

RODRIGO BARROS ROCHA

**MAPEAMENTO DE QTL'S PARA CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DA
MADEIRA E DE CRESCIMENTO EM HÍBRIDOS (*Eucalyptus grandis* x
Eucalyptus urophylla).**

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

Viçosa
Minas Gerais – Brasil
2004

RODRIGO BARROS ROCHA

**MAPEAMENTO DE QTL'S PARA CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DA
MADEIRA E DE CRESCIMENTO EM HÍBRIDOS (*Eucalyptus grandis* x
Eucalyptus urophylla).**

APROVADA: 16 de fevereiro de 2004.

Prof. Cosme Damião Cruz

(Conselheiro)

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros

(Conselheiro)

Prof. Marisa Vieira de Queiroz

Prof. João Marcos de Araújo.

Prof. Elza Fernandes de Araújo.

(Orientadora)

A Deus, meu guia.

Aos meus pais Danilo e Graça, exemplos de vida, e meus irmãos Daniela e Rafael, de quem também sinto saudades.

A minha esposa e companheira Roseane e meu filho Pedro, minha inspiração.

AGRADECIMENTOS

Deixo meus sinceros agradecimentos as seguintes pessoas e instituições sem as quais o presente trabalho seria impossível.

A Universidade Federal de Viçosa e a CAPES pela oportunidade de concluir a minha formação.

A Prof. Elza Fernandes de Araújo pela dedicação e orientação constante em todas as etapas de minha formação.

Ao Prof. Cosme Damião Cruz, também orientador deste trabalho, pelo estímulo, contribuições e amizade.

Ao Prof. Everaldo Gonçalves de Barros pelas contribuições minuciosas e por ter participado da minha formação como um todo.

A Prof. Marisa Vieira de Queiróz e Prof. João Marcos de Araújo não somente por terem feito parte da minha banca de defesa de tese mas por terem contribuído em minha formação.

A empresa CENIBRA CELULOSE S/A pela pesquisa em parceria, em especial, aos profissionais, Everton de Souza e David Fernandes pela participação pessoal neste trabalho.

A Júpiter Israel Muro Abad pela grande amizade e por todos os anos de aprendizado na iniciação científica.

Aos companheiros(as) e amigos(as) do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, de Bioinformática e de curso pela convivência e por toda a contribuição recebida ao longo destes dois anos.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Viçosa, em especial as funcionárias da secretaria de genética e melhoramento Rita e Conceição e os funcionários Evandro e Danilo pela atenção e amizade.

Aos meus pais Danilo Rocha e Maria das Graças Barros Rocha, exemplos de minha vida.

A minha esposa e companheira Roseane, pelo amor, carinho e apoio dados durante todas as etapas deste trabalho.

A Deus, meu guia.

BIOGRAFIA

Rodrigo Barros Rocha, filho de Maria das Graças Barros Rocha e Danilo Rocha, nasceu em Viçosa - MG, em 28 de setembro de 1978.

Em 1997 formou-se no COLUNI, Viçosa - MG.

Em 1998 ingressou na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, no curso de Ciências Biológicas, concluindo-o em Setembro de 2002.

Iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento em Setembro de 2002, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese no dia 16 de Fevereiro de 2004.

CONTEÚDO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 As espécies <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Eucalyptus urophylla</i>	3
2.2 Características de tecnologia da madeira.....	4
2.3 Marcadores moleculares.....	7
2.4 Mapeamento genético.....	10
2.5 Detecção de QTL´s.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Material genético.....	17

3.2 Dados quantitativos.....	17
3.3 Construção do mapa de ligação e identificação de QTL´s.....	18
3.3.1 Extração e quantificação do DNA total.....	18
3.3.2 Amplificação e análise por marcadores RAPD.....	19
3.3.3 Construção de mapa de ligação.....	19
3.3.4 Identificação e mapeamento dos QTL´s.....	20
3.3.5 Determinação do nível de significância.....	21
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Detecção de polimorfismos e seleção dos oligonucleotídeos RAPD.....	22
4.2 Construção do mapa de ligação.....	26
4.3 Características quantitativas.....	36
4.4 Mapeamento dos QTL´s.....	41
4.4.1 Mapeamento dos QTL´s – Características de qualidade da madeira: densidade.....	42
4.4.2 Mapeamento dos QTL´s – Características de qualidade da madeira: rendimento de polpa.....	45
4.4.3 Mapeamento dos QTL´s – Características de qualidade da madeira: teor de extrativos.....	48
4.4.4 Mapeamento dos QTL´s – Características de qualidade da madeira: teor de lignina insolúvel.....	51
4.4.5 Mapeamento dos QTL´s – Características de qualidade da madeira: teor de lignina solúvel.....	55

4.4.6 Mapeamento dos QTL's – Características de crescimento da madeira: D.A.P.....	57
4.4.7 Mapeamento dos QTL's – Características de crescimento da madeira: altura comercial.....	60
4.5 Seleção assistida.....	63
5. CONCLUSÕES.....	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
7. ANEXO.....	75

RESUMO

ROCHA, Rodrigo Barros, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004. **Mapeamento de QTL'S para características de qualidade da madeira e de crescimento em híbridos (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*)**. Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Conselheiros: Cosme Damião Cruz e Everaldo Gonçalves de Barros.

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização e identificação de QTL's para características de crescimento e de qualidade da madeira em híbridos de eucalipto derivados do cruzamento *E.grandis* e *E. urophylla*. Para isto foi desenvolvido um mapa de ligação RAPD, pouco saturado, para os híbridos (LOD = 3 e $r = 0,40$) contendo 52 marcas e 12 grupos de ligação. Foram utilizados 90 indivíduos de população F1, "pseudotestcross" e 176 marcadores RAPD, a partir da amplificação com 63 oligonucleotídeos decâmeros de seqüência arbitrária. As características de qualidade da madeira densidade; rendimento de polpa; teor de extrativos; teor de lignina insolúvel, teor de lignina solúvel determinadas em espectrofotômetro de infravermelho e as características de crescimento, diâmetro altura do peito (D.A.P.); altura total, altura comercial; foram avaliadas quanto a presença de QTL's. As análises de QTL foram feitas utilizando os testes: de segregação do χ^2 , mapeamento por marca simples, mapeamento por intervalo simples e mapeamento por intervalo composto. Todas as análises geraram resultados consistentes que indicam 9

QTL's relacionados com a expressão de 7 das 8 características avaliadas, respectivamente: 1 QTL para densidade, 1 QTL para rendimento de polpa e 2 QTL's para teor de extrativos confirmados pelas metodologias de mapeamento por intervalo simples e composto e 1 QTL para teor de lignina solúvel, 2 QTL's para teor de lignina insolúvel, 1 QTL para D.A.P. e 1 QTL para altura total confirmados apenas pela metodologia de mapeamento por intervalo composto. A sobreposição de QTL's em determinadas regiões dos grupos de ligação pode ser resultado da existência de regiões do genoma mais importantes para o crescimento e desenvolvimento da planta sugerindo a existência de blocos gênicos de maior efeito relacionados com a regulação e controle das características estudadas.

ABSTRACT

ROCHA Rodrigo Barros, , M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2004. **Use of RAPD molecular markers for mapping and identification of QTL'S related with the expression of wood quality characteristics in hybrids (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*).** Advisor: Elza Fernandes de Araújo. Committee Members: Cosme Damião Cruz and Everaldo Gonçalves de Barros.

The present work aimed to characterize and identify QTL's for wood quality and growth characteristics in *E. grandis* x *E. urophylla* hybrids. For this purpose a RAPD linkage map was developed for the hybrids (LOD = 3 and $r = 0.40$), containing 52 markers and 12 linkage groups. For the map development, 176 RAPD markers from 63 random primers were used in a F1 full siblings population of 90 plants. Characteristics related to wood quality such as: density, cellulose pulp yield, percentage of extractives, percentage of insoluble lignin, percentage of soluble lignin, determined in a near infrared spectrophotometer - NIRS and the growth characteristics: circumference at breast height (CBH), total height, and commercial height were used in the QTL analyses. QTL's analyzes were performed using chi-square tests, single-marker analysis, interval mapping and composite interval mapping analyses. All approaches led to the identification of similar QTL's, respectively: one QTL associated with wood density, two for cellulose pulp yield and two for percentage of extractives, were detected and confirmed by the interval mapping and composite interval

mapping. One QTL associated with percentage of soluble lignin, two for percentage of insoluble lignin, one for C.B.H. and one for total height confirmed only by the composite interval mapping methodology. The QTL's overlapping can be the result of major genes involved in the regulation and control of the growth traits by epistatic interactions with other genes.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente as espécies do gênero *Eucalyptus* (Myrtaceae) são as mais utilizadas em reflorestamentos no país e representam cerca de 60% de uma área total de quase 5 milhões de hectares reflorestados. Esta condição faz do Brasil o país com a maior área de povoamentos florestais de *Eucalyptus* e um dos maiores produtores de celulose fibra curta.

Para atender a alta demanda por matéria prima de qualidade para a produção de papel e celulose, características tecnológicas da madeira vem sendo, mais recentemente, priorizadas nos programas de melhoramento florestal. Estudos das características tecnológicas da madeira são em geral limitados pela dificuldade de sua avaliação, que somente pode ser realizada em plantas adultas e em laboratórios com uma infra-estrutura apropriada. O desenvolvimento de técnicas modernas de mensuração, como as na absorção da luz infravermelha, vem permitindo a automatização do processo de avaliação de características de qualidade da madeira. No entanto, poucos estudos foram feitos para elucidar a natureza da herança destas características, apesar da sua importância para os programas de melhoramento florestais,.

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular tem disponibilizado aos melhoristas novos recursos que se somam àqueles já empregados tradicionalmente em programas de melhoramento. Estudos de herança e variação de características quantitativas têm sido realizados com o

emprego destas metodologias, que visam, em curto prazo, recomendar cruzamentos utilizando a informação de diversidade genética e a médio e longo prazo monitorar a herança complexa de características quantitativas utilizando poucas marcas de segregação mendeliana. Neste contexto estudos de variabilidade genética e o de desenvolvimento de mapas genéticos utilizando informações de marcadores moleculares permitem o direcionamento de cruzamentos específicos e predição da herança das características visando à obtenção das melhores combinações específicas.

O presente trabalho teve como objetivos: construir um mapa de ligação para híbridos derivados do cruzamento entre *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*, utilizando marcadores moleculares RAPD, e detectar locos candidatos controladores de características quantitativas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As espécies *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*

Atualmente as espécies do gênero *Eucalyptus* (Myrtaceae) são as mais utilizadas em reflorestamentos no país, destacam-se pelo rápido crescimento, facilidade de manejo e boas características tecnológicas (CÂNCIO, 1998). O interesse crescente pela madeira das árvores do gênero *Eucalyptus* é refletida na expansão da área de cultivo, que aumentou em mais de três milhões de hectares no período entre 1985 e 1994 (ABRACAVE, 1996), e nos programas de melhoramento realizados visando à obtenção de matéria prima de melhor qualidade. O Brasil possui a maior área de povoamentos florestais de *Eucalyptus* do mundo, e também se destaca no mercado mundial como um dos maiores produtores de celulose de fibra curta (dados do MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR – acessado em 2003, <http://www.mdic.gov.br>).

O *Eucalyptus* foi introduzido no Brasil há mais de um século, no Jardim Botânico do Rio de Janeiro pelo Engenheiro-Silvicultor Dr. Edmundo Navarro de Andrade para atender à demanda por madeira como fonte de energia para as locomotivas a vapor da Companhia Paulista de Estradas de Ferro (FERREIRA, 1992). Sua grande distribuição pode ser justificada pela sua agressividade e rusticidade aliadas a seus diversos usos, como produção de

madeira para celulose, carvão, serrarias e extração de óleos essenciais (RAMALHO, 1995). O principal uso da madeira dos reflorestamentos plantados no Brasil destina-se à produção de celulose fibra curta, amplamente utilizada no mundo, principalmente, para a produção de papel.

O gênero *Eucalyptus* contém cerca de 800 espécies arbóreas, incluindo variedades e híbridos naturais da Austrália e ilhas vizinhas como Nova Guiné e Indonésia, pertence à subtribo *Eucalyptinae*, tribo *Leptospermeae*, subfamília *Leptospermoideae*, família *Myrtaceae* (ARAÚJO et al., 2002). O eucalipto é uma espécie predominantemente alógama que apresenta hibridização interespecífica natural.

As espécies *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis* e o híbrido derivado do cruzamento entre as mesmas são de grande importância para a produção de celulose de fibra curta no Brasil. Estas espécies possuem ampla capacidade de adaptação às condições tropicais, aliada a tolerância ao patógeno causador do Cancro do Eucalipto (FERREIRA, 1992). A obtenção de um híbrido entre estas duas espécies, que apresente suas melhores características, é uma das principais estratégias empregadas em programas de melhoramento, uma vez que o processo de recombinação permite, nesse caso, a obtenção de híbridos que apresentam características desejadas de ambas as espécies: resistência a doenças e alta adaptação do *E. urophylla*, associada ao rápido crescimento e alta qualidade da madeira do *E. grandis* (CÂNCIO, 1998).

2.2. Características de tecnologia da madeira

Diferente das espécies, tradicionalmente agronômicas, que sofreram seleção por centenas ou até milhares de anos, espécies florestais como o *Eucalyptus* foram selecionadas por poucas gerações e por isto conservam grande parte da variabilidade genética inerente à espécie (ZOBEL & JETT, 1995). As características de maior interesse econômico, como volume, densidade da madeira, conteúdo de pentosanas, teor de lignina, entre outras, são quantitativas e a sua herança depende da segregação de muitos genes de efeitos variados, com expressão afetada pelo ambiente (THODAY, 1961). A manipulação genética de características quantitativas e o longo ciclo das

espécies florestais constituem uma das maiores limitações de um programa de melhoramento florestal (ZOBEL & JETT, 1995).

Atualmente, para atender à demanda por matéria prima de qualidade para a produção de papel e celulose, características de tecnológicas da madeira vem sendo priorizadas nos programas de melhoramento (MURO ABAD, 2000). No Brasil a maioria das fibras utilizadas na fabricação de pastas celulósicas são provenientes de árvores do grupo das dicotiledôneas, dentre as quais as mais importantes se encontram no gênero *Eucalyptus*, e das coníferas (família Gymnospermae). Dentre as características de maior interesse se destacam a densidade da madeira, percentuais de celulose, hemicelulose, lignina e extrativos, além das relacionadas com a anatomia da madeira como comprimento de vasos e percentual de casca (D' ALMEIDA, 1981). Em geral, as características de qualidade da madeira para produção de papel e celulose apresentam valores de herdabilidade mais elevados do que as características de crescimento como D.A.P. e altura, por exemplo. Segundo ZOBEL & JETT, (1995), isto se deve ao fato de que as características de qualidade da madeira para produção de papel estão diretamente relacionadas com características anatômicas, que em geral, são de alta herdabilidade. Estudos mais detalhados citados por ZOBEL & JETT, (1995), encontraram os seguintes valores de herdabilidades em sentido amplo para as características (TABELA 1):

TABELA 1: Valores de herdabilidade em sentido amplo para características de qualidade da madeira.

Autor	Espécie	Característica	Herdabilidade
BERTOLUCCI, 1992	<i>E. grandis</i>	Rendimento de polpa	0,46
BERTOLUCCI, 1992	<i>E. grandis</i>	Teor de pentosanas	0,95
BERTOLUCCI, 1992	<i>E. grandis</i>	Densidade	0,89
EINSPHR, 1964	<i>Populus tremuloides</i>	Teor de lignina	0,72
ZOBEL, 1973	<i>Pinus sp.</i>	Teor de extrativos	0,51

Tais magnitudes de herdabilidade permitem que procedimentos de seleção baseada no indivíduo: tais como seleção massal e testes clonais,

gerem ganhos satisfatórios no melhoramento de características de qualidade da madeira.

Segundo D´ ALMEIDA, et al. (1981), as propriedades físico-químicas da madeira empregada no cozimento, mais do que qualquer outra variável do processo é responsável por grandes diferenças na qualidade e nas propriedades da pasta celulósica.

A densidade da madeira e os percentuais de celulose e hemicelulose são caracteres diretamente correlacionados com o rendimento da polpa celulósica. A massa específica ou densidade da madeira expressa em gramas por centímetro cúbico pode ser utilizada como um fator de conversão madeira/polpa celulósica. As madeiras mais densas são as preferidas para o procedimento de polpação por proporcionarem maior carga por volume (D´ ALMEIDA et al., 1981). A celulose, o principal componente das paredes celulares das fibras, é um polissacarídeo linear, constituído por um único tipo de unidade de açúcar; de grande importância uma vez que o rendimento da polpa é proporcional ao teor de celulose da madeira (STRYER; 1988). Também importantes, as hemiceluloses, que são polissacarídeos constituídas por vários tipos de subunidades de açúcar, apresentando polímeros ramificados de cadeia mais curta (STRYER; 1988). A proporção de hemicelulose na madeira também está positivamente correlacionada com a qualidade e rendimento da polpa (D´ ALMEIDA et al., 1981).

Por outro lado, outras características são também importantes e devem ser selecionadas por estarem negativamente correlacionadas com o rendimento da polpa celulósica. Altos percentuais de lignina e extrativos, por exemplo, não são desejados por aumentarem os custos da polpação (D´ ALMEIDA et al., 1981). Considerando que a deslignificação da madeira é uma etapa crucial, altos percentuais de lignina, contribuem para o aumento indesejável na quantidade de dióxido de enxofre necessária para a dissolução da lignina (D´ ALMEIDA et al., 1981). Os extrativos por sua vez, são constituídos de diferentes compostos orgânicos como ácidos voláteis e resinosos, óleos voláteis, ácidos graxos, esteróides entre outras substâncias orgânicas que alteram a qualidade da polpa (D´ ALMEIDA et al., 1981).

As características de tecnologia da madeira são de difícil mensuração, só podem ser avaliadas em plantas adultas e em laboratórios com a infra-

estrutura apropriada para cada um dos testes. Poucos estudos moleculares visando elucidar a natureza da herança destas características foram feitos até agora

Grandes mudanças nos procedimentos de análise de tecnologia da madeira ocorreram na década de 90 mediante a aplicação da tecnologia de absorção da luz infravermelha; principalmente porque esta metodologia permite a automatização de todo o processo (ANTTI, H, 1999). O emprego da tecnologia de absorção da luz infravermelha para separar e quantificar moléculas não é recente, e vem sendo utilizada desde 1965 para quantificação de misturas em produtos alimentícios (ANTTI, H, 1999). As tecnologias baseadas na utilização da luz infravermelha, do inglês N.I.R. ("Near-Infrared"), se baseiam no princípio de que diferentes tipos de moléculas são capazes de absorver diferencialmente a luz infravermelha.

Medidas da absorção diferencial da luz infravermelha permitem quantificar os principais componentes da polpa celulósica: celulose, hemicelulose, lignina e extrativos. É interessante destacar que as estimativas obtidas pela metodologia de NIR apresentam correlações superiores a 80% com as análises tradicionais de qualidade da madeira (ANTTI, H, 1999).

2.3. Marcadores moleculares

O advento de técnicas de marcadores moleculares em meados da década de 80 disponibilizaram ferramentas de grande impacto para o controle e auxílio dos programas de melhoramento (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores moleculares possibilitam verificar as diferenças entre dois indivíduos a partir das suas seqüências de DNA, se destacam por permitirem o isolamento do efeito ambiental e a caracterização genética da população em qualquer fase do desenvolvimento. Em sistemas biológicos onde os indivíduos apresentam longos ciclos de vida e as características de interesse são em geral de baixa herdabilidade, como o observado em espécies florestais, o ganho genético resultado da utilização de marcadores é potencializado (YOUNG & BOYLE & BOSHIER; 2000).

Atualmente diversas técnicas permitem a obtenção de um número praticamente ilimitado de marcadores moleculares que podem ser utilizados

com diferentes finalidades em um programa de melhoramento genético vegetal. Se um marcador apresentar comportamento de acordo com as leis básicas de herança enunciadas por Mendel, ele será um “marcador genético” e poderá ser monitorado ao longo das gerações (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre as técnicas de marcadores disponíveis se destacam as técnicas baseadas na reação de PCR (“Polymerase Chain Reaction”). A reação de PCR permite a replicação “in vitro” de fragmentos de DNA resultando em grandes quantidades destes fragmentos a partir de poucas moléculas iniciais de DNA. A técnica de PCR conforme idealizada e desenvolvida por Kary Mullis em meados da década de 80, envolve a amplificação de uma região específica do DNA de sequência conhecida utilizando oligonucleotídeos complementares que flanqueiam a região alvo (MULLIS, 1987). O conhecimento prévio da região a ser amplificada é uma das principais limitações da técnica, pois impossibilita o estudo simultâneo de muitos locos. O PCR ocorre em três ciclos de temperaturas onde oligonucleotídeos de sequência específica são utilizados como iniciadores para a síntese de uma fita de DNA complementar a região alvo.

Uma variante da técnica de PCR foi descrita por dois grupos independentes e quase ao mesmo tempo (WELSH et al, 1990 e WILLIAMS et. al. 1990) utilizando iniciadores de sequência arbitrária, não requer o conhecimento prévio da sequência alvo a ser amplificada. A técnica de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) utiliza um único iniciador de sequência arbitrária, que flanqueia em sentidos opostos, regiões aleatórias do genoma de um organismo. Se entre dois indivíduos houver diferenças nos locais de pareamento do iniciador, eles produzirão diferentes padrões de amplificação (JAUHAR, 1996). A análise por RAPD considera a presença de bandas resultantes da amplificação como semelhança, e a ausência da banda em um indivíduo e presença em outro como dissemelhança. A técnica de RAPD foi utilizada para a detecção de QTL’s em diferentes espécies vegetais, pois possibilita alta cobertura do genoma, de resultados rápidos e menor de custo financeiro comparado com outras técnicas de marcadores permite a análise simultânea de grande número de genótipos (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994; BYRNE et al., 1995, NESBITT et al., 1995). A metodologia de RAPD ainda se destaca por permitir a obtenção de marcadores em qualquer

organismo estudado. A principal limitação da técnica diz respeito ao baixo conteúdo de informação por loco, o RAPD é um marcador dominante, não permite a discriminação precisa dos indivíduos heterozigotos, exigindo a utilização de vários iniciadores para a detecção do polimorfismo entre indivíduos mais aparentados (ROCHA, 2002).

Também baseados na reação de PCR, destacam-se os marcadores moleculares microssatélites. Os marcadores microssatélites são obtidos através da amplificação de regiões repetitivas do genoma utilizando iniciadores específicos, e se caracterizam pela alta repetibilidade entre laboratórios, multialelismo e co-dominância. Os microssatélites são considerados por muitos autores como uma das metodologias de marcadores moleculares mais robustas atualmente a disposição do melhorista (BRONDANI et al., 1998; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). A necessidade de desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos representa a principal limitação desta metodologia, tendo em vista a considerável quantidade de recursos necessários para o desenvolvimento e aquisição destes oligonucleotídeos de aplicação limitada a espécie ou ao gênero do organismo para o qual foram desenvolvidos.

