

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

**CONSTRUÇÃO DE MAPA MOLECULAR DE UMA
POPULAÇÃO DE *Eucalyptus grandis* SEGREGANTE PARA O
CARÁTER FLORESCIMENTO PRECOCE UTILIZANDO
MARCADORES RAPD**

Tânia Mara Bortoloto

Orientador: Prof. Dr. Celso Luís Marino

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da UNESP – Campus de
Botucatu, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas – Área
de concentração em Genética.

BOTUCATU – SP
2006

ANEXAR FICHA CATALOGRÀFICA

Dedico mais essa etapa...

... à pessoa mais forte e corajosa que eu conheço. Por me ensinar tudo o que sei, por me ajudar a caminhar e me apoiar nos momentos alegres e de dificuldades...

... à você mãe.
Te amo!

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Celso Luís Marino pelo exemplo de profissional e pessoa, pelos ensinamentos e por sua amizade durante esses anos.
- À Companhia Suzano de Papel e Celulose pelo fornecimento da população vegetal e pela colaboração com discussões.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo suporte financeiro.
- Ao amigo Dr. Willian Silva Barros, da Universidade Federal de Viçosa, pela disponibilidade e grande ajuda nos processos de análise, se mostrando sempre disposto a ajudar até mesmo nos momentos mais impertinentes, madrugada adentro.
- À Profa. Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz” (ESALQ – USP) pela disponibilidade em abrir seu laboratório para uma das etapas de análise dos dados, e ao Luciano Consoli pela disponibilidade.
- Ao Prof. Dr. Edson Seizo Mori do Departamento de Agricultura e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) por permitir o uso do laboratório em uma das etapas experimentais e ao Evandro Tambarussi por sua disponibilidade em ajudar.
- Aos colegas e professores do Departamento de genética, pela convivência e ensinamentos.
- Aos colegas do grupo BIOGEM: Edna, Adriana, Andréia, Tati, Paula, Akemi, Itatinga, Marcelo, Antônio, Regiane, Bonsai, Carla,
- Aos amigos e colegas do laboratório: Letícia, Karina, Lígia, Virgínia, Douglas, Gabriela, Edgar, Bárbara, Helena, Aline pelo auxílio e convivência.
- À Ana Paula Farro por sua amizade, auxílio nas discussões e pelos ensinamentos.
- Ao amigo Douglas Domingues pelo auxílio nas discussões e etapas iniciais do trabalho, pelas conversas e amizade.
- À Cristiane Alves, que em pouco tempo se mostrou uma grande amiga, dessas amizades que são para toda a vida. Agradeço pelo companheirismo, conversas, festas, congressos, pelo acolhimento, e por sua amizade.
- Ao amigo Dudu, pelo auxílio inicial nesse projeto, pelo companheirismo, e pela certeza de que se estivesse presente por mais tempo, tudo teria sido mais fácil, minhas eternas saudades.

- A todos os amigos da xxxv turma de biologia especialmente à Carolina, Adriana, Tatiane, Rafael, Marcos, Roberta, David, Thiago, Ana Paula, Paulo, enfim, a vocês amigos que apesar de estarmos distantes sei que a nossa amizade é verdadeira.
- Aos amigos TCris (mainha), Juliana Brasil, Daniele Santarém, minha prima Dani, Andrei, Rob, Raul, Kris, Michele. Tenho muitas saudades de todos, mas tenho a certeza que a distância nunca irá atrapalhar nossa amizade. Vocês foram muito importantes para meu amadurecimento, são importantes por toda a vida.
- Às amigas Ana e Angélica pelas conversas, pelos sorvetes, risadas, besteiras, minhas eternas e lindas amigas “Matéis”. Amo vocês.
- À Débora pela amizade sincera e por seu exemplo de pessoa e bondade.
- A todos os meu familiares especialmente a meu avô e minhas avós muitas saudades de seus mimos e carinhos.
- À Luiza e Sr. Tomaz pelo acolhimento e confiança.
- Ao Guilherme, um irmão que ganhei da vida, pelas conversas e amizade.
- Ao Tomaz (Tô), por todos os momentos felizes que passamos juntos. Pelo companheirismo, carinho, afeto, amizade, por seu amor, são poucas as palavras para agradecer todo o bem que me faz.
- Ao meu irmão Alexandre, por sua amizade, amor e confiança.
- A minha mãe Mara e meu pai Valter, por seu amor, ensinamentos e exemplos, sem vocês eu não teria conseguido.
- A Deus pela força e proteção em todos os momentos.
- Enfim, a todos que passaram em minha vida nesses anos e que me transformaram, deixando um pouquinho de si, e levando um pouquinho de mim com eles.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Lista de tabelas	ix
Lista de figuras	x
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	6
2.1. Economia do setor florestal brasileiro	6
2.1.1. O gênero <i>Eucalyptus</i>	7
2.1.1.1. A espécie <i>E. grandis</i> W. Hill ex Maiden	8
2.1.1.2. O setor papel e celulose	8
2.2. Biologia floral e sistema reprodutivo	10
2.3. Marcadores moleculares	11
2.3.1. Marcadores RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	12
2.3.2. <i>Bulked Segregant Analyses</i>	13
2.3.3. Mapeamento	15
2.3.3.1. Softwares para mapeamento	18
2.4. O caráter molecular do florescimento	19
2.4.1. Florescimento em gêneros florestais	22
2.4.2. No gênero <i>Eucalyptus</i>	23
2.5. A população em estudo	25
3. Materiais e Métodos	27
3.1. Material vegetal	27
3.2. DNA genômico	28
3.2.1. Extração de DNA	28
3.2.2. Quantificação e diluição de DNA	30
3.3. Confeção dos <i>bulks</i>	31
3.4. Reação de amplificação RAPD	32
3.5. Nomenclatura das marcas	34
3.6. Reação com <i>primer</i> específico de florescimento	34
3.7. Mapeamento	36

4. Resultados e discussão	38
4.1. Detecção de polimorfismos e seleção dos <i>primers</i>	38
4.2. Construção dos mapas de ligação	41
4.2.1. Mapa do genitor materno (florescimento precoce) P-01.....	52
4.2.2. Mapa do genitor paterno (florescimento normal) P-02	56
4.2.3. Análise e comparação dos mapas	60
4.3. Cálculo da BSA	66
4.4. Marca SCAR	68
4.5. Gene candidato <i>EgLFY</i>	70
5. Conclusões	75
6. Referências bibliográficas	76

RESUMO

O *Eucalyptus* é o gênero florestal mais importante para a economia do país. Além de ser fonte de madeira, sua polpa de celulose é a mais utilizada para a fabricação de papel. Há um grande interesse em seu melhoramento genético, devido à importância econômica do gênero para as empresas florestais. O tempo necessário para a obtenção de populações ideais, após cruzamentos selecionados, é um fator limitante do melhoramento clássico nessas espécies. Uma das maneiras de contornar este problema é o uso de técnicas de genética molecular, que possibilita a seleção precoce dos indivíduos. Dentre elas, destaca-se a construção de mapas genéticos a partir de marcadores moleculares. Através desta técnica, podem ser encontrados genes de importância dentro das populações estudadas. O mapeamento genético de uma população segregante para um caráter de interesse silvicultural pode trazer importantes dados para uma seleção de genótipos

superiores utilizando marcadores moleculares. Foram construídos dois mapas moleculares com marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) para uma população de um cruzamento intraespecífico de *Eucalyptus grandis* segregante para a característica florescimento precoce na proporção de 1:1. O mapa do genitor materno cobre 86,6% do genoma da espécie com 1402,39 cM e consta de 100 marcadores ligados em 17 grupos de ligação. O mapa do genitor paterno, cobre 84,5% do genoma (1367,89 cM) com 102 marcadores ligados em 17 grupos de ligação. Foi utilizada a técnica de BSA (*Bulked Segregant Analysis*), porém não foram encontrados marcadores próximos o suficiente da região controladora da característica em questão. Uma marca SCAR (*Sequenced Characterized Amplified Region*) desenvolvida para detectar florescimento foi mapeada na população e se apresentou ligada ao microssatélite EMBRA 7 no grupo GL-13 do mapa do genitor paterno indicando um grupo alvo para a identificação do caráter em questão. Uma marca derivada da amplificação do *primer* desenhado a partir do gene de florescimento *EgLFY* de *Eucalyptus grandis* também foi mapeada e apresentou-se ligada ao marcador de microssatélite EMBRA 6, indicando que essa região pode ser uma região de genes controladores de florescimento. O mapeamento foi dificultado pelo caráter intraespecífico do cruzamento, que apresenta um menor desequilíbrio de ligação que os cruzamentos entre diferentes espécies.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers selecionados para o mapeamento na população F1.....	42
Tabela 2. Teste do qui-quadrado da marcas segregantes presentes em ambos os genitores da população F1, realizado pelo software GQMOL, com $\theta=0,05$	46
Tabela 3. Teste do qui-quadrado da marcas segregantes na população F1 presentes no genitor materno (P-01), realizado pelo software GQMOL, com $\theta=0,05$	47
Tabela 4. Teste do qui-quadrado da marcas segregantes na população F1 presentes no genitor materno (P-02), realizado pelo software GQMOL, com $\theta=0,05$	49
Tabela 5. Análise dos grupos de ligação do mapa do genitor materno, pela análise com software GQMOL.....	55
Tabela 6. Análise dos grupos de ligação do mapa do genitor paterno, pela análise com software GQMOL.....	59
Tabela 7. Recombinação da marca SCAR (Domingues, 2003) e das marcas polimórficas entre os <i>bulks</i> , em relação ao marcador morfológico de florescimento nas análises realizadas pelo software GQMOL.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via metabólica simplificada de controle do tempo de florescimento em <i>Arabidopsis</i> e interações entre alguns genes envolvidos.....	21
Figura 2. Gel da reação de amplificação do primers OPM-04. As setas apontam para bandas polimórficas entre os genitores.....	39
Figura 3. Mapa parcial de ligação do genitor materno P-01 da população F1 de <i>Eucalyptus grandis</i> , montado a partir da análise pelo software GQMOL.....	53
Figura 4. Pares de ligação do genitor materno P-01 da população F1 de <i>Eucalyptus grandis</i> , montado a partir da análise pelo software GQMOL.....	54
Figura 5. Mapa parcial de ligação do genitor paterno P-02 da população F1 de <i>Eucalyptus grandis</i> , montado a partir da análise pelo software GQMOL.....	57
Figura 6. Pares de ligação do genitor paterno P-02 da população F1 de <i>Eucalyptus grandis</i> , montado a partir da análise pelo software GQMOL.....	58
Figura 7. Comparação entre os mapas de ligação dos genitores da população F1 de <i>Eucalyptus grandis</i>	61
Figura 8. Comparação entre o grupo de ligação 1 do mapa de <i>Eucalyptus grandis</i> de Brondani <i>et al.</i> (2002) e os grupos GL-02 do genitor materno e GL-02 e GL-03 do genitor paterno da população F1 de <i>E. grandis</i>	63

Figura 9. Comparação do Grupo 9 descrito por Brondani <i>et al.</i> (2002) com o GL-16 do genitor materno.....	64
Figura 10. Grupo GL-13 do mapa do genitor paterno, mostrando a marca SCAR ligada a 4 marcas do tipo RAPD e ao SSR EMBRA 7, mapeado no grupo de ligação 1 do mapa desenvolvido por Brondani <i>et al.</i> , (2002).....	69
Figura 11. Amplificação do primer desenhado a partir do gene <i>EgLFY</i> de florescimento de <i>Eucalyptus grandis</i> (Dornellas <i>et al.</i> , 2004) com os genitores da população F-1 à temperatura de 62°C.....	71
Figura 12. Amplificação do primer desenhado a partir do gene <i>EgLFY</i> de florescimento de <i>Eucalyptus grandis</i> (Dornellas, <i>et al.</i> , 2004) com um indivíduo com florescimento normal e outro com florescimento precoce, utilizando gradiente de temperatura.....	72
Figura 13. Amplificação do primer desenhado a partir do gene <i>EgLFY</i> de florescimento de <i>Eucalyptus grandis</i> (Dornellas <i>et al.</i> , 2004) à temperatura de 43°C com os genitores e alguns indivíduos da população.....	73

1. INTRODUÇÃO

O eucalipto, por ter uma larga empregabilidade econômica, é o gênero florestal de rápido crescimento mais difundido no mundo. Entre as árvores exóticas produtoras de madeira é a mais plantada nas regiões tropicais e subtropicais (Myburg *et al.*, 2003). Sua madeira tem diversas utilidades econômicas que vão desde a utilização na construção civil até a produção de carvão.

É o principal fornecedor de fibras para a fabricação de papel e celulose, indústria do setor florestal melhor sucedida no Brasil, sendo considerado o gênero florestal mais importante para a economia do país. Desde o seu início, o segmento de produção de papel e celulose brasileiro buscou operar em condições de concorrer com os grandes produtores mundiais, e com os países desenvolvidos, hoje o Brasil ocupa uma posição muito importante nesta produção (Patiño-Valena e Kageyama, 1995 apud Farro, 2001).

