Volume	C1	4	IC(8)	3,88	10,48	Eg128-Embra213
Volume	UGL	3	IC(5)	3,48	10,11	Embra227-Embra350
Volume	UGL	10	IC(8)	3,00	4,00	Embra40-Embra1428
Altura	C1	4	IC(8)	2,30	7,21	Eg128-Embra213
Altura	UGL	4	IS	2,33	9,00	Embra645-Eg128
Altura	UGL	6	IS	5,20	21,90	Embra28-Embra950
Altura	UGL	3	IS	2,66	8,14	Embra227-Embra350
RD	UGL	6	IS	2,62	8,14	Embra1474-Embra28
DAP	UGL	3	IC(5)	2,36	6,10	Embra227-Embra350
Pilodyn	C1	8	IC(5)	1,89	7,77	Embra47-Embra203
Pilodyn	UGL	6	IC(8)	4,00	9,18	Embra28-Embra950

Tabela 8. Sumário dos QTLs detectados pela metodologia de mapeamento por intervalo pela estratégia de pseudo-cruzamento teste para o cruzamento DG x U2

Característica	Genitor	Grupo de Ligação	Análise	LOD	Varição explicada(%)	Marcadores dos flancos
Volume	DG	9	IC(5)	7,08	19,74	Embra1977-Embra210
Volume	DG	5	IC(8)	5,89	13,73	Embra388-Embra5
DAP	DG	5	IC(5)	6,47	16,47	Embra388-Embra5
DAP	DG	9	IC(8)	5,29	15,63	Embra1977-Embra210
Altura	DG	5	IC(3)	2,81	8,62	Embra388-Embra5
Altura	DG	8	IC(8)	3,27	8,00	Embra47-Embra3
Lignina	DG	2	IC(8)	3,39	8,90	Embra43-Embra3
RSG	DG	2	IC(5)	6,66	16,92	Embra63-Embra172
RSG	DG	9	IC(8)	2,82	7,37	Embra1977-Embra210
RD	U2	2	IC(8)	2,32	5,35	Embra201-Eg96
RD	U2	9	IC(8)	2,35	7,30	Embra1977-Embra210
Pilodyn	U2	5	IC(8)	2,28	8,96	Embra1990-Embra5
Pilodyn	U2	6	IC(3)	3,71	10,38	Embra2055-Embra367

Tabela 9. Sumário dos QTLs detectados pela metodologia de mapeamento por intervalo pela estratégia de pseudo-cruzamento teste para o cruzamento DG x UGL.

Característica	Genitor	Grupo de Ligação	Análise	LOD	Varição explicada(%)	Marcadores dos flancos
DAP	DG	5	IC(8)	3,38	7,22	Embra111-Embra1770
DAP	UGL	1	IC(8)	3,76	10,34	Embra632-Embra6
DAP	UGL	6	IC(8)	2,81	6,22	Embra372-Embra51
DAP	UGL	11	IC(8)	3,61	9,12	Embra269-Embra669
Altura	DG	6	IC(8)	3,01	7,67	Embra173-Embra950
Altura	UGL	6	IC(8)	3,99	11,76	Embra372-Embra51
Lignina	DG	6	IS	2,72	11,00	Embra81-Embra1070
RD	DG	2	IC(3)	5	13,00	Embra915-Embra201
RD	DG	3	IC(8)	2,94	6,80	Embra122-Eg98
RD	UGL	1	IC(8)	4,96	11,89	Embra6-Embra11
RD	UGL	4	IC(8)	2,54	5,40	Embra19-Embra341
DB	DG	2	IC(3)	2,87	7,45	Embra915-Embra201
DB	UGL	10	IC(8)	2,47	5,71	Embra33-Embra127
DB	UGL	6	IC(8)	4,01	10,62	Embra372-Embra51
Pilodyn	UGL	1	IC(3)	2,79	6,85	Embra632-Embra6
Pilodyn	UGL	2	IC(8)	3,08	6,08	Embra945-Embra58
Pilodyn	UGL	6	IC(8)	3,49	9,08	Embra1535-Embra8

3.5. Análise de coincidência de QTLs entre os dois ambientes contrastantes

Na tabela 10 encontram-se todos os QTLs detectados nos dois ambientes, seus genitores, grupo de ligação, LODs e variação explicada calculados nas análises para os dois ambientes e os marcadores flanqueantes destes QTLs.

Nas tabelas de 11 a 15, encontram-se os marcadores ligados a QTLs para os dois ambientes, por meio da análise de marca simples. Os marcadores sombreados não estão em grupos de ligação onde foram detectados QTLs em comum para os dois ambientes pelo mapeamento por intervalo.

Tabela 10. QTLs detectados em comum para os dois ambientes contrastantes

Característica	Genitor (cruzamento)	Grupo de Ligação	LOD (1)	LOD (2)	VE (1)	VE (2)	Marcadores dos flancos
Altura	UGL(C1xUGL)	6	5,20	9,44	21,90	22,40	Embra28-Embra950
Pilodyn	UGL(C1xUGL)	6	4,00	7,98	9,18	18,37	Embra28-Embra951
Lignina	DG(DGxU2)	2	3,39	2,81	8,90	6,71	Embra43-Embra333
RD	U2(DGxU2)	9	2,35	2,67	7,30	11,82	Embra1928-Embra210 *
DAP(1),Altura(2)	UGL(DGxUGL)	1	3,76	2,73	10,34	5,20	Embra632-Embra6
DAP	UGL(DGxUGL)	6	2,81	6,10	6,22	15,00	Embra1535-Embra51*
Altura	UGL(DGxUGL)	6	3,99	2,74	11,76	7,00	Embra1535-Embra51*
Volume(1),Altura(2)	UGL(DGxUGL)	1	4,52	2,73	14,45	5,20	Embra632-Embra6

VE-Varição explicada (%)

(1)Ambiente 1 - Guanhães

(2)Ambiente 2 - Guaíba

* Deslocado para o próximo intervalo do mapa

Tabela11. Marcadores ligados a QTL nos dois ambientes para o parental UGL do cruzamento C1 x UGL, por meio da análise de marca simples.