Marcadores moleculares podem ser utilizados com diferentes finalidades em programas de melhoramento florestal. Por permitir a obtenção de um padrão de bandas exclusivo para cada indivíduo (“fingerprint”) facilita procedimentos de proteção de cultivares (BRONDANI et al., 1998), permite a confirmação de cruzamentos controlados e da identidade clonal (LAIA et al., 1996) seleção de genitores (DIAS et al. 2001, MURO ABAD, 2000), análise de diversidade genética (ROCHA et al. 2002, MURO ABAD et al.; 2000b), construção de mapa de ligação gênica (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994) e localização de marcadores para características de importância econômica (VERHAEGEN et al., 1997) entre outras aplicações.

O objetivo geral da utilização de marcadores moleculares é incrementar o ganho genético por unidade de tempo (MURO ABAD, 2000). A utilização de marcadores moleculares associados às características de expressão controlada por muitos genes, pode potencialmente aumentar a eficiência e reduzir o tempo dos ciclos de seleção (VERHAEGEN et al., 1997). A construção de mapas de ligação utilizando marcadores moleculares é uma estratégia que

vem sendo utilizada para detecção de locos relacionados com a expressão de características quantitativas (QTL's sigla do inglês "Quantitative Trait Loci).

2.4 Mapeamento Genético

Depois da redescoberta do trabalho de Mendel (MENDEL, 1866), em 1900, várias pesquisas foram realizadas visando ampliar e validar suas conclusões, a respeito do mecanismo de herança de características qualitativas. BATESON e PUNNET (1905), citados por STUTERVANT (1965), trabalhando com as características, cor da flor e formato do grão de pólen em ervilha, publicaram um dos primeiros relatos de ligação gênica ("genetic linkage"). No entanto, o primeiro trabalho a sugerir que a distribuição gênica não independente é devida a localização dos genes nos cromossomos e a eventos de trocas de segmentos entre as moléculas de DNA foi publicado por MORGAN (1910). Ao analisar o padrão de herança de um gene mutante ligado ao sexo, para a cor dos olhos em *Drosophila melanogaster*, MORGAN forneceu a primeira evidência de que os genes estão localizados em posições definidas nos cromossomos e que podem ser manipulados e estudados experimentalmente.

Historicamente mapas de ligação foram pouco utilizados no auxílio à seleção em programas de melhoramento, até mesmo em espécies bem estudadas como milho, *Zea mays*, e o tomate, *Lycopersicon spp.* (LEE, 1995). O tipo de marcador utilizado para o mapeamento (alterações citológicas estruturais) e a falta de mapas integrados que relacionem vários tipos de marcadores são, segundo LEE (1995), as principais dificuldades para a utilização de mapas genéticos em programas de melhoramento. O número reduzido de marcadores citológicos e fenotípicos faz com que a probabilidade de encontrar um marcador relacionado com características de interesse seja reduzida, dificultando o mapeamento genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A disponibilidade de marcadores genéticos neutros cuja herança pode ser acompanhada sem influência do ambiente tem permitido a construção de mapas de ligação para várias espécies vegetais (FERREIRA &

GRATTAPAGLIA, 1998). Por sua praticidade e capacidade de discriminação de inúmeras marcas, o desenvolvimento de técnicas com marcadores moleculares resultaram em um aumento significativo da importância dos mapas genéticos para o auxílio à seleção em programas de melhoramento (LEE, 1995). Grandes esforços vêm sendo empregados na integração dos mapas construídos com diferentes marcadores visando a identificação dos locos relacionados com a expressão de características quantitativas (BYRNE et al. 1995).

A construção de um mapa de ligação envolve a aplicação de técnicas de biologia molecular a conceitos originais da genética mendeliana. O desenvolvimento de mapas de ligação é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores na análise genética das espécies para o melhoramento de plantas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). A detecção de marcadores relacionados com a expressão de características quantitativas (QTL's), a identificação de regiões específicas do genoma e a quantificação de sua interferência na expressão do fenótipo são informações de aplicação em programas de melhoramento (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF; 1994, BYRNE et al., 1997a; VERHAEGEN et al., 1997).

Em geral o primeiro passo na construção de um mapa de ligação refere-se à escolha dos cruzamentos de forma a maximizar o polimorfismo genético (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994, VERHAEGEN et al., 1997). Uma vez selecionados os genitores, o desenvolvimento de uma progênie segregante composta de algumas dezenas ou centenas de indivíduos é necessária. Tradicionalmente a população segregante analisada para a construção do mapa de ligação é derivada do retrocruzamento ou da autofecundação da geração F1 proveniente do cruzamento de dois genitores selecionados.

O grande ciclo de vida e a perda de vigor, resultado de cruzamentos endogâmicos característico das espécies alógamas, dificultam a utilização de estratégias que dependam da progênie de segunda ou terceira geração e procedimentos de autofecundação e retrocruzamentos em *Eucalyptus* (GRATTAPAGLIA et al. 1994). Uma estratégia alternativa que envolve a análise diretamente da população F1 foi utilizada por GRATTAPAGLIA et al. (1994) para a confecção de um mapa de ligação a partir de uma geração F1

composta por 62 híbridos de um cruzamento entre *E. grandis* e *E. urophylla*. A alta porcentagem de locos em heterozigose, como o observado nas espécies do gênero *Eucalyptus*, permite este tipo de análise que se justifica pela praticidade e ganho de tempo (GRATTAPAGLIA et al. 1994).

O primeiro mapa de ligação construído utilizando marcadores moleculares RAPD para o gênero *Eucalyptus* foi publicado em 1994 (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994); neste trabalho foram analisados 62 indivíduos da F1 de um cruzamento controlado entre *E. grandis* e *E. urophylla*. No ano seguinte GRATTAPAGLIA et al. (1995) publicaram quais destes marcadores mapeados estavam correlacionados com o controle de características relacionadas com a propagação vegetativa em *Eucalyptus*. Um segundo mapa de ligação foi publicado em 1996 (VERHAEGEN & PLOMION, 1996), utilizando marcadores RAPD baseado na análise de 93 híbridos entre *E. grandis* e *E. urophylla*. Em 1997, VERHAEGEN publicou um segundo trabalho mostrando quais marcadores mapeados estavam correlacionados com as características densidade da madeira, forma e crescimento. Posteriormente, BYRNE et al. (1995) publicaram um mapa de ligação integrado utilizando marcadores RAPD, RFLP e isoenzimas em *E. nitens*. Dois anos depois, em 1997, BYRNE et al. publicaram dois trabalhos correlacionando seus marcadores com a tolerância ao frio (BYRNE et al., 1997a), e o tamanho da folha e área foliar em *E. nitens* (BYRNE et al., 1997b). Mais recentemente, MYBURG et al. (2003) desenvolveram nova população para o mapeamento em *Eucalyptus*. A população nomeada de “double pseudo-backcross” envolve o desenvolvimento de duas populações de retrocruzamento além da F1 tradicional. A TABELA 2 resume as informações e mostra as principais publicações de mapas genéticos para o gênero *Eucalyptus*.

TABELA 2 – Principais trabalhos publicados de mapeamento genético para espécies do gênero *Eucalyptus*, destacando a população avaliada, técnica utilizada, numero de indivíduos e numero de marcas avaliadas.

Autores	Ano	Espécie estudada	População avaliada	Técnica utilizada	Nº de indivíduos.	Nº de marcas
Grattapaglia & Sederoff	1994	<i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i>	F1	RAPD	62	240 RAPD <i>E. grandis</i> 251 RAPD <i>E. urophylla</i> .
Grattapaglia et al.	1996	<i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i>	Pop. de polinização aberta	RAPD	96	77 RAPD <i>E. grandis</i> 210 RFLP
Byrne et al.	1995	<i>E. nitens</i>	F2	RAPD, RFLP Isoenzima	118	121 RAPD 4 Isoenzimas
Verhaegen & Plomion	1996	<i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i>	F1	RAPD	93	244 RAPD <i>E. grandis</i> 211 RAPD <i>E. urophylla</i>
Marques et al.	1998	<i>E. globulus</i> e <i>E. tereticornis</i>	F1	AFLP	91	487 AFLP
Thamarus et al.	2002	<i>E. globulus</i>	F1	RFLP EST's SSR Isoenzima	148	204 RFLP 31 EST's 40 SSR 5 isoenzimas
Brondani et al.	2002	<i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i>	F1	SSR	92	50 SSR
Myburg et al.	2003	<i>E. grandis</i> e <i>E. globulus</i>	Retrocruzamentos recíprocos	AFLP	78	800 AFLP

Siglas: AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism.
EST: Expressed Sequences Tags
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
SSR: Simple Sequence Repeats.

2.5 Detecção de QTL's

Muitas características de importância econômica em plantas apresentam a expressão governada por muitos genes. Embora os princípios genéticos de segregação das características métricas sejam mendelianos, a identificação da segregação dos genes individualmente é complexa (FALCONER, 1987). Por este motivo, a média e a variância da distribuição dos valores métricos das características quantitativas são essenciais para o estudo da herança e variação destas características.

A aplicação de técnicas de marcadores moleculares no estudo de características quantitativas permite identificar maiores frações da variância genética total relacionadas com a expressão de determinada característica, permitindo ainda detectar quais regiões dos cromossomos, ou grupos de ligação, são mais determinantes para a expressão da característica. O termo QTL ("Quantitative trait loci") foi criado por GELDERMANN (1975), se baseia no princípio de existência de locos de maior importância relacionados com a expressão de determinada característica métrica (teoria dos poligenes). Além da determinação da posição do QTL ao longo do grupo de ligação, a utilização de técnicas de marcadores moleculares permite a obtenção de estimativas de ação gênica (efeito aditivo), e de interação entre os alelos (efeito de dominância) e não alelos (efeito epistático).

Estratégias utilizadas para detecção e caracterização dos QTL's dependem principalmente: da população avaliada, do número de indivíduos genotipados e da técnica de marcador molecular empregada. Além destas três características já citadas, destacam-se também: o efeito do QTL na expressão da característica, a precisão experimental e herdabilidade da característica avaliada, os efeitos de dominância.

Os testes para determinação da associação marcador/QTL se dividem em duas estratégias principais: avaliação de uma única marca por vez, ou avaliação de duas marcas simultaneamente na procura pelo QTL. A análise baseada em uma única marca é considerada exploratória e grosseira se considerada a precisão das estimativas obtidas com métodos de intervalo. A idéia de utilizar um par de marcas como unidade de análise para o mapeamento foi proposta por LANDER & BOTSTEIN (1989). O mapeamento

por intervalo simples, utiliza a função de verossimilhança ou análise de regressão considerando estimativas de “a” (desvio devido a efeitos aditivos do QTL) e “d” (desvio devido a efeitos de dominância do QTL) obtidas por meio de análises iterativas, para valores de recombinação compreendidos entre 0 e 0,5 e definidos por incrementos sucessivos (SCHUSTER & CRUZ, 2004).

A probabilidade de que os valores de “a” e “d” sejam diferentes de zero é estimada utilizando a razão de verossimilhança que representa o quociente entre as probabilidades de que “a” e “d” sejam diferentes de zero, dividido pela probabilidade de ocorrência da hipótese nula ($a=0$ e $d=0$) de ausência de QTL. Se o valor de “LOD score” for maior do que o valor crítico que pode ser definido pela metodologia de permutação ou de χ^2 , considera-se a existência de um QTL naquele intervalo do grupo de ligação. A TABELA 3 resume informações e mostra as principais publicações de QTL’s relacionados a diversas características para o gênero *Eucalyptus*.

TABELA 3 – Principais trabalhos publicados sobre detecção de QTL's para espécies do gênero *Eucalyptus*.

Autores	Ano	Espécie estudada	Característica estudada
Grattapaglia et al.	1995	<i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i>	Características de propagação vegetativa
Byrne et al.	1997	<i>E. nitens</i>	Área foliar Altura da muda
Byrne et al.	1997	<i>E. nitens</i>	Resistência ao frio
Verhaegen & Plomion	1997	<i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i>	Densidade da madeira Crescimento de talo Forma de talo
Marques et al.	1998	<i>E. globulus</i> e <i>E. tereticornis</i>	Características de propagação vegetativa

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético

Foram coletadas folhas sadias de 90 árvores que correspondem a irmãos completos F1 do cruzamento entre os genitores *E. grandis* e *E. urophylla* proveniente de testes de progênie da empresa CENIBRA S/A, localizado no município de Ipatinga, Minas Gerais, latitude 18° S, longitude 42° W, altura entre 800-1000 metros acima do nível do mar, precipitações 1300-1500mm/ano e déficit hídrico de 100 a 150 mm/ano. As folhas foram identificadas e mantidas resfriadas em isopor contendo gelo até o armazenamento em congelador a -20° C no Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos – Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, Viçosa – MG, para posterior extração de DNA.

3.2. Dados quantitativos.

As características diâmetro a altura do peito (DAP), altura total (HT) e altura comercial (AC) foram determinadas na época do corte das árvores, aos sete anos de idade. As características de qualidade da madeira: densidade, rendimento de polpa, teor de extrativos, teor de lignina insolúvel, teor de lignina solúvel, foram determinadas em espectrofotômetro de infravermelho – NIRS, no laboratório de tecnologia da madeira da empresa CENIBRA S/A. Para isto,

foram retirados três toretes provenientes respectivamente do topo, meio e base das árvores. Em seguida, utilizando sonda presley foi retirada uma bagueta em posição mediana (a 1 metro de cada extremidade) de cada torete. As baguetas foram moídas em moinho do tipo ciclone e separadas em peneiras de malha 0,5 mm. A serragem proveniente das baguetas foi climatizada em sala com temperatura e umidade controladas e armazenadas em frascos com tampa, para serem conduzidas para análise em espectrofotômetro de infravermelho – NIRS. As mensurações das características estão mostradas no anexo, TABELA 22.

3.3. Construção do mapa de ligação e identificação de QTL's

Para mapeamento genético e identificação de QTL's relacionados com a expressão de características de qualidade da madeira em *Eucalyptus*, amostras de DNA de 90 irmãos completos F1 do cruzamento *E.grandis* e *E. urophylla* foram utilizadas com marcadores RAPD. A estimação das distâncias, a ordenação nos grupos de ligação e a detecção dos QTL's foram feitas utilizando os softwares: GQMOL, em desenvolvimento na Universidade Federal de Viçosa, disponível em (<http://www.ufv.br/dbg>) e Windows QTL Cartographer.

3.3.1 Extração e quantificação do DNA total

A extração de DNA total de folhas de eucalipto foi feita de acordo com o método descrito por DOYLE e DOYLE (1990), com modificações. Cerca de 50 mg de folhas desidratadas ou 150 mg de folhas verdes foram maceradas em nitrogênio líquido até o estado de pó. O material foi transferido para tubo Eppendorf ao qual foram adicionados 650 µL de tampão de extração contendo: CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) 2 %; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM, pH 8,0; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; P.V.P. (polivinilpirrolidona) 1 % e β-mercaptoetanol 1 % previamente aquecido a 65°C. Os tubos foram incubados a 65°C por 30 minutos. Após a incubação foi adicionado um volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), os tubos foram agitados levemente por 10 minutos e

centrifugados a 6.000g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para tubo Eppendorf para extração das proteínas utilizando clorofórmio-álcool isoamílico. Em seguida foi adicionado um volume de isopropanol, seguido de incubação por duas horas a -20°C. O material foi centrifugado a 6.000g por 30 minutos e o sedimento lavado com etanol 70%, seco sob vácuo e ressuspendido em 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM, pH 8,0) contendo 10 µg de RNase. Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos.

A quantidade de DNA total foi estimada, comparando-se com DNA de quantidade conhecida, por eletroforese em gel de agarose 0,8% e brometo de etídio a 200 ng/mL. Para a visualização do DNA, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta com máquina Polaroid MP4 ou as imagens foram digitalizadas em um sistema de vídeo Eagleye™ (Stratagene®).

3.3.2 Amplificação e análise por marcadores RAPD.

As reações de amplificação foram feitas em um volume de 25µL, contendo Tris-HCl 10mM, pH 8,0; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,5mM; 0,1mM de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP - Promega®); 0,4 µM de um oligonucleotídeo de 10 nucleotídeos - Operon®; 10 ng de DNA e 1 unidade de Taq DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em um termociclador "Programmable Thermal Controller - 100", programado para 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e um minuto a 72°C. Após o último ciclo, uma etapa de 7 minutos a 72°C.

Terminada a amplificação, foram adicionados 5 µL de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol e 60% de glicerol) em cada tubo e o seu conteúdo analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio 200 ng/mL, em tampão TEB 1X (Tris-borato 0,09 mM e EDTA 0,002 mM) por 4 horas a 100 volts. Após a corrida eletroforética, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, utilizando câmera Polaroid MP4 ou as imagens foram digitalizadas em um sistema de vídeo Eagleye™ (Stratagene®).

3.3.3 Construção de mapa de ligação.

Os marcadores RAPD foram codificados em 2 etapas: Inicialmente os marcadores foram codificados utilizando 1 para a presença da banda em um indivíduo, 0 para ausência da banda em um indivíduo e 9 para a falha na amplificação do genótipo. Em seguida a planilha contendo a informação das bandas foi recodificada para ser utilizada no software GQMOL (<http://www.ufv.br/dbg>) em desenvolvimento na Universidade Federal de Viçosa, considerando a presença ou ausência das bandas em relação a um dos genitores. Se os indivíduos avaliados apresentaram o mesmo genótipo em relação a um dos genitores para a banda considerada, foram codificados como 1 e se apresentaram genótipos diferentes foram codificados como 0. A segregação de cada fragmento polimórfico foi testada na população por meio do teste de qui-quadrado ($\alpha = 5\%$). O mapeamento dos marcadores RAPD e o estabelecimento dos grupos de ligação foram feitos utilizando o programa GQMOL (<http://www.ufv.br/dbg>) em desenvolvimento na Universidade Federal de Viçosa. Os marcadores foram agrupados em dois mapas distintos, utilizando-se respectivamente “LOD score” mínimo de 3,0 e frequência de recombinação máxima de 0,40 e “LOD score” mínimo de 2,0 e frequência de recombinação máxima de 0,40. A função de mapeamento de Kosambi foi utilizada para a transformação dos dados de frequência de recombinação para centiMorgans (cM).

3.3.4 Identificação e mapeamento dos QTL's.

Análise de marca simples

A associação entre marcadores individuais e a expressão das características quantitativas foi testada pela análise de marca simples, utilizando o programa GQMOL (<http://www.ufv.br/dbg>) em desenvolvimento na Universidade Federal de Viçosa, considerando significativos os casos em que o nível de significância foi inferior a $P < 0,05$. A análise de regressão linear também foi realizada com o intuito de comprovação dos resultados da ANOVA

e, adicionalmente, para a determinação do R^2 , que neste caso é interpretado como o percentual da variação fenotípica explicado pela marca analisada.

Análise por mapeamento por intervalo simples e composto

Visando melhor precisão das estimativas de número e posição do QTL, e confirmação dos resultados da análise de marca simples, os marcadores que agruparam nos grupos de ligações, foram avaliados em um modelo de mapeamento por intervalo simples conforme proposto por LANDER & BOTSTEIN, (1989) e mapeamento por intervalo composto, conforme proposto por ZENG (1993) empregando o programa GQMOL (<http://www.ufv.br/dbg>) em desenvolvimento na Universidade Federal de Viçosa e o programa Windows QTL Cartographer.

3.3.5 Determinação do nível crítico.

A significância de um QTL pode ser determinada pela razão da verossimilhança (LR) entre o modelo que testa a hipótese de existência do QTL e o modelo que testa a hipótese de existência de nenhum QTL em nenhuma posição do mapa. O valor de LR crítico, para considerar a existência de um QTL foi determinado para as análises de mapeamento por intervalo simples pelo teste de χ^2 , corrigido por Bonferroni para múltiplas observações independentes ($\alpha = 10\%$); e para as análises por mapeamento por intervalo composto foi utilizado teste de permutação como proposto por DEORGE et al. (1996). O teste foi realizado com 1000 repetições, gerando valores de LOD score ou de razão de verossimilhança (LR) no mesmo número de repetições realizadas. Foi utilizado nível de significância de 5% para todo o mapa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção de polimorfismos e seleção dos oligonucleotídeos RAPD.

Em uma primeira etapa os oligonucleotídeos RAPD foram testados objetivando a detecção de fragmentos de DNA polimórficos a serem utilizados no mapeamento genético. Foram avaliados 260 oligonucleotídeos decâmeros de sequência arbitrária utilizando os Kits A, B, C, D, E, D, F, G, H, I, J, K, L, N, P, Q, R, V, W, X, Z (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA). Somente os fragmentos de DNA polimórficos entre os dois genitores, de comportamento mendeliano e segregação na população F1, são de interesse para fins de mapeamento. Em média apenas um, em cada quatro fragmentos amplificados, foram polimórficos e estavam segregando na população de mapeamento.

Visando a comparação futura entre mapas, oligonucleotídeos utilizados para amplificar marcadores já mapeados por outros autores foram testados (VERHAEGEN & PLOMION, 1996; GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994). Tais oligonucleotídeos não geraram polimorfismos semelhantes aos descritos em outras populações de híbridos *E. grandis* e *E. urophylla*, uma vez que não resultaram na amplificação de fragmento de DNA polimórfico de tamanho semelhante e/ou produziram outros fragmentos polimórficos não descritos. A disparidade entre os mapas desenvolvidos por GRATTAPAGLIA & SEDEROFF (1994) e VERHAEGEN & PLOMION, (1996) indica que os mapas desenvolvidos para híbridos *E. grandis* e *E. urophylla* utilizando a técnica de

RAPD são válidos apenas para as populações mapeadas e populações aparentadas com as mesmas. Estas distorções entre os mapas podem ter causas diversas: 1) a heterogeneidade genética característica das espécies do gênero *Eucalyptus*; 2) a alta sensibilidade da metodologia de RAPD; 3) a utilização de híbridos entre duas espécies diferentes para o mapeamento. CAMPINHOS (1996), observou distorções entre mapas de ligação RAPD desenvolvidos a partir do cruzamento de um genitor *E. grandis* previamente mapeado com 5 genitores *E. urophylla*, tais como: fusão de grupos de ligação distintos, inversão na ordem de mapeamento dos marcadores, ausência de ligação entre marcadores previamente mapeados, falta dos dados genotípicos de marcadores nas famílias e diferenças nas frequências de recombinação entre marcadores adjacentes. O desenvolvimento de mapas moleculares referência para as espécies do gênero *Eucalyptus* depende da utilização de metodologias mais robustas de detecção da diversidade genética, menos sensíveis a grande variação genética e do desenvolvimento de novas populações de mapeamento (MYBURG et al., 2003, BRONDANI et al., 2002).