Existe um forte investimento no país para o melhoramento genético desse gênero florestal, porém o longo tempo necessário para a realização de um ciclo de melhoramento o torna um dos fatores limitantes. Daí a importância da incorporação de novas ferramentas que possibilitem reduzir esse tempo, como é o caso da aplicação de biotecnologia para melhorar a qualidade e aumentar a produtividade da madeira a cada ciclo de seleção.

A utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento genético, dentre outros fatores, permite uma avaliação prévia de indivíduos superiores, otimizando o processo de seleção dentro dessas espécies, além de possibilitar o estudo de caracterização de genótipo de indivíduos a partir de células e tecidos em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A perspectiva de tornar a seleção mais eficiente faz com que o melhoramento de espécies florestais seja uma das áreas que mais solicita o uso desta tecnologia.

Algumas estratégias vêm sendo utilizadas com sucesso para localizar marcadores ligados a genes de importância econômica e posterior utilização destes em programas de melhoramento, dentre elas podemos destacar: a construção de mapas genéticos e a técnica de BSA:

Técnica de BSA: A utilização de marcadores moleculares combinados com a técnica de BSA, descrita por Michelmore *et al.* em 1991, possibilita a identificação de marcadores relacionados a características de interesse (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Esta técnica consiste em detectar diferenças entre duas amostras agrupadas de DNA (*bulks*) de indivíduos contrastantes selecionados com base na expressão fenotípica de um caráter, possibilitando um mapeamento acurado desta região. Com sua utilização, foram desenvolvidos vários

marcadores moleculares de interesse em diversas espécies vegetais (Jughans, 2000; Moretzsohn *et al.*, 2000; Martins Filho *et al.*, 2002; Ávila *et al.*, 2003; Benko-Iseppon *et al.*, 2003), em *Eucalyptus grandis* a técnica foi utilizada com sucesso na identificação de gene de resistência a *Puccinia psidii* Winter (Junghans *et al.*, 2003) onde foi construído um grupo de ligação com o gene de resistência e marcadores a ele flanqueados. Estes marcadores podem ser utilizados em programas de melhoramento possibilitando a seleção precoce de indivíduos portadores do gene de interesse.

Construção de um mapa genético de uma espécie: com esta técnica, abre-se a possibilidade de decompor características genéticas complexas em seus componentes mendelianos; localizar regiões genômicas que controlam caracteres de importância; quantificar o efeito dessas regiões na característica estudada; usar todas as informações em programas de melhoramento (Ferreira e Grattapaglia, 1998); além de facilitar o estudo da transferência de genes entre diferentes espécies de um gênero, a partir da avaliação de marcadores moleculares bem caracterizados, avaliando o grau de conservação entre essas espécies e possibilitar a seleção precoce de indivíduos.

Trabalhos vêm sendo reportados quanto à localização de genes de importância em populações segregantes com o auxílio de mapas construídos a partir de marcadores moleculares: Boiteux *et al.* (2000) encontraram um loco de resistência ao nematoda *Meloidogyne javanica* numa população segregantes de cenouras com o auxílio de um mapa de marcadores RAPD. Hayashi *et al.* (2004), encontraram o gene de resistência a um mosquito em pinus preto japonês, Zhang *et al.*, (2004) construíram um mapa em soja com marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Single Sequence Repeat*) e EST

(*Expressed Sequence Tag*) que possibilitou o mapeamento de 10 características agrônômicas, dentre elas, dias para florescer, para maturar, altura, etc, possibilitando o mapeamento de vários QTLs (Quantitative Trait Loci) relacionados a essas características.

Em *Eucalyptus* são poucas as populações disponíveis que segregam para características de importância econômica para serem utilizadas em estudos de melhoramento dessa espécie, devido ao longo ciclo das espécies e ao pouco tempo de melhoramento das mesmas no país. A Companhia Suzano de Papel e Celulose produziu, através de cruzamento controlado entre genitores contrastantes para florescimento precoce, uma população composta por 117 indivíduos que segrega para a característica em questão.

Esta população já foi alvo de estudos em nosso grupo devido à importância de suas características. Farro (2001 e 2006) mapeou marcadores microsatélites nesta população e localizou um marcador SSR possivelmente ligado ao caráter de interesse, num LOD score de 2,24. Bortoloto,(2003) adicionou marcas RAPD no mapa construído por Farro, (2001) encontrando duas marcas possivelmente ligadas ao caráter em questão, com LOD scores de 1,1 e 1,5. Os marcadores ligados à esta característica encontrados por Farro *et al.*, (2006) e Bortoloto, (2003) podem ser considerados com algumas restrições, devido ao baixo valor dos LOD scores. Domingues, (2003) utilizando a técnica de BSA localizou um marcador RAPD relacionado à ocorrência do florescimento, esse marcador foi convertido em SCAR, apresentando uma eficiência de 60%.

O tempo de florescimento em *Eucalyptus* é um caráter útil para aplicação de melhoramento assistido por marcadores, devido ao longo período que as

espécies levam para florescer, o que dificulta estudos genéticos neste gênero (Southerson *et al.*, 1998a).

Os programas de melhoramento são pouco atuantes na seleção do caráter florescimento precoce. Esta característica é indesejável nas plantações comerciais do gênero, pois ao florescer a planta utiliza suas reservas para a produção e manutenção dos órgãos florais, o que impede que a planta atinja o seu desenvolvimento vegetativo máximo, resultando em uma menor produtividade. Por isso, marcadores moleculares que identifiquem árvores que florescem precocemente em estágio inicial de desenvolvimento seriam de grande valia para o melhoramento do gênero florestal.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi construir um mapa de ligação através do uso de marcadores RAPD e uma população F1 de *Eucalyptus grandis* segregante para o caráter florescimento precoce, derivada do cruzamento de dois genitores contrastantes da mesma espécie.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Economia do setor florestal brasileiro

O setor florestal do Brasil tem grande importância social, econômica e ambiental, contribuindo com 5% na formação do PIB nacional e 8% das exportações do país. É capaz de absorver mão-de-obra numerosa gerando 1,6 milhões de empregos diretamente e 5,6 milhões indiretamente, colaborando para uma melhor distribuição de renda na a população. O setor ainda gera uma receita anual de R\$ 20 bilhões e recolhe anualmente cerca de R\$ 3 bilhões em impostos (IPEF, 2006).

O país conta com 6,4 milhões de hectares de florestas plantadas, sendo 4,8 milhões de florestas de produção de *Pinus* e *Eucalyptus* (aproximadamente 1,8 e 3 milhões de hectares, respectivamente), que continua em expansão. Esses gêneros exóticos encontraram no país um ambiente bastante favorável para o seu desenvolvimento, apresentando rápido crescimento, excelente produtividade

e custos de implantação e manutenção em declínio. As condições favoráveis e o emprego de modernas técnicas florestais de manejo fizeram com que o eucalipto alcançasse no Brasil os maiores índices de produtividade do mundo produzindo mais de 40 m³/ha/ano de madeira de eucalipto (IPEF, 2006; SBS, 2001; Scarpinella, 2002, Juvenal e Mattos, 2002).

O reflorestamento com espécies exóticas, contribui reduzindo a dilapidação das florestas nativas remanescentes.

2.1.1. O gênero *Eucalyptus*

É classificado como sendo um vegetal do grupo das Fanerógamas, divisão *Angiospermae*, classe *Dicotyledonea*, ordem *Myrtales* e família *Myrtaceae*.

O eucalipto é originário da Austrália, com exceção das espécies *E. urophylla* e *E. deglupta*. Já foram identificadas mais de 650 espécies do gênero.

É o gênero florestal de rápido crescimento mais difundido no mundo (Scarpinella, 2002). Tem uma vasta aplicabilidade econômica, sua madeira é utilizada na fabricação de celulose, papel, carvão, painéis de madeira, caixotaria, móveis, sendo também empregada na construção civil. O eucalipto também é utilizado para extração de óleos, taninos, produção de mel, etc.

2.1.1.1. A espécie *E. grandis* W. Hill ex Maiden

É a espécie de eucalipto mais cultivada no Brasil e o uso de sua madeira é crescente em diversos segmentos industriais.

A espécie e seus híbridos interespecíficos representam 50% da área total de eucalipto plantada no país, representando 1,5 milhões de hectares (SBS).

A árvore adulta é alta, com média de 45 a 50 metros podendo chegar aos 75 metros de altura.

Sua madeira é considerada medianamente leve e fácil de ser trabalhada; apresenta baixa estabilidade, mas elevada permeabilidade e possui um crescimento volumétrico superior em relação às outras espécies do gênero. É a principal espécie utilizada para a produção de papel e celulose, além de painéis, aglomerados e chapas duras (Scarpinella, 2002).

2.1.1.2. O setor papel e celulose

Resultados significativos foram registrados, em 2005, na indústria brasileira de papel e celulose em seu desempenho produtivo. Foi observado um crescimento de 4% para celulose e 2% para papel em relação ao ano de 2004, chegando a 10 milhões de toneladas de celulose e 8,6 milhões de papel (Zogbi, 2006).

Zogbi, (2006) observou crescimento de 2,3% no consumo de papel no Brasil, em 2005 - 7,5 milhões de toneladas - indicando um consumo anual de 40,4 kg/habitante. No mesmo ano, as exportações - para mais de 100 países -

chegaram a registrar um aumento de 18,6% em relação ao ano de 2004 (US\$ 3,5 bilhões), com aumento no superávit de 22,3%.

As empresas do setor (220) geram diretamente 108 mil empregos, até 2012 é prevista a criação de 60 mil novos empregos diretos. O setor gera cargos indiretos para cientistas, técnicos e outros trabalhadores (BRACELPA, 2006). Cerca de 20% da matéria prima florestal é consumida pelas indústrias de papel e celulose no país.

O manejo da floresta para produção de madeira para celulose e chapas de fibra apresenta Taxa Interna de Retorno de 18,88% a.a., e Valor Presente Líquido de R\$1.085,94/ha reflorestado (Baena, 2005).

O desenvolvimento tecnológico de processos e produtos de maior valor agregado foi possível devido aos investimentos pelo Setor nos últimos anos, resultando na melhoria ambiental e racionalização industrial das empresas brasileiras, possibilitando as mesmas atingirem os padrões internacionais de qualidade de seus produtos, de produtividade e proteção ambiental. (Zogbi, 2006)

O setor de celulose busca um aumento na produtividade e qualidade da madeira com diminuição do custo, buscando maior homogeneidade na qualidade da madeira produzida, maior resistência a pragas e doenças (IPEF, 2006). O Brasil, hoje, é o maior produtor mundial de celulose fibra curta, com produção aumentando de 1,4 para 6,0 milhões de toneladas/ano (Zogbi, 2006).

Estudos de melhoramento, unidos às técnicas moleculares, são de extrema importância para a economia e desenvolvimento do setor florestal no país.

2.2. Biologia floral e sistema reprodutivo

As flores das espécies de eucalipto são hermafroditas, ocorrendo tanto a fecundação cruzada como a autofecundação. As espécies são preferencialmente alógamas, mas a autogamia pode chegar a 30%. A alogamia é favorecida pelo mecanismo de protandria, porém não elimina totalmente a ocorrência de autopolinização, pois uma mesma planta apresenta flores em diferentes estádios de desenvolvimento. Além da protandria, há um sistema de auto-incompatibilidade controlado geneticamente característico do gênero que diminui a ocorrência de autogamia (Eldridge, 1978 apud Paula, 2002).

Os principais vetores de polinização são os insetos, sobretudo himenópteros, dípteros, lepdópteros, coleópteros e hemípteros. Nas áreas de ocorrência natural, pequenos marsupiais e alguns pássaros também figuram como polinizadores importantes. (Paula, 2002)

Os botões florais em *E. grandis*, na Austrália, aparecem na primavera, preferencialmente de outubro a dezembro, e o florescimento ocorre de abril a agosto, no outono e início do inverno (Floyd, 1961 e Burgess, 1980, apud Aguiar, 1987).

No Brasil, segundo Aguiar (1987), o principal período de florescimento do *E. grandis* ocorre preferencialmente nos meses de janeiro a abril. A espécie floresce num período de aproximadamente um ano, desde o aparecimento dos botões florais em novembro e dezembro até a maturação dos frutos que se inicia em setembro, isso geralmente ocorre na idade de três anos depois da germinação.

2.3. Marcadores moleculares

Inicialmente os marcadores utilizados em estudos genéticos e de melhoramento eram os controlados por genes e associados a caracteres morfológicos. Os marcadores moleculares ampliaram o número de marcadores genéticos disponíveis. Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular ocorreu um aumento significativo nos métodos de detecção de polimorfismo genético ao nível de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

A técnica de PCR possibilitou um aumento nas classes de marcadores moleculares, a um número ilimitado de marcadores altamente polimórficos. As técnicas de PCR aliadas a outras como à clonagem e ao seqüenciamento de DNA, possibilitou um rápido acúmulo de informações sobre os genomas eucariotos (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Marcador molecular pode ser considerado qualquer dado molecular que forneça polimorfismo herdável e acessível, e que se comporte de acordo com as leis de herança de Mendel.

Os marcadores moleculares geram altos níveis de polimorfismo em comparação aos marcadores morfológicos e geralmente não apresentam efeitos epistáticos ou pleiotrópicos em relação aos fenótipos; possibilitam a caracterização do genótipo de indivíduos a partir de amostras celulares ou teciduais.