Característica	Genitor(cruzamento)	Grupo de ligação	Marcador	p valor (1)	p valor (2)
DAP	UGL(C1xUGL)	3	Embra350	0,002**	0,028**
DAP	UGL(C1xUGL)	3	Embra122	0,002**	0,028**
DAP	UGL(C1xUGL)	6	En16	0,010*	0,000*****
Altura	UGL(C1xUGL)	6	En16	0,000*****	0,000*****
Altura	UGL(C1xUGL)	6	Embra8	0,009**	0,000*****
Altura	UGL(C1xUGL)	6	Embra50	0,009**	0,000*****
Altura	UGL(C1xUGL)	6	Embra950	0,035*	0,003**
Volume	UGL(C1xUGL)	3	Embra350	0,001***	0,036*
Volume	UGL(C1xUGL)	3	Embra122	0,001***	0,041*
Volume	UGL(C1xUGL)	6	En16	0,004**	0,000*****
Lignina	UGL(C1xUGL)	4	Embra645	0,013*	0,002**
Pilodyn	UGL(C1xUGL)	6	En16	0,016*	0,000***
Pilodyn	UGL(C1xUGL)	6	Embra950	0,000***	0,003**

(1)Ambiente Guanhães

(2)Ambiente Guaíba

Tabela12. Marcadores ligados a QTL nos dois ambientes para o parental DG do cruzamento DG x U2, por meio da análise de marca simples.

Característica	Genitor(cruzamento)	Grupo de ligação	Marcador	p valor (1)	p valor (2)
DAP	DG(DGxU2)	5	Embra45	0,000****	0,034*
DAP	DG(DGxU2)	5	Embra5	0,000***	0,015*
DAP	DG(DGxU2)	5	Embra1924	0,001***	0,044*
Volume	DG(DGxU2)	5	Embra5	0,001***	0,039*
Volume	DG(DGxU2)	8	Embra47	0,015*	0,043*
Lignina	DG(DGxU2)	2	Embra43	0,001***	0,023*
Lignina	DG(DGxU2)	2	Embra915	0,001***	0,002**
Lignina	DG(DGxU2)	2	Embra172	0,001***	0,006**
Lignina	DG(DGxU2)	2	Embra390	0,001***	0,003**
Lignina	DG(DGxU2)	2	Embra201	0,036*	0,009**
Lignina	DG(DGxU2)	9	Embra210	0,004**	0,014*
RD	DG(DGxU2)	2	Embra915	0,042*	0,012*
RD	DG(DGxU2)	2	Embra172	0,042*	0,012*
RD	DG(DGxU2)	2	Embra390	0,016*	0,004**
RD	DG(DGxU2)	2	Embra333	0,022*	0,038*
DB	DG(DGxU2)	2	Embra390	0,011*	0,036*

(1)Ambiente Guanhães

(2)Ambiente Guaíba

Tabela13. Marcadores ligados a QTL nos dois ambientes para o parental U2 do cruzamento DG x U2, por meio da análise de marca simples.

Característica	Genitor(cruzamento)	Grupo de ligação	Marcador	p valor (1)	p valor (2)
DAP	U2(DGxU2)	2	Embra695	0,003**	0,012*
Volume	U2(DGxU2)	2	Embra695	0,030*	0,003**
DB	U2(DGxU2)	4	Embra4	0,010*	0,023*
Pilodyn	U2(DGxU2)	2	Embra43	0,031*	0,022*

(1)Ambiente Guanhães

(2)Ambiente Guaíba

Tabela14. Marcadores ligados a QTL nos dois ambientes para o parental UGL do cruzamento DG x UGL, por meio da análise de marca simples.

Característica	Genitor(cruzamento)	Grupo de ligação	Marcador	p valor (1)	p valor(2)
DAP	UGL(DGxUGL)	4	Embra19	0,031*	0,035*
DAP	UGL(DGxUGL)	6	Embra372	0,011*	0,0001***
DAP	UGL(DGxUGL)	6	En16	0,011*	0,0001***
DAP	UGL(DGxUGL)	6	Embra8	0,015*	0,0001***
DAP	UGL(DGxUGL)	6	Embra950	0,037*	0,0001***
ALTURA	UGL(DGxUGL)	1	Embra6	0,029*	0,044*
ALTURA	UGL(DGxUGL)	6	Embra372	0,022*	0,001**
ALTURA	UGL(DGxUGL)	6	En16	0,011*	0,004**
ALTURA	UGL(DGxUGL)	6	Embra8	0,012*	0,013*
ALTURA	UGL(DGxUGL)	6	Embra950	0,031*	0,016*
VOLUME	UGL(DGxUGL)	1	Embra632	0****	0,05*
VOLUME	UGL(DGxUGL)	4	Embra19	0,015*	0,024*
VOLUME	UGL(DGxUGL)	6	Embra1535	0,023*	0,003**
VOLUME	UGL(DGxUGL)	6	Embra372	0,003**	0,0001***
VOLUME	UGL(DGxUGL)	6	En16	0,002**	0,0001***
VOLUME	UGL(DGxUGL)	6	Embra8	0,004**	0,0001***
VOLUME	UGL(DGxUGL)	6	Embra950	0,017*	0,0001***
LIGNINA	UGL(DGxUGL)	5	Embra242	0,004**	0,013*
LIGNINA	UGL(DGxUGL)	5	Embra618	0,003**	0,002**
LIGNINA	UGL(DGxUGL)	5	Embra120	0,012*	0,004**
PILODYN	UGL(DGxUGL)	5	Embra242	0,01**	0,011*
PILODYN	UGL(DGxUGL)	5	Embra618	0,011*	0,012*
PILODYN	UGL(DGxUGL)	5	Embra120	0,013*	0,015*

(1)Ambiente Guanhães

(2)Ambiente Guaíba

Tabela15. Marcadores ligados a QTL nos dois ambientes para o parental DG do cruzamento DG x UGL, por meio da análise de marca simples.

Característica	Genitor(cruzamento)	Grupo de ligação	Marcador	p valor (1)	p valor (2)
RSG	DG(DGxUGL)	6	Embra1070	0,03*	0,007**
RSG	DG(DGxUGL)	6	Embra324	0,039*	0,005**
RSG	DG(DGxUGL)	6	Embra997	0,025*	0,008**
RSG	DG(DGxUGL)	6	Embra51	0,033*	0,032*
RD	DG(DGxUGL)	2	Embra72	0,017*	0,016*
PILODYN	DG(DGxUGL)	5	Embra979	0,017*	0,028*
PILODYN	DG(DGxUGL)	5	Embra111	0,018*	0,029*

(1)Ambiente Guanhães

(2)Ambiente Guaíba

3.6. Análise de coincidência de QTLs entre diferentes *backgrounds* genéticos

Comparando-se os QTLs detectados para o genitor UGL do cruzamento DG x UGL, ambiente Guaíba, com os QTLs detectados para o mesmo genitor do ambiente Guanhães, verifica-se dois QTLs em comum, altura e RD. Quando feita a comparação inversa, ou seja, dos QTLs detectados para o genitor UGL do cruzamento C1 x UGL, ambiente Guaíba, com os QTLs detectados para o mesmo genitor, cruzamento DG x UGL, ambiente de Guanhães, verifica-se três QTLs em comum, DAP, altura e profundidade de penetração do Pillodyn (Tabela 16).