O número de marcadores para o mapeamento é função da divergência genética entre os genitores e do tipo da técnica de detecção utilizada. A técnica de RAPD permite a análise simultânea de vários locos dominantes que utilizados em associação com população F1 “*pseudotestcross*” permite a identificação de duas classes de marcas segregantes, marcas que segregam na proporção de 1:1 e 3:1. O DNA total dos dois genitores *E. grandis* e *E. urophylla* e de seis indivíduos da população F1 foram utilizados nas reações de amplificação RAPD (FIGURA 1). A amplificação conjunta do DNA total dos dois genitores e dos seis indivíduos da população F1 faz com que a probabilidade de detecção da segregação de um marcador polimórfico entre os genitores seja superior a 98%.

Do total de 260 oligonucleotídeos testados foram selecionados 63 que amplificaram fragmentos polimórficos de melhores definições, variando de 1 a 5 fragmentos polimórficos por oligonucleotídeo (FIGURA 2 e TABELA 4). Os 63 oligonucleotídeos selecionados resultaram na amplificação total de 176 fragmentos de DNA polimórficos e de segregação mendeliana 1:1, com tamanhos variando de 200 a 2000 pares de base.

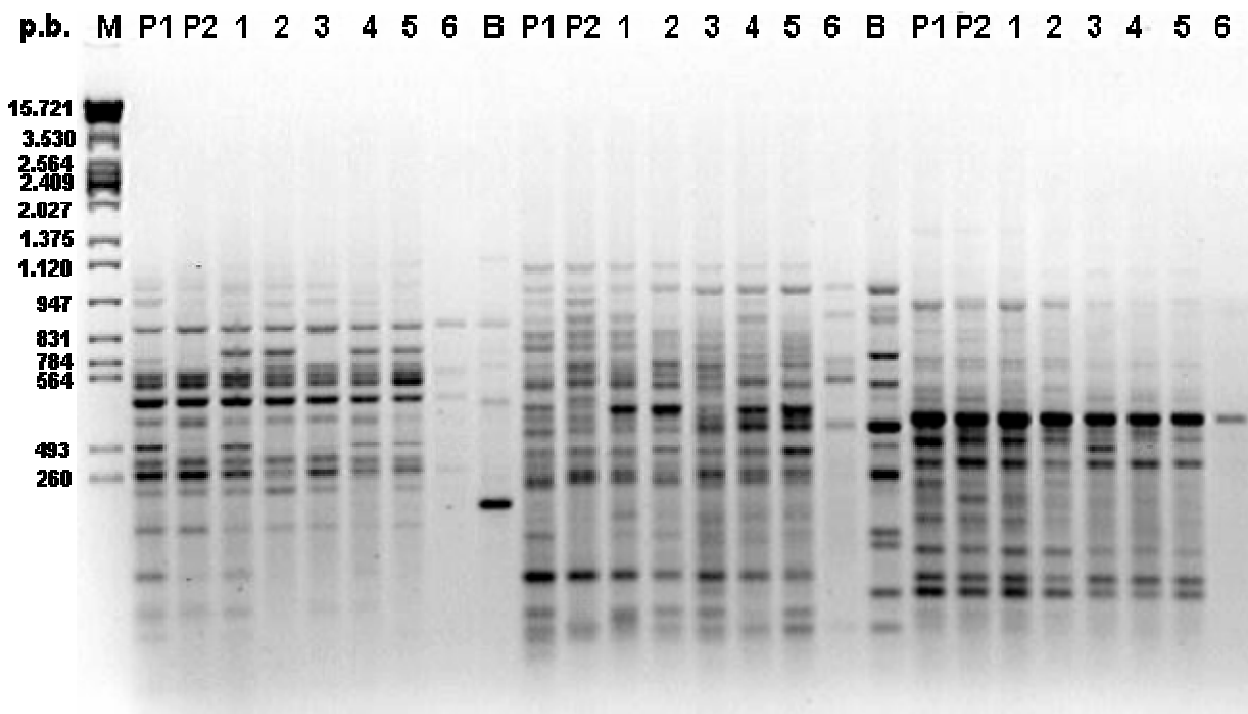


FIGURA 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação utilizando os oligonucleotídeos OPK15, OPK16, OPL05. P1 e P2 referem-se respectivamente, aos padrões de amplificação dos genitores *E. grandis* e *E. urophylla*, seguidos da amplificação do DNA total de 6 irmãos completos F1 (1 a 6) e de uma reação controle sem o DNA total de *Eucalyptus* (B). O marcador utilizado é o DNA do fago λ clivado com as enzimas *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* (M).

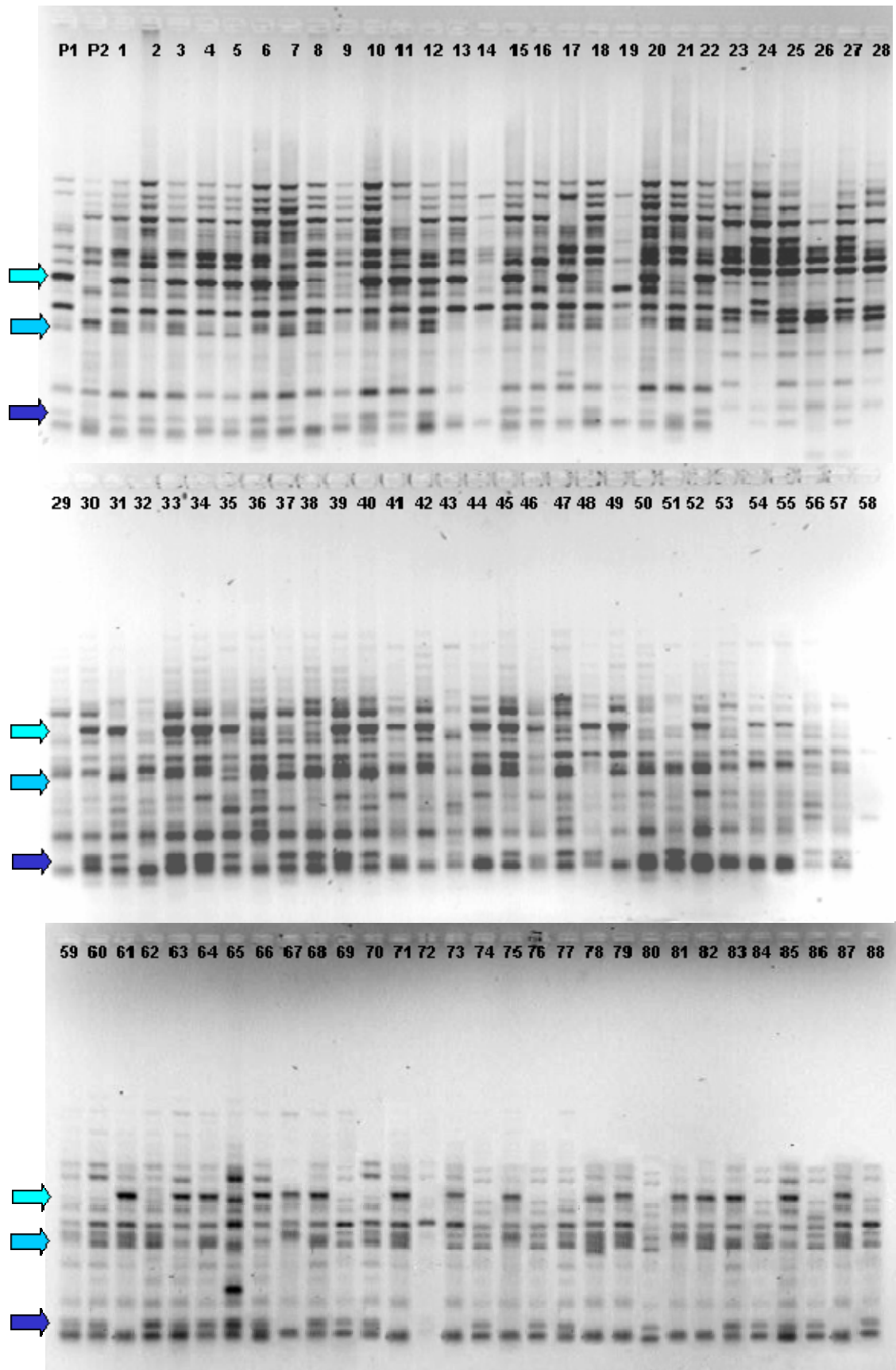


FIGURA 2 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% da reação de amplificação utilizando o oligonucleotídeo OPK16. P1 e P2 mostram o padrão de amplificação dos genitores *E. grandis* e *E. urophylla*, seguidos da amplificação de 88 irmãos completos F1 (1 a 88). As setas indicam fragmentos de DNA de segregação 1:1.

Dos 176 fragmentos de DNA polimórficos selecionados, 87 são do genitor *E.grandis* e 89 de *E. urophylla*. O número médio de marcadores polimórficos por oligonucleotídeo foi de 2,79. Foram amplificados, em média, 10,2 fragmentos de DNA por oligonucleotídeo, com o número total variando entre 6 a 16 fragmentos de DNA. Resultado semelhante ao observado foi obtido por MURO ABAD (2000), trabalhando com seleção de matrizes mais divergentes utilizando marcadores RAPD. O número de fragmentos de DNA observado depende da espécie, do oligonucleotídeo utilizado e das condições de amplificação (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Trabalhos visando o desenvolvimento de mapas genéticos utilizando marcadores moleculares RAPD já publicados para o gênero *Eucalyptus*. (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF,1994; VERHAEGEN & PLOMION, 1996) ambos trabalhando com população F1 resultante do cruzamento entre *E. grandis* e *E. urophylla*, e (BYRNE et al., 1995) trabalhando com população F3 de *Eucalyptus nitens* obtiveram, respectivamente, 3,69, 3,08 e 1,5 marcas de interesse, por oligonucleotídeo utilizado no mapeamento. Nestes trabalhos estas diferenças são principalmente em função da composição genética das espécies estudadas.

4.2 Construção do mapa de ligação

Previamente à construção do mapa, a segregação dos marcadores RAPD foi testada por meio do teste de qui-quadrado ($P < 0,05$). De um conjunto total de 176 marcas, 24 (13,6%) apresentaram segregação distorcida, ou seja, diferente da proporção esperada 1:1 (TABELA 4). Considerando o total de 176 marcas é esperado que em média duas marcas apresentem distorção da proporção esperada por obra do acaso ($\alpha < 0,01$). A distorção no padrão de segregação de 24 marcas pode ser evidência de um evento biológico causador desta perturbação.

O descarte dos marcadores de segregação distorcida é uma possibilidade que deve ser avaliada considerando as causas que podem resultar em tais distorções: 1) número insuficiente de indivíduos avaliados (ROCHA et al., 2003; CARLSON et al., 1991) 2) amplificação de marcadores sobrepostos pela técnica de RAPD 3) erro na avaliação de presença ou ausência do marcador

(CAMPINHOS et al., 1996) 4) seleção natural ou artificial das mudas no viveiro florestal antes de ir para o campo (VERHAEGEN & PLOMION, 1996). Além de causar distorções no padrão de segregação por alterar as frequências alélicas, a seleção natural ou artificial pode resultar em uma tendência de agrupamento dos marcadores distorcidos em um mesmo grupo de ligação, como sugerido por VERHAEGEN & PLOMION (1996), resultado do efeito da seleção a favor ou contra determinado conjunto de marcas. Além das causas citadas acima, a elevada carga genética das espécies do gênero *Eucalyptus* pode resultar em distorção dos marcadores próximos a genes letais em condição heterozigota nos indivíduos de uma população (YOUNG & BOYLE & BOSHER, 2000).

TABELA 4: Valores dos testes de qui-quadrado relativos à segregação das marcas polimórficas considerando a proporção esperada de 1:1. As marcas que fazem parte do mapa (LOD = 3) estão destacadas em negrito e apresentam a identificação do tamanho do fragmento de DNA correspondente em pares de base. As letras “P”, “A” e “F” identificam respectivamente a classe dos genótipos que apresentaram a banda (P), que não a apresentaram (A) e os que falharam na reação de amplificação (F).

Marca	P	A	F	Probabilidade(%)	Marca	P	A	F	Probabilidade(%)	Marca	P	A	F	Probabilidade(%)
AB01a	13	14	63	84.739 ns	C06a_700	11	16	63	33.5924 ns	J13b	52	20	18	0.0162 *
AB01b	14	13	63	84.739 ns	C14	12	15	63	56.3703 ns	J13c	44	30	16	10.3638 ns
AB02a_800	13	14	63	84.739 ns	E01a_831	44	39	7	58.3128 ns	K01a	9	18	63	8.3265 *
AB02b_731	17	10	63	17.7932 ns	E01b	55	13	22	0.0 *	K01b	11	16	63	33.5924 ns
AB04a_920	33	23	34	18.1449 ns	E01c_490	31	37	22	46.6854 ns	K08a_790	27	21	42	38.6476 ns
AB04b_450	29	27	34	78.9268 ns	E01d_440	30	35	25	53.5143 ns	K08b_730	29	19	42	14.8915 ns
AB04c_370	30	27	33	69.1102 ns	E01e_480	32	36	22	62.7626 ns	K08c	23	25	42	77.283 ns
AB05a	14	13	63	84.739 ns	E05a_960	44	36	10	37.1093 ns	K08d_550	25	23	42	77.283 ns
AB05b_600	11	16	63	33.5924 ns	E05b	40	28	22	14.561 ns	K08e_300	22	26	42	56.3703 ns
AB05c	14	13	63	84.739 ns	E19a	40	27	23	11.2241 ns	K12a_800	39	32	19	40.6116 ns
AB05d	9	18	63	8.3265 *	E19b	51	16	23	0.0019 *	K12b_540	33	34	23	90.2765 ns
AB05e_280	11	16	63	33.5924 ns	E19c_550	42	25	23	3.7813 *	K12c	25	36	29	15.9011 ns
AB11a	31	48	11	5.5793 *	E19d_460	42	25	23	3.7813 *	K12d	39	22	29	2.9508 *
AB11b_400	37	42	11	57.3745 ns	E19e	32	35	23	71.3986 ns	K14a_480	26	25	39	88.8638 ns
AB14a	28	25	37	68.028 ns	E19f_240	47	20	23	0.0972 *	K14b_460	22	14	54	18.2422 ns
AB14b	31	22	37	21.6368 ns	G04a	28	24	38	57.91 ns	K15a	22	23	45	88.1497 ns
AB14c	22	31	37	21.6368 ns	G04b	25	27	38	78.1511 ns	K15b_490	22	23	45	88.1497 ns
AB15a	12	11	67	83.4827 ns	G11a_784	43	41	6	82.7259 ns	K15c	30	15	45	2.5347 *
AB15b	7	16	67	6.0569 *	G11b	38	46	6	38.2733 ns	K15d_490	25	20	45	45.6057 ns
AC03a	29	24	37	49.2207 ns	G11c	50	34	6	8.0856 *	K16a_510	41	45	4	66.6228 ns
AC03b	30	23	37	33.6289 ns	G11d_240	48	36	6	19.043 ns	K16b	41	43	6	82.7259 ns
AD18a	34	29	27	52.8733 ns	G12a	35	38	17	72.5496 ns	K16c	47	37	6	27.5234 ns
AD18b	36	27	27	25.6839 ns	G12b_784	29	39	22	22.5253 ns	L11a_990	27	55	8	0.1988 *
AD18c	31	32	27	89.9741 ns	G12c	41	27	22	8.9555 *	L11b_700	31	51	8	2.72 *

AE13a_990	16	24	50	20.5903 ns	G12d	47	21	22	0.1616 *	L11c_250	50	35	5	10.3742 ns
AF15a	22	30	38	26.7257 ns	G12e_450	23	50	17	0.1577 *	L11d_250	47	38	5	32.8972 ns
AF15b	21	20	49	87.5896 ns	G12f_260	33	40	17	41.2622 ns	P07a	29	34	27	52.8733 ns
AI09a_990	14	13	63	84.739 ns	G14a	31	47	12	7.0041 *	P07b	30	33	27	70.5457 ns
AI12a	30	34	26	61.7075 ns	G14b	42	37	11	57.3745 ns	P07c_460	32	31	27	89.9741 ns
AI12b	36	28	26	31.7311 ns	G16a_540	14	13	63	84.739 ns	P07d	23	40	27	3.221 *
AI12c	37	28	25	26.4288 ns	G17a	39	34	17	55.8409 ns	P13a	22	19	49	63.9412 ns
AI12d_240	19	45	26	0.1154 *	G17b_730	36	37	17	90.6827 ns	P13b_460	23	23	44	100.0 ns
AI13a_990	13	9	68	39.3769 ns	G19a	12	15	63	56.3703 ns	P13c	25	16	49	15.9854 ns
AI13b	10	12	68	66.9815 ns	G19b	11	16	63	33.5924 ns	P14a_700	21	49	20	0.0818 *
AI15a_960	29	28	33	89.4626 ns	H07a_890	21	29	40	25.7899 ns	P14b_550	36	34	20	81.107 ns
AI15b	25	32	33	35.3837 ns	H07b	8	19	63	3.4264 *	P17a_831	15	12	63	56.3703 ns
AI15c_490	25	32	33	35.3837 ns	H07c_250	12	15	63	56.3703 ns	R04a_930	34	32	24	80.5541 ns
AI15d_320	24	33	33	23.323 ns	H07d	15	12	63	56.3703 ns	R10a_890	17	10	63	17.7932 ns
AI9b_600	20	7	63	1.2355 *	H07e	8	19	63	3.4264 *	R10b	16	11	63	33.5924 ns
B02a	14	13	63	84.739 ns	H14a	9	18	63	8.3265 *	R10c_280	10	17	63	17.7932 ns
B02b	12	15	63	56.3703 ns	H14b	9	18	63	8.3265 *	R11a_900	14	13	63	84.739 ns
B02c_490	15	12	63	56.3703 ns	I01a	9	14	67	29.7147 ns	R11b	15	10	65	31.7311 ns
B06a_731	15	12	63	56.3703 ns	I01b	7	16	67	6.0569 *	R11c_680	19	15	56	49.2717 ns
B06b_490	9	18	63	8.3265 *	I08a	16	11	63	33.5924 ns	U03a_700	35	43	12	36.503 ns
B06c	14	13	63	84.739 ns	I10a	30	48	12	4.154 *	U03b_550	30	34	26	61.7075 ns
B06d	7	20	63	1.2355 *	I10b	47	31	12	7.0041 *	U03c_250	28	37	25	26.4288 ns
B11a	36	29	25	38.5261 ns	I11a	12	15	63	56.3703 ns	U08a	14	13	63	84.739 ns
B11b_831	34	31	25	70.9815 ns	I11b_610	12	15	63	56.3703 ns	U08b_510	12	17	61	35.316 ns
B11c_440	28	37	25	26.4288 ns	I11c	13	14	63	84.739 ns	U08c_340	15	12	63	56.3703 ns
B11d_240	18	27	45	17.9713 ns	I11d	15	12	63	56.3703 ns	U09a_560	14	12	64	69.4887 ns
B11e_221	20	25	45	45.6057 ns	I15a_560	19	15	56	49.2717 ns	W09a_831	5	19	66	0.4267 *
B15a	24	41	25	3.498 *	I15b_490	13	14	63	84.739 ns	W09b_780	15	17	58	72.3674 ns
B15b	34	30	26	61.7075 ns	I18_300	17	15	58	72.3674 ns	W16a_590	14	13	63	84.739 ns
B15c	28	36	26	31.7311 ns	J01a_484	15	20	55	39.8025 ns	W16b	8	19	63	3.4264 *
B18a	14	13	63	84.739 ns	J01b	19	14	57	38.4088 ns	W20a_800	21	22	47	87.8794 ns
B18b	15	12	63	56.3703 ns	J07a	33	28	29	52.2053 ns	W20b_500	26	29	35	68.583 ns
C04a_910	35	33	22	80.8365 ns	J07b	30	30	30	100.0 ns	X17a	11	16	63	33.5924 ns
C04b	31	37	22	46.6854 ns	J07c	30	30	30	100.0 ns	X17b_550	24	26	40	77.7297 ns
C04c_500	38	36	16	81.6153 ns	J13a_831	48	24	18	0.4678 *					

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste de χ^2 .
ns: não significativo.

A proporção de marcadores de segregação distorcida é comparável com as proporções relatadas no mapeamento de híbridos *E. grandis* e *E. urophylla*: CAMPINHOS (1996), 13,7%; VERHAEGEN & PLOMION (1996); 7%, GRATTAPAGLIA & SEDEROFF (1994), 4%, e BYRNE et al. (1995) trabalhando com *E. nitens*, 6%. Os marcadores que apresentaram distorções na segregação não foram excluídos das análises seguintes e estão indicados com um asterisco no mapa (marcadores E19c_550 e E19d_460 pertencentes ao grupo de ligação 5).

O mapeamento de híbridos interespecíficos permite o desenvolvimento de dois mapas de ligação desde que as marcas sejam separadas em dois grupos e mapeadas de acordo com a origem parental. Tal procedimento traz a vantagem evidente de obtenção de dois mapas de ligação ao invés de um e a

possibilidade de construção de mapas referência para as espécies dos genitores. Trabalhos como os publicados por VERHAEGEN & PLOMION (1996), GRATTAPAGLIA & SEDEROFF (1994), BYRNE et al. (1995) utilizam desta estratégia para o desenvolvimento de mapas espécies específicos. No entanto, considerando que o número de marcadores é limitado, o desenvolvimento de um único mapa é desejável pois contribui para o aumento da saturação do mapa que pode ser crucial na detecção dos QTL's. Assim, como os mapas RAPD espécies específicos, o mapa dos híbridos mantém sua validade para a população mapeada e populações aparentadas com a vantagem de ser mais informativo para detecção dos QTL's do que cada mapa desenvolvido em separado.

Para o desenvolvimento de um único mapa dos híbridos *E. grandis* e *E. urophylla*, foram utilizados os parâmetros de "LOD score" mínimo (LOD = 3,0) e a máxima frequência de recombinação ($r = 0,40$), para formação dos grupos de ligação. Após a definição dos grupos de ligação foi determinada a ordem mais provável dos marcadores utilizando a metodologia do "SARF", que se baseia na escolha da melhor ordem considerando a menor soma de recombinações adjacentes. Foram obtidos 12 grupos de ligação pouco saturados contendo 51 marcadores ligados (FIGURA 3). Também foram obtidas 125 marcas não ligadas.