Além da grande utilização desses marcadores na agricultura, eles vêm sendo muito utilizados como ferramenta para auxiliar programas de melhoramentos no setor florestal, onde o ciclo da espécie é maior e a aplicação desses marcadores reduz o tempo necessário para completar uma geração de

melhoramento das espécies (Nkongolo, *et al.* 2002, Bekessy *et al.*, 2002, Gan, *et al.*, 2003).

Esses marcadores podem ser utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta acelerando os processos de seleção e recombinação dos indivíduos desejados. Além de possibilitar testes de materiais genéticos, seleção assistida, estudos na detecção de genes e QTLs, dentre outras aplicações (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

2.3.1. Marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

A técnica foi descrita no início da década de 90 (Welsh e McClelland, 1990) e propiciou um grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR, devido à utilização de “primers” mais curtos e de seqüência arbitrária na reação de amplificação, dispensando a necessidade do conhecimento prévio das seqüências genômicas e possibilitando a amplificação simultânea de vários locos no genoma (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Para a reação de polimerização dos fragmentos de DNA é utilizado um *primer* único como iniciador, o produto de amplificação são regiões flanqueadas em sentidos opostos por seqüências homólogas a do “primer” utilizado. O polimorfismo gerado está associado a mudanças em um ou mais pares de bases no sítio de hibridização do *primer*, fazendo com que este não localize a região homóloga no DNA molde.

O polimorfismo genético gerado nesse tipo de marcador é de natureza binária, ou seja, o segmento de DNA da fita molde é ou não amplificado, sua

visualização é realizada em matriz eletroforética, a diferença de amplificação ou não do fragmento gera um fenótipo de presença ou ausência da banda no gel. Conferindo ao marcador a característica de dominância, impossibilitando a diferenciação de indivíduos homocigotos de heterocigotos.

Os marcadores RAPD vêm sendo amplamente utilizados em estudos vegetais: polimorfismo em *Pinus sp.* (Kaya e Neale, 1993); divisão e distribuição de *Eucalyptus globulus* (Nesbitt *et al.*, 1995); *fingerprint* para identificação de clones de *E. grandis* (Lange *et al.*, 1993); estudo de estrutura de populações em *E. urophylla* (Gaioto, *et al.* 1997); construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica possibilitando a localização de genes de interesse econômico (Mehlenbacher *et al.*, 2006); dentre outros.

Esses marcadores têm como principais vantagens a rapidez e a facilidade de manuseio, além do baixo custo operacional, se comparado com outros marcadores moleculares.

Com essas vantagens e resultados positivos, esse marcador vem sendo utilizado cada vez mais no melhoramento genético de populações vegetais e no mapeamento das mesmas, mostrando-se eficiente.

2.3.2. Bulk Segregant Analyses

Esta técnica foi descrita por Michelmore *et al.* em 1991 e consiste em detectar diferenças entre duas amostras agrupadas de DNA de uma população segregante. Estas amostras (*bulks*) são obtidas pela mistura de quantidades iguais de DNA de indivíduos selecionados com base na expressão fenotípica de um caráter, ou seja, são confeccionados dois *bulks* um com DNA de indivíduos

que apresentem o fenótipo em questão e outro com DNA de indivíduos que não apresentem este fenótipo. Com isso se obtém na mistura um genótipo idêntico em uma região genômica de interesse (região alvo) e genótipos ao acaso em regiões não ligadas à região alvo. Assim, os *bulks* tendem a diferir somente na região alvo selecionada (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Na construção dos *bulks*, são selecionados os indivíduos com fenótipos extremos de uma população segregante para a característica de interesse.

O DNA dos genitores da população e os dois *bulks* são testados com um grande número de marcadores, buscando-se bandas polimórficas entre os *bulks*. A evidência de ligação entre o marcador polimórfico e a região alvo é confirmada através de uma análise de segregação utilizando-se todos os indivíduos da população, onde é realizada uma estimativa da recombinação entre o marcador e o gene que controla o caráter.

A técnica de BSA reduz os esforços para se localizar uma ligação gênica focalizando a análise da região do genoma associada ao caráter de interesse, permitindo uma rápida identificação de marcadores em regiões específicas do genoma, sendo ainda mais eficiente quando baseada em marcadores RAPD, detectando polimorfismos facilmente. Tais técnicas são muito utilizadas na localização de genes de resistência (Kutcher *et al.*, 1996; Kesseli *et al.*, 1993; Junghans, 2003; Martins Filho *et al.*, 2002) e outros caracteres de importância econômica (Rameau *et al.*, 1998; Ramirez *et al.*, 2001).

Em espécies alógamas como as de *Eucalyptus*, são encontrados altos níveis de heterozigose na maioria dos locos, permitindo a utilização da técnica de BSA sem a necessidade de retrocruzamentos, se mostrando um método dinâmico para a localização de genes (ou regiões genômicas) de interesse nestas espécies.

Junghans (2003), a partir do uso de marcadores RAPD e a técnica BSA, identificou um gene de efeito principal na resistência à ferrugem causada por *Puccinia psidii* em *Eucalyptus grandis* e determinou o modo de herança para este gene. Foram identificados e mapeados seis marcadores em acoplamento com o gene, possibilitando a seleção precoce de indivíduos resistentes para a ferrugem.

A partir das mesmas técnicas, Sedgley *et al.*, (1999) realizou estudos sobre a variabilidade de produção de cera em folhas de *Eucalyptus*. A técnica também é utilizada em mapeamento de QTLs relacionados à qualidade da madeira em *Eucalyptus grandis* (Grattapaglia *et al.*, 1996), e também para outras espécies, como resistência a seca no milho (Quarie *et al.*, 1999), mapeamento de gene de resistência em cevada (Mammadov *et al.*, 2003), dentre outras. A técnica vem se mostrando eficaz na detecção de genes e QTLs.

2.3.2. Mapeamento

A construção de mapas genéticos a partir de marcadores moleculares tem um papel importante na análise genética das espécies vegetais, possibilitando a localização de regiões genômicas controladoras de caracteres de importância e a quantificação dessas regiões na característica estudada. A técnica facilita o estudo de transferência de genes entre diferentes espécies de um gênero e possibilita a seleção precoce de indivíduos.

Os mapas genéticos têm se mostrado eficazes na detecção de genes de importância e também na detecção de QTLs em diversos trabalhos: Liebhard *et al.* (2003) construíram um mapa genético para identificar características

fisiológicas quantitativas em maçãs tais como tempo e intensidade de florescimento, tamanho da folha, tempo de maturação e tamanho de frutas, dentre outras; Le Guen *et al* (2003) identificou QTL para resistência à doença causada pelo fungo *Microcyclus ulei* em seringueira; Beattie *et al* (2003) localizou 21 QTLs com a utilização de um mapa genético em feijão realizado com marcadores RAPD, SSR e STS (*Sequence Tagged Site*); foi construído um mapa com ervilha utilizando marcadores AFLP, RAPD e STS para localização de QTL de resistência (Tar'an *et al* 2003).

Os marcadores RAPD também se mostram eficazes na construção de mapas genéticos de diferentes espécies vegetais na identificação de locus de importância econômica e de QTLs; Moretzsahn *et al.* (1999) após o estabelecimento dos grupos de ligação, com a construção de um mapa de dendê, utilizou a técnica BSA para identificar marcadores mais fortemente ligados ao locus que confere a espessura da casca; identificação de QTL para resistência em pinus preto japonês (Hayashi *et al.*, 2004); tomate e batata (Thanksley *et al.*, 1992); *Arabidopsis thaliana* (Kuittinen *et al.*, 1997); ervilha (Rameal, *et al.*, 1998); melancia (Levi *et al.* 2002); algodão (Zhang *et al.*, 2003); dentre outros.

Em 1994, Grattapaglia e Sederoff desenvolveram o primeiro mapa genético de ligação para o gênero *Eucalyptus*, com uma população interespecífica originada de um cruzamento de *E. urophylla* e *E. grandis* utilizando a técnica de *pseudo-testcross* agregada a marcadores RAPD. Esta técnica de “falso cruzamento teste” permite que mapas de ligação sejam construídos a partir de um cruzamento F1, analisando os marcadores presentes em heterozigose em um dos genitores e nulos no outro, esses marcadores segregam na proporção de 1:1 como num cruzamento teste, e com eles, podem

ser confeccionados dois mapas de ligação, um para cada genitor. Esse trabalho abriu portas para inúmeros estudos e logo após, diversos outros mapas desse gênero foram construídos.

Verhaegen e Plomion, (1996) que após a construção de um mapa molecular utilizando marcadores RAPD no gênero *Eucalyptus*, compararam seus resultados com os obtidos por Grattapaglia e Sederoff (1994) observando grande homologia entre os dois mapas. Os trabalhos utilizaram uma população híbrida originada de um cruzamento controlado entre *E. urophylla* e *E. grandis*. Esses mapas possibilitaram a identificação de QTLs. Mais recentemente, Brondani *et al.*, (2002) desenvolveu um mapa de ligação utilizando marcadores do tipo microssatélites, a partir de um híbrido das mesmas espécies citadas acima.

Em 1995, Grattapaglia *et al.* mapearam QTLs (“Quantitative trait loci”) responsáveis pelo controle da propagação vegetativa em *E. grandis* e *E. urophylla*, utilizando a técnica *pseudo-testcross* e marcadores RAPD. Em 1997, Verhaegen *et al.* aplicaram marcadores RAPD para detectar QTLs em progênie de híbridos interespecíficos de *Eucalyptus* e estudar a estabilidade da expressão destes QTLs em indivíduos com diferentes idades. Os resultados mostraram que a utilização dos marcadores RAPD foi útil na seleção precoce de híbridos para serem propagados vegetativamente.

Como se pode observar, os mapas genéticos no gênero *Eucalyptus*, se mostraram de grande utilidade para o melhoramento destas espécies.

2.3.2.1. Softwares para mapeamento

Softwares gratuitos para *download* como o Mapmaker e o JoinMap1.4 não permitem a integração de diferentes segregações, outros como o JoinMap 3.0 permitem esse tipo de análise, porém são softwares de difícil manipulação e de licença com um alto custo financeiro. Foi realizada uma análise preliminar dos dados com o programa JoinMap 3.0, que não apresentou diferenças significantes no mapeamento dos dados, comparando com o GQMOL2.1 (2004, <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>) (dados não apresentados). Devido a disponibilidade e facilidade de manuseio o software utilizado para o mapeamento foi o GQMOL.

Esse software foi desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa e vem sendo utilizado com sucesso em diversos trabalhos de diversidade genética (Mota *et al.*, 2004, Machado *et al.*, 2003), mapeamento de QTLs e identificação de genes (Silva *et al.*, 2003, Alcochete *et al.*, 2005, Ninamango-Cárdenas *et al.*, 2003, Caixeta, *et al.*, 2003).

Ele possibilita a integração de marcas com segregação do tipo 1:1 com marcas de segregação 3:1, permitindo a análise de todos os dados gerados. O software não integra dados com segregação 1:1:1:1 e 1:2:1 com segregação simples 1:1 e 3:1, porém, devido ao número reduzido de marcas pontes, segregantes em ambos os genitores ao mesmo tempo, foi decidido confeccionar dois mapas separadamente, um para cada genitor. Assim, os marcadores SSR que apresentaram segregação 1:2:1 e 1:1:1:1, tiveram seus alelos analisados separadamente para cada genitor originando na segregação de 1:1 desses marcadores.

2.4. O caráter molecular do florescimento

O florescimento é uma característica quantitativa muito estudada no gênero *Arabidopsis* (Yanofsky *et al.*, 1990; Mandel *et al.*, 1992; Pena *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 1999; Kardailsky *et al.*, 1999; Parcy *et al.*, 2002; Ratcliffe *et al.*, 1999). Estudos genéticos e fisiológicos em espécies modelos relatam a existência de mais de 80 genes envolvidos na regulação do tempo de florescimento (Simpson *et al.*, 1999).

Neste gênero, a duração da fase vegetativa (V) depende das condições ambientais e é controlada por uma extensiva rede de genes *flowering-time*, além de sinais físicos e químicos (Komeda, 2004). Esses genes regulam a passagem do broto para o desenvolvimento reprodutivo onde ocorre o aparecimento de uma inflorescência (I). Durante a primeira fase de inflorescência (I₁) são produzidos 2-3 primórdios foliares antes da fase I₂ e o meristema floral é gerado (Ratcliffe *et al.*, 1999; Mandel *et al.*, 1992).

A distinção entre o meristema do broto e o meristema floral é mantida por dois tipos complementares de genes: 1) Genes de identidade do meristema floral: o destino floral depende da ação destes genes, dentre eles temos: *LEAFY* (LFY) (Parcy *et al.*, 2002), *APETALA1* (AP1) (Mandel *et al.*, 1992; Pena *et al.*, 2001), *CAULIFLOWER* (CAL), *AGAMOUS* (AG) (Yanofsky *et al.*, 1990); 2) Genes de identidade do broto: um grupo de genes que retarda o progresso de formação da flor a partir do broto, dentre eles inclui o *TERMINAL FLOWER1* (TFL1) (Kobayashi, *et al.*, 1999; Ratcliffe *et al.*, 1999; Parcy *et al.*, 2002), *FLOWERING LOCUS T* (FT) (Kardailsky *et al.*, 1999).