Os QTLs detectados em comum entre diferentes *backgrounds* genéticos, apenas no ambiente Guanhães estão na Tabela 17.

Tabela 16. QTLs detectados em comum entre diferentes *backgrounds* genéticos e ambientes.

Guaíba	Guanhães	QTLs em comum	Grupo de ligação
UGL (DG x UGL)	UGL(C1 x UGL)	Altura e RD	6
UGL (C1 x UGL)	UGL (DG x UGL)	DAP, Altura e Pillodyn	6

Tabela 17. QTLs detectados em comum entre diferentes *backgrounds* genéticos apenas no ambiente de Guanhães.

Guanhães		QTLs em comum	Grupo de ligação
DG (DG x U2)	DG (DG x UGL)	DAP	5
UGL (C1 UGL)	UGL (DGx UGL)	DAP, Altura e Pillodyn	6

4 – DISCUSSÃO

A colinearidade entre os marcadores completamente informativos localizados nos mapas de ambos os parentais dos três cruzamentos, demonstra que os mapas gerados explicam adequadamente os dados genotípicos levantados e são consistentes aos mapas gerados anteriormente.

Comparando-se os mapas genéticos gerados neste trabalho com os mapas genéticos gerados anteriormente para as mesmas famílias, observa-se que os marcadores mantiveram-se nos seus respectivos grupos de ligação, de modo geral na mesma ordenação, com pequenas inversões de posição entre marcadores próximos e algumas variações de frequência de recombinação entre locos adjacentes e conseqüentemente comprimento de alguns grupos de ligação. Estas diferenças entre os mapas eram esperadas. Diferenças nas estimativas das frequências de recombinação ocorrem tendo em vista que diferentes amostras de eventos meióticos foram analisadas para a construção dos mapas para cada local. As diferenças nos comprimentos totais dos grupos de ligação derivam do número muito diferente de marcadores mapeados. Apenas parte dos microsatélites mapeados anteriormente foi mapeada neste trabalho, e sabe-se que ao se adicionar ou retirar marcas eventos de duplas recombinações são detectados ou deixam de ser detectados respectivamente fazendo com que as estimativas de distância entre os marcadores sejam restabelecidas (Lynch & Walsh, 1998).

Os seis locos que apresentaram distorção das proporções esperadas para a segregação de acordo com a primeira lei de Mendel não apresentaram distorção nos trabalhos de mapeamento anteriores, e um loco que apresentou distorção nos trabalhos anteriores não apresentou distorção de segregação no presente trabalho. Isso pode ser resultado novamente do fato que amostras distintas de eventos meióticos foram analisadas ou alternativamente por classificação errônea de

genótipos. Apesar das distorções de segregação os locos foram incluídos nas análises de ligação e foram mapeados e ordenados conforme os mapas gerados nos trabalhos anteriores.

Muitos dos caracteres fenotípicos utilizados para a detecção de QTLs nas três populações estudadas neste trabalho têm variabilidade relativamente limitada. Nas três populações as características densidade básica (DB), teor de lignina e rendimento depurado (RD), apresentaram coeficiente de variação (CV) menor que 5,0 %. Essa baixa variabilidade pode ser por uma menor heterozigosidade aos QTLs que conduz ao menor efeito de substituição dos alelos, o que torna mais difícil a detecção. Porém, apesar da variabilidade limitada nesses caracteres, foi possível a detecção de QTLs para essas características nos genitores dos três cruzamentos (Tabelas 7, 8 e 9), demonstrando que há heterozigosidade nos QTLs e os alelos desses locos possuem diferenças de efeitos médios suficientemente grandes para permitir a detecção do QTL.

Do ponto de vista das análises estatísticas para mapeamento de QTLs, em geral, nas regiões onde foram localizados QTLs pelo mapeamento por intervalo (simples ou composto) também foram identificados marcadores ligados a QTLs pela análise de marca simples. 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 em repulsão. Esses QTLs só puderam ser localizados com a inclusão de cofatores em regressão múltipla. Por outro lado, muitos dos marcadores identificados como ligados a QTLs pela análise de marca simples foram localizados em regiões onde o valor de LOD não ultrapassou o limiar estatístico do mapeamento por intervalo, sugerindo uma maior probabilidade de erros do tipo I na análise por marca simples.

As características densidade básica e profundidade de penetração do Pilodyn não apresentarão nenhuma correlação, como era esperado, possivelmente porque para a densidade básica da madeira o NIRS não foi calibrado de forma precisa, impedindo a mensuração precisa dessa característica.

Os caracteres DAP, volume e altura apresentam correlação positiva maior que 80%. Esses caracteres tiveram QTLs co-localizados no grupo de ligação 3 do genitor UGL e no grupo de ligação 4 do genitor C1, ambos do cruzamento C1 x UGL; grupo de ligação 5 e 9 do genitor DG, cruzamento DG x U2 e no grupo de ligação 6 do genitor UGL, cruzamento C1 x UGL. A co-localização de QTLs para

caracteres altamente correlacionados sugere que um único loco ou grupo de locos com efeito pleiotrópico, esteja controlando parte da variabilidade em diferentes caracteres. Ainda, há a hipótese que genes distintos, porém ligados estejam controlando cada um deles estas características distintas e no caso seus efeitos não possam ser distinguidos pela baixa resolução do mapeamento.

Neste trabalho foi observada coincidência de detecção de QTLs para três famílias em dois ambientes contrastantes, e ainda coincidência na detecção de QTLs entre diferentes *backgrounds* genéticos, visto que uma das famílias, DG x UGL tem parentais em comum com as outras duas famílias, C1 x UGL e DG x U2. Dois QTLs, um para altura e um para profundidade de penetração do Pilodyn foram detectados no genitor UGL do cruzamento C1 x UGL, nos dois ambientes. Para o cruzamento DG x U2, também foram detectados dois QTLs em comum para os dois ambientes, um para teor de lignina no genitor DG e outro para rendimento depurado no genitor U2. No cruzamento DG x UGL além de dois QTLs em comum para os dois ambientes (DAP e altura), verificou-se coincidência de localização de QTLs de características correlacionadas. No genitor UGL, no mesmo intervalo em que se detectou um QTL para DAP e volume no ambiente de Guanhães, detectou-se um QTL para altura no ambiente de Guaíba. As diferenças das estimativas de LOD e variação explicada entre os QTLs comuns entre os dois ambientes são esperadas uma vez que estas estimativas dependem de vários fatores tais como o tamanho da população, densidade de marcadores, distribuição de genótipos e a proporção e padrão dos dados perdidos, entre outros (Churchill & Doerge, 1994). Esses oito QTLs para características de qualidade da madeira (Tabela 10) apresentaram estabilidade entre os dois ambientes inferida pela possibilidade de detecção com níveis adequados de significância estatística.