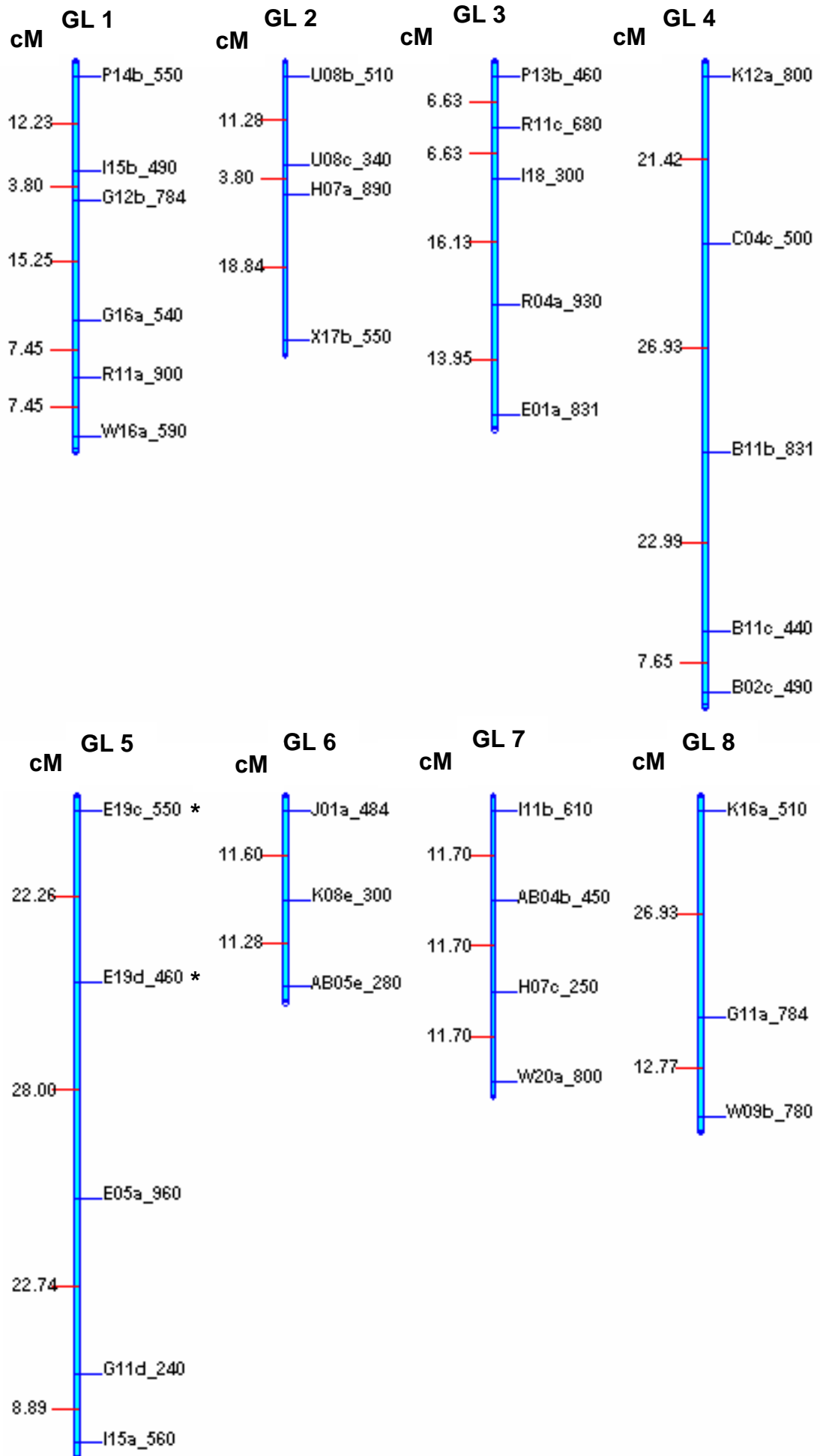
As marcas foram identificadas utilizando a nomenclatura do oligonucleotídeo seguida de uma letra minúscula do alfabeto, relacionada com o número de marcas amplificadas por oligonucleotídeo. O tamanho do fragmento de DNA em pares de base estimado utilizando o "software" KBCALC (versão DOS), está indicado para os marcadores que fazem parte dos grupos de ligação.

O tamanho total do mapa foi de 632 cM com valor de distância média entre os locos de 16,14 cM, com valor de mínima distância entre duas marcas adjacentes de 3,08 cM e máxima distância de 32,08 cM. Considerando que as árvores do gênero *Eucalyptus* apresentam número haplóide de 11, a análise de mapeamento apresentou um grupo de ligação a mais do que o esperado. Provavelmente os menores grupos de ligação encontrados poderão se agrupar com outro grupo de ligação desde que as marcas adjacentes sejam mapeadas.

Considerando o alto número de marcadores não ligados foi construído também outro mapa de ligação utilizando novos parâmetros de “LOD score” mínimo igual a 2 e a máxima frequência de recombinação igual a 0,40, para formação dos grupos de ligação. A alteração do valor de LOD resulta em menor restrição à ligação das marcas fazendo com que a probabilidade necessária para considerar que dois marcadores estejam ligados se altere de 1000 vezes (LOD = 3) para 100 (LOD = 2).

A construção deste segundo mapa, menos restritivo quanto à ligação dos marcadores, resultou em um tamanho total de 1114 cM, equivalente a 1,7 vezes à região coberta pelo mapa anterior em cM. Foram agrupadas 84 marcadores em 24 grupos de ligação, 33 marcas a mais do que o mapa de LOD = 3,0 e 12 grupos de ligação adicionais. Os valores de distância média entre os locos e a máxima e mínima distância entre duas marcas adjacentes foram semelhantes entre os dois mapas, respectivamente: 18,56, 36,57 e 3,8. A utilização do valor de LOD menos restritivo para a construção do mapa indica prováveis locais de ligação entre marcadores adjacentes, sendo também adotado na literatura para o desenvolvimento de alguns mapas (LUCCIANE BRAGA OLIVEIRA VILARINHO, comunicação pessoal), no entanto, visando maior precisão do posicionamento das marcas para identificação e posicionamento dos QTL's foi utilizado o mapa de LOD = 3 nas avaliações seguintes.

Novamente considerando que as árvores do gênero *Eucalyptus* apresentam número haplóide igual a 11, a nova análise de mapeamento apresentou grupos de ligação a mais do que o esperado. Provavelmente os menores grupos de ligação encontrados, irão agrupar com outros desde que as marcas adjacentes sejam mapeadas.



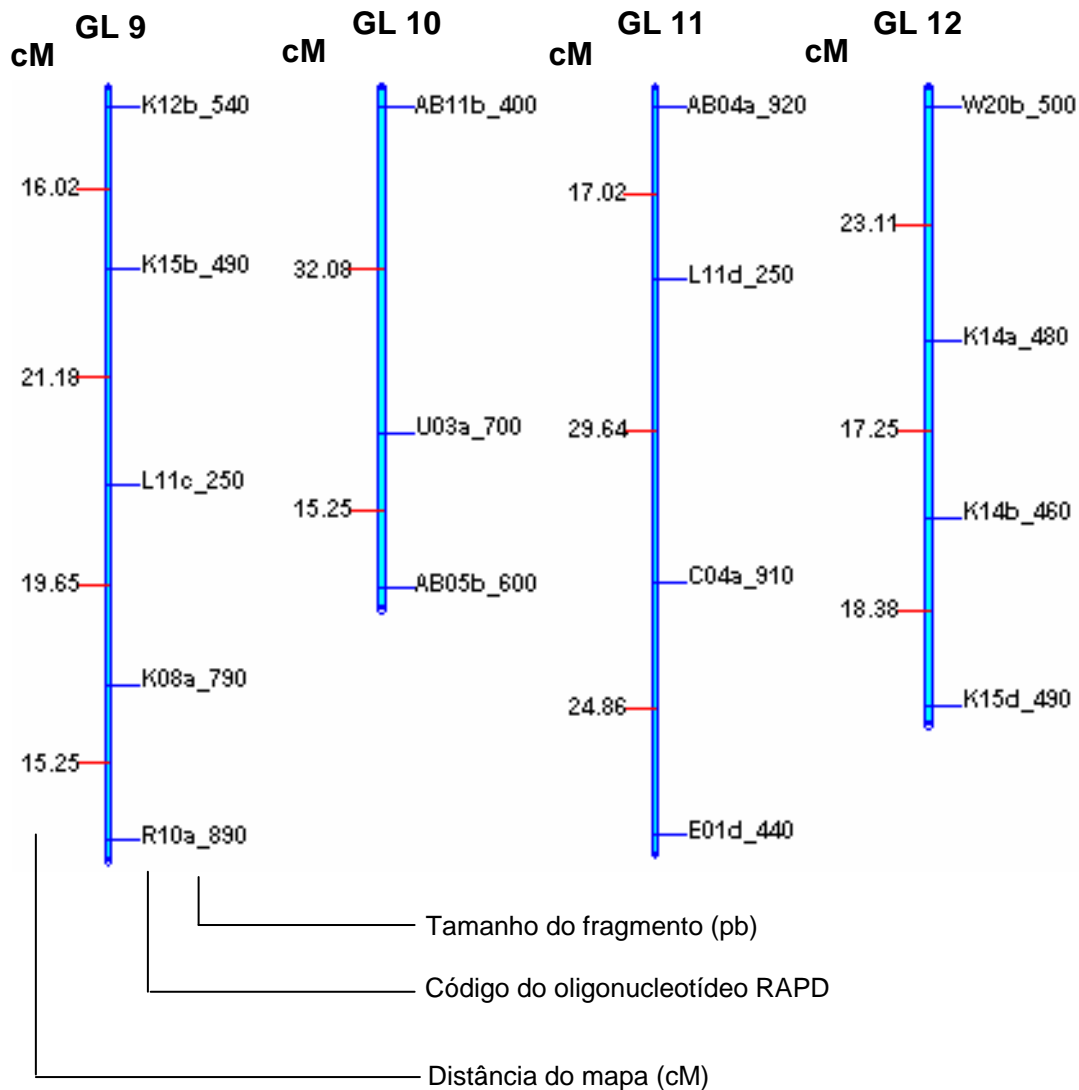
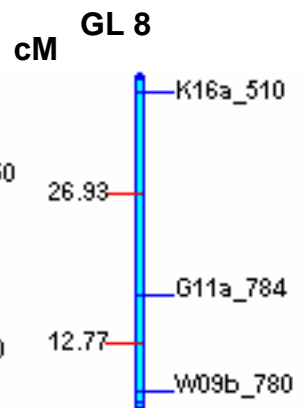
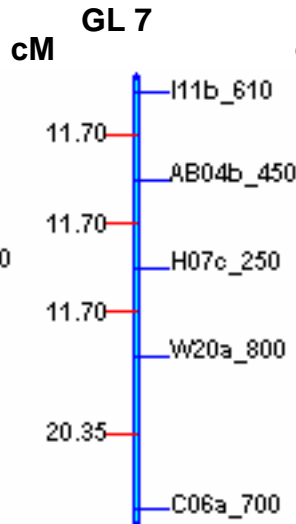
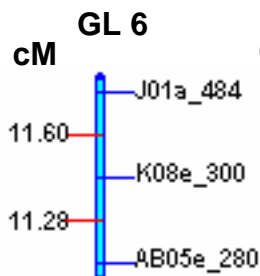
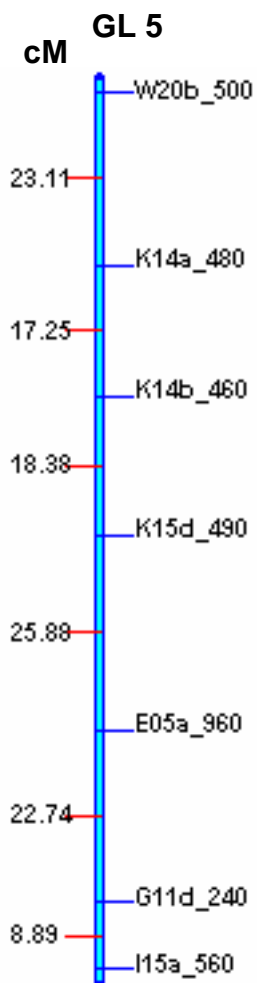
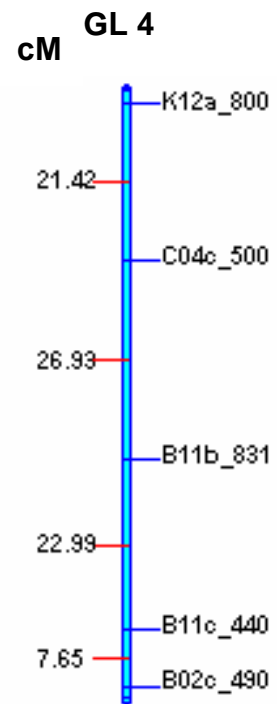
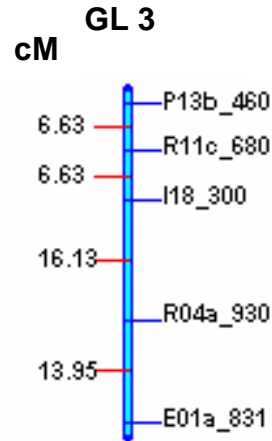
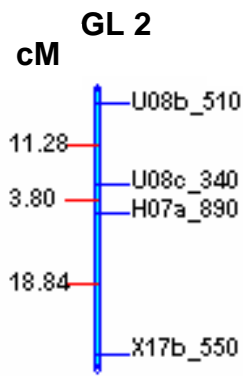
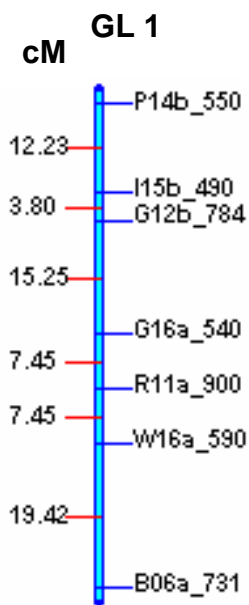
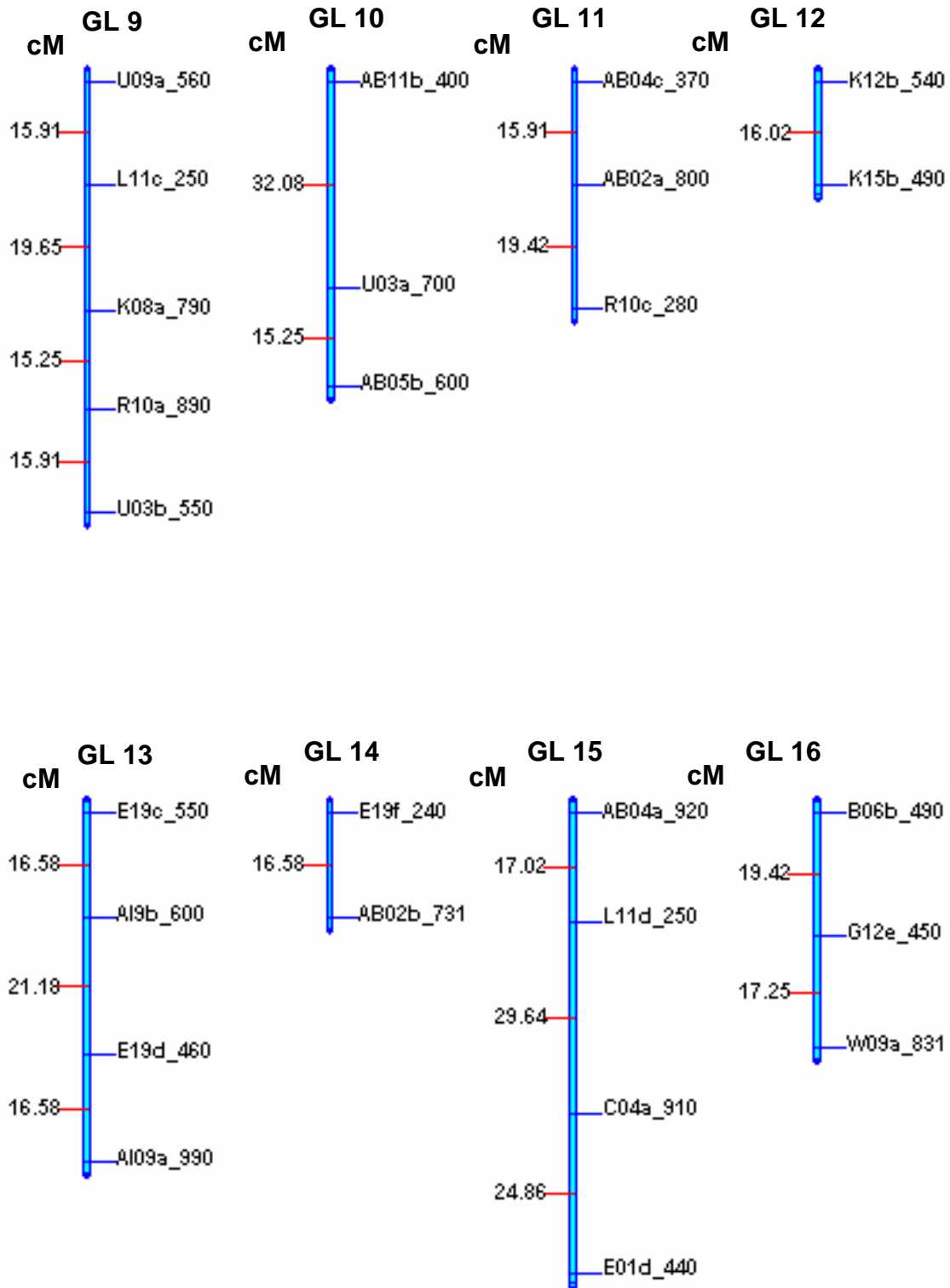


FIGURA 3: Mapa genético de *Eucalyptus* desenvolvido a partir da análise de 90 híbridos do cruzamento *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*. Os grupos de ligação foram obtidos utilizando-se valores de LOD = 3 e $r = 0,40$ e unidade de Kosambi. Os valores da esquerda representam as distâncias entre as marcas e os da direita estão identificando as marcas. Estão marcadas com um asterisco as marcas que apresentaram segregação distorcida segundo o teste de χ^2 com $\alpha = 5\%$.





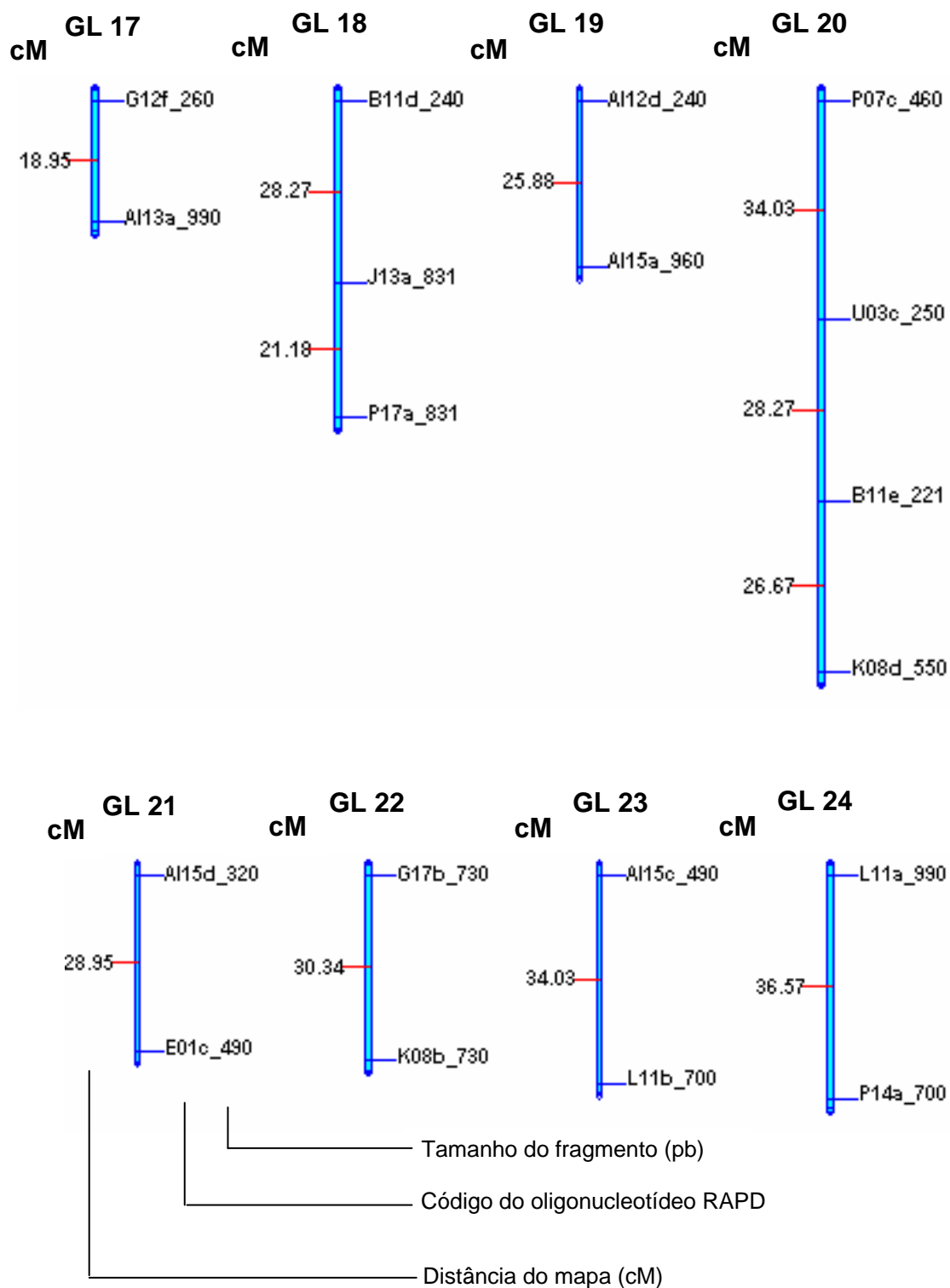


FIGURA 4: Mapa genético de *Eucalyptus* desenvolvido a partir da análise de 90 híbridos do cruzamento *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*. Os grupos de ligação foram obtidos utilizando-se valores de LOD = 2 e $r = 0,40$ e unidade de Kosambi. Os valores da esquerda representam as distâncias entre as marcas e os da direita estão identificando as marcas

4.3 Características Quantitativas

Muitas das metodologias de detecção e determinação da significância de QTL's, como por exemplo, de mapeamento de marcas simples por análise de variância, mapeamento por intervalo simples e mapeamento por intervalo composto consideram a pressuposição da distribuição normal dos dados quantitativos avaliados. O não ajustamento dos valores das características quantitativas à distribuição normal resulta em menor precisão das metodologias de detecção citadas.