No tipo selvagem, estes dois tipos de genes são expressos em domínios separados, ambos são expressos fortemente durante o desenvolvimento da inflorescência com o *TFL1* no centro do ápice e os genes de identidade do meristema floral na periferia (Ratcliffe *et al.*, 1999).

Os genes *AP1* e *LFY* são necessários para que ocorra a transição de um meristema de inflorescência em um meristema floral (Mandel *et al.*, 1992). *AP1* age localmente em especificar a identidade do meristema floral e determina o desenvolvimento de sépalas e pétalas (Mandel *et al.*, 1992). O mutante *lfy* mostra uma transformação completa em flores *early-arising* e uma transformação parcial em flores *late-arising* no broto da inflorescência. (Mandel *et al.*, 1992)

Quando a atividade dos genes de identidade do meristema floral é reduzida, as flores se desenvolvem com várias características *shoot-like*, nos triplos mutantes *lf;ap1;cal* inflorescências dormentes constituem brotos secundários com flores com estruturas deformadas, o broto do ápice passa da fase vegetativa para a fase de inflorescência I_1 no tempo normal, mas as flores na fase I_2 são substituídas por brotos. Ao contrário, quando *LFY* ou *AP1* são constitutivamente expressos por um promotor 35ScaMV, todas as fases de crescimento são encurtadas e os brotos meristemáticos são convertidos em flores (Ratcliffe *et al.*, 1999). Esses fenótipos produzidos por expressão constitutiva dos genes *AP1* e *LFY* são semelhantes aos efeitos de uma redução na atividade do *TFL1*. Em mutantes *tfl1*, as fases vegetativas, I_1 e I_2 são encurtadas e o broto entra em uma fase final onde o próprio ápice se torna um meristema floral, neste caso, *LFY* e *AP1* se tornam prematuramente expressos no ápice, indicando que *TFL1* normalmente inibe suas atividades nesta região (Ratcliffe *et al.*, 1999). A ativação do *TFL1* por promotor produz uma extensão nas fases de crescimento

resultando em plantas muito ramificadas e com formações florais mais tardias que o selvagem.

Outro gene que regula o tempo de florescimento é o *FLOWERING LOCUS C (FLC)* esse gene codifica um domínio MADS e um fator de transição que atua inibindo uma série de genes que promovem o florescimento.

Além desses genes, a via metabólica de florescimento depende da interação de outras vias como: fotoperíodo (via dependente de luz), vernalização, via da giberelina, via autônoma. A figura 1 ilustra a interação de algumas dessas vias e alguns genes importantes para o florescimento.

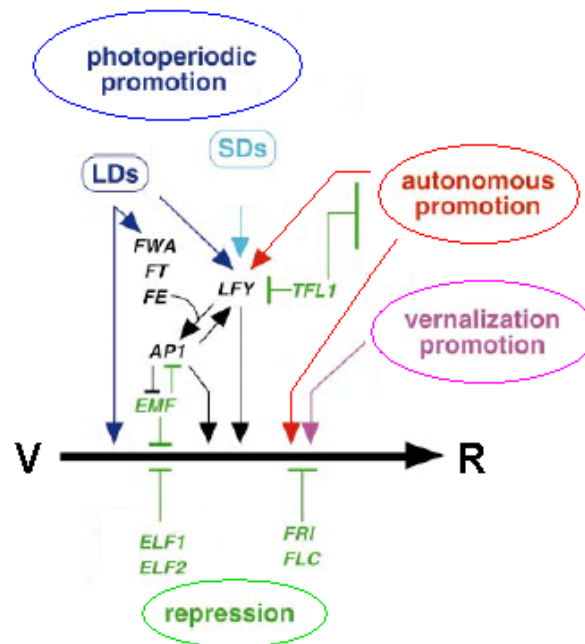


Figura 1. Via metabólica simplificada de controle do tempo de florescimento em *Arabidopsis* e as interações entre alguns genes envolvidos. (Adaptado de Levy e Dean, 1998). A linha horizontal simboliza a passagem da fase vegetativa (V) para a fase reprodutiva (R). São mostradas quatro vias metabólicas: repressão (verde), *autonomous promotion* (vermelho), fotoperíodos (LD= dias longos e SD= dias curtos, azul) e vernalização (rosa). Em preto são apresentados genes que influenciam tanto na identidade do meristema floral, como no tempo de florescimento. Interações de repressão são mostradas pelas barras em "T" e promotoras pelas setas. Sigla dos genes AP1= *APETALA 1*, EMF=*EMBRYONIC FLOWER*, LFY=*LEAFY*, TFL1=*TERMINAL FLOWER1*, ELF1, 2=*EARLY FLOWERING1* e 2; FRI = *FRIGIDA*; FWA, FT e FE são genes cujo os mutantes apresentam florescimento tardio (Koorneef *et al.* 1991 apud Levy e Dean, 1998).

Apesar do florescimento ser considerado uma característica quantitativa, ou seja, dependente da ação de vários genes (Levy e Dean, 1998), pode ser identificado um marcador molecular relacionado ao gene de efeito principal no florescimento precoce (Missiaggia *et al.*, 2005).

2.4.1. Florescimento em gêneros florestais

A questão molecular do florescimento em espécies florestais ainda é pouco conhecida, os estudos de florescimento são realizados em plantas modelos de ciclo anual como *Arabidopsis* e *Antirrhinum*.

Mutantes naturais para florescimento de espécies florestais são muito difíceis de serem encontrados, devido à altura das plantas, ao seu longo tempo de geração e na demora da expressão de características alvos.

Apesar das dificuldades, diversos estudos vêm sendo realizados nesses gêneros: Mouradov *et al.* (1998) trabalhando com biblioteca de cDNA de *Pinus radiata*, descreveu o gene de identidade de meristema *NEEDLY*, ortólogo ao gene *FLORICAULA* e *LEAFY*. O gene apresentou expressão em meristemas vegetativos e reprodutivos e apresentou a mesma função do gene *LFY* em teste com *Arabidopsis* transgênicas. Dornelas e Rodriguez (2006) encontraram homologia com o gene *CfLFY* de cedro (*Cedrela fissilis*) com os genes *FLORICAULA* e *LEAFY* encontrando alto grau de similaridade, o gene e seus homólogos estão envolvidos no controle do desenvolvimento reprodutivo do cedro.

2.4.2. No gênero *Eucalyptus*

Pouco é conhecido sobre a genética do florescimento no gênero *Eucalyptus*. Apesar disso, acredita-se que mecanismos básicos envolvidos na iniciação e desenvolvimento floral em eucalipto são similares àqueles descritos em *Arabidopsis* (Southerton, *et al.*, 1998a e 1998b, Dornelas, *et al.*, 2004). Há algum tempo os estudos genéticos e moleculares têm mostrado que os mecanismos controladores do desenvolvimento de flores são conservados entre as angiospermas (Ma, 1994 apud Mouradov *et al.*, 1998).

Southerton *et al.*, (1998a) verificaram que o genoma do eucalipto contém uma família de genes MADS-box, assim como encontrado em outras espécies vegetais. Foram isolados três genes da família MADS-box em *Eucalyptus grandis*, que se expressaram preferencialmente nas flores. As seqüências foram comparadas com genes MADS-box de outras plantas, e a expressão desses genes - nas flores em desenvolvimento de eucalipto - foi analisada revelando similaridade a genes MADS-box descritos de outras espécies, indicando que esses genes estão presentes no eucalipto atuando em seu desenvolvimento floral. Esses genes têm importante papel na diversificação floral, pois regulam passos na morfogênese da flor.

Southerton (1998b) descreveu a clonagem do gene *Eucalyptus* *LeaFy* (*ELF1* e *ELF2*) de *E. globulus* com homologia de seqüência aos genes de identidade meristemática *LEAFY* (*LFY*) e *FLORICAULA* (*FLO*) de *Arabidopsis* e *Antirrhinum*, respectivamente. Quando a região codificada do *ELF1* foi introduzida em *Arabidopsis* sobre o controle do promotor 35S foram encontrados efeitos fenotípicos similares aos observados com uma construção 35S-*LFY*. Os

resultados indicam que o *ELF1* atua similarmente ao *LFY* no desenvolvimento de flores, o gene *ELF1* pode ser o homólogo funcional do *LFY* em eucalipto. O *ELF2* parece ser um pseudogene não expresso.

Dornelas *et al.*, (2004) também encontrou grande homologia entre um gene de florescimento *EgLFY* de *Eucalyptus grandis* com os genes *LFY* e *FLO*. Assim como nas espécies modelo, o gene é expresso em meristemas florais no início do desenvolvimento e durante a formação dos primórdios de sépalas, pétalas, estames e carpelos. A expressão é também encontrada em primórdios de foliares de árvores adultas. Estudos com plantas transgênicas mutantes *Arabidopsis lfy* sugerem que o gene *EgLFY* possui papéis similares ao *LFY* no desenvolvimento floral.

Mais recentemente Missiaggia *et al.*, (2005) identificou e mapeou 6 marcadores ligados ao gene *Eef1*, dois deles flanqueando o gene de interesse às distâncias de 6,44 cM e 21,8 cM. Para esse estudo, foi utilizada uma população de *Eucalyptus grandis* onde alguns indivíduos floresceram de 60 a 90 dias após a germinação, essa característica de florescimento precoce segregou na população à proporção de 1:1. Foi utilizada a técnica de BSA associada a marcadores SSRs. Comparado ao mapa descrito por Brondani, *et al.*, (2002) o gene mapeado se encontra no grupo de ligação 02. Todas as marcas que apresentaram polimorfismo nas reações com os *bulks* contrastantes e os marcadores SSR foram mapeadas ao gene de florescimento. Já foram testados 450 marcadores RAPD que originaram cerca de 2000 marcas, mas nenhum deles apresentou ligação menor que a encontrada com os marcadores SSR mapeados.

Estudos *in silico* também estão sendo realizados; Dornelas e Rodrigues, (2005) caracterizaram dez possíveis membros da família *CONSTANS* de fatores

de transição de *Arabidopsis* em *Eucalyptus*, através de análise do banco de dados FOREST de ESTs, tornando possível a identificação de elementos conservados envolvidos em vias que controlam o florescimento (Dornelas e Rodrigues, 2005).

2.5. A população em estudo

A população F1 é segregante para característica florescimento precoce, cerca de metade de seus indivíduos floresceram com um ano de idade. É uma das poucas, se não a única população com esse tipo de florescimento para a espécie. Devido à dificuldade de se obter populações desse tipo, ela é de extrema importância, e vem sendo alvo de estudos em nosso grupo de pesquisa, na tentativa de encontrar o gene de efeito principal no florescimento desta população e compreender seu comportamento.

Farro *et al.*, (2006) mapearam marcadores SSRs desenvolvidos por Brondani *et al.*, (1998) abrindo a possibilidade de se comparar essa população com outras da mesma espécie através dos marcadores SSR agrupados, ela encontrou um marcador (EMBRA 2) possivelmente ligado ao gene, a distância de 35,09 cM com um LOD-score de 2,24. Esses resultados abriram a perspectiva para outros estudos mais acurados.

Domingues (2003) utilizando a técnica de BSA fez uma busca de marcadores ligados a essa região, foram testados cerca de 80 *primers* e apenas um deles apresentou uma banda polimórfica e foi convertido em SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), que foi validado e apresentou uma eficiência de 60%.

Esse trabalho é uma continuidade desses estudos para a obtenção de marcadores mais próximos e de um mapa mais denso, na tentativa de entender o controle genético dessa característica na população em estudo, essa característica ainda foi pouco estudada em trabalhos de melhoramento dessa espécie devido ao tempo despendido para o florescimento das árvores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

O material em estudo é composto por uma população F1 de 118 árvores de eucalipto e seus genitores (P-01 e P-02) contrastantes pertencentes à espécie *Eucalyptus grandis*.

A população foi obtida através de técnicas de polinização controlada entre duas árvores que apresentaram flores em idades diferentes.

A árvore mãe, receptora de pólen (P-01), é originária do Zimbábue, está localizada na Fazenda Morrinhos no município de Botucatu, SP e apresentou florescimento precoce. A árvore doadora de pólen (P-02) é originária do Horto Florestal de Rio Claro e está localizada na Fazenda Ariona no município de Itatinga, SP e apresentou florescimento no período normal.

A população apresentou segregação mendeliana de 1:1 para a característica em questão, 62 indivíduos floresceram precocemente em campo

com a idade de um ano e 56 indivíduos floresceram com cerca de 2 a 4 anos apresentando florescimento em idade normal.

Há dificuldade de se obter populações florestais segregantes para característica de florescimento, devido ao tempo que estas espécies levam para florescer. A segregação de florescimento precoce há um ano após a germinação faz dessa população um material de estudo de extrema importância. O material foi doado para esse estudo pela Companhia Suzano de Papel e Celulose.

3.2. DNA genômico

3.2.1. Extração de DNA

Após a coleta em campo, as folhas dos indivíduos da população, incluindo a de seus genitores, foram limpas, embaladas em papel alumínio e armazenadas à temperatura de -20°C, para conservação e posterior extração do DNA vegetal.

Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998) com adaptação na etapa de CTAB 10%, que foi substituída pela utilização de CTAB 5%. O CTAB 5% apresenta uma manipulação mais fácil, tendo menor viscosidade, sua utilização em trabalhos anteriores não mostrou alteração na qualidade do DNA final (Domingues, 2003; Bortoloto, 2003).

O protocolo que segue foi utilizado para todos os indivíduos da população, incluindo os seus genitores.

Em um tubo foram macerados, aproximadamente, 150mg de folhas com nitrogênio líquido, em seguida, foram adicionados 700µl de solução de extração

com PVP e 2-mercapto-etanol (2 μ l de mercapto-etanol para cada ml de solução de extração), aplicado em capela de exaustão e misturado até que todo o material macerado entrasse em contato com a solução. Esta mistura foi levada para o banho-maria por 45 a 60 min à temperatura de 65°C.

Em seguida, foi realizada a primeira extração, adicionando-se 600 μ l de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA 24:1). Esta solução foi misturada com o auxílio de vortex e os tubos levados à centrífuga refrigerada a 10°C, numa rotação de 12000 rpm durante 5 min. Após a centrifugação, a solução apresentou três fases, a superior foi transferida para um novo tubo (\pm 500 μ l) e a esta solução foram adicionados 100 μ l de CTAB 5%. Foi realizada então a segunda extração adicionando-se 600 μ l de CIA 24:1. Essa solução foi homogeneizada em vortex e centrifugada nas mesmas condições anteriores.

Após a centrifugação a solução apresentou duas fases separadas por uma película de proteínas. O sobrenadante (\pm 500 μ l) foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado 400 μ l de NaCl 5M e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante (\pm 500 μ l) foi novamente transferido para um novo tubo onde foram adicionados 400 μ l de álcool isopropílico gelado. O material foi mantido à temperatura de -20°C por um período de aproximadamente 10 horas. As amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores.

Após a centrifugação pode-se visualizar um *pellet* no fundo dos tubos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 μ l de etanol 95% por 2 min, o etanol foi descartado e o *pellet* após secagem em centrífuga a vácuo foi suspenso em tampão TE contendo 10ng/ μ l de RNase (volume variou de 100 a 50 μ l, dependendo do tamanho do “pellet”). As amostras foram levadas ao banho-

maria a 37°C para a digestão do RNA por no mínimo 40 min ou até completa dissolução do “pellet”.

As amostras de DNA que após a digestão do seu RNA pela RNase, ainda apresentaram resíduo de RNA, verificado após quantificação, foram tratadas com 1 µl de RNase a 10ng/µl. O resíduo de RNA fica visível na quantificação, onde a amostra apresenta uma sombra borrada abaixo da banda do DNA.

As amostras, que não apresentaram completa dissolução do pellet após 2 horas no banho-maria a 37°C, foram deixadas *over-night* à temperatura ambiente e/ou foram levadas ao banho-maria a 65°C por 30 minutos. As que mesmo após esses procedimentos ainda apresentaram *pellet* indissolúvel foram transferidas para um novo tubo e o pellet foi descartado. Isso ocorre devido a impurezas encontradas no DNA após a extração, essas impurezas como polissacarídeos, por exemplo, não se dissolvem na solução ficando na forma de pellet que deve ser descartado.

3.2.2. Quantificação e diluição de DNA

O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose 0,8% através da comparação com padrões de concentração conhecida (Lambda DNA - Invitrogen). A corrida eletroforética foi realizada por 40 min a 5 volts/cm de gel com solução tampão Tris-borato (TBE 1x pH 8,0).

Foram aplicados no gel 50ng, 100ng e 150ng do padrão de DNA (Lambda DNA - Invitrogen) nos três primeiros poços e 3µl do DNA das amostras a serem

quantificadas com 5 μ l de tampão de carregamento (sacarose, azul de bromofenol, TE pH 8,0 e brometo de etídio).

Após a corrida eletroforética, o gel foi visualizado em transluminador (Eagle Eye - Stratagene). A intensidade das bandas das amostras foi comparada à intensidade do padrão de DNA e assim as concentrações em ng/ μ l de DNA das amostras extraídas foram estimadas.

A utilização de eletroforese para quantificação do DNA, permite também verificar se ocorreu degradação e possíveis contaminações com RNA.

A fim de evitar degradação do DNA por ação de DNAses nos processos de congelamento e descongelamento, e para obter um padrão na concentração de todas as amostras, o DNA foi diluído à concentração de 5ng/ μ l em água ultra pura autoclavada.

3.3. Confeção dos *bulks*

Para a confeção dos *bulks*, foram misturadas alíquotas iguais de DNA (50 μ l) já diluído a 5ng/ μ l. Foram confeccionados dois *bulks*; o *bulk* de florescimento precoce (BF), obtido com a mistura do DNA dos 10 indivíduos que apresentaram flores mais precocemente (indivíduos 03, 19, 22, 35, 44, 53, 77, 85, 100 e 102) e o *bulk* de florescimento normal, obtido com a mistura do DNA dos 10 indivíduos que apresentaram flores no período normal de florescimento 2 a 4 anos (indivíduos 01, 17, 23, 37, 55, 69, 83, 94, 103 e 119), na tentativa de se encontrar marcadores eficientes.

A amplificação do DNA dos indivíduos que formam os *bulks* foi testada com reação de RAPD antes da confecção dos mesmos para confirmar a qualidade e eficiência desses DNAs. As amostras em que o DNA não amplificou foram novamente extraídas e diluídas até se obter a amplificação satisfatória de todas as amostras selecionadas.

3.4. Reação de amplificação RAPD

Cada reação foi composta de 15ng de DNA, quantidade estabelecida por Grattapaglia & Sederoff (1994) e a mesma utilizada com sucesso por, Domingues (2003), Bortoloto (2003).

O produto de amplificação possui um volume final de 13 μ l. Foram aplicados 15ng de DNA (3 μ l) em placas recicláveis de policarboneto, acrescentando-se a esse 10 μ l de solução *Mix*, um coquetel de reagentes preparado separadamente momentos antes do processo de amplificação. O *Mix* foi composto por: 1,30 μ l de Tampão 10x; 1,9mM de MgCl₂; 1,4 μ l de BSA a 4,5%; 0,8mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,3 μ M de *primer* (Operon Technologies Inc.); 0,18 μ l de Taq DNA polimerase (5U/ μ l) (Invitrogen), o volume foi completado com água ultra pura autoclavada.

Para evitar a evaporação do DNA diluído, a reação foi coberta com óleo mineral (cerca de 50 μ l) e devidamente tampada, depois foi levada a um termociclador (MJ Research/modelo PTC 100TM). As condições de amplificação utilizadas foram uma desnaturação inicial de 96°C por 3 minutos e um ciclo que se repetiu por 41 vezes:

1 min a 92°C, para a desnaturação

1 min a 35°C para o anelamento dos *primers*

2 min a 72°C para a extensão da cadeia de DNA

Em seguida, o DNA amplificado foi submetido a um período de extensão de 5 min a 72°C e mantido a 10°C após o término dos ciclos, até sua retirada do termociclador, quando a eletroforese não foi realizada na hora da retirada, a reação foi levada para temperatura de 4°C até o momento de ser realizada a eletroforese.

Após a amplificação, foram adicionados 7µl de tampão de carregamento aos produtos, que em seguida sofreram separação por eletroforese em gel de agarose 1,5% acrescido 0,03µg de brometo de etídio por ml de gel, usando como tampão Tris-borato (TBE 1x pH 8,0). Também foi aplicada no gel uma amostra padrão de DNA, ou seja, com seu peso molecular conhecido (Ladder 100bp e/ou 1Kb, Invitrogen). A visualização do gel foi realizada por um transiluminador de luz U.V., no sistema de foto-documentação digital Eagle-Eye (Stratagene®).

3.5. Nomenclatura das marcas

Para nomear as marcas foi utilizada a sigla do kit de “primer” da Operon e o tamanho da banda em questão, determinado pela comparação com o padrão ladder (Invitrogen). Para as marcas de Bortoloto (2003) foi utilizado o prefixo loc + sigla do primer + letra de A a F. Para os marcadores Microssatélites foi utilizada a mesma nomenclatura do primer (EMBRA+número).

3.6. Reação com *primer* específico de florescimento

Foram construídos os primers a partir do gene *EgLFY* na tentativa de identificar a presença e ação deste gene na população em estudo, os *primers* foram construídos a partir da seqüência descrita por Dornelas *et al.* (2002):

Primer 5':E25: 5'-CTTCCTCCTCCAAGTCCAATC-3'

primer 3':E13: 5'-TGGCGGAGCTTGGTGGGGACA-3'

Os *primers* foram diluídos para uma concentração de 100 μ M. Posteriormente foi realizada uma nova diluição para 10 μ M.

A reação de amplificação possui um volume final de 10 μ l. Foram aplicados 7,5ng de DNA (1,5 μ l) em tubos com capacidade para 200 μ l, acrescentando-se a esse 8,5 μ l de *Mix* composto por: água ultra pura autoclavada; 1,0 μ l de Tampão 10x; concentrações de MgCl₂ que variaram de 0,5mM a 3mM; 0,25 μ l de BSA a 4,5%; 1mM de dNTPs; 0,5 μ M de cada *primer*, *forward* e *reverse* (Dialab) e 0,10 μ l de Taq DNA polimerase (5U/ μ l) (Invitrogen).

As reações foram levadas a um termociclador com gradiente de temperaturas (mastercycler gradiente da eppendorf) onde foram testadas diferentes temperaturas de anelamento do *primer* para se obter a amplificação do fragmento de tamanho esperado. As condições de amplificação utilizadas foram: uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, depois, as amostras foram submetidas ao seguinte ciclo:

30 seg. a 94°C, para a desnaturação

1 min a 40°C – 62°C para o anelamento dos *primers*

1 min a 72°C para a extensão da cadeia de DNA

Este ciclo se repete por 34 vezes, e em seguida, o DNA amplificado foi submetido a um período de extensão de 7 min a 72°C e mantido a 4°C após o término dos ciclos.

Após a amplificação, foram adicionados 5µl de tampão de carregamento aos produtos, que em seguida sofreram separação por eletroforese em gel de agarose 1% acrescido 0,03µg de brometo de etídio por ml de gel, usando como tampão Tris-borato (TBE 1x pH 8,0). Também foi aplicada no gel uma amostra padrão de DNA, ou seja, com seu peso molecular conhecido (Ladder 100bp e/ou 1Kb, Invitrogen). A visualização do gel foi realizada por um transiluminador de luz U.V., no sistema de foto-documentação digital Eagle-Eye (Stratagene®).

3.7. Mapeamento

O software utilizado para as análises de ligação entre as marcas foi o GQMOL2.1 (2004, <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>).

Os géis de agarose foram analisados e montadas planilhas no EXEL com a presença e ausência das bandas do gel. Para os marcadores segregantes nos dois genitores ao mesmo tempo, foi utilizado o código 4 e 2 para presença e ausência de bandas, respectivamente. Para os marcadores que segregaram apenas em um dos genitores, foi utilizado o código 1 e 0 para presença e ausência de bandas respectivamente. Inicialmente esses dados foram separados em 3 planilhas, uma contendo apenas os marcadores segregantes para o genitor materno, outra contendo as marcas segregantes apenas para o genitor paterno e outra com as marcas segregantes para ambos os genitores. Nas linhas foram colocadas as marcas e os indivíduos formaram as colunas.

Essas planilhas foram utilizadas para a análise do qui-quadrado (X^2), utilizando valor crítico de 5%. Para a planilha que continham os dados de marcas segregantes para os dois genitores, foi utilizada a opção cruzamento F2, que analisa a segregação das marcas comparando com a segregação esperada de 3:1. Para a análise das outras marcas, foi utilizada a opção retrocruzamento, que analisa a segregação das marcas comparando-as com a segregação 1:1.

As marcas que apresentaram distorção da segregação esperada foram eliminadas da análise. Foram montadas, então, duas planilhas, uma para cada genitor, contendo as marcas segregantes para o genitor em questão e as marcas que segregaram em ambos os genitores ao mesmo tempo.

Essas planilhas foram utilizadas no mapeamento. Foi selecionada a opção “mapa de ligação” “segregação mista”, que permite a análise de segregação do tipo 1:1 com segregação 3:1. Para conversão da frequência de recombinação pra distância em centi-Morgans, foi utilizada a opção “distância de Kossambi”. A matriz de distância foi gerada e para concluir o agrupamento das marcas foi utilizada a frequência de recombinação máxima de 30% e um LOD-score=3 para obter uma ordem inicial dos marcadores. Para agregar marcas não ligadas aos grupos de ligação formados, foi utilizado um LOD=2,5, esse processo de agregação de marcas após montagem da ordem inicial dos marcadores com diminuição do LOD utilizado vem sendo realizado com sucesso em diferentes trabalhos (Nelson *et al.*, 1994; Myburg *et al.*, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Detecção de polimorfismos e seleção dos *primers*

A reação de RAPD foi realizada com o DNA diluído dos parentais e com os dois *bulks* contrastantes para uma análise individual das bandas resultantes e para verificar o grau de polimorfismo dos *primers* entre os genitores e entre os *bulks*.