Além desses oito QTLs em comum para os dois ambientes, detectados por meio da análise por intervalo, verificou-se um grande número de marcadores significativamente ligados a QTLs, também em comum aos dois ambientes, por meio da análise de marca simples. Muitos destes marcadores estão em regiões e grupos de ligação onde foram também detectados os QTLs em comum para os dois ambientes por meio da análise por intervalo. Porém vários outros (tabelas 11, 12, 13, 14 e 15, marcadores sombreados) estão em grupos de ligação onde não foram detectados QTLs em comum aos dois ambientes pela análise por intervalo.

Da mesma forma que a análise por marca simples está mais sujeita a erros do tipo 1, a análise por intervalo está mais sujeita a erros do tipo 2, por isso a importância de considerar resultados de ambas as análises, principalmente se o objetivo for a utilização dos QTLs em procedimentos de seleção assistida. Tanto resultados obtidos por meio da análise por marca simples como por intervalo são de grande relevância na prática do melhoramento florestal, pois fornecem regiões alvo interessantes para a seleção assistida dentro de famílias. O debate a respeito do nível adequado de rigor estatístico a ser utilizado na declaração de QTLs tem sido tema de alguns trabalhos indicando que erros do tipo II, isto é deixar de declarar QTLs reais pode ser mais prejudicial em procedimentos de SAM do que erros do tipo I, ou seja, declarar erroneamente QTLs inexistentes (Jansen et al., 1994).

Poucos trabalhos em espécies florestais investigaram a estabilidade de QTLs em diferentes ambientes e backgrounds genéticos. Estudos para algumas espécies florestais também detectaram alguns QTLs estáveis entre diferentes ambientes. Em *Populus*, alguns QTLs para crescimento (altura e área basal) foram detectados em três diferentes locais de teste, enquanto outros foram detectados apenas em um ou dois ambientes (Wu et al., 1998) e ainda em um trabalho de Rae et al. (2007), foram detectados alguns QTLs para crescimento sob diferentes condições experimentais (concentração de CO₂), sendo possível identificar regiões genéticas sob influência ambiental. Neste mesmo trabalho foi possível fazer comparação entre QTLs mapeados para as mesmas características em dois trabalhos diferentes, mostrando a colocação de QTLs entre ambientes contrastantes. Ainda sobre *Populus*, oito QTLs para características relacionadas ao potencial osmótico foram identificados a partir do conjunto de dados de todos os tratamentos e locais, indicando que estes QTLs foram consistentemente expressos independentemente de tratamento ou local. No entanto, foram detectados quatro QTLs apenas em um único local, demonstrando mais uma vez que para detecção de QTLs é necessário que o ambiente permita sua plena expressão (Tschaplinski et al., 2006). Em *Quercus*, dos 12 QTLs detectados para características fenológicas, nove foram detectados em pelo menos dois ambientes e cinco em todos os três ambientes (Scotti-Saintagne et al, 2004). Em Douglas Fir (*Pseudotsuga menziesii*), cinco dos seis QTLs detectados para início de brotação das gemas foram estáveis entre os dois experimentos de campo. Neste trabalho foi utilizada uma progênie de mais de 400 indivíduos replicados por estaquia e plantados em duas condições ambientais

altamente controladas. Este resultado podem ser explicados pela alta qualidade experimental e também pelo fato da característica início de brotação das gemas apresentar uma alta herdabilidade (Jermstad et al., 2001). Em alguns estudos de interação QTL x ambiente para *Eucalyptus*, *Populus* e *Pinus* também foram detectados alguns QTLs que não interagem com diferentes ambientes ou condições experimentais (Rae et al., 2008; Bundock et al., 2008, Sewell et al., 2002)

Fazendo-se uma comparação entre os QTLs mapeados no ambiente Guanhães para o genitor DG do cruzamento DG x U2 e o genitor DG do cruzamento DG x UGL, verifica-se um QTL para DAP, grupo de ligação 5, em comum. Na comparação entre o genitor UGL do cruzamento C1x UGL e UGL do cruzamento DG x UGL, também no ambiente de Guanhães, verifica-se a coincidência de três QTLs, respectivamente para DAP, altura e profundidade de penetração do Pilodyn, todos localizados no grupo de ligação 6 (Tabela 17).

Quando feita a comparação dos QTLs mapeados no genitor UGL, cruzamento C1 x UGL, no ambiente de Guanhães com os QTLs mapeados para o mesmo genitor só que no cruzamento DG x UGL, no ambiente de Guaíba, verifica-se dois QTLs em comum, um para altura e outro para rendimento depurado, ambos no grupo de ligação 6, embora para admitir que o QTL para RD seja o mesmo nos dois ambientes seria necessário incorporar mais marcas, pois os QTLs, embora próximos, mas não no mesmo intervalo. Quando feita a comparação inversa, ou seja, entre os QTLs mapeados no genitor UGL, do cruzamento DG x UGL, no ambiente de Guanhães, e os QTLs mapeados para o mesmo genitor, só que no cruzamento C1 x UGL no ambiente de Guaíba, verifica-se três QTLs em comum, DAP, altura e profundidade de penetração do Pilodyn, todos localizados no grupo de ligação 6 (Tabela 16). Diante destes resultados conclui-se que os QTLs para DAP, altura e profundidade de penetração do Pilodyn, localizados no grupo de ligação 6 do genitor UGL, apresentam possivelmente uma elevada estabilidade entre diferentes ambientes e backgrounds genéticos. Estes QTLs podem representar alvos importantes de investigações futuras, principalmente com a disponibilização da sequência completa do genoma de *Eucalyptus*. Para espécies florestais nas quais há uma elevada heterozigosidade espera-se uma grande variabilidade alélica aos QTLs o que em princípio facilita a detecção de QTLs em comum em diferentes backgrounds. O QTL para DAP

detectado no genitor DG para os cruzamentos DG x UGL e DG x U2 é detectado exclusivamente no ambiente de Guanhões, porém neste ambiente é estável entre diferentes *backgrounds*.