A não normalidade dos dados é um problema que não tem uma solução trivial. Alternativas como a transformação de dados ou a troca da distribuição por outra de melhor ajuste juntamente com derivações apropriadas das metodologias são questionáveis, caso da transformação de dados, ou de difícil implementação. Em geral, o estudo da normalidade das características quantitativas é feito objetivando inferir a precisão das metodologias de mapeamento de QTL's.

Os testes mais utilizados para verificar a normalidade de uma amostra de dados são os testes χ^2 , de Kolmogorov-Smirnov e de Lilliefors. O teste de Lilliefors apresenta as vantagens de não necessitar do conhecimento prévio dos valores de média e variância que são estimadas da própria amostra e pode ser aplicado sem restrição para pequenas amostras. Por considerar dados individualmente não perdendo informação devido a agrupamentos o teste de Lilliefors é considerado por alguns autores como o mais robusto dos testes de normalidade.

As características quantitativas avaliadas quanto a sua normalidade pelo teste de Lilliefors são respectivamente: densidade Kg/m³, rendimento de polpa %, teor de extrativos %, teor de lignina insolúvel %, teor de lignina solúvel %, D.A.P. cm, altura total m, altura comercial m, em que a hipótese H_0 corresponde a testar se é razoável considerar que os dados seguem uma distribuição normal (TABELA 5). As características altura total, altura comercial são as que mais se desviam da distribuição normal o que leva na rejeição da hipótese mesmo a 1% de probabilidade. A FIGURA 5 mostra a distribuição das características em comparação com a distribuição normal.

Por facilitarem comparações das distribuições observadas com a distribuição normal também foram consideradas as estimativas de simetria e curtose da distribuição observada dos dados. Os testes de simetria e curtose permitem estimar alterações dos parâmetros próprios da distribuição normal, que se caracteriza por apresentar-se simétrica (grau de simetria nulo) e mesocúrtica (valor de curtose igual a 3). As estimativas de simetria e curtose confirmam que as características altura total, altura comercial e teor de extrativos foram as que respectivamente apresentaram distribuições mais divergentes em relação à distribuição normal.

A não normalidade dos dados avaliados pode ser devido a diferentes fatores, como: 1) número insuficiente de indivíduos avaliados 2) erros nas medições 3) seleção natural ou artificial das mudas no viveiro florestal antes de ir para o campo (VERHAEGEN & PLOMION, 1996). Embora as medições das características no espectrofotômetro de infravermelho apresentem altas correlações com os dados reais, erros nas mensurações podem acontecer (EVERTON DE SOUZA - CENIBRA – comunicação pessoal).

TABELA 5: Valor das estatísticas de Lilliefors para as características quantitativas avaliadas:

Características	Estatística de Lilliefors	Simetria	Curtose
Densidade Kg/m ³	D _(calculado) = 0,0395 ns	-0,192	3,18
Rendimento de polpa %,	D _(calculado) = 0,0787 ns	-0,34	5,45
Teor de extrativos %,	D _(calculado) = 0,1029 *	1,315	6,119
Teor de lignina insolúvel %,	D _(calculado) = 0,0589 ns	-0,445	4,144
Teor de lignina solúvel %,	D _(calculado) = 0,0544 ns	0,229	5,494
D.A.P. cm	D _(calculado) = 0,0758 ns	-0,183	2,184
Altura total m	D _(calculado) = 0,1235 **	-1,7218	6,734
Altura comercial m	D _(calculado) = 0,1122 **	-1,448	5,222

D(tabelado) 10% = 0,0849

D(tabelado) 5% = 0,0936

D(tabelado) 1% = 0,1087

Se D_{calc.} > D_{tab.} Rejeita-se H₀: É razoável considerar que os dados seguem distribuição normal.

* significativo a 5%, ** significativo a 1%, ns não significativo.

Além da normalidade dos dados, as correlações entre as características métricas devem ser consideradas em estudos genéticos. De grande

importância para programas de melhoramento genético, as correlações entre características permitem prever a alteração que a seleção de uma ou poucas características pode causar em outras. Para a avaliação e estudo de QTL's, o principal objetivo é verificar as correlações para desvendar os efeitos pleiotrópicos. A pleiotropia é uma propriedade muito comum de genes de maior efeito mas em geral pouco considerada em genética quantitativa (FALCONER, 1987).

Altos valores de correlação associadas com QTL's posicionados próximos em um mesmo grupo de ligação, pode ser evidencia de um único bloco gênico de efeito pleiotrópico, capaz de afetar a expressão simultânea de uma ou mais características. A TABELA 6 mostra a parte inferior da matriz quadrada simétrica contendo os valores de correlações simples de Pearson para as 8 variáveis analisadas.

TABELA 6: Valores de correlações de Pearson para características métricas de crescimento e qualidade da madeira avaliadas em *Eucalyptus*. Magnitudes de correlação maiores que 0,50 estão em negrito.

	Densidade	Rend. de polpa	Extrativos	Lignina insolúvel	Lignina solúvel	D.A.P.	Altura Total	Altura Comercial
Densidade	1							
Rend. de polpa	-0,11463	1						
Extrativos	0,101007	-0,80359	1					
Lignina insolúvel	0,12746	-0,68508	0,364777	1				
Lignina solúvel	-0,18718	0,31799	-0,43311	-0,22105	1			
D.A.P.	0,398862	0,078967	-0,29154	0,183714	0,050692	1		
Altura Total	0,336004	0,374547	-0,43589	-0,06478	0,190059	0,78087	1	
Altura Comercial	0,349215	0,325152	-0,44712	-0,00936	0,16451	0,843917	0,96556	1

Os valores de correlação negativa de alta magnitude entre as características de teor de extrativos e rendimento de polpa, e de lignina insolúvel e rendimento de polpa, indicam boa qualidade dos dados provenientes das leituras de absorvância do N.I.R. Os valores de correlação entre as características D.A.P., altura total e altura comercial, como esperado, são positivos e de alta magnitude.

É importante considerar que além da pleiotropia, outros fatores causadores de alteração nas frequências gênicas podem ser responsáveis pela

correlação diferencial de características entre populações. Entre estes fatores destacam-se: 1) ligação gênica, 2) seleção natural ou artificial, 3) deriva genética, 4) acasalamentos preferenciais. Portanto, características métricas mesmo que correlacionadas, podem apresentar diferentes blocos gênicos controladores de sua expressão.

De grande importância para o estudo dos QTL's são as estimativas de herdabilidade das características. As estimativas de herdabilidade estão relacionadas com a precisão experimental e indicam a proporção da variação explicada pelo QTL é de origem genética. As estimativas de herdabilidade das características de qualidade da madeira e de crescimento não puderam ser obtidas uma vez que os genitores dos híbridos avaliados apresentam-se com 15 anos de idade, impossibilitando a comparação com os híbridos avaliados aos 7 anos. Tanto as características de qualidade da madeira quanto às de crescimento tendem a se aproximar valores semelhantes com a idade avançada. No entanto, as altas herdabilidades geralmente encontradas para as características de qualidade da madeira são bons indicativos da acurácia da identificação de QTL's para seleção precoce.

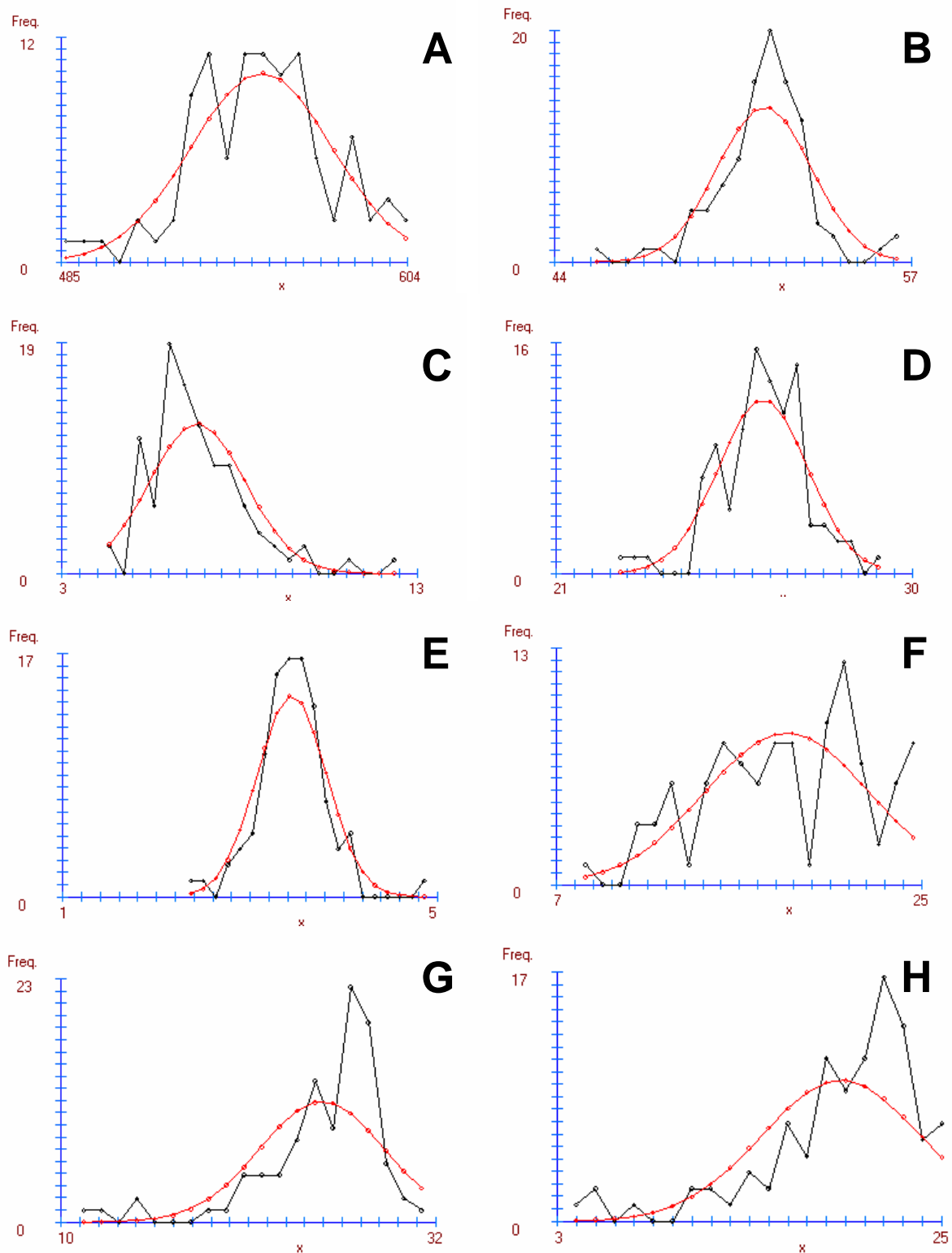


FIGURA 5: Distribuição das características quantitativas analisadas em comparação com a distribuição normal, respectivamente A: Densidade, kg/m³; B: Rendimento de polpa %; C: Teor de extrativos %; D: Teor de lignina insolúvel %, E: Teor de lignina solúvel %, F: DAP, cm; G: Altura total m; H: Altura comercial m;. A linha vermelha representa a distribuição esperada considerando a distribuição normal e a linha preta representa a distribuição dos dados observados

4.4 Mapeamento dos QTL's

Previamente à análise de mapeamento de QTL's por intervalo composto foi feita uma análise de mapeamento de marca simples por análise de variância que permite a detecção de marcadores relacionados com locos controladores da expressão, por diferença entre a média do grupo de indivíduos que possui a marca em comparação com os que não a possui. Embora seja considerada uma análise grosseira e exploratória a análise de mapeamento por marcas simples apresenta o benefício de permitir a detecção dos marcadores relacionados com a expressão das características mesmo que estes não façam parte dos grupos de ligação. O número relativamente alto de marcadores não ligados obtidos na análise aumenta a importância desta abordagem indicando a existência de regiões do genoma importantes para a expressão das características e ainda não mapeadas. VERHAEGEN et al. (1997), encontraram pelos menos 4 regiões do genoma em *E. urophylla* e 5 regiões em *E. grandis* relacionadas com as características de crescimento, altura e diâmetro. GRATTAPAGLIA et al., (1996) encontraram 3 regiões em diferentes grupos de ligação de importância para a expressão das características D.A.P e densidade da madeira.

A utilização de mapa menos restritivo para a ligação dos marcadores (LOD = 2) fez com que 7 de um total de 36 marcas não ligadas, mas relacionadas com locos controladores das características quantitativas, fossem incorporadas ao mapa de ligação.

Os resultados do mapeamento por marcas simples indicam marcadores importantes para a expressão das características avaliadas (significativos a 1%) que não estão agrupados em nenhum dos grupos de ligação. A presença de marcadores não ligados relacionadas com os locos controladores de todas as características quantitativas avaliadas sugere que mais de uma região do genoma estão relacionadas com a expressão das características mensuradas.

Em etapa seguinte à construção do mapa de ligação, a saturação de regiões específicas utilizando metodologias de mapeamento direcionado se destaca por permitir a caracterização de regiões sabidamente importantes e pela praticidade. Metodologias de mapeamento direcionado utilizando "bulks" de DNA genômico como realizado por CAMPINHOS, (1996), apresentam o alto

poder de análise dos “bulks” associada à utilização da informação prévia de associação entre marcador/QTL, permitindo a saturação de regiões específicas do mapa estejam os marcadores previamente ligados ou não.

Visando posicionar os QTLs ao longo dos grupos de ligação e aumentar a precisão das estimativas de efeito e posição foram utilizadas as metodologias de mapeamento por intervalo simples (LANDER & BOTSTEIN, 1989) e mapeamento por intervalo composto (ZENG et al., 1993). As metodologias de mapeamento por intervalo consideram a região entre um par de marcas como unidade de análise sendo, para isto, necessário o conhecimento das distâncias entre os marcadores em um grupo de ligação. A essência do método consiste em testar a possibilidade de ocorrência do QTL dentro do intervalo flanqueado por dois marcadores.

Estudos posteriores visando o aumento da saturação do mapa e validação da eficiência das marcas na seleção dos genótipos superiores deverão ser feitos visando o desenvolvimento de marcadores para seleção.

4.4.1 Mapeamento dos QTL's – Característica de qualidade da madeira: densidade.

A metodologia de mapeamento por marcas simples indicou a existência de 5 marcas próximas aos locos controladores da expressão da característica de densidade da madeira (TABELA 7). Destas 5 marcas, 3 agruparam no mapa de ligação de LOD = 3, sendo que somente a marca X17b_550 está próxima a um QTL identificado pelas metodologias de mapeamento por intervalo.

Locos controladores da expressão da característica densidade da madeira foram previamente estudados por GRATTAPAGLIA et al., (1996), avaliando híbridos *E. grandis* e *E.urophylla* provenientes de uma população de polinização aberta, utilizando a estratégia de “bulk segregant analyses” (MILCHEMORE et al., 1981). Neste estudo foram identificadas 4 QTL's relacionados com a expressão da característica densidade da madeira, localizados em 4 grupos de ligação diferentes. Verhaegen et al., 1997 também identificaram 3 QTL's em idade adulta associados com a característica densidade da madeira avaliando híbridos *E. grandis* e *E.urophylla* provenientes de cruzamento controlado.

TABELA 7- Resultados do mapeamento por marca simples utilizando as metodologias de análise de variância e de regressão, mostrando as marcas ligadas aos QTL's e as diferenças entre as médias dos indivíduos que apresentam a marca (1) e os que não apresentam (0). Os grupos de ligação das marcas para os mapas de LOD = 3 e LOD = 2 estão indicados.

Característica 1 – Densidade						
Marca	Prob(F)	Média(1)	Média(0)	r	G. L. (LOD 3)	G. L. (LOD 2)
AC03b	0,035 *	549,235 a	562,3057 b	0,3563	não agrupou	não agrupou
E05a_960	0,0257 *	548,5172 a	560,3948 b	0,3762	5	5
X17b_550	0,0054 **	565,7238 a	549,2837 b	0,2753	2	2
K01a	0,0353 *	562,5698 a	544,4647 b	0,2932	não agrupou	não agrupou
B02c_490	0,0178 *	545,9164 a	565,0294 b	0,2795	4	4

* Significativo a 5%.

** Significativo a 1%.

as letras "a" e "b" representam os contrastes entre as médias que diferiram pelo teste de Tukey.

A identificação e posicionamento dos QTL's dependem de uma série de fatores, tais como: 1) do mapa de ligação desenvolvido 2) da diversidade genética da população avaliada 3) do delineamento genético da população 4) da técnica de marcadores utilizada 5) dos efeitos gênicos predominantes das características avaliadas 6) do número de indivíduos genotipados, entre outros fatores. Considerando as disparidades encontradas entre os mapas genéticos RAPD das espécies, e agora dos híbridos, *E. grandis* e *E. urophylla* é esperado que os QTL's sejam posicionados em posições diferentes de acordo com os grupos de ligação obtidos na construção do mapa.

O mapeamento por intervalo simples indicou uma única região relacionada com a expressão da característica densidade que apresentou valores de LR superiores ao LR crítico (FIGURA 6A). O nível de significância foi determinado para cada grupo de ligação separadamente pelo teste de χ^2 corrigido por Bonferroni com 1 grau de liberdade e nível de significância para cada grupo de ligação de $\alpha = 10\%$. Após esta análise preliminar todas as regiões do genoma tiveram sua posição e efeitos reavaliados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto (FIGURA 6B).

A metodologia de mapeamento por intervalo composto inclui na análise marcadores adicionais além daqueles que compreendem o intervalo, chamados de co-fatores. Os co-fatores são marcadores associados à expressão da característica que permitem a redução da variância residual

provocada por outros QTL's fora do intervalo considerado, podendo estar ou não localizados no mesmo grupo de ligação do QTL. Os co-fatores foram escolhidos para análise de mapeamento por intervalo composto utilizando o procedimento de regressão "stepwise" do "WINQTL CART" (TABELA 8). O ponto de corte para identificação dos possíveis QTL's foi determinado por teste de permutação (DEORGE et al., 1996) adotando 1000 permutações e nível de significância de 5% para o mapa completo, sendo que o valor limite para a característica densidade da madeira foi de 11,29.

Considerando o nível de significância obtido pelo teste de permutação, um QTL foi confirmado para a característica de densidade da madeira em posição semelhante aquela obtida pelo método de mapeamento por intervalo simples (FIGURA 6B). Este QTL explica aproximadamente 29,4% da variação fenotípica total observada.

TABELA 8 – Co-fatores escolhidos utilizando o procedimento de regressão "stepwise" do WINQTL CART para análise de mapeamento por intervalo composto.

Característica - Densidade Kg/m ³ ,	
Marcador	Grupo de ligação
X17b_550	2
E05a_960	5

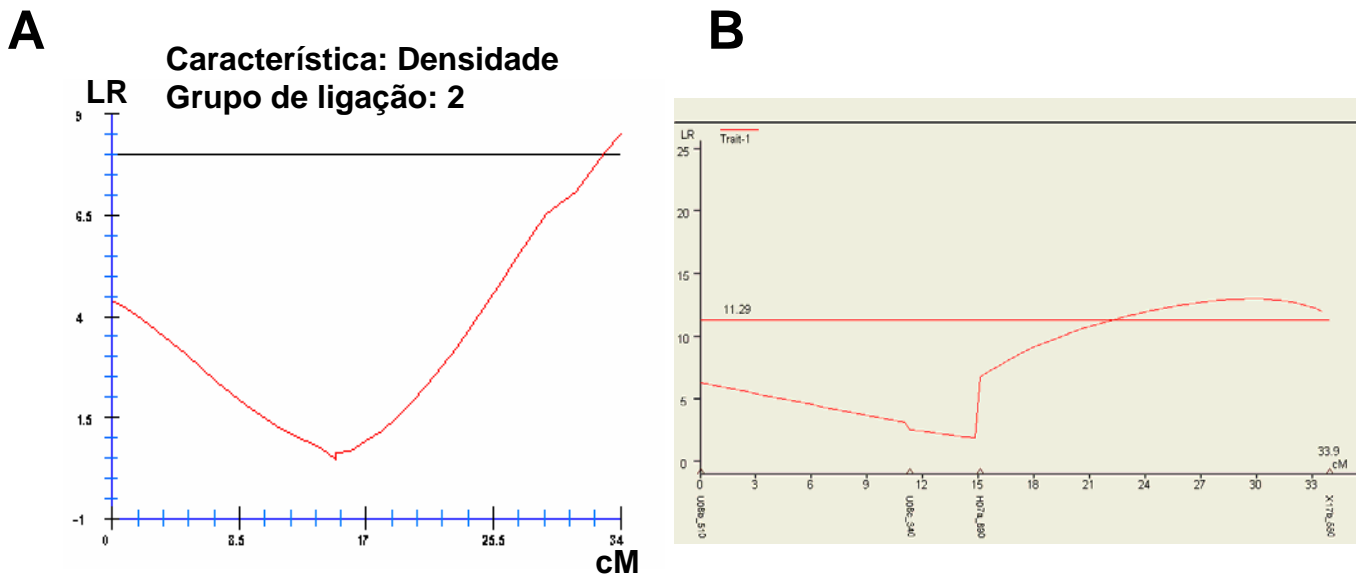


FIGURA 6 – Detecção de QTL’s relacionados com a expressão da característica de densidade da madeira utilizando as metodologias de mapeamento por intervalo simples (A) e mapeamento por intervalo composto (B).

4.4.2 Mapeamento dos QTL’s – Característica de qualidade da madeira: rendimento de polpa.

A metodologia de mapeamento por marcas simples indicou a existência de 8 marcas próximas aos locos controladores da expressão da característica densidade da madeira (TABELA 9). Destas 8 marcas apenas 3 agruparam no mapa de ligação de LOD = 3, sendo que as marcas E01a_831 e R04a_930 estão próximas a QTL identificado pelas metodologias de mapeamento por intervalo no grupo de ligação 3.

Locos controladores da expressão da característica rendimento de polpa também foram previamente estudados por GRATTAPAGLIA et al., (1996) avaliando híbridos *E. grandis* e *E. urophylla* provenientes uma população de polinização aberta, utilizando a estratégia de “bulk segregant analyses” (MILCHEMORE et al., 1981). Neste estudo não foram identificadas QTL’s relacionados com a expressão da característica rendimento de polpa.

TABELA 9 - Resultados do mapeamento por marca simples utilizando as metodologias de análise de variância e de regressão, mostrando as marcas

ligadas aos QTL's e as diferenças entre as médias dos indivíduos que apresentam a marca (1) e os que não apresentam (0). Os grupos de ligação das marcas para os mapas de LOD = 3 e LOD = 2 estão indicados.