Foram avaliados 234 *primers* RAPD, pertencentes aos kits OPAD, OPH, OPJ, OPK, OPM, OPN, OPP, OPQ, OPR, OPW, OPX e OPY (Operon Technologies Inc), cada kit é composto por 20 *primers*. Dos 234 *primers*, 70 (29,9%) não apresentaram produto de amplificação, mesmo após a repetição das reações, e 164 amplificaram um total de 1993 bandas, uma média de 12,15 bandas por *primer*. Resultado semelhante à média de 10,7 bandas por *primer* encontrada em *Eucalyptus* por Grattapaglia e Sederoff (1994) e superior à de

5,49 encontrado por Gan *et al.*, (2003) num cruzamento de *E. urophilla* e *E. tereticornis*. A figura 2 ilustra a amplificação do *primer* OPM-04 com os *bulks*, os genitores e alguns indivíduos da população F1.

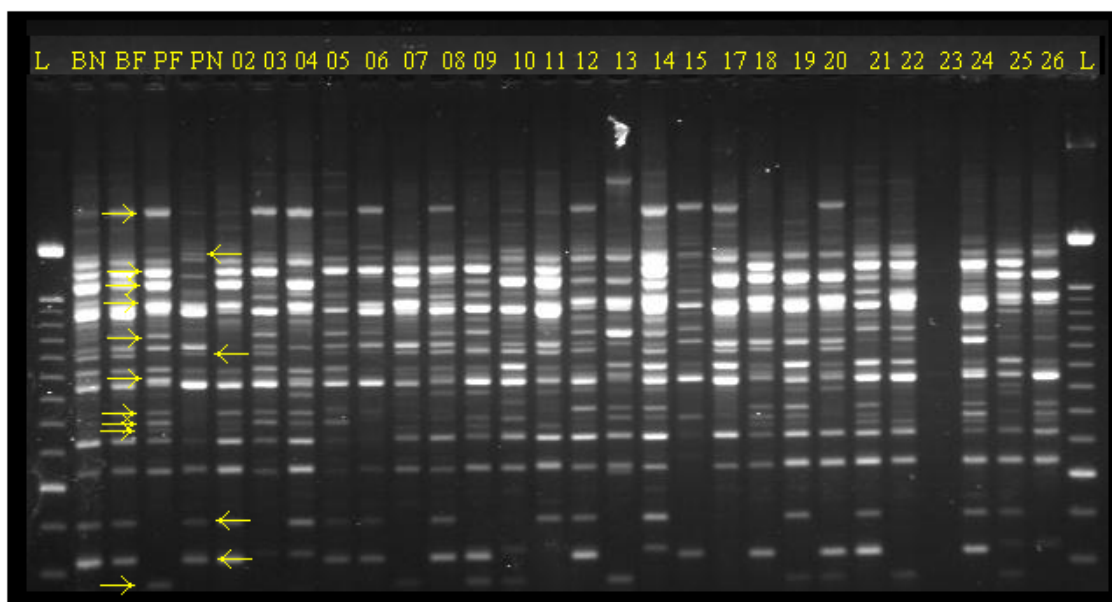


Figura 2. Gel da reação de amplificação do primers OPM-04. As setas apontam para bandas polimórficas entre os genitores. Siglas: L=ladder 100 bp (Invitrogen), BN=*bulk* normal, BF=*bulk* florescimento, PF=Pai com florescimento precoce e PN=Pai com florescimento normal, números de 02 a 26 representam indivíduos da população F1 de *Eucalyptus grandis*.

O kit OPX foi o que apresentou mais falhas nas reações com seus *primers*, com 55% deles sem produto de amplificação, o que apresentou menos falhas nas amplificações foi o kit OPH com apenas dois dos vinte *primers* analisados (10%) (OPH-06 e OPH-10) não apresentando produto de amplificação.

Das 1993 bandas amplificadas, 638 (32%) apresentaram-se polimórficas entre os genitores da população. Este polimorfismo foi resultado da amplificação de 143 *primers*, o que representa 61,11% dos *primers* testados e 87,2% dos

primers que amplificaram, resultados semelhantes foram encontrados por Grattapaglia e Sederoff (1994) com 64,9% de *primers* polimórficos.

Foi observada uma média de 4,46 bandas polimórficas entre os genitores por *primer*, resultado superior à média de 3,09, encontrada no mesmo gênero (Gan *et al.*, 2001), e superior também à média encontrada em outras espécies: 2,4 em noqueira (Beedanagari *et al.*, 2005) e 1,9 em melancia (Levi *et al.*, 2002).

O *primer* que mais apresentou polimorfismo entre os genitores foi o OPM-04 (figura 2) com 14 bandas polimórficas, seguido pelo OPK-16 com 13. Vinte e um dos *primers* que amplificaram, não apresentaram nenhum polimorfismo entre os genitores.

Para o mapeamento foram escolhidos os *primers* mais polimórficos entre os genitores e que apresentaram repetibilidade no padrão de bandas nas reações de amplificação. Foram selecionados também os que apresentaram polimorfismo entre os *bulks*.

4.2. Construção dos mapas de ligação

Foram selecionados 50 *primers*, de acordo com seu grau de polimorfismo entre os genitores e ou ao polimorfismo presente entre os *bulks* da população F1 (tabela 1). Esses *primers* foram analisados, com reação de amplificação, com o DNA de todos os indivíduos da população.

A tabela 1 apresenta os *primers* selecionados para o mapeamento na população F1, além de suas seqüências, número de bandas amplificadas, bandas polimórficas entre os genitores e entre os bulks, bandas com segregação do tipo 3:1 e o número de bandas selecionadas para o mapeamento.

Tabela 1. Primers selecionados para o mapeamento na população F1.

Primer	Seqüência					Primer	Seqüência						
	5'-3'	BA	BPG	BPB	3:1		BSM	5'-3'	BA	BPG	BPB	3:1	BSM
OPAD-01	CAAAGGGCGG	16	9	1	2	6	OPM-10	TCTGGCGCAC	13	7	1	1	8
OPAD-03	TCTCGCCTAC	15	8	-	-	5	OPM-16	GTAACCAGCC	13	7	1	3	10
OPAD-04	GTAGGCCTCA	16	7	1	-	4	OPN-05	ACTGAACGCC	12	4	-	3	7
OPAD-06	AAGTGCACGG	8	4	-	1	4	OPN-06	GAGACGCACA	16	8	2	1	6
OPAD-12	AAGAGGGCGT	15	5	1	1	6	OPN-08	ACCTCAGCTC	25	9	-	1	7
OPAD-16	AACGGGCGTC	13	5	1	2	6	OPN-09	TGCCGGCTTG	10	4	3	2	6
OPH-02	TCGGACGTGA	18	3	1	2	5	OPN-13	AGCGTCACTC	15	8	-	5	13
OPH-03	AGACGTCCAC	20	5	-	1	6	OPP-05	CTGATACGCC	10	5	1	2	6
OPH-04	GGAAGTCGCC	15	10	2	2	6	OPP-03	CCCCGGTAAC	18	8	4	1	9
OPH-07	CTGCATCGTG	12	9	2	2	11	OPP-10	TCCCGCCTAC	13	6	-	3	3
OPH-08	GAACACCCCC	7	5	-	2	7	OPP-11	AACGGGTCGG	14	4	-	2	5
OPH-11	CTCCGCAGT	9	4	-	2	6	OPR-01	TGCGGGTCCT	15	6	-	2	5
OPH-13	GACGCCACAC	21	8	4	-	5	OPR-03	ACACAGAGGG	12	7	-	3	8
OPH-19	CTGACCAGCC	13	7	-	1	6	OPR-12	ACAGGTGCGT	10	7	1	-	7
OPH-20	GGGAGACATC	18	6	-	5	8	OPR-13	GGACGACAAG	22	8	2	-	1
OPJ-11	ACTCCTGCGA	11	5	1	1	5	OPW-03	GTCCGGAGTG	9	6	1	-	3
OPJ-16	CTGCTTAGGG	15	7	1	5	12	OPW-04	CAGAAGCGGA	14	5	-	1	6
OPJ-18	TGGTGCAGAG	17	12	-	5	14	OPW-05	GGCGGATAAG	11	5	-	2	7
OPK-15	CTCCTGCCAA	10	4	1	3	5	OPW-07	CTGGACGTCA	18	10	1	-	4
OPK-16	GAGCGTCGAA	14	13	-	5	15	OPW-12	TGGGCAGAAG	12	7	1	2	6
OPK-18	CCTAGTCGAG	11	6	1	3	9	OPW-15	ACACCGGAAC	14	7	-	2	7
OPK-20	GTGTGCGGAG	25	12	-	9	16	OPX-02	TTCCGCCACC	15	7	-	-	5
OPM-01	GTTGGTGGCT	21	5	1	1	4	OPX-08	CAGGGGTGGA	12	5	-	2	5
OPM-02	ACAACGCCTC	24	9	1	2	3	OPY-10	CAAACGTGGG	15	8	1	4	12
OPM-04	GGCGGTTGTC	23	14	1	1	14	OPY-15	AGTCGCCCTT	15	6	1	2	6
		TOTAL		740	346	40	102	350					

Abreviações: BA: bandas amplificadas; BPG: bandas polimórficas entre os genitores; BPB: bandas polimórficas entre os bulks; BSM: bandas selecionadas para o mapeamento; “3:1”: bandas biparentais, presentes em ambos os genitores.

Da amplificação dos 50 *primers* selecionados, obteve-se 740 bandas, média de 14,8 bandas por primers. Dessas bandas, 346 foram polimórficas entre os genitores (46,76%), média de 6,9 algumas delas não apresentam segregação na população, talvez pela presença da mesma em ambos os cromossomos de um dos genitores. Foram encontradas também 40 bandas polimórficas entre os *bulks* (5,41%).

O polimorfismo encontrado por *primer* se mostrou superior ao encontrado em outros trabalhos 3,6 bandas polimórficas por *primer* selecionado na mesma espécie (Grattapaglia e Sederoff, 1994), apresentou-se 2 vezes maior que a

média 2,5 encontrada em gramíneas (Kema, *et al.*, 2002) e 5 vezes maior que a média de 1,38 em café (Machado, 2004).

Para o mapeamento foram selecionadas apenas as bandas com tamanho entre 200bp e 2500bp. As bandas que se apresentaram fracas na análise dos géis não foram mapeadas, pois em algumas reações sua presença não podia ser afirmada com certeza, as que se apresentaram numa região com bandas muito próximas umas das outras também não foram mapeadas, pois estas confundiam a análise. Esse critério de seleção de bandas na análise dos géis, resultou numa perda de 98 marcas, diminuindo em 21,9% a quantidade inicial de bandas disponíveis para seleção.

O *primer* que apresentou maior índice de seleção de marcas para o mapeamento foi o OPK-20 com 16 bandas e o que apresentou menor índice foi o *primer* OPR-13 com apenas uma banda. Este último, nas reações de teste de polimorfismo apresentou alto grau de polimorfismo, com sete bandas polimórficas entre os genitores, porém, quando a amplificação do *primer* foi analisada na população, seis de suas marcas apresentaram difícil interpretação e não foram selecionadas.

O uso da técnica de RAPD com o *pseudo-testcross* (Grattapaglia e Sederoff, 1994) é uma estratégia eficiente para a construção de mapas genéticos de ligação em organismos florestais ou de ciclos longos e pode ser aplicada a qualquer espécie mesmo sem conhecimento genético prévio, essa estratégia permite utilizar para mapeamento qualquer população F1 derivada do cruzamento entre indivíduos geneticamente divergentes.

Se um genitor é heterozigoto para um marcador e o outro tiver genótipo nulo, a F1 segrega 1:1. Após a genotipagem desses marcadores nos indivíduos

F1, são gerados dois conjuntos distintos de marcadores, ou seja, um para cada genitor do cruzamento, resultando em dois mapas de ligação.

Marcadores comuns em ambos os genitores (biparentais) também são encontrados segregando na população F1, neste caso, os genitores são heterozigotos para o loco em questão, e a segregação esperada é de 3:1, estas marcas também podem ser utilizados no mapeamento. Os marcadores do tipo dominante, incluindo o RAPD apresentam um número limitado destas marcas, principalmente quando a seleção de *primers* é realizada através da análise de polimorfismo entre os genitores, uma vez que sua segregação só aparece quando o *primer* é amplificado na população. A baixa densidade desse tipo de marcas, em estudos de mapa de ligação, implica na necessidade da construção de dois mapas, um para cada genitor.

Um grupo desses marcadores pode ser utilizado como ponte para a integração dos mapas e construção de um mapa único representante da população. São necessários pelo menos dois marcadores biparentais, segregantes em cada grupo de ligação para a união dos mapas (Atienza, *et al.*, 2002). Infelizmente os marcadores do tipo dominantes são pouco informativos para as marcas com esse tipo de segregação, pois quando o indivíduo apresenta a marca dominante, não se pode diferenciar se ele é homozigoto, ou heterozigoto para o loco em questão. Marcadores biparentais codominantes aumentam ainda mais a eficiência, na união dos dois mapas, pois estes são mais informativos, permitindo a análise de todos os locos. Na análise dos dados, foram encontradas 102 marcas biparentais (13,78%).

Marcadores polimórficos, presentes em um genitor e ausente no outro, podem não segregar na população, isso acontece quando o genitor possui a

marca nos dois cromossomos, sendo homozigoto e impedindo a sua segregação na população F1.