A investigação de expressão de QTLs em diferentes *backgrounds* genéticos é particularmente importante em espécies florestais, pois os programas de melhoramento exploram a ampla variabilidade genética em populações grandes e heterogêneas, amostrando maior multialelismo aos QTLs. Torna-se, portanto, essencial avaliar a expressão de alelos a QTLs descobertos em árvores individuais frente a uma ampla diversidade genética, seja para validar a posição do QTL, seja para avaliar o valor de melhoramento do alelo.

Em outros trabalhos também se observou forte interação entre QTLs e diferentes famílias, em que alguns QTLs se mostraram estáveis em diferentes *backgrounds* genéticos e outros se mostraram específicos. Os trabalhos de Campinhos et al.(1997) e Thamarus et al.(2004), Marques et al, (2005), Freeman et al. (2008) em *Eucalyptus*, e Devey et al. (2004b) e Brown et al. (2003) em *Pinus radiata* mostraram resultados nesta linha. Os resultados deste trabalho corroboram a hipótese de que existem múltiplos alelos aos QTLs nas populações de melhoramento das espécies florestais o que resulta em variabilidade da expressão de alelos a QTLs em diferentes *backgrounds* genéticos.

Os resultados obtidos indicam que QTLs de maior efeito para as mesmas características são detectados em ambientes contrastantes em latitude, altitude, solos e clima. Além disso, os resultados indicam ainda que regiões genômicas específicas contendo QTLs para características biologicamente correlacionadas também tendem a apresentar conservação entre ambientes distintos, embora os QTLs sejam detectados para características em princípio diferentes, possivelmente como resultado do próprio processo de mensuração da característica o que impacta a herdabilidade e conseqüentemente a possibilidade de detecção do QTL. Independentemente da característica, estes resultados inéditos são relevantes, pois fornecem regiões alvo interessantes para a seleção assistida dentro de famílias.

6 – REFERÊNCIAS

- Bradshaw HDJ & Grattapaglia D (1994) QTL Mapping In Interspecific Hybrids Of Forest Trees. *Forest Genetics (Zvolen)*, 1(4):191-196.
- Brondani RPV & Grattapaglia D (2001) Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. *Biotechniques* 31, 793-5.
- Brondani RPV, Williams ER, Brondani C & Grattapaglia D (2006) A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. *BMC Plant Biology* 6:20.
- Brown GR, Bassoni DL., Gill GP, Fontana JR, Wheeler NC, Megraw RA, Davis MF, Sewell MM, Tuskan GA & Neale BA (2003) Identification of quantitative trait loci influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). III. QTL Verification and candidate gene mapping. *Genetics* 164:1537-1546.
- Byrne M, Murrell JC, Owen JV, Kriedemann P, Williams ER & Moran GF (1997a) Identification and mode of action of quantitative trait loci affecting seedling height and leaf area in *Eucalyptus nitens*. *Theor Appl Genet* 94, 674-681.
- Byrne M, Murrell JC, Owen JV, Williams ER & Moran GF (1997b) Mapping of quantitative trait loci influencing frost tolerance in *Eucalyptus nitens*. *Theor Appl Genet* 95:975-979.
- Campinhos EN, Grattapaglia D, Bertolucci FL & Alfenas A (1997) Stability Of Expression Of QTL Alleles Controlling Growth Across Variable Genetic Backgrounds In *Eucalyptus Grandis*. In: International IUFRO Conference on Eucalyptus Genetics and Silviculture, Salvador. Proceedings of the International IUFRO Conference on Eucalyptus Genetics and Silviculture 2:186-191.
- Bundock PC, Potts BM, Vaillancourt RE (2008) Detection and stability of quantitative trait loci (QTL) in *Eucalyptus globulus*. *Tree Genet Genom* 4:85–95.

- Correia LQ, Faria DA & Grattapaglia D (2008) Mapeamento de QTL para características da Madeira em uma família segregante do gênero *Eucalyptus*. XIII Encontro do Talento Estudantil da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília-DF.
- Churchill GA & Doerge RW (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138:963-71.
- Cruz CD (1997) Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 442p.
- Devey ME, Groom KA, Nolan MF, Bell JC, Dudzinski MJ, Old KM, Matheson AC & Moran GF (2004b). Detection and verification of quantitative trait loci for resistance to *Dothistroma* needle blight in *Pinus radiata*. *Theoretical and Applied Genetics* 108:1056–1063.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Faria DA, Neves LG, Correia LQ, Mamani E & Grattapaglia D (2008) Mapeamento de QTLs para qualidade da madeira em uma população segregante envolvendo quatro espécies de *Eucalyptus*. XIII Encontro do Talento Estudantil da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília-DF.
- Freeman JS, Potts BM & Vaillancourt RE (2008) Few Mendelian genes underlie the quantitative response of a forest tree, *Eucalyptus globulus*, to a natural fungal epidemic. *Genetics* 178:563-571.
- Gomide JL & Demuner BJ (1986) Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método klason modificado. *O Papel* 47:36-38.
- Grattapaglia D. & Sederoff RR (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137:1121-1137.
- Grattapaglia D, Bertolucci FL & Sederoff RR (1995) 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.
- Grattapaglia D, Bertolucci FL, Penchel R & Sederoff RR (1996) 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.
- Grattapaglia D, Kirst M (2008) *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. *New Phytologist* 179:911-929.

- Grattapaglia D, Plomion C, Kirst M, Sederoff R (2009) Genomics of growth traits in forest trees. *Current Opinion in Plant Biology* 12(2):148-156.
- Haley CS & Knott SA (1992) A simple regression method for mapping quantitative trait loci in the line crosses using flanking markers. *Heredity* 69:315-324.
- Idury RM, Cardon LR (2006) A Simple Method for Automated Allele Binning in Microsatellite Markers. *Genome Research* 1104-1109.
- Jansen RC (1993) Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135:205-211.
- Jansen RC (1994) Controlling the type I and type II errors in mapping quantitative trait loci. *Genetics* 138(3):871–881.
- Jermstad KD, Bassoni DL, Jech KS, Wheeler NC & Neale DB (2001) Mapping of quantitative trait loci controlling adaptive traits in coastal Douglas-fir: I. Timing of vegetative bud flush. *Theor. Appl. Genet.* 102:1142-1151.
- Kerr RJ, Jarvis SF, Goddard ME (1996) The use of genetic markers in tree breeding programs. In: Dieters MJ, Matheson AC, Nikkles DG, Harwood CE, Walker SM (eds) *Tree improvement for sustainable tropical forestry. Proceedings, QFRI-IUFRO Conference, Caloundra.*
- Kumar S & Garrick DJ (2001) Genetic response to within-family selection using molecular markers in some radiata pine breeding schemes. *Can J For Res* 31:779–785.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE & Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-81.
- Lander ES & Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-99.
- Lynch M & Walsh B (1998) *Genetics and analysis of quantitative traits.* Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Marques CM, Vasquez-Kool J, Carocha VJ, Ferreira JG, O'Malley DM, Liu BH & Sederoff R (1999) Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*. *Theor Appl Genet* 99, 936-946.
- Marques CM, Carocha VJ, Pereira de Sá AR, Oliveira MR, Pires AM, Sederoff RR & Borralho NMG (2005) Verification of QTL linked markers for propagation traits in *Eucalyptus*. *Tree Genetics and Genomes* 1:103-108.