Característica 2 – Rendimento de polpa						
Marca	Prob(F)	Média(1)	Média(0)	r	G. L. (LOD 3)	G. L. (LOD 2)
AF15a	0,0018 **	52,3516 a	50,683 b	0,2902	não agrupou	não agrupou
E01a_831	0,0033 **	52,3419 a	51,3049 b	0,3421	3	3
U03c_250	0,0303 *	52,1851 a	51,2045 b	0,3663	não agrupou	20
AB05c	0,0327 *	50,6338 a	52,2374 b	0,3004	não agrupou	não agrupou
G16a_540	0,0294 *	50,6185 a	52,2515 b	0,2967	1	1
C14	0,0292 *	52,1956 a	50,5523 b	0,2956	não agrupou	não agrupou
G19a	0,0092 **	52,321 a	50,3956 b	0,26	não agrupou	não agrupou
R04a_930	0,0327 *	52,3022 a	51,4538 b	0,3702	3	3

* Significativo a 5%.

** Significativo a 1%.

as letras "a" e "b" representam os contrastes entre as médias que diferiram pelo teste de Tukey.

O mapeamento por intervalo simples indicou uma única região relacionada com a expressão da característica rendimento de polpa que apresentou valores de LR superiores ao LR crítico (FIGURA 7A). O nível de significância determinado pelo teste de χ^2 corrigido por Bonferroni com 1 g.l. e nível de significância $\alpha = 10\%$ está indicado.

Após esta análise preliminar todas as regiões do genoma tiveram sua posição e efeitos reavaliados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto (FIGURA 7B). Os co-fatores foram escolhidos para análise de mapeamento por intervalo composto utilizando o procedimento de regressão "stepwise" do "WINQTL CART" (TABELA 10). O ponto de corte para identificação dos possíveis QTL's foi determinado por teste de permutação (DEORGE et al., 1996) conforme já descrito, sendo que o valor limite para a característica rendimento de polpa foi de 12,25.

Considerando o nível de significância obtido pelo teste de permutação, um QTL foi confirmado para a característica de rendimento de polpa em posição semelhante aquela obtida pelo método de mapeamento por intervalo simples (FIGURA 7B). Este QTL explica aproximadamente 13,5% da variação fenotípica total observada.

TABELA 10 – Co-fatores escolhidos utilizando o procedimento de regressão “stepwise” do WINQTL CART para análise de mapeamento por intervalo composto.

Característica -Rendimento de polpa %,	
Marcador	Grupo de ligação
E01a_831	3
K15b_490	9

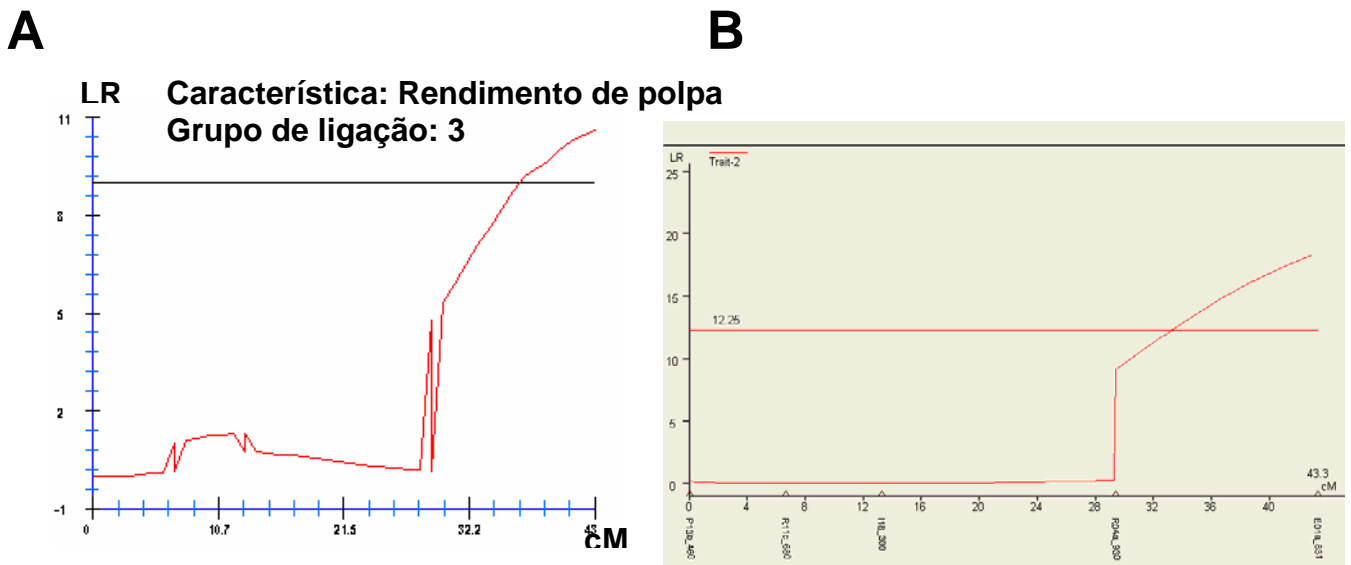


FIGURA 7 – Detecção de QTL’s relacionados com a expressão da característica de rendimento de polpa utilizando as metodologias de mapeamento por intervalo simples (A) e mapeamento por intervalo composto (B).

4.4.3 Mapeamento dos QTL's – Característica de qualidade da madeira: teor de extrativos.

Foram identificadas 7 marcas pela metodologia de mapeamento por marcas simples próximas aos locos controladores da expressão da característica teor de extrativos da madeira (TABELA 11). Destas 7 marcas, 4 agruparam no mapa de ligação de LOD = 3, sendo que as marcas G16a_540, R11a_900 e W16a_590 estão próximas a QTL's identificados pelas metodologias de mapeamento por intervalo no grupo de ligação 1. Não existem na literatura relatos anteriores de estudos de locos controladores da característica teor de extrativos em *Eucalyptus*.

TABELA 11- Resultados do mapeamento por marca simples utilizando as metodologias de análise de variância e de regressão, mostrando as marcas ligadas aos QTL's e as diferenças entre as médias dos indivíduos que apresentam a marca (1) e os que não apresentam (0). Os grupos de ligação das marcas para os mapas de LOD = 3 e LOD = 2 estão indicados.

Característica 3 – Teor de extrativos						
Marca	Prob(F)	Média(1)	Média(0)	r	G. L. (LOD 3)	G. L. (LOD 2)
B11d_240	0,0234 *	6,3967 a	7,3941 b	0,3316	não agrupou	18
E01a_831	0,0176 *	6,3829 a	7,0353 b	0,3713	3	3
K12d	0,0424 *	7,2357 a	6,5084 b	0,3667	não agrupou	não agrupou
G16a_540	0,0005 **	7,98 a	5,9629 b	0,1944	1	1
C14a	0,028 *	6,3248 a	7,6957 b	0,2942	não agrupou	não agrupou
R11a_900	0,0062 **	7,7926 a	6,1369 b	0,2504	1	1
W16a_590	0,0313 *	7,6281 a	6,2896 b	0,2989	1	1

* Significativo a 5%.

** Significativo a 1%.

as letras "a" e "b" representam os contrastes entre as médias que diferiram pelo teste de Tukey.

O mapeamento por intervalo simples indicou uma única região presente no grupo de ligação 1 relacionada com a expressão da característica teor de extrativos que apresentou valores de LR superiores ao LR crítico (FIGURA 8A). O nível de significância foi determinado teste de χ^2 corrigido por Bonferroni com 1 g.l., $\alpha = 10\%$. Após esta análise preliminar todas as regiões do genoma tiveram sua posição e efeitos reavaliados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto (FIGURA 8B). A metodologia de intervalo composto é

considerada um aperfeiçoamento da teoria proposta por Lander & Botstein, 1989 pois permite o isolamento de QTL's presentes dentro de um intervalo estabelecido, resolvendo uma importante limitação da metodologia de mapeamento por intervalo simples, a baixa resolução de detecção de dois ou mais QTL's presentes dentro de um mesmo grupo de ligação. Os efeitos dos QTL's adjacentes são confundidos na análise de mapeamento por intervalo simples o que geralmente resulta em um único QTL de efeito maior posicionado em posição intermediária, chamado de QTL fantasma (do inglês "Ghost QTL").

Os co-fatores foram escolhidos para análise de mapeamento por intervalo composto utilizando o procedimento de regressão "stepwise" do "WINQTL CART" (TABELA 12). O ponto de corte para identificação dos possíveis QTL's foi determinado por teste de permutação (DEORGE et al., 1996) conforme já descrito, sendo que o valor limite para a característica teor de extrativos foi de 11,34.

Considerando o nível de significância obtido pelo teste de permutação, dois QTL's foram confirmados para a característica teor de extrativos localizados em um mesmo grupo de ligação em posições diferentes daquelas obtida pelo método de mapeamento por intervalo simples (FIGURA 8B), caracterizando assim um QTL fantasma pela metodologia de mapeamento por intervalo simples, resultado da soma dos efeitos de dois QTL's adjacentes presentes no mesmo grupo de ligação.

Embora tenha sido encontrado valor de correlação negativo de alta magnitude para as características de teor de extrativos e rendimento de polpa, não existe indicativo de que estas características sejam predominantemente controladas por blocos gênicos comuns, considerando que os QTL's de maior efeito encontrados para cada uma das características estão em diferentes grupos de ligação (grupos 1 e 3 respectivamente). Estes dois QTL's explicam 17,3% e 24,8% da variação fenotípica total observada.

TABELA 12 – Co-fatores escolhidos utilizando o procedimento de regressão “stepwise” do WINQTL CART para análise de mapeamento por intervalo composto.

Característica - Teor de extrativos%	
Marcador	Grupo de ligação
I15b_490	1
G16a_540	1
R11c_680	3
R04a_930	3
E01a_831	3
R10a_890	9
AB05b_600	10
K15d_490	12

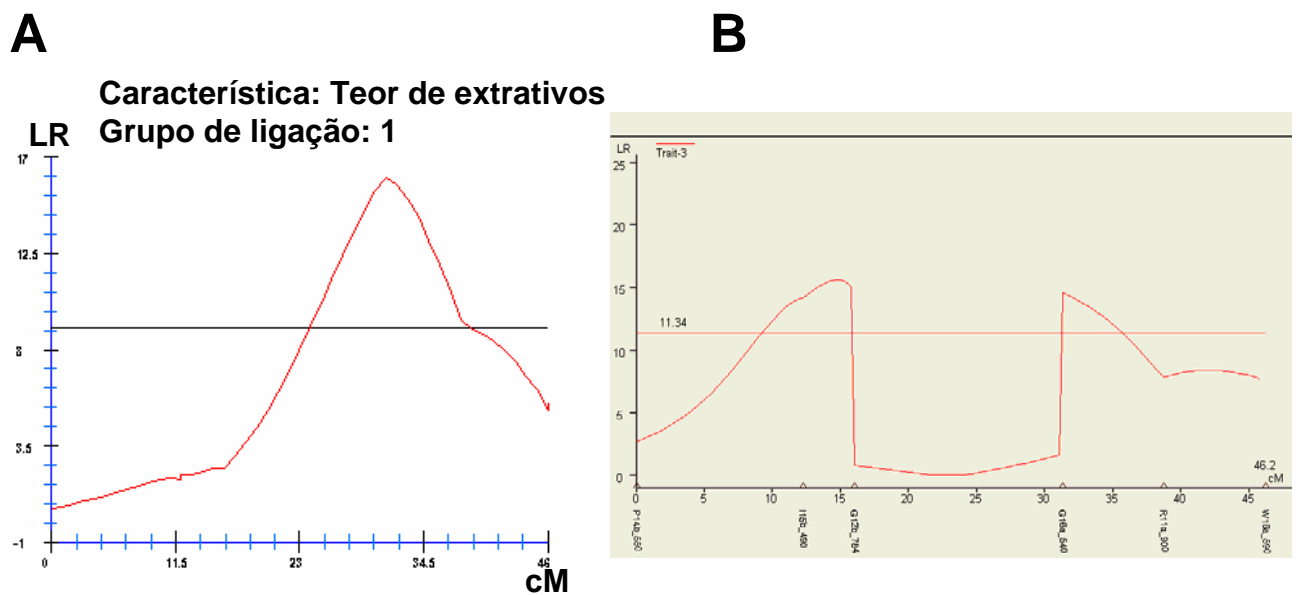


FIGURA 8 – Detecção de QTL’s relacionados com a expressão da característica de teor de extrativos utilizando as metodologias de mapeamento por intervalo simples (A) e mapeamento por intervalo composto (B).

4.4.4 Mapeamento dos QTL's – Característica de qualidade da madeira: teor de lignina insolúvel.

Foram identificadas 8 marcas pela metodologia de mapeamento por marcas simples próximas aos locos controladores da expressão da característica teor de lignina insolúvel (TABELA 13). Destas 8 marcas, apenas 2 agruparam no mapa de ligação de LOD = 3, sendo que as marcas G12b_784 e E01a_831 estão próximas a QTL's identificado pelas metodologias de mapeamento por intervalo presentes nos grupos de ligação 1 e 3. Não existem na literatura relatos anteriores de estudos de locos controladores da característica teor de lignina insolúvel em *Eucalyptus*.

TABELA 13- Resultados do mapeamento por marca simples utilizando as metodologias de análise de variância e de regressão, mostrando as marcas ligadas aos QTL's e as diferenças entre as médias dos indivíduos que apresentam a marca (1) e os que não apresentam (0). Os grupos de ligação das marcas para os mapas de LOD = 3 e LOD = 2 estão indicados.

Característica 4 – Teor de lignina insolúvel						
Marca	Prob(F)	Média(1)	Média(0)	r	G. L. (LOD 3)	G. L. (LOD 2)
AF15a	0,0014 **	25,7161 a	26,7726 b	0,2855	não agrupou	não agrupou
Al15b	0,0498 *	26,6193 a	26,007 b	0,3707	não agrupou	não agrupou
E01a_831	0,025 *	25,8588 a	26,4125 b	0,3782	3	3
G12b_784	0,0288 *	25,8346 a	26,4171 b	0,3678	1	1
G12f_260	0,0026 **	25,7862 a	26,5522 b	0,3274	não agrupou	17
K16c	0,0372 *	25,8351 a	26,403 b	0,3728	não agrupou	não agrupou
R10c_280	0,0171 *	26,6544 a	25,6357 b	0,2732	não agrupou	11
G19a	0,0142 *	25,826 a	26,8409 b	0,2727	não agrupou	não agrupou

* Significativo a 5%.

** Significativo a 1%.

as letras "a" e "b" representam os contrastes entre as médias que diferiram pelo teste de Tukey.

O mapeamento por intervalo simples não indicou regiões relacionadas com locos controladores da expressão da característica teor de lignina insolúvel considerando o critério de que são considerados QTL's apenas aquelas regiões de valores de LR superiores ao LR crítico determinado pelo teste de χ^2 corrigido por Bonferroni com 1 g.l., $\alpha = 10\%$ (FIGURA 9A).

Após esta análise preliminar todas as regiões do genoma tiveram sua posição e efeitos reavaliados pela metodologia de mapeamento por intervalo

composto (FIGURA 9B). QTL's aparentemente não significativos pela metodologia de intervalo simples podem exibir valores de LR superiores ao estabelecido pelo teste de permutação, empregando a metodologia de mapeamento por intervalo composto. Isto porque o emprego de metodologias de mapeamento por intervalo composto associadas a testes de permutação garante maior poder de detecção de QTL's permitindo a identificação de regiões do genoma de importância aparentemente não significativas pelo intervalo simples (ZENG, 1993).

Os co-fatores foram escolhidos para análise de mapeamento por intervalo composto utilizando o procedimento de regressão "stepwise" do "WINQTL CART" (TABELA 14). O ponto de corte para identificação dos possíveis QTL's foi determinado por teste de permutação (DEORGE et al., 1996) conforme já descrito, sendo que o valor limite para a característica teor de lignina insolúvel foi de 11,32.

Considerando o nível de significância obtido pelo teste de permutação, dois QTL's foram confirmados para a característica teor de lignina insolúvel localizado no grupo de ligação 1 (FIGURA 9B).

O valor de correlação negativo de alta magnitude encontrado entre as características teor de lignina insolúvel e rendimento de polpa associado à sobreposição de QTL's encontrados no grupo de ligação 3 sugere que estas características tenham a expressão afetada por blocos gênicos comuns. GRATTAPAGLIA et al. (1996) também relatam a existência de regiões genômicas chave, relacionadas de maneira ampla com a expressão de características de crescimento e qualidade da madeira. Tal fato pode ser devido à existência de genes de maior efeito relacionados não apenas com a regulação e controle das características avaliadas, mas também de ação predominantemente epistática em outros genes. Neste sentido, destaca-se todo o grupo de ligação 1 e as regiões após 20 cM do grupo de ligação 3, como essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta. Estes dois QTL's explicam, respectivamente, 12,3% e 14,1% da variação fenotípica total observada.

TABELA 14 – Co-fatores escolhidos utilizando o procedimento de regressão “stepwise” do WINQTL CART para análise de mapeamento por intervalo composto.

Característica – Teor de lignina insolúvel %	
Marcador	Grupo de ligação
G12b_784	1
G16a_540	1
E01a_831	3
E19d_460	5
AB04b_450	7
L11d_250	11

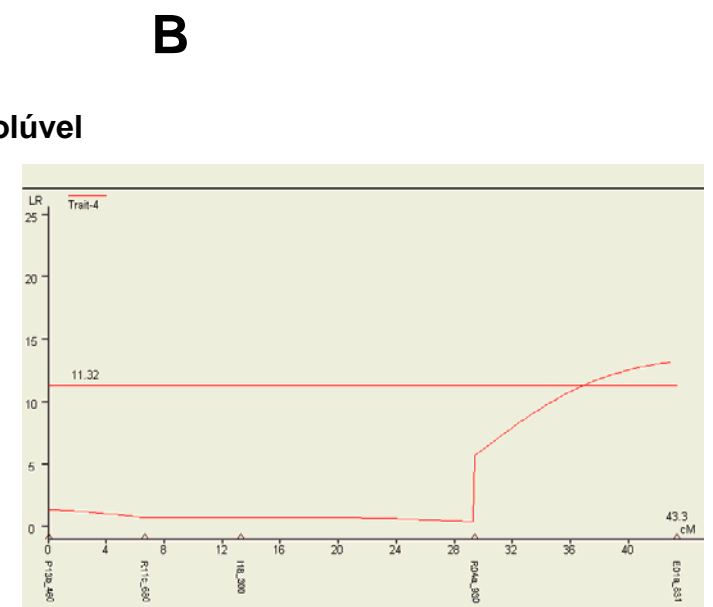
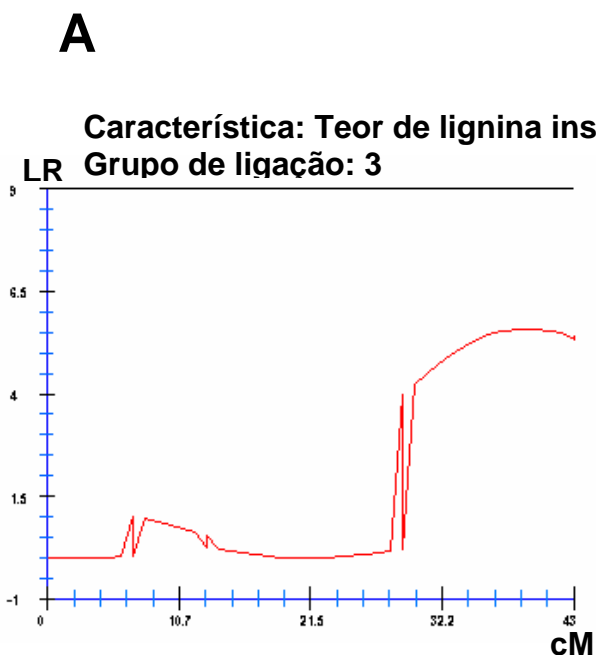
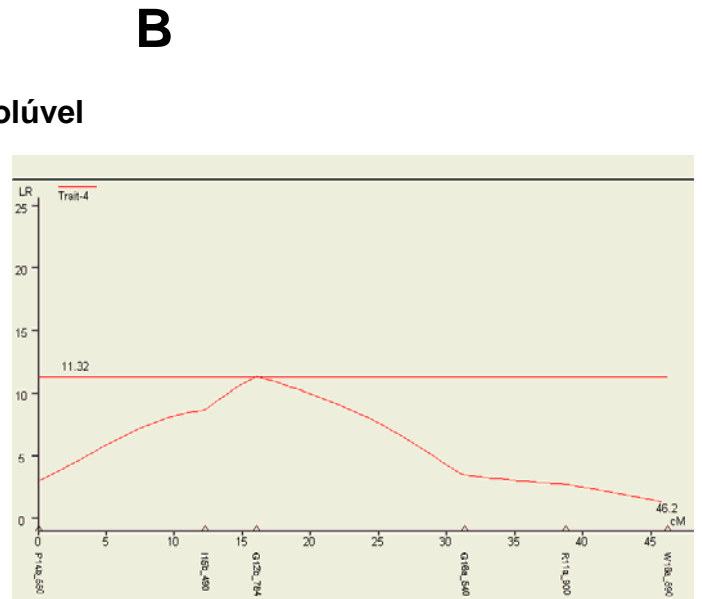
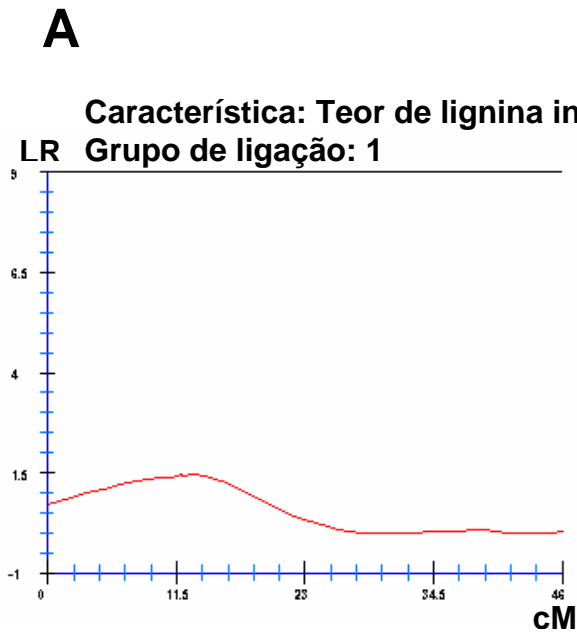


FIGURA 9 – Detecção de QTL's relacionados com a expressão da característica de teor de lignina insolúvel utilizando as metodologias de mapeamento por intervalo simples (A) e mapeamento por intervalo composto (B).