Após a análise dos géis de amplificação, as marcas foram separadas de acordo com a origem genitora do marcador e com o tipo de segregação esperado. Foram montadas três planilhas de dados. A primeira contendo os dados de amplificação das marcas biparentais, outra com as marcas segregantes apenas no genitor P-01 e a última com as segregantes em P-02.

As planilhas foram analisadas com o teste do qui-quadrado (X^2), para eliminar possíveis distorções na segregação das marcas selecionadas. Nesse teste, a segregação observada é comparada com a mendeliana esperada. O software utilizado para estas análises foi o GQMOL. Para os testes, foi utilizado um valor crítico de 5%.

A tabela 2 apresenta o teste do qui-quadrado (X^2) das marcas presentes nos dois genitores. Trinta e cinco das marcas analisadas (33,33%) sofreram distorções da proporção esperada com valores abaixo do nível crítico estabelecido.

Tabela 2. Teste do qui-quadrado da marcas segregantes presentes em ambos os genitores da população F1, realizado pelo software GQMOL, com $\theta=0,05$.

Primer	4	2	9	X ²	Probabilidade (%)	Primer	4	2	9	X ²	Probabilidade (%)
K16-950	33	67	5	3,413	6,4672 ns	M16-870	24	48	33	2,667	10,2470 ns
H08-1600	24	73	8	0,003	95,3254 ns	H02-430	24	73	8	0,003	95,3254 ns
J16-1650	29	62	14	2,289	13,0262 ns	H04-1300	31	68	6	2,104	14,6878 ns
J16-1630	15	76	14	3,520	6,0627 ns	H08-2000	39	60	6	10,939	0,0941*
J16-2100	26	64	15	0,726	39,4207 ns	H08-1800	34	63	8	5,227	2,2241*
J16-450	10	80	15	9,259	0,2343*	H11-500	13	88	4	7,924	0,4878*
J16-1550	20	71	14	0,443	50,5571 ns	H07-1090	29	65	11	1,716	19,0168 ns
K20-600	32	71	2	2,023	15,4968 ns	H02-770	28	61	16	1,981	15,9256 ns
K20-420	17	59	29	0,281	59,6242 ns	J11-880	21	79	5	0,853	35,5611 ns
K20-1350	20	80	5	1,333	24,8213 ns	J18-2000	10	84	11	10,34	0,1301*
K20-740	11	84	10	9,126	0,252*	J18-1100	32	50	23	8,602	0,3359*
K20-950	31	73	1	1,282	25,7518 ns	J18-1050	58	40	7	61,075	0,0000*
K20-1400	29	70	6	0,973	32,3917 ns	X08-930	13	69	23	3,659	5,5783 ns
K20-1550	32	69	4	2,406	12,0875 ns	X08-2000	27	52	26	3,549	5,9598 ns
K20-1200	23	52	30	1,284	25,7074 ns	AD16-1720	18	84	3	2,941	8,6348 ns
K16-1200	16	72	17	2,182	13,9649 ns	H19-370	38	65	2	7,770	0,5311*
K16-1350	23	80	2	0,392	53,1467 ns	N05-300	6	44	55	4,507	3,3763*
K16-1000	27	75	3	0,118	73,1601 ns	N05-380	17	75	13	2,087	14,8562 ns
K16-800	21	83	1	1,282	25,7518 ns	N05-900	33	64	8	4,210	4,0195*
K16-900	18	85	2	3,110	7,7811 ns	N06-1300	23	75	7	0,122	72,6393 ns
M16-1090	21	52	32	0,553	45,7293 ns	N09-950	28	74	3	0,327	56,7551 ns
M10-760	25	47	33	3,630	5,6759 ns	H03-880	25	75	5	0,000	100,000 ns
R03-2130	31	71	3	1,582	20,8516 ns	P11-600	7	90	8	16,361	0,0052*
H04-750	33	65	7	3,932	4,7376*	N13-1490	21	79	5	0,853	35,5611 ns
H11-1000	30	71	4	1,191	27,5043 ns	N13-940	18	80	7	2,299	12,9431 ns
AD16-1700	30	73	2	0,935	33,3496 ns	N13-500	34	67	4	4,043	4,4357*
N09-1300	26	48	31	4,054	4,4065*	N13-450	32	71	2	2,023	15,4968 ns
W05-1500	17	81	7	3,061	8,0181 ns	P11-1600	12	83	10	7,751	0,5369*
P10-900	36	66	3	5,765	1,6351*	N13-350	20	81	4	1,455	22,7656 ns
K18-1680	19	67	19	0,388	53,3565 ns	M16-850	42	63	-	12,600	0,0386*
R01-700	34	69	2	3,524	6,0476 ns	P03-650	27	76	2	0,081	77,6073 ns
AD06-850	21	75	9	0,500	47,9500 ns	P03-750	8	96	1	16,615	0,0046*
W15-700	26	74	5	0,053	81,7361 ns	H20-1600	47	57	1	22,615	0,0002*
M01-1550	31	59	15	4,281	3,8530*	H20-1050	25	78	2	0,029	86,4488 ns
M04-800	24	58	23	0,797	37,2067 ns	H20-700	30	67	8	1,818	17,7567 ns
R03-2000	24	50	31	2,180	13,9798 ns	H20-520	16	87	2	4,922	2,6512*
H07-2200	28	67	10	1,014	31,3938 ns	H20-500	19	84	2	2,359	12,4544 ns
J18-2030	14	66	25	2,400	12,1335 ns	Y15-650	34	65	6	4,609	3,1797*
J18-330	29	53	23	4,699	3,0177*	Y15-620	55	43	7	50,626	0,0000*
M02-480	32	70	3	2,209	13,7194 ns	N08-500	6	98	1	20,513	0,0006*
M02-395	25	76	4	0,003	95,4188 ns	Y10-410	35	63	7	6,000	1,4306*
P05-1800	26	53	26	2,637	10,4392 ns	Y10-650	14	84	7	6,000	1,4306*
R01-1150	25	78	2	0,029	86,4488 ns	Y10-700	5	92	8	20,375	0,0006*
R03-2010	27	75	3	0,118	73,1601 ns	Y10-900	26	72	7	0,122	72,6393 ns
locW15A	25	71	9	0,056	81,3664 ns	P10-400	40	59	6	12,529	0,0401*
AD01-600	15	85	5	5,333	2,0921*	P10-510	39	64	2	9,091	0,2569*
AD01-1050	33	64	8	4,210	4,0195*	K15-1800	36	64	5	6,453	1,1074*
AD12-1100	25	55	25	1,667	19,6706 ns	K15-700	23	79	3	0,327	56,7551 ns
W04-650	40	61	4	11,488	0,07*	K15-1100	22	80	3	0,641	42,3522 ns
W05-2030	21	60	24	0,037	84,7390 ns	K18-800	22	68	15	0,015	90,3124 ns
W12-1400	32	64	9	3,556	5,9346 ns	K18-850	19	71	15	0,726	39,4207 ns
W12-1900	18	64	23	0,407	52,3749 ns	locA1C	16	81	8	3,742	5,3052 ns
W15-1200	25	79	1	0,051	82,0847 ns						

Legenda: *: marcadores com valores abaixo do nível crítico estabelecido, não foram utilizados para o mapeamento; ns: valores não significativo, ou seja, acima do nível crítico estabelecido, selecionados para o mapeamento.

A tabela 3 apresenta o teste do χ^2 para segregação das marcas presentes no genitor materno (P-01), nesse genitor, 44 das 155 marcas analisadas (28,4%) apresentaram-se distorcidas da segregação esperada, com valor abaixo do nível crítico especificado.

Tabela 3. Teste do qui-quadrado da marcas segregantes na população F1 presentes no genitor materno (P-01), realizado pelo software GQMOL, com $\theta=0,05$.

Primer	1	0	9	X ²	Probabilidade (%)	Primer	1	0	9	X ²	Probabilidade (%)
FLOR	45	59	1	1,885	16,9811 ns	M04-2000	58	41	6	2,919	8,7532 ns
K20-500	36	30	39	0,545	46,0181 ns	M04-1600	34	65	6	9,707	0,1836*
K20-1500	42	60	3	3,176	7,4706 ns	M04-1700	46	55	4	0,802	37,0502 ns
K16-650	51	53	1	0,038	84,4519 ns	M04-1400	46	51	8	0,258	61,1683 ns
K16-1630	33	51	21	3,857	4,9535*	M04-1200	46	54	5	0,640	42,3711 ns
K16-2100	45	55	5	1,000	31,7311 ns	M04-810	35	46	24	1,494	22,1624 ns
H07-2100	45	49	11	0,170	67,9923 ns	M04-790	48	34	23	2,390	12,2095 ns
H02-900	49	47	9	0,042	83,8256 ns	M04-380	50	50	5	0,000	100,0 ns
J18-980	47	54	4	0,485	48,6100 ns	M16-890	34	39	32	0,342	55,8409 ns
N13-950	40	53	12	1,817	17,7646 ns	M16-1110	33	38	34	0,352	55,2920 ns
P05-900	43	52	10	0,853	35,5809 ns	M10-950	35	36	34	0,014	90,5530 ns
AD16-1100	46	59	-	1,610	20,4559 ns	M10-850	52	46	7	0,367	54,4454 ns
K18-2000	36	54	15	3,600	5,7780 ns	R12-1120	46	40	19	0,419	51,7634 ns
K18-900	33	38	34	0,352	55,2920 ns	R12-440	48	51	6	0,091	76,3025 ns
AD01-300	46	45	14	0,011	91,6512 ns	R12-2000	44	52	9	0,667	41,4216 ns
AD01-610	45	55	5	1,000	31,7311 ns	R13-1100	40	40	25	0,000	100,0 ns
AD01-800	40	60	5	4,000	4,55*	H04-1550	46	54	5	0,640	42,3711 ns
AD04-1210	50	49	6	0,010	91,9944 ns	H04-550	10	92	3	65,922	0,0*
AD04-1220	57	36	12	4,742	2,9436*	H08-1900	68	32	5	12,960	0,0318*
AD04-920	65	27	13	15,696	0,0074*	H08-1750	45	54	6	0,818	36,5712 ns
AD06-990	46	48	11	0,043	83,6569 ns	H08-1100	49	50	6	0,010	91,9944 ns
AD06-1150	46	52	7	0,367	54,4454 ns	H11-680	49	52	4	0,089	76,5313 ns
AD03-850	60	29	16	10,798	0,1016*	H07-2030	38	44	23	0,439	50,7594 ns
AD03-1100	46	24	35	6,914	0,8551*	H07-1600	34	62	9	8,167	0,4267*
AD12-620	66	36	3	8,824	0,2974*	H07-1450	50	46	9	0,167	68,3091 ns
AD12-380	46	54	5	0,640	42,3711 ns	H07-1400	15	81	9	45,375	0,0*
AD12-800	43	36	26	0,620	43,0953 ns	H07-1270	34	63	8	8,670	0,3235*
W03-750	56	29	20	8,576	0,3405*	H13-1550	25	32	48	0,860	35,3837 ns
W04-1150	57	44	4	1,673	19,5821 ns	H13-1200	53	48	4	0,248	61,8823 ns
W04-590	46	56	3	0,980	32,2102 ns	H13-820	48	53	4	0,248	61,8823 ns
W04-400	59	39	7	4,082	4,3352*	H02-1300	54	46	5	0,640	42,3711 ns
W07-1050	44	42	19	0,047	82,9248 ns	H02-700	31	38	36	0,710	39,9396 ns
W12-1050	40	60	5	4,000	4,55*	J11-1050	49	36	20	1,988	15,8526 ns
W12-1700	47	55	3	0,627	42,8292 ns	J18-2010	28	50	27	6,205	1,2738*
W12-1090	55	47	3	0,627	42,8292 ns	J18-2020	37	45	23	0,780	37,6992 ns
M01-500	34	64	7	9,184	0,2442*	J18-1900	34	63	8	8,670	0,3235*
M01-810	40	52	13	1,565	21,0903 ns	J18-870	11	6	88	1,471	22,5253 ns

Tabela 3. Continuação.