- Rae AM, Tricker PJ, Bunn SM & Taylor G (2007) Adaptation of tree growth to elevated CO₂: quantitative trait loci for biomass in *Populus*, *New Phytol* 175:59–69.
- Rae A, Pinel M, Bastien C, Sabatti M, Street N, Tucker J, Dixon C, Marron N, Dillen S & Taylor G (2008) QTL for yield in bioenergy *Populus*: identifying GxE interactions from growth at three contrasting sites. *Tree Genetics & Genomes* 4:1614-2950.
- Scotti- Saintagne C, Bodenes C, Barreneche T, Bertocchi E, Plomion C & Kremer A (2004) Detection of quantitative trait loci controlling bud burst and height growth in *Quercus robur* L. *Theoretical and Applied Genetics* 109:1648- 59.
- Sewell MM, Davis MF, Tuskan GA, Wheeler NC, Elam CC, Bassoni DL & Neale DB (2002) Identification of QTLs influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). II. Chemical wood properties. *Theor Appl Genet* 104:214–222.
- Strauss SH, Lande R & Namkoong G (1992) Limitations of molecular-marker-aided selection in forest tree breeding. *Can J For Res* 22:1050–1061.
- Tschaplinski TJ, Tuskan GA, Sewell MM, Gebre GM, Donald ETI & Pendley C (2006) Phenotypic variation and quantitative trait locus identification for osmotic potential in an interspecific hybrid inbred F-2 poplar pedigree grown in contrasting environments. *Tree Physiol* 26:595–604.
- Thamarus K, Groom K, Bradley A, Raymond CA, Schimleck LR, Williams ER & Moran GF (2004) Identification of quantitative trait loci for wood and fibre properties in two full-sib properties of *Eucalyptus globulus*. *Theor Appl Genet*. 109:856-864.
- Verhaegen D, Plomion C, Gion JM, Poitel M, Costa P & Kremer A (1997) 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.
- Voorrips RE (2002) MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The Journal of Heredity* 93:77-78.
- Wang S, Basten CJ & 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>).
- Wilcox PL, Carson SD, Richardson TE, Ball RD, Horgan GP & Carter P (2001) Benefit-cost analysis of DNA marker-based selection in progenies of *Pinus radiata* seed orchard parents. *Can J For Res* 31:2213–2224.

Wu R, Bradshaw Jr HD & Stettler RF (1998) Developmental quantitative genetics of growth in *Populus*. *Theoretical and Applied Genetics* 97:1110-1119.

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

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

CONCLUSÕES GERAIS

- Os marcadores microssatélites derivados de EST desenvolvidos neste estudo apresentam elevada transferibilidade interespecífica nas principais espécies plantadas do subgênero *Symphyomyrtus* possivelmente pelo fato dos iniciadores se localizarem em regiões transcritas e mais conservadas entre espécies;
- A estrutura do motivo de repetição do microssatélite não pode ser considerada como um indicador de polimorfismo;
- Os locos microssatélites derivados de EST apresentam conteúdo de informação menor, i.e. menor número de alelos, menor heterozigosidade esperada e menor PIC quando comparados aos locos derivados de bibliotecas genômicas enriquecidas;
- As estimativas de conteúdo de informação polimórfica, indicam que marcadores microssatélites derivados de EST podem ser incorporados com eficiência a painéis de marcadores a serem utilizados em estudos de parentesco, avaliação de diversidade genética, certificação de cruzamentos controlados, identidade clonal, mapeamento genético e seleção assistida por marcadores;
- QTLs de maior efeito para características de crescimento volumétrico e densidade da madeira são detectados em ambientes contrastantes em latitude, altitude, solos e clima;

- As regiões genômicas específicas contendo QTLs para características biologicamente correlacionadas também tendem a apresentar conservação entre ambientes distintos;
- Os QTLs para DAP, altura e profundidade de penetração do Pilodyn, localizados no grupo de ligação 6 do genitor UGL, são altamente estáveis entre diferentes ambientes e *backgrounds* genéticos;
- O QTL para DAP detectado no genitor DG para os cruzamentos DG x UGL e DG x U2 se expressa exclusivamente no ambiente de Guanhães e neste ambiente é estável entre diferentes *backgrounds*;
- Estes resultados fornecem regiões alvo interessantes para a seleção assistida dentro de famílias via seleção para QTLs ou ainda como ponto de partida para estudos de associação.

ANEXO

Tabela 1- Resultados apresentados pela análise de marca simples utilizando o programa QTL Cartographer. Marcadores associados a características fenotípicas avaliadas na população segregante DG x UGL e p valor da associação encontrada.

Característica	Genitor	Marcador	P value
DAP	DG	Embra662	0,042*
DAP	DG	Embra36	0,026*
DAP	DG	Embra1990	0,007**
DAP	DG	Embra979	0,002**
DAP	DG	Embra111	0,009**
DAP	DG	Embra209	0,002**
DAP	DG	Embra168	0,001***
DAP	DG	Embra1770	0,024*
DAP	DG	Embra48	0,008**
DAP	DG	Embra668	0,037*
DAP	DG	Embra3	0,029*
DAP	UGL	Embra632	0***
DAP	UGL	Embra6	0,012*
DAP	UGL	Embra676	0,009**
DAP	UGL	Embra11	0,027*
DAP	UGL	Embra122	0,03*
DAP	UGL	Embra19	0,031*
DAP	UGL	Embra372	0,011*
DAP	UGL	En16	0,011*
DAP	UGL	Embra8	0,015*
DAP	UGL	Embra950	0,037*
DAP	UGL	Embra87	0,002**
DAP	UGL	Embra669	0,001***
ALTURA	DG	Embra1990	0,019*
ALTURA	DG	Embra979	0,005**
ALTURA	DG	Embra111	0,013*
ALTURA	DG	Embra209	0,022*
ALTURA	DG	Embra168	0,029*
ALTURA	DG	Embra747	0,028*
ALTURA	DG	Embra651	0,019*
ALTURA	DG	Embra1966	0,019*
ALTURA	DG	Embra269	0,013*
ALTURA	UGL	Embra632	0,003**
ALTURA	UGL	Embra6	0,029*
ALTURA	UGL	Embra676	0,015*
ALTURA	UGL	Embra19	0,007**
ALTURA	UGL	Embra1643	0,02*
ALTURA	UGL	Embra372	0,022*
ALTURA	UGL	En16	0,011*
ALTURA	UGL	Embra8	0,012*
ALTURA	UGL	Embra950	0,031*