4.4.5 Mapeamento dos QTL's – Característica de qualidade da madeira: teor de lignina solúvel.

Foram identificadas 7 marcas pela metodologia de mapeamento por marcas simples próximas a os controladores da expressão da característica teor de lignina solúvel (TABELA 15). Destas 7 marcas, apenas 1 agrupou no mapa de ligação de LOD = 3, sendo que a marca AB04b_450 está próxima a QTL identificado pelas metodologias de mapeamento por intervalo presente no grupo de ligação 7. Não existem na literatura relatos anteriores de estudos de locos controladores da característica teor de lignina solúvel em *Eucalyptus*.

TABELA 15- Resultados do mapeamento por marca simples utilizando as metodologias de análise de variância e de regressão, mostrando as marcas ligadas aos QTL's e as diferenças entre as médias dos indivíduos que apresentam a marca (1) e os que não apresentam (0). Os grupos de ligação das marcas para os mapas de LOD = 3 e LOD = 2 estão indicados.

Característica 5 – Teor de lignina solúvel						
Marca	Prob(F)	Média(1)	Média(0)	r	G. L. (LOD 3)	G. L. (LOD 2)
AB04b_450	0,0282 *	3,329 a	3,5617 b	0,3557	7	7
E19e	0,0272 *	3,5873 a	3,385 b	0,3668	não agrupou	não agrupou
G12a	0,0497 *	3,3693 a	3,5419 b	0,3862	não agrupou	não agrupou
P14a_700	0,0324 *	3,399 a	3,6132 b	0,363	não agrupou	24
B06d	0,0317 *	3,3504 a	3,6813 b	0,2765	não agrupou	não agrupou
G19a	0,0337 *	3,5645 a	3,2757 b	0,3005	não agrupou	não agrupou
I11a	0,0075 **	3,5935 a	3,2394 b	0,2548	não agrupou	não agrupou

* Significativo a 5%.

** Significativo a 1%.

as letras "a" e "b" representam os contrastes entre as médias que diferiram pelo teste de Tukey.

O mapeamento por intervalo simples não indicou regiões relacionadas com locos controladores da expressão da característica teor de lignina solúvel considerando o critério de que são considerados QTL's, apenas aquelas regiões de valores de LR superiores ao LR crítico determinado pelo teste de χ^2 corrigido por Bonferroni com 1 g.l., $\alpha = 10\%$ (FIGURA 10A).

Após esta análise preliminar todas as regiões do genoma tiveram sua posição e efeitos reavaliados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto (FIGURA 10B).

Os co-fatores foram escolhidos para análise de mapeamento por intervalo composto utilizando o procedimento de regressão “stepwise” do “WINQTL CART” (TABELA 16). O ponto de corte para identificação dos possíveis QTL’s foi determinado por teste de permutação (DEORGE et al., 1996) conforme já descrito, sendo que o valor limite para a característica teor de lignina insolúvel foi de 11,22.

Considerando o nível de significância obtido pelo teste de permutação, um QTL foi confirmado para a característica teor de lignina insolúvel localizado no grupo de ligação 7 (FIGURA 10A). Este QTL explica 18,1% da variação fenotípica total observada.

TABELA 16 – Co-fatores escolhidos utilizando o procedimento de regressão “stepwise” do WINQTL CART para análise de mapeamento por intervalo composto.

Característica – Teor de lignina solúvel %	
Marcador	Grupo de ligação
I15b_490	1
G11d_240	5
AB04b_450	7
W20a_800	7
K12b_540	9
E01d_440	11

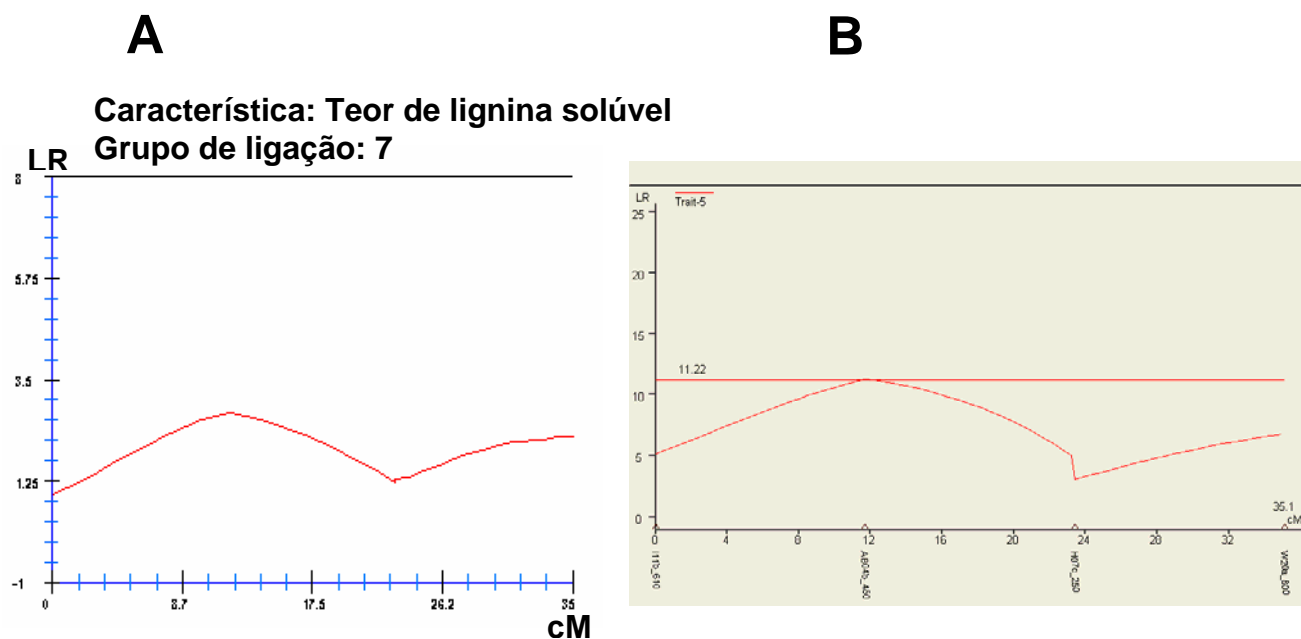


FIGURA 10 – Detecção de QTL's relacionados com a expressão da característica de teor de lignina solúvel utilizando as metodologias de mapeamento por intervalo simples (A) e mapeamento por intervalo composto (B).

4.4.6 Mapeamento dos QTL's – Característica de crescimento da madeira: D.A.P.

A metodologia de mapeamento por marcas simples indicou a existência de 11 marcas próximas aos locos controladores da expressão da característica densidade da madeira (TABELA 17). Destas 11 marcas apenas 5 agruparam no mapa de ligação de LOD = 3, sendo que as marcas B11b_831 e C04c_500 estão próximas a QTL identificado pelas metodologias de mapeamento por intervalo no grupo de ligação 4.

Locos controladores da expressão da característica D.A.P. foram previamente estudados por GRATTAPAGLIA et al., (1996) avaliando híbridos *E. grandis* e *E. urophylla* provenientes de uma população de polinização aberta, utilizando a estratégia de "bulk segregant analyses" (MILCHEMORE et al., 1981). Neste estudo foram identificadas 2 QTL's relacionados com a expressão da característica D.A.P. localizados em 2 grupos de ligação diferentes.

VERHAEGEN et al., (1997) também identificaram 2 QTL's em idade adulta associados com a característica densidade da madeira avaliando híbridos *E. grandis* e *E. urophylla* provenientes de cruzamento controlado.

TABELA 17 Resultados do mapeamento por marca simples utilizando as metodologias de análise de variância e de regressão, mostrando as marcas ligadas aos QTL's e as diferenças entre as médias dos indivíduos que apresentam a marca (1) e os que não apresentam (0). Os grupos de ligação das marcas para os mapas de LOD = 3 e LOD = 2 estão indicados.

Característica 6 - DAP						
Marca	Prob(F)	Média(1)	Média(0)	r	G. L. (LOD 3)	G. L. (LOD 2)
AD18b	0,0435 *	19,8704 a	17,9444 b	0,3731	não agrupou	não agrupou
B11b_831	0,0415 *	19,3826 a	17,3382 b	0,3749	4	4
B11d_240	0,0426 *	20,1615 a	17,7778 b	0,3485	não agrupou	18
B15b	0,0135 *	19,6953 a	17,2206 b	0,3483	não agrupou	não agrupou
C04c_500	0,003 **	19,8572 a	17,1053 b	0,3316	4	4
E19d_460	0,0166 *	20,2344 a	17,8095 b	0,3517	5	5
J07b	0,0493 *	19,312 a	17,1333 b	0,3745	não agrupou	não agrupou
AB02a_800	0,0457 *	20,0257 a	16,9615 b	0,3123	não agrupou	11
AB15a	0,018 *	20,5782 a	16,875 b	0,264	não agrupou	não agrupou
G16a_540	0,0442 *	16,9508 a	20,0357 b	0,3111	1	1
X17b_550	0,0481 *	19,4815 a	17,4287 b	0,3617	2	2

* Significativo a 5%.

** Significativo a 1%.

as letras "a" e "b" representam os contrastes entre as médias que diferiram pelo teste de Tukey.

O mapeamento por intervalo simples não indicou regiões relacionadas com locos controladores da expressão da característica D.A.P. considerando que QTL's apenas aquelas regiões de valores de LR superiores ao LR crítico determinado pelo teste de χ^2 corrigido por Bonferroni com 1 g.l., $\alpha = 10\%$ (FIGURA 11A).

Após esta análise preliminar todas as regiões do genoma tiveram sua posição e efeitos reavaliados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto (FIGURA 11B). Os co-fatores foram escolhidos para análise de mapeamento por intervalo composto utilizando o procedimento de regressão "stepwise" do "WINQTL CART" (TABELA 18). O ponto de corte para identificação dos possíveis QTL's foi determinado por teste de permutação (DEORGE et al., 1996) conforme já descrito, sendo que o valor limite para a característica teor de lignina insolúvel foi de 12,13.

Considerando o nível de significância obtido pelo teste de permutação, um QTL foi confirmado para a característica D.A.P. localizado no grupo de ligação 4 (FIGURA 11B). Este QTL explica 20,0% da variação fenotípica total observada.

TABELA 18 – Co-fatores escolhidos utilizando o procedimento de regressão “stepwise” do WINQTL CART para análise de mapeamento por intervalo composto.

Característica – D.A.P.	
Marcador	Grupo de ligação
X17b_550	2
C04c_500	4

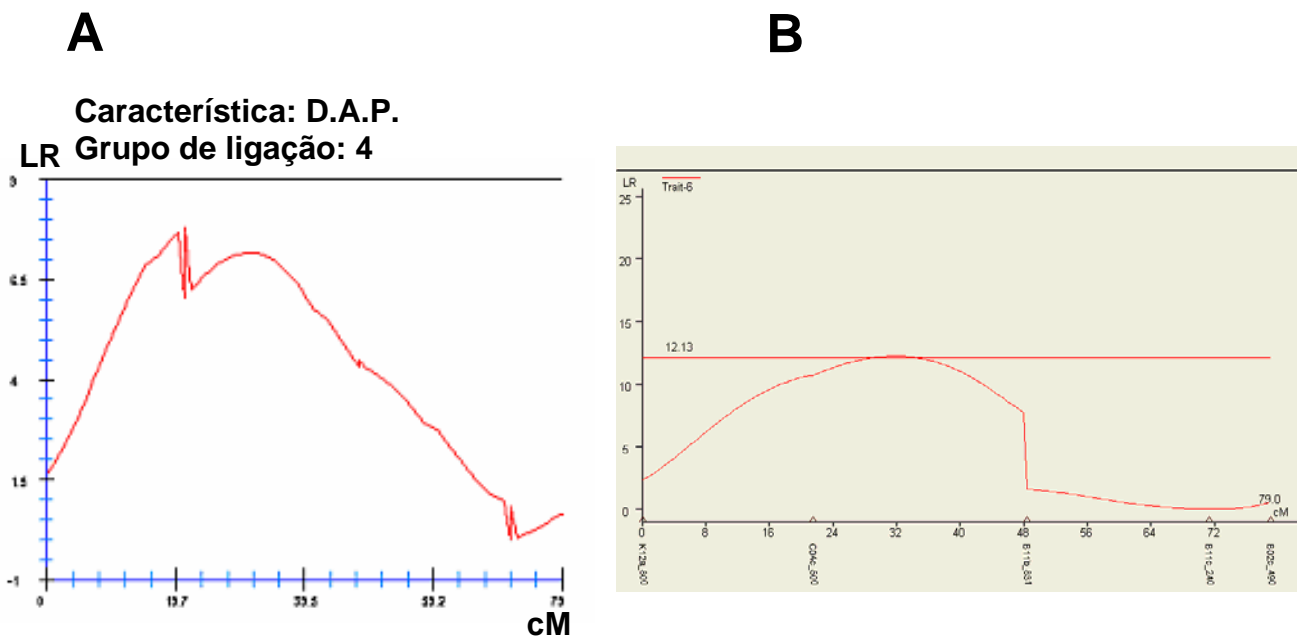


FIGURA 11 – Detecção de QTL’s relacionados com a expressão da característica D.A.P. utilizando as metodologias de mapeamento por intervalo simples (A) e mapeamento por intervalo composto (B).

4.4.7 Mapeamento dos QTL's – Característica de crescimento da madeira: altura comercial.

A metodologia de mapeamento por marcas simples indicou a existência de 7 marcas próximas aos locos controladores da expressão da característica densidade da madeira (TABELA 19). Destas 7 marcas, 4 agruparam no mapa de ligação de LOD = 3, sendo que as marcas B11b_831 e C04c_500 estão próximas a QTL identificado pelas metodologias de mapeamento por intervalo no grupo de ligação 4.

Locos controladores da expressão da característica D.A.P. foram previamente estudados por VERHAEGEN et al., 1997 que identificaram 2 QTL's em idade adulta associados com a característica altura avaliando híbridos *E. grandis* e *E. urophylla* provenientes de cruzamento controlado.

TABELA 19 - Resultados do mapeamento por marca simples utilizando as metodologias de análise de variância e de regressão, mostrando as marcas ligadas aos QTL's e as diferenças entre as médias dos indivíduos que apresentam a marca (1) e os que não apresentam (0). Os grupos de ligação das marcas para os mapas de LOD = 3 e LOD = 2 estão indicados.

Característica 8 – Altura comercial						
Marca	Prob(F)	Média(1)	Média(0)	r	G. L. (LOD 3)	G. L. (LOD 2)
AF15b	0,0439 *	17,831 a	20,3043 b	0,3453	não agrupou	não agrupou
C04c_500	0,0085 **	20,8103 a	17,9268 b	0,3499	4	4
E01b	0,026 *	17,3892 a	20,2544 a	0,3343	não agrupou	não agrupou
E01e	0,0162 *	18,5628 a	20,9934 b	0,3564	não agrupou	não agrupou
K12a_800	0,0486 *	20,5597 a	18,3328 b	0,3836	4	4
G16a_540	0,0101 *	16,3985 a	21,44 b	0,2638	1	1
R11a_900	0,0266 *	16,7215 a	21,14 b	0,2934	1	1

* Significativo a 5%.

** Significativo a 1%.

as letras "a" e "b" representam os contrastes entre as médias que diferiram pelo teste de Tukey.

O mapeamento por intervalo simples não indicou regiões relacionadas com locos controladores da expressão da característica altura comercial considerando QTL's, apenas aquelas regiões de valores de LR superiores ao LR crítico determinado pelo teste de χ^2 corrigido por Bonferroni com 1 g.l., $\alpha = 10\%$ (FIGURA12A).

Após esta análise preliminar todas as regiões do genoma tiveram sua posição e efeitos reavaliados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto (FIGURA 12B). Os co-fatores foram escolhidos para análise de mapeamento por intervalo composto utilizando o procedimento de regressão “stepwise” do “WINQTL CART” (TABELA 20). O ponto de corte para identificação dos possíveis QTL’s foi determinado por teste de permutação (DEORGE et al., 1996) conforme já descrito, sendo que o valor limite para a característica teor de lignina insolúvel foi de 11,15.

Considerando o nível de significância obtido pelo teste de permutação, um QTL foi confirmado para a característica altura comercial localizado no grupo de ligação 4 (FIGURA 12B).

Tendo em vista o valor de correlação positivo de alta magnitude encontrado entre as características altura comercial e D.A.P. associado à sobreposição de QTL’s encontrados no grupo de ligação 4 é provável que estas características tenham a expressão afetada por blocos gênicos comuns. O alto valor de correlação e a similaridade das metodologias de mapeamento por intervalo sugerem a existência de apenas 1 QTL relacionado com a expressão destas duas características. Este QTL explica 19,8% da variação fenotípica total observada.

TABELA 20 – Co-fatores escolhidos utilizando o procedimento de regressão “stepwise” do WINQTL CART para análise de mapeamento por intervalo composto.

Característica – Altura comercial%	
Marcador	Grupo de ligação
G12b_784	1
G16a_540	1
U08b_540	2
U08c_340	2
X17b_550	2
C04c_500	4
K14b_460	12

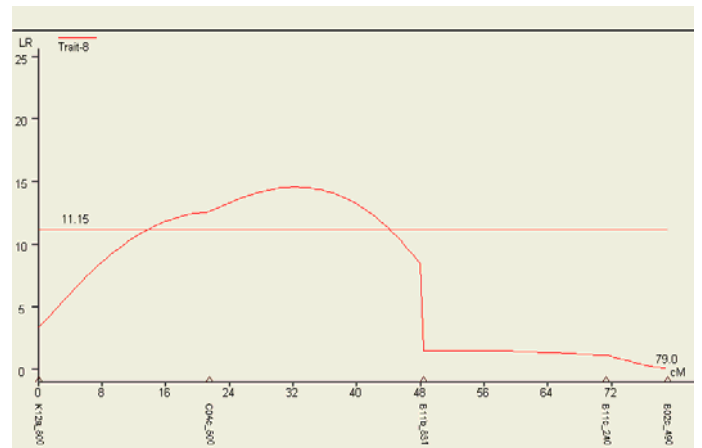
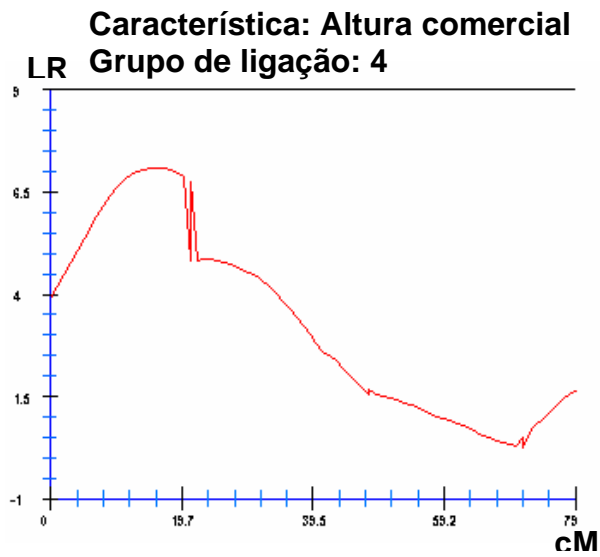


FIGURA 12 – Detecção de QTL's relacionados com a expressão da característica altura comercial utilizando as metodologias de mapeamento por intervalo simples (A) e mapeamento por intervalo composto (B).

Embora todas as características avaliadas tenham exibido variabilidade e marcadores relacionados com locos controladores da expressão de todas as características tenham sido detectados a baixa saturação do mapa dificultou a detecção dos QTL's além dos descritos, respectivamente: 1 QTL para densidade, 1 QTL para rendimento de polpa e 2 QTL's para teor de extrativos confirmados pelas duas metodologias e 1 QTL para teor de lignina solúvel, 2 QTL's para teor de lignina insolúvel, 1 QTL para D.A.P. e 1 QTL para altura total confirmados apenas pela metodologia de mapeamento por intervalo composto.

4.5 Seleção assistida

Além de permitir o estudo da natureza e variação das características quantitativas, um dos principais objetivos da análise de QTL's é a identificação de marcadores capazes de auxiliar procedimentos de seleção. Normalmente a implementação de procedimentos de seleção assistida por marcadores moleculares depende de duas etapas principais: primeiro da caracterização dos efeitos e identificação dos QTL's e segundo da manipulação destes QTL's ao longo dos ciclos de seleção. Neste sentido a utilização de marcadores moleculares associado ao desenvolvimento de novas progênies a partir dos genitores *E. grandis* e *E. urophylla* estudados deve permitir a seleção precoce para os QTL's identificados.

Segundo GRATTAPAGLIA et al., 1996 a utilização de marcadores para seleção assistida em *Eucalyptus* é promissora. O grande desequilíbrio de ligação gerado no cruzamento de genitores altamente divergentes associado a possibilidade de manutenção a variação genética não aditiva, geração a geração, utilizando processos de clonagem em larga escala favorecem procedimentos de seleção assistida por marcadores em *Eucalyptus*.

Procedimentos de seleção assistida por marcadores moleculares apresentam eficiência de seleção diferencial em relação a metodologias de seleção fenotípica, podendo ser mais ou menos eficiente que estas. Segundo LANDE & THOMPSON (1990) a utilização de metodologias de seleção assistida por marcadores moleculares deve ser decidida caso a caso.

Em teoria a seleção assistida por marcadores moleculares é mais eficiente quando: 1) a ligação entre o marcador e o QTL é pequena, (YOUSEF & JUVIK, 2001) 2) grandes populações são consideradas (MOREAU et al., 1998) 3) pares de marcadores adjacentes ao QTL são utilizados em conjunto (LANDE & THOMPSON, 1990) 4) a herdabilidade da característica é baixa (MOREAU et al., 2000) 5) a seleção é realizada em gerações próximas aquela estudada, para que eventos naturais de recombinação não diminuam a associação marcador QTL (YOUSEF & JUVIK, 2001).

Visando avaliar o efeito da seleção precoce utilizando a informação de marcadores moleculares foi avaliada a eficiência da seleção assistida utilizando os marcadores adjacentes aos QTL's identificados. Para isto foram

comparados os valores dos diferenciais de seleção da seleção assistida e seleção fenotípica (TABELA 21). O diferencial de seleção é um componente importante das expressões de ganho se seleção, utilizadas para prever a alteração na média da característica resultado da prática da seleção. A eficiência de seleção é diretamente proporcional ao diferencial de seleção e portanto considera-se mais eficiente a metodologia que resultar nos maiores diferenciais de seleção. Para a obtenção dos valores dos diferenciais de seleção foi considerada a porcentagem dos selecionados igual a 10%.

A análise dos valores dos diferenciais de seleção sugere que para todas as características avaliadas a seleção fenotípica aos 7 anos deva gerar ganhos maiores que a seleção precoce assistida por marcadores moleculares. O QTL que apresentou o menor efeito na alteração da média da característica foi o QTL flanqueado pelos marcadores I15b_490, G12b_784 para teor de lignina insolúvel, identificado apenas pela metodologia de mapeamento por intervalo composto para esta característica (0,3%). QTL's identificados apenas pela metodologia de mapeamento por intervalo composto e não identificados no mapeamento por intervalo simples representam regiões de menor efeito do que aquelas identificadas pelas duas metodologias e sua utilização nos procedimentos de seleção assistida deve ser avaliado individualmente. Alterações nas médias das características tão altas como 19% para D.A.P. e 11% para teor de extrativos e altura comercial foram encontradas com a utilização de marcadores para a seleção.