ALTURA	UGL	Embra87	0,022*
ALTURA	UGL	Embra669	0,005**
VOLUME	DG	Embra1990	0,025*
VOLUME	DG	Embra979	0,009**
VOLUME	DG	Embra111	0,048*
VOLUME	DG	Embra209	0,024*
VOLUME	DG	Embra168	0,021*
VOLUME	DG	Embra48	0,041*
VOLUME	DG	Embra668	0,038*
VOLUME	DG	Embra3	0,027*
VOLUME	DG	Embra53	0,048*
VOLUME	UGL	Embra632	0****
VOLUME	UGL	Embra6	0,004**
VOLUME	UGL	Embra676	0,004**
VOLUME	UGL	Embra11	0,032*
VOLUME	UGL	Embra19	0,015*
VOLUME	UGL	Embra1535	0,023*
VOLUME	UGL	Embra372	0,003**
VOLUME	UGL	En16	0,002**
VOLUME	UGL	Embra8	0,004**
VOLUME	UGL	Embra950	0,017*
VOLUME	UGL	Embra87	0,011*
VOLUME	UGL	Embra669	0,002**
LIGNINA	DG	Embra81	0,002**
LIGNINA	DG	Embra646	0,004**
LIGNINA	DG	Embra105	0,003**
LIGNINA	DG	Embra1070	0,012*
LIGNINA	DG	Embra324	0,043*
LIGNINA	DG	Embra173	0,034*
LIGNINA	DG	Embra997	0,011*
LIGNINA	DG	Embra51	0,014*
LIGNINA	UGL	Embra242	0,004**
LIGNINA	UGL	Embra618	0,003**
LIGNINA	UGL	Embra120	0,012*
LIGNINA	UGL	Embra41	0,01**
LIGNINA	UGL	Embra42	0,034*
RSG	DG	Embra6	0,025*
RSG	DG	Embra632	0,043*
RSG	DG	Embra81	0,021*
RSG	DG	Embra646	0,023*
RSG	DG	Embra105	0,007**
RSG	DG	Embra1070	0,03*
RSG	DG	Embra324	0,039*
RSG	DG	Embra997	0,025*
RSG	DG	Embra51	0,033*
RSG	DG	Embra941	0,015*

RSG	UGL	Embra242	0,014*
RSG	UGL	Embra618	0,009**
RD	DG	Embra63	0,001**
RD	DG	Embra72	0,017*
RD	DG	Embra390	0,017*
RD	DG	Embra333	0***
RD	DG	Embra1428	0,043*
RD	UGL	Embra6	0,004**
RD	UGL	Embra676	0,002**
RD	UGL	Embra11	0,001***
RD	UGL	Embra19	0,007**
RD	UGL	Embra242	0,005**
RD	UGL	Embra618	0,005**
RD	UGL	Embra41	0,019*
RD	UGL	Embra1990	0,027*
RD	UGL	Embra979	0,012*
RD	UGL	Embra111	0,013*
RD	UGL	Embra22	0,039*
RD	UGL	Embra269	0,006**
DB	DG	Embra72	0,004**
DB	DG	Embra126	0,035*
DB	DG	Embra915	0,011*
DB	DG	Embra172	0,011*
DB	DG	Embra390	0,003**
DB	DG	Embra333	0,009**
DB	DG	Embra27	0,03*
DB	DG	Embra48	0,014*
DB	DG	Embra153	0,023*
DB	UGL	Embra372	0,048*
DB	UGL	Embra8	0,002**
DB	UGL	Embra950	0,007**
DB	UGL	Embra997	0,018*
DB	UGL	Embra747	0,006**
DB	UGL	Embra651	0,002**
PILODYN	DG	Embra662	0,027*
PILODYN	DG	Embra36	0,016*
PILODYN	DG	Embra979	0,017*
PILODYN	DG	Embra111	0,018*
PILODYN	DG	Embra209	0,028*
PILODYN	DG	Embra168	0,031*
PILODYN	DG	Embra48	0,039*
PILODYN	DG	Embra1428	0,027*
PILODYN	DG	Embra747	0,035*
PILODYN	UGL	Embra632	0***
PILODYN	UGL	Embra11	0,011*
PILODYN	UGL	Embra945	0,046*

PILODYN	UGL	Embra58	0,011*
PILODYN	UGL	Embra242	0,01**
PILODYN	UGL	Embra618	0,011*
PILODYN	UGL	Embra120	0,013*
PILODYN	UGL	Embra28	0,007**
PILODYN	UGL	Embra1535	0,012*
PILODYN	UGL	Embra372	0,001***
PILODYN	UGL	En16	0,002**
PILODYN	UGL	Embra42	0,028*
PILODYN	UGL	Embra121	0,003**
PILODYN	UGL	Embra69	0,037*
PILODYN	UGL	Embra941	0,025*
PILODYN	UGL	Embra669	0,036*

Tabela 2- Resultados apresentados pela análise de marca simples utilizando o programa QTL Cartographer. Marcadores associados a características fenotípicas avaliadas na população segregante C1 x UGL e p valor da associação encontrada.