TABELA 21: Valores dos diferenciais de seleção obtidos utilizando a informação dos marcadores moleculares e os valores obtidos utilizando informação dos valores fenotípicos.

Característica: densidade da madeira		
Marcadores selecionados (presença): X17b_550 e H07a_890		
	Seleção assistida	Seleção fenotípica
Média selecionados	567,7389	595,4847
DS	13,8623	41,608
DS(%)	2,5028	7,5122
Característica: rendimento de polpa		
Marcadores selecionados (presença): E01a_831 e R04a_930		
	Seleção assistida	Seleção fenotípica
Média selecionados	52,4715	53,3265
DS	0,8272	1,6822
DS(%)	1,6018	3,2573
Característica: teor de extrativos		
Marcadores selecionados (ausência): I15b_490, G12b_784		
Média selecionados	6,4865	4,958
DS	-0,3213	-1,85
DS(%)	-4,72	-27,17
Característica: teor de extrativos		
Marcadores selecionados (ausência) G16a_540 e R11a_900		
Média selecionados	6,0272	4,958
DS	-0,7806	-1,85
DS(%)	-11,4667	-27,17

Característica: teor de lignina insolúvel		
Marcadores selecionados (presença): R04a_930 e E01a_831		
Média selecionados	25,7019	24,117
DS	-0,5222	-2,107
DS(%)	-1,9913	-8,0336
Característica: teor de lignina insolúvel		
Marcadores selecionados (presença): I15b_490, G12b_784		
Média selecionados	26,1237	24,117
DS	-0,1004	-2,107
DS(%)	-0,3829	-8,0336
Característica: teor de lignina solúvel		
Marcadores selecionados (presença): AB04b_450 e H07c_250		
Média selecionados	3,3224	2,766
DS	-0,1236	-0,680
DS(%)	-3,5869	-19,729
Característica: D.A.P.		
Marcadores selecionados (presença): C04c_500 e B11b_831		
Média selecionados	21,9444	24,7222
DS	3,5864	6,3642
DS(%)	19,5361	34,6673
Característica: Altura comercial		
Marcadores selecionados (presença): C04c_500 e B11b_831		
Média selecionados	21,4489	24,5844
DS	2,2068	5,3423
DS(%)	11,4685	27,7638

A utilização da seleção precoce assistida por marcadores moleculares em adição a seleção fenotípica aos 7 anos além de gerar maiores ganhos a cada ciclo de seleção deve ser empregada visando o aumento na intensidade de seleção em idade precoce resultando em menor número de indivíduos que serão levados para o campo.

Além do efeito do QTL, a técnica de marcadores moleculares utilizada e a saturação média do mapa também apresentam implicações para o desenvolvimento de marcas para auxiliar a seleção. A reprodutibilidade questionável da técnica de RAPD pode ser contornada por meio do desenvolvimento de marcadores SCAR, sintetizados a partir do conhecimento da sequência de bases dos fragmentos de DNA amplificados pela técnica de RAPD. Além do desenvolvimento de um marcador extremamente robusto o sequenciamento dos marcadores relacionados com a expressão das características quantitativas podem ajudar a esclarecer mecanismos de controle da expressão. A baixa saturação do mapa também apresenta implicações no que diz respeito ao desenvolvimento de marcadores para seleção assistida uma vez que dificulta a utilização de pares de marcas nos procedimentos de seleção, sabidamente mais eficientes do que procedimentos utilizando uma única marca.

O acúmulo de informações a respeito de regiões do genoma de maior efeito na expressão das características de crescimento e qualidade da madeira e a utilização de técnicas de marcadores mais robustas devem resultar em um conjunto cada vez maior de marcadores disponíveis para a seleção assistida nas espécies do gênero *Eucalyptus*. A validação dos QTL's mediante ao emprego da seleção assistida em programas de melhoramento é considerada por muitos pesquisadores como a etapa seguinte aos trabalhos de mapeamento dos QTL's, imprescindível para o desenvolvimento de marcas a serem incorporadas na rotina destes programas.

5. CONCLUSÕES

Do total de 260 oligonucleotídeos testados, 63 amplificaram fragmentos de DNA de melhor resolução para o mapeamento. A alta diversidade genética inerente às espécies do gênero *Eucalyptus* favoreceu a obtenção de maior número de fragmentos polimórficos.

Foram obtidos 176 marcadores RAPD polimórficos sendo 87 do genitor *E. grandis* e 89 do *E. urophylla*. Uma proporção de 13,6% do total de marcas apresentou segregação distorcida. Duas destas marcas foram agrupadas no mapa de ligação e não foram descartadas.

Foi desenvolvido um único mapa de ligação para os híbridos *E. grandis* e *E. urophylla* como estratégia para a obtenção de um mapa de maior saturação. Foram obtidos 12 grupos de ligação pouco saturados contendo 51 marcas e 125 marcadores não ligados no desenvolvimento do mapa de LOD = 3.

Nas análises de mapeamento por análise de variância foram obtidas 59 marcas relacionadas com locos controladores da expressão das características quantitativas, portanto, potencialmente úteis para a seleção assistida. Tais marcadores indicam que devam existir outras regiões do genoma relacionadas com a expressão das características avaliadas.

Utilizando a metodologia de mapeamento por intervalo composto, foram identificados 9 QTL's associados com as características de qualidade da madeira: densidade, rendimento de polpa, teor de extrativos, teor de lignina solúvel e teor de lignina insolúvel e para as características de crescimento D.A.P. e altura.

A sobreposição de QTL's em determinadas regiões dos grupos de ligação pode ser indício da existência de regiões do genoma de maior importância para o crescimento e desenvolvimento da planta, sugerindo a presença de blocos gênicos de maior efeito relacionados com a regulação e controle das características de crescimento.

Alterações nas médias das características tão altas como 19% para D.A.P. e 11% para teor de extrativos e altura comercial foram encontradas com a utilização de marcadores para a seleção.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRACAVE - Associação Brasileira de Florestas Renováveis. **Anuário Estatístico**, 1996. Belo Horizonte, p.18, 1996.
- ANTTI, H. **Multivariate characterization of wood related materials**. Umea University, Umea, Sweden, 1999. 86p. Phd. Tesis, University of Umea, 1999.
- ARAÚJO E. S. N., GIMENES M. A., LOPES C. R., Phylogenetic relation among genera *Eucalyptus* and *Corymbia* species based on rDNA internal transcribed spacers sequences. **Scientia Forestalis** v.62, p. 75-85, 2002.
- BRONDANI, R.P.V., BRONDANI C., TARCHINI R., GRATTAPAGLIA D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* . **Theor. Appl. Genet.** v.97: p.816-827, 1998.
- BRONDANI, R.P.V., BRONDANI C., GRATTAPAGLIA D., Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. **Mol. Genet. Genomics**, v.267, p.338-347, 2002.
- BYRNE, M., MURREL, J. C., ALLEN, B. An integrated genetic linkage map for *Eucalyptus* using RFLP, RAPD and isozyme markers. **Theor. Appl. Genet.** v.91:p.869-875, 1995.
- BYRNE M., MURRELL J. C., OWEN J. V., KRIEDMANN P., WILLIAMS E. R., MORAN G. F. Identification and mode of action of quantitative trait loci affecting seedling height an leaf area in *Eucalyptus nitens*. **Theor. Appl. Genet.** v.94:p.674-681, 1997a.

- BYRNE M., MURRELL J. C., OWEN J. V., WILLIAMS E. R., MORAN G. F. Mapping of quantitative trait loci influencing frost tolerance in *Eucalyptus nitens*. **Theor. Appl. Genet.** v.95:p.975-979, 1997b.
- CARLSON J. E., TULSIERAM L. K., GLAUBITZ, J. C. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. **Theor. Appl. Genet...**, v.83, p.194-200, 1991
- CÂNCIO, O.N.; **Diversidade genética de progênies de meios irmãos de *E. urophylla* por meio de metodologia quantitativa e marcadores moleculares RAPD.** Viçosa, MG: UFV 1998. 52 p. Dissertação. (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- CAMPINHOS, E. N., **Análise de QTL´s em *Eucalyptus grandis*: Estabilidade da expressão, mapeamento localizado e preservação de folhas para análise RAPD.** Viçosa, MG: UFV, 1996. 86 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- D´ALMEIDA M. L. O. **Celulose e papel: Tecnologia de fabricação da pasta celulósica.** Mooca, SP. SENAI, 1981. 492 p.
- DEORGE, R. W., CHURCHILL, G. A. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, v.142 p.285-294, 1996
- DIAS L. A. S., ROCHA, R. B., MURO ABAD J. I., SALOMÃO T. F., ALFENAS A. C. Cocoa cultivar distinctiveness and hybrid prediction using RAPD markers. **Ingenic Newsletter** v.6:p.19–22, 2001.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.27, p. 13-15, 1990.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa.** Trad. De Martinho de Almeida e Silva e José Carlos Silva. Viçosa, MG: UFV, 1987. 279p.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília, DF: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220p.
- FERREIRA, M. **Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal.** Piracicaba: IPEF, v.45. p.22-30, 1992.
- GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by genes markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 46:p.310-330, 1975.

- GRATTAPAGLIA, D., BERTOLUCCI, F.L., SEDEROFF, R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.90, p.933-947, 1995.
- GRATTAPAGLIA, D., SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v.137, p.1121-1137, 1994.
- GRATTAPAGLIA, D. BERTOLUCCI F. L. G., PENCHEL R., SEDEROFF R. R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth trait and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using maternal half-sib family and RAPD markers. **Genetics** v.144, p.1205-1214, 1996.
- JAUHAR P. P., **Methods of genomes analysis in plants**. Florida: C.R.C. Press, Inc., 2000. 386p.
- LAIA, M. L., ESBRISSSE, E. J., BARROS, E. G., ARAÚJO, E. F. Use of RAPD-PCR markers to determine the genotypic identity of clones of *Eucalyptus grandis*. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 3, p.24-29 1996.
- LANDE R., THOMPSON R. Efficiency of marker assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics** v.124 p.743-756, 1990.
- LANDER E. S., BOTSTEIN D., Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics** v.121, n.1, p185-199, 1989
- MYBURG A. A., GRIFFIN A. R., SEDEROFF R. R., WHETTEN R. W. Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F1 hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach, **Theor. Appl. Genet.** v.107, p.1028-1042, 2003
- LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. In: LEE, M. **Advances in Agronomy** Iowa: Academic Press Inc., 1995, p.265-344.
- MARQUES C. M., VASQUEZ-KOOL J., CAROCHA V. J., FERREIRA J. G., O'MALLEY D. M., LIU B. H., SEDEROFF R. Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globules*. **Theor. Appl. Genet.** v.99, p.936-946, 1999.
- MILCHEMORE, R. W., PARAN I., KESSELI R. V., Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.88 p.9828-9832, 1991.
- MOREAU L., CHARCOSSET A., HOSPITAL F., GALLAIS A., Marker-assisted selection efficiency in populations of finite size. **Genetics** v.148 p.1353-1365, 1998.

- MOREAU L., LEMARIÉ S., CHARCOSSET A., GALLAIS A., Economic efficiency of one cycle of marker-assisted selection. **Crop Science** v.40 p.329-337, 2000.
- MORGAN T. H., Sex limited inheritance in Drosophila. **Science** v.32:p.120-122, 1910.
- MULLIS, K. & FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.** v.55:p.335-350,.1987.
- MURO ABAD, J.I.; **Método de melhoramento, assistido por marcadores moleculares, visando a obtenção de híbridos de *Eucalyptus* spp.** Viçosa, MG: UFV, 2000. 65p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- MURO ABAD J. I., GOMES E. A., CÂNCIO O.N., ARAÚJO E. F. Genetic analysis of *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* clones selected in commercial crops from the Brazilian amazon by RAPD markers. **Silvae Genetica** v.50:p.177-181, 2000b.
- NESBITT, K. A., POTTS, B. M., VAILLANCOURT, R. E., WEST A. K., REID, J. B. Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus globules* (Myrtaceae). **Heredity** v.74:p.628-637, 1995.
- RAMALHO, R.S. **Dendrologia Tropical (terminologia)**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 1995. 52 p.
- RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil - Manual de Dendrologia Brasileira**, SP: Ed. da Universidade de São Paulo, 1971. 294 p.
- ROCHA R. B., MURO ABAD, J. I., PIRES, I. E., ARAÚJO, E. F. "Fingerprint" e análise da diversidade genética entre híbridos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* utilizando marcadores RAPD e microssatélite. **XI Simpósio de Iniciação Científica**, 2002.-
- ROCHA R. B., MURO ABAD, J. I., ELEOTÉRIO I. P., ARAÚJO E. F. Fingerprint and genetic diversity analysis of *Eucalyptus* spp. genotypes using RAPD and SSR markers, **Scientia Forestalis** v.62, p.24-31, 2002.
- SCHUSTER I, CRUZ C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos**. Viçosa , MG. Editora UFV, 2004 (no prelo).
- STUTERVANT, A. H. **A History of Genetics**. New York: Harper & Row, 1965. 156p.
- STRYER L. **Biochemistry**. New York: Freeman and Company. 1995. 861p.

- THAMARUS K. A., GROOM K., MURRELL J. BYRNE M., MORAN G. F. A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre and floral traits. **Theor. Appl. Genet.** v.104, p.379-387, 2002
- THODAY, J.M.; Location of polygenes. **Nature** v.191:p. 369-370, 1961.
- VERHAEGEN, D., PLOMION, C. Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers. **Genome**, v.39 p. 1051-1061, 1996.
- VERHAEGEN, D., PLOMION, C., GION, J.-M.; POITEL, M., COSTA, P., KREME, A. Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers: I. Detection of QTL in Interspecific hybrid progeny, stability of QTL, expression across different ages. **Theor. Appl. Genet.** v. 95, p. 597-608, 1997.
- WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & SCOTT, V.T. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n. , p.6531-6535, 1990.
- ZENG Z. B., Theoretical basis for separation of multiple linked gene effect in mapping quantitative trait loci. **Proc. Natl. Acad Sci. USA**, v.90 p.10972-10976, 1993
- ZOBEL, B., JETT J. B. **Genetics of wood production**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 337p.
- YOUNG A., BOYLE T. J. B., BOSCHER D. **Forest conservation genetics: Principles and practice**. Australia: CSIRO, 2000. 352p.
- YOUSEF G. G., JUVIK J. A., Comparison of phenotypic and marker assisted selection for quantitative traits in sweet corn. **Crop Science** v.41 p.645-655, 2001.

7- ANEXO:

TABELA 22 - Valores das características métricas de qualidade da madeira e de crescimento analisadas, respectivamente: Densidade, kg/m³, Rendimento de polpa %, Teor de extrativos %, Teor de lignina insolúvel %, Teor de lignina solúvel %, D. A. P. cm, Altura Total, m, Altura comercial m.

Indiv.	Densidade, kg/m ³	Ren. Dep; %	Extrativos, %	Lig. Ins; %	Lig. Sol; %	DAP, cm	Alt. Total, m	Alt. Com., m
1	583.954	49.189	8.003	27.146	3.309	21.50	26.10	20.40
2	538.981	51.282	7.272	25.851	3.094	21.00	25.10	19.80
3	560.528	52.888	5.239	25.902	3.179	24.00	26.40	22.50
4	483.461	56.736	4.120	23.094	4.926	13.00	24.16	16.20
5	586.138	49.975	8.475	26.100	3.193	23.00	26.80	20.90
6	557.326	51.565	6.408	26.534	3.796	20.50	27.60	21.74
7	583.962	50.630	6.655	26.417	2.714	24.00	27.00	22.20
8	587.402	51.600	6.009	26.832	3.978	22.00	26.10	21.00
9	567.740	53.041	6.619	24.587	3.097	12.00	19.60	12.96
10	539.712	50.120	7.541	26.564	3.322	19.50	26.00	20.30
11	557.035	52.700	5.779	25.772	3.660	25.00	27.40	22.30
12	537.953	51.396	5.769	25.987	3.795	19.00	25.80	19.10
13	599.065	50.144	6.403	27.806	4.083	21.00	26.60	21.20
14	549.634	49.786	8.780	25.770	3.585	16.00	24.00	18.00
15	563.656	50.379	6.481	27.184	3.500	22.00	26.70	22.00
16	595.395	51.425	6.692	26.559	3.147	22.00	27.20	20.70
17	568.678	51.707	6.114	26.226	3.716	16.50	25.80	20.20
18	555.503	52.584	5.258	24.864	3.511	21.00	23.90	18.94
19	538.158	50.665	6.423	27.658	3.206	24.00	25.80	20.96
20	539.259	51.406	6.863	24.847	3.413	18.00	24.60	18.45
21	528.222	52.305	6.089	25.991	3.696	16.50	24.80	19.70
22	530.942	52.922	5.996	26.480	3.723	22.00	27.70	22.20
23	574.683	52.211	7.674	24.595	3.653	19.00	24.00	16.90
24	569.301	51.231	6.659	25.998	3.262	20.00	27.36	21.30

25	597.846	52.149	6.042	26.382	3.272	25.00	28.20	24.66
26	532.688	52.022	6.215	26.026	3.981	15.00	23.70	17.36
27	573.032	50.917	7.149	25.742	3.861	13.00	23.30	15.16
28	538.342	51.206	7.562	25.494	4.023	18.36	25.33	19.24
29	550.492	45.231	12.560	28.019	2.303	11.00	10.80	3.50
30	558.879	49.683	8.044	27.269	3.723	12.00	14.80	5.00
31	562.815	51.860	6.088	26.481	3.392	19.00	26.60	20.36
32	555.900	53.216	6.768	25.421	3.539	16.00	24.00	17.36
33	545.973	47.823	9.996	27.187	3.439	21.00	27.65	21.78
34	567.435	52.364	5.276	27.638	3.518	25.00	27.60	23.04
35	548.904	51.526	5.967	25.899	3.285	22.00	26.60	21.60
36	605.753	51.094	6.081	28.368	3.769	18.00	25.75	19.56
37	553.089	52.303	6.156	26.624	3.287	24.00	29.10	24.04
38	552.933	49.471	8.084	26.987	3.208	20.00	27.60	21.30
39	559.734	51.929	7.256	25.794	3.278	20.00	27.20	21.16
40	573.396	50.688	6.435	26.907	3.478	22.00	28.30	22.68
41	529.255	51.441	6.601	26.729	3.427	13.50	23.50	15.54
42	528.809	52.846	6.575	25.670	3.699	16.00	27.10	18.06
43	533.582	53.239	6.091	24.905	3.444	15.00	25.00	18.42
44	519.671	51.707	5.790	27.211	3.927	20.00	28.00	22.86
45	588.185	55.620	5.925	23.379	2.976	15.00	26.80	18.64
46	575.155	52.595	5.080	26.762	3.495	25.00	29.90	24.72
47	537.060	53.957	5.126	26.035	3.335	21.00	29.00	23.44
48	539.862	52.050	6.319	24.918	3.144	20.00	27.90	23.34
49	553.664	49.183	9.701	27.041	3.058	15.00	20.30	12.32
50	568.084	56.320	5.087	22.454	3.501	18.00	28.40	19.52
51	557.778	53.399	6.899	25.008	2.988	18.00	29.30	22.10
52	536.461	54.182	5.156	25.575	3.164	17.00	27.90	22.54
53	580.467	53.676	5.992	24.784	3.515	20.00	27.60	23.40
54	564.247	53.677	5.315	24.613	3.492	18.00	28.88	23.20
55	550.235	51.570	8.415	25.924	3.265	16.00	25.26	18.60
56	606.588	52.730	7.173	25.592	3.455	18.00	28.44	23.18
57	511.956	51.950	6.813	26.437	3.639	21.00	27.34	20.18
58	549.704	51.377	6.492	26.934	4.094	21.00	27.50	22.04
59	583.521	51.856	7.248	26.557	3.079	24.00	30.20	25.14
60	585.887	49.418	8.077	27.485	3.521	21.00	28.50	24.00
61	561.396	51.444	6.580	26.403	3.371	17.00	24.87	18.84
62	567.502	53.244	6.333	24.703	3.336	15.00	24.45	18.24
63	561.344	51.988	6.171	26.200	3.580	24.50	28.30	24.48
64	552.612	52.456	6.029	27.203	3.649	25.00	28.65	24.60
65	529.592	53.032	4.520	25.537	3.275	13.00	23.10	16.72
66	531.536	52.445	6.324	25.770	3.604	15.00	22.00	16.60
67	550.371	52.730	5.149	26.883	3.783	21.00	27.70	24.06
68	559.342	52.103	8.625	26.026	2.860	16.00	20.80	14.16
69	534.290	51.179	6.942	26.634	4.114	13.00	19.10	10.82
70	513.331	49.037	8.902	27.128	2.543	11.00	14.50	6.82
71	524.673	50.655	7.131	26.057	3.482	13.00	21.46	14.50
72	524.839	51.815	7.034	25.180	3.868	14.00	23.30	16.90
73	490.221	51.890	5.141	26.326	3.396	8.00	12.50	4.64
74	554.848	52.154	7.615	25.118	3.725	15.00	21.60	18.04
75	592.990	51.293	7.766	26.921	3.252	14.00	24.58	16.30
76	574.837	51.120	6.356	26.770	3.568	19.00	27.18	23.06
77	560.832	50.033	7.980	26.557	3.330	18.00	26.70	22.28
78	545.284	52.870	5.398	25.176	3.432	16.00	25.35	19.48

79	556.621	52.078	6.206	27.199	3.496	25.00	31.70	25.56
80	538.715	50.627	6.707	27.045	3.689	18.36	25.33	19.24
81	565.661	50.164	7.599	27.311	3.363	23.00	26.96	21.84
82	538.679	47.338	11.050	26.882	3.351	11.00	20.56	10.76
83	565.650	48.750	9.338	28.233	2.884	12.00	20.70	11.82
84	580.847	50.824	7.617	26.658	3.423	19.00	27.20	21.52
85	547.267	51.902	5.798	26.963	3.376	21.00	26.65	21.48
86	527.439	52.457	7.471	26.092	3.554	20.00	28.20	23.04
87	500.095	52.690	6.074	25.480	3.628	14.00	24.50	16.68
88	541.859	52.012	7.064	28.444	2.898	14.00	23.20	16.10
89	547.222	52.526	7.218	24.940	3.448	14.00	21.78	13.50
90	534.931	50.970	7.695	29.314	2.729	17.00	26.55	20.72