Característica	Genitor	Marcador	P value
DAP	C1	Embra2000	0,023 *
DAP	C1	Embra36	0,020 *
DAP	UGL	En6	0,048 *
DAP	UGL	Embra350	0,002 **
DAP	UGL	Embra122	0,002 **
DAP	UGL	En16	0,010 *
ALTURA	C1	Embra645	0,033 *
ALTURA	C1	Eg128	0,028 *
ALTURA	C1	Embra36	0,008 **
ALTURA	UGL	Embra56	0,043 *
ALTURA	UGL	En6	0,014 *
ALTURA	UGL	Embra350	0,001 ***
ALTURA	UGL	Embra122	0,001 ***
ALTURA	UGL	Embra645	0,001 **
ALTURA	UGL	En16	0,000 ****
ALTURA	UGL	Embra8	0,009 **
ALTURA	UGL	Embra50	0,009 **
ALTURA	UGL	Embra950	0,035 *
VOLUME	C1	Embra2000	0,040 *
VOLUME	C1	Embra648	0,045 *
VOLUME	C1	Embra645	0,018 *
VOLUME	C1	Eg128	0,023 *
VOLUME	C1	Embra36	0,001 **
VOLUME	UGL	En6	0,035 *
VOLUME	UGL	Embra350	0,001 ***
VOLUME	UGL	Embra122	0,001 ***
VOLUME	UGL	En16	0,004 **

VOLUME	UGL	Embra40	0,024 *
LIGNINA	UGL	Embra645	0,013 *
LIGNINA	UGL	Embra45	0,016 *
LIGNINA	UGL	Embra28	0,030 *
DB	C1	Embra122	0,019 *
DB	C1	Embra350	0,019 *
RSG	UGL	Embra28	0,015 *
RSG	UGL	Embra203	0,020 *
RD	UGL	Embra1474	0,001 ***
RD	UGL	Embra28	0,001 ***
PILODYN	C1	Embra645	0,014 *
PILODYN	C1	Embra47	0,047 *
PILODYN	C1	Embra40	0,042 *
PILODYN	UGL	Eg128	0,021 *
PILODYN	UGL	Embra179	0,049 *
PILODYN	UGL	Embra1474	0,009 **
PILODYN	UGL	En16	0,016 *
PILODYN	UGL	Embra950	0,000 ***

Tabela 3- Resultados apresentados pela análise de marca simples utilizando o programa QTL Cartographer. Marcadores associados a características fenotípicas avaliadas na população segregante DG x U2 e p valor da associação encontrada.

Característica	Genitor	Marcador	P value
DAP	DG	Embra120	0,02*
DAP	DG	Embra914	0,01*
DAP	DG	Embra388	0,000***
DAP	DG	Embra1451	0,0000****
DAP	DG	Embra45	0,0000****
DAP	DG	Embra5	0,000***
DAP	DG	Embra1924	0,001***
DAP	DG	Embra47	0,025*
DAP	DG	Embra629	0,044*
DAP	DG	Embra18	0,002**
DAP	DG	Embra210	0,000***
DAP	U2	Embra201	0,046*
DAP	U2	Embra695	0,003**
DAP	U2	Embra1451	0,045*
DAP	U2	Embra1535	0,043*
DAP	U2	Embra105	0,009**
DAP	U2	Embra2014	0,046*
DAP	U2	Embra22	0,034*
ALTURA	DG	Embra120	0,05*
ALTURA	DG	Embra914	0,005**
ALTURA	DG	Embra388	0,001**
ALTURA	DG	Embra1451	0,003**

ALTURA	DG	Embra45	0,002**
ALTURA	DG	Embra5	0,001**
ALTURA	DG	Embra47	0,002**
ALTURA	DG	Embra18	0,012*
ALTURA	DG	Embra210	0,011*
ALTURA	U2	Embra695	0,007**
ALTURA	U2	Eg96	0,022*
ALTURA	U2	Embra2055	0,033*
ALTURA	U2	Embra1535	0,014*
ALTURA	U2	Embra105	0,008**
ALTURA	U2	Es157	0,03*
VOLUME	DG	Embra120	0,034*
VOLUME	DG	Embra914	0,022*
VOLUME	DG	Embra388	0,003**
VOLUME	DG	Embra1451	0,000****
VOLUME	DG	Embra45	0,000***
VOLUME	DG	Embra5	0,001***
VOLUME	DG	Embra1924	0,001***
VOLUME	DG	Embra47	0,015*
VOLUME	DG	Embra941	0,02*
VOLUME	DG	Embra1977	0,002**
VOLUME	DG	Embra629	0,001***
VOLUME	DG	Embra18	0,000****
VOLUME	DG	Embra210	0,000****
VOLUME	U2	Embra695	0,03*
VOLUME	U2	Embra242	0,019*
VOLUME	U2	Embra2055	0,04*
VOLUME	U2	Embra1535	0,028*
VOLUME	U2	Embra105	0,013*
VOLUME	U2	Embra22	0,044*
LIGNINA	DG	Embra63	0,001**
LIGNINA	DG	Embra43	0,001***
LIGNINA	DG	Embra915	0,001***
LIGNINA	DG	Embra172	0,001***
LIGNINA	DG	Embra390	0,001***
LIGNINA	DG	Embra333	0,001***
LIGNINA	DG	Embra201	0,036*
LIGNINA	DG	Embra210	0,004**
LIGNINA	DG	Embra61	0,03*
LIGNINA	U2	Embra695	0,008**
LIGNINA	U2	Embra4	0,027*
LIGNINA	U2	Embra1451	0,033*
RSG	DG	Embra63	0,000****
RSG	DG	Embra43	0,000****
RSG	DG	Embra915	0,000****
RSG	DG	Embra172	0,000****

RSG	DG	Embra390	0,000****
RSG	DG	Embra333	0,000****
RSG	DG	Embra201	0,001***
RSG	DG	Embra695	0,049*
RSG	DG	Embra648	0,049*
RSG	DG	Embra324	0,022*
RSG	DG	Embra941	0,011*
RSG	DG	Embra1977	0,017*
RSG	DG	Embra629	0,016*
RSG	DG	Embra18	0,005**
RSG	DG	Embra210	0,003**
RSG	DG	Embra61	0,009**
RSG	DG	Embra153	0,024*
RSG	U2	Embra695	0,009**
RSG	U2	Embra4	0,049*
RSG	U2	Embra1451	0,026*
RSG	U2	Embra22	0,036*
RSG	U2	Embra127	0,025*
RD	DG	Embra915	0,042*
RD	DG	Embra172	0,042*
RD	DG	Embra390	0,016*
RD	DG	Embra333	0,022*
RD	DG	Embra324	0,032*
RD	DG	Embra47	0,018*
RD	DG	Embra153	0,034*
RD	U2	Embra695	0,018*
RD	U2	Embra210	0,018*
DB	DG	Embra63	0,028*
DB	DG	Embra915	0,02*
DB	DG	Embra172	0,02*
DB	DG	Embra390	0,011*
DB	DG	Embra333	0,016*
DB	DG	Es157	0,023*
DB	U2	Embra4	0,01*
PILODYN	DG	Embra3	0,049*
PILODYN	U2	Embra43	0,031*
PILODYN	U2	Embra915	0,031*
PILODYN	U2	Embra172	0,029*
PILODYN	U2	Embra2055	0,013*
PILODYN	U2	Embra1535	0,001***
PILODYN	U2	Embra950	0,034*