Primer	1	0	9	X ²	Probabilidade (%)	Primer	1	0	9	X ²	Probabilidade (%)
J18-850	52	41	12	1,301	25,4017 ns	N05-1100	51	46	8	0,258	61,1683 ns
X02-1200	52	53	-	0,010	92,2258 ns	N06-400	43	55	7	1,469	22,5442 ns
X02-1000	51	54	-	0,086	76,9698 ns	N09-1200	40	60	5	4,000	4,55*
X02-600	37	68	-	9,152	0,2484*	N09-750	47	56	2	0,786	37,5189 ns
X02-580	38	62	5	5,760	1,6395*	N09-650	40	62	3	4,745	2,9382*
H19-1100	47	56	2	0,786	37,5189 ns	N09-320	41	61	3	3,922	4,767*
H19-650	54	49	2	0,243	62,225 ns	P11-650	60	37	8	5,454	1,9528*
H03-790	51	53	1	0,038	84,4519 ns	P11-1500	56	41	8	2,320	12,7754 ns
H03-1100	45	40	20	0,294	58,7594 ns	J16-2000	50	40	15	1,111	29,1841 ns
N13-490	44	57	4	1,673	19,5821 ns	J16-2200	45	31	29	2,579	10,8294 ns
M02-1500	45	60	-	2,143	14,3235 ns	J16-1450	46	45	14	0,011	91,6512 ns
M16-900	56	48	1	0,615	43,2768 ns	locA1B	42	56	7	2,000	15,7299 ns
N13-400	62	41	2	4,282	3,8528*	locA4A	52	46	7	0,367	54,4454 ns
N13-330	55	42	8	1,742	18,6852 ns	locA4B	52	47	6	0,253	61,5303 ns
M16-1150	45	60	-	2,143	14,3235 ns	locA4D	58	33	14	6,868	0,8775*
P03-350	51	53	1	0,038	84,4519 ns	locA6B	35	42	28	0,636	42,5031 ns
P03-1050	61	43	1	3,115	7,7556 ns	locA6D	32	36	37	0,235	62,7626 ns
Y15-1020	62	37	6	6,313	1,1985*	locA12C	60	35	10	6,579	1,0319*
N08-950	54	49	2	0,243	62,2250 ns	locA12E	44	49	12	0,269	60,4126 ns
Y10-400	36	62	7	6,898	0,8629*	locA12F	39	35	31	0,216	64,1938 ns
Y10-810	71	27	7	19,755	0,0009*	locW3A	49	28	28	5,727	1,6703*
Y10-730	55	44	6	1,222	26,8925 ns	locW4B	53	42	10	1,274	25,9077 ns
W05-600	36	58	11	5,149	2,3261*	locW4D	45	51	9	0,375	54,0291 ns
W05-1510	58	40	7	3,306	6,9022 ns	locW4E	57	35	13	5,261	2,181*
K18-750	32	59	14	8,011	0,4649*	locW7B	41	39	25	0,050	82,3063 ns
K18-1700	45	41	19	0,186	66,6228 ns	locW12B	39	57	9	3,375	6,6193 ns
K18-2050	42	48	15	0,400	52,7089 ns	locW12C	46	52	7	0,367	54,4454 ns
K15-650	34	69	2	11,893	0,0563*	locW12D	49	49	7	0,000	100,0 ns
P05-520	46	38	21	0,762	38,2733 ns	locW5A	38	41	26	0,114	73,5720 ns
P05-600	47	51	7	0,163	68,6168 ns	EMBRA 01	42	63	-	4,200	4,0424*
P05-800	54	39	12	2,419	11,9844 ns	EMBRA 03	36	67	2	9,330	0,2254*
P05-1700	51	27	27	7,385	0,6578*	EMBRA 04	53	50	2	0,087	76,7537 ns
P05-2100	49	29	27	5,128	2,354*	EMBRA 17	58	46	1	1,385	23,9317 ns
R01-1390	53	50	2	0,087	76,7537 ns	EMBRA 20	54	49	2	0,243	62,2250 ns
R01-750	56	47	2	0,786	37,5189 ns	EMBRA 02	54	48	2	0,353	55,2453 ns
X08-1300	38	60	7	4,939	2,6261*	EMBRA 06	51	50	4	0,010	92,0738 ns
R03-2110	33	62	10	8,853	0,2927*	EMBRA 07	51	51	3	0,000	100,0 ns
AD16-300	61	43	1	3,115	7,7556 ns	EMBRA 08	34	71	-	13,038	0,0305*
AD16-1400	47	55	3	0,627	42,8292 ns	EMBRA 11	40	65	-	5,952	1,4697*
N05-320	46	46	13	0,000	100,0 ns	EMBRA 18	55	42	8	1,742	18,6852 ns
N05-750	48	49	8	0,010	91,9126 ns						

Legenda: *: marcadores com valores abaixo do nível crítico estabelecido, não foram utilizados para o mapeamento; ns: valores não significativo, ou seja, acima do nível crítico estabelecido, selecionados para o mapeamento.

A tabela 4 apresenta os resultados do teste do X² com as marcas segregantes na população originadas do genitor paterno (P-02). Das 159 marcas analisadas, 35 (22%) apresentaram valor abaixo do nível crítico.

Tabela 4. Teste do qui-quadrado da marcas segregantes na população F1 presentes no genitor materno (P-02), realizado pelo software GQMOL, com $\theta=0,05$.

Primer	1	0	9	X ²	Probabilidade (%)	Primer	1	0	9	X ²	Probabilidade (%)
FLOR	45	59	1	1,885	16,9811 ns	R03-890	59	44	2	2,184	13,9409 ns
K20-640	43	60	2	2,806	9,3923 ns	R03-2120	26	26	53	0,000	100,0 ns
K20-320	52	40	13	1,565	21,0903 ns	H04-600	64	39	2	6,068	1,3766*
K20-620	42	32	31	1,351	24,5042 ns	H04-500	43	59	3	2,510	11,314 ns
K20-1000	59	42	4	2,861	9,0729 ns	H08-1500	49	51	5	0,040	84,1481 ns
K20-2000	6	65	34	49,028	0,0*	H11-1600	50	51	4	0,010	92,0738 ns
K20-550	30	39	36	1,174	27,8599 ns	H11-600	50	47	8	0,093	76,0668 ns
K16-510	26	17	62	1,884	16,9912 ns	H11-580	50	51	4	0,010	92,0738 ns
K16-1640	38	44	23	0,439	50,7594 ns	H07-1700	56	41	8	2,320	12,7754 ns
K16-550	47	58	-	1,152	28,3051 ns	H07-550	61	33	11	8,340	0,3877*
K16-2000	39	42	24	0,111	73,8883 ns	H07-500	41	56	8	2,320	12,7754 ns
K16-1610	37	46	22	0,976	32,3212 ns	H13-750	45	52	8	0,505	47,7244 ns
K16-1620	37	46	22	0,976	32,3212 ns	H13-720	40	58	7	3,306	6,9022 ns
M10-1400	40	42	23	0,049	82,5199 ns	J11-1100	44	38	23	0,439	50,7594 ns
Y10-600	43	56	6	1,707	19,1366 ns	J11-830	64	35	6	8,495	0,3561*
R03-620	32	58	15	7,511	0,6132*	J11-750	52	40	13	1,565	21,0903 ns
W05-2010	42	41	22	0,012	91,2596 ns	J18-950	47	33	25	2,450	11,7525 ns
AD01-810	46	56	3	0,980	32,2102 ns	J18-595	49	24	32	8,562	0,3433*
AD04-910	43	52	10	0,853	35,5809 ns	J18-400	56	47	2	0,786	37,5189 ns
AD06-1100	43	59	3	2,510	11,3140 ns	X08-900	9	64	32	41,438	0,0*
AD03-620	43	49	13	0,391	53,1615 ns	w04-1500	38	65	2	7,078	0,7805*
AD03-720	39	52	14	1,857	17,2955 ns	W05-2020	38	42	25	0,200	65,4721 ns
AD03-2000	40	49	16	0,910	34,0085 ns	X08-1700	45	49	11	0,170	67,9923 ns
AD12-1250	48	54	3	0,353	55,2453 ns	X02-1400	50	55	-	0,238	62,5585 ns
AD12-420	38	60	7	4,939	2,6261*	H19-1050	50	52	3	0,039	84,3022 ns
W03-1350	55	47	3	0,627	42,8292 ns	H19-1000	48	53	4	0,248	61,8823 ns
W03-2000	54	47	4	0,485	48,6100 ns	H19-880	56	47	2	0,786	37,5189 ns
W04-1160	58	44	3	1,922	16,5684 ns	H03-620	47	56	2	0,786	37,5189 ns
W05-2040	38	42	25	0,200	65,4721 ns	H03-800	35	68	2	10,573	0,1148*
W07-700	61	35	9	7,042	0,7963*	H03-1120	50	36	19	2,279	13,1131 ns
W07-1190	40	53	12	1,817	17,7646 ns	N13-1500	42	59	4	2,861	9,0729 ns
W07-1500	40	57	8	2,979	8,4332 ns	N13-520	59	28	18	11,046	0,0889*
W12-700	49	53	3	0,157	69,2061 ns	N13-300	12	86	7	55,878	0,0*
W15-1100	49	55	1	0,346	55,6298 ns	N13-280	47	49	9	0,042	83,8256 ns
W15-1400	51	52	2	0,010	92,1509 ns	H20-1700	49	55	1	0,346	55,6298 ns
W15-1350	49	45	11	0,170	67,9923 ns	M16-1130	50	55	-	0,238	62,5585 ns
W15-1330	36	68	1	9,846	0,1702*	P03-400	8	93	4	71,535	0,0*
M01-800	59	39	7	4,082	4,3352*	P03-600	57	46	2	1,175	27,8426 ns
M04-1900	34	59	12	6,720	0,9531*	H20-1500	46	58	1	1,385	23,9317 ns
M04-1100	49	34	22	2,711	9,9668 ns	H20-1110	54	49	2	0,243	62,225 ns
M04-500	41	60	4	3,574	5,8682 ns	Y15-350	59	36	10	5,568	1,8287*
M04-431	37	25	43	2,323	12,7508 ns	Y15-700	39	59	7	4,082	4,3352*
M04-432	42	59	4	2,861	9,0729 ns	Y15-600	50	49	6	0,010	91,9944 ns
M16-1100	43	62	-	3,438	6,3709 ns	N08-550	45	59	1	1,885	16,9811 ns
M16-1400	27	42	36	3,261	7,0951 ns	N08-900	13	91	1	58,500	0,0*
M10-1600	51	51	3	0,000	100,0 ns	N08-1500	63	38	4	6,188	1,2861*
M10-1350	41	39	25	0,050	82,3063 ns	N08-1450	57	46	2	1,175	27,8426 ns
M10-800	55	47	3	0,627	42,8292 ns	N08-1400	3	100	2	91,35	0,0*
M10-320	49	55	1	0,346	55,6298 ns	Y10-800	43	40	22	0,108	74,1934 ns
R12-1700	48	47	10	0,011	91,8282 ns	Y10-750	53	46	6	0,495	48,1728 ns
R12-1100	46	38	21	0,762	38,2733 ns	Y10-1200	49	48	8	0,010	91,9126 ns
R12-450	54	47	4	0,485	48,61 ns	Y10-1100	48	49	8	0,010	91,9126 ns
R12-2020	63	37	5	6,760	0,9322*	K18-1650	43	42	20	0,012	91,3627 ns
R03-600	42	47	16	0,281	59,6113 ns	K15-1300	52	48	5	0,160	68,9157 ns

Tabela 4. Continuação.

Primer	1	0	9	X ²	Probabilidade (%)	Primer	1	0	9	X ²	Probabilidade (%)
P05-650	48	22	35	9,657	0,1886*	locW7D	40	51	14	1,330	24,8864 ns
P05-1600	16	63	26	27,962	0,0*	locW12A	48	50	7	0,041	83,9893 ns
R01-1100	44	57	4	1,673	19,5821 ns	locW15B	59	38	8	4,546	3,2988*
W15-710	62	42	1	3,846	4,986*	locW15C	50	50	5	0,000	100,0 ns
N06-900	54	41	10	1,779	18,2279 ns	locW15D	48	50	7	0,041	83,9893 ns
N06-480	51	46	8	0,258	61,1683 ns	locW15E	40	40	25	0,000	100,0 ns
N06-450	37	61	7	5,878	1,5335*	locW15F	35	58	12	5,688	1,708*
N06-790	68	30	7	14,735	0,0124*	scar	49	55	1	0,346	55,6298 ns
N05-510	43	54	8	1,247	26,4045 ns	locW5B	35	41	29	0,474	49,1297 ns
P11-700	54	41	10	1,779	18,2279 ns	locW5D	39	37	29	0,053	81,8546 ns
J16-1500	57	34	14	5,813	1,5906*	EMBRA05	44	60	1	2,462	11,6664 ns
J16-1990	51	39	15	1,600	20,5903 ns	EMBRA10	55	50	-	0,238	62,5585 ns
AD16-900	56	48	1	0,615	43,2768 ns	EMBRA15	54	45	6	0,818	36,5712 ns
J16-750	52	39	14	1,857	17,2955 ns	EMBRA19	56	43	6	1,707	19,1366 ns
J16-2300	39	37	29	0,053	81,8546 ns	EMBRA01	69	36	-	10,371	0,128*
locA1A	45	52	8	0,505	47,7244 ns	EMBRA03	50	53	2	0,087	76,7537 ns
locA4C	45	45	15	0,000	100,0 ns	EMBRA04	49	54	2	0,243	62,225 ns
locA6A	11	66	28	39,286	0,0*	EMBRA17	2	102	1	96,154	0,0*
locA6C	35	44	26	1,025	31,1261 ns	EMBRA20	46	57	2	1,175	27,8426 ns
locA12A	44	52	9	0,667	41,4216 ns	EMBRA02	50	52	3	0,039	84,3022 ns
locA12D	38	54	13	2,783	9,5293 ns	EMBRA06	55	46	4	0,802	37,0502 ns
locW3B	41	38	26	0,114	73,5720 ns	EMBRA07	51	51	3	0,000	100,0 ns
locW3C	40	37	28	0,117	73,2440 ns	EMBRA08	45	60	-	2,143	14,3235 ns
locW4A	54	43	8	1,247	26,4045 ns	EMBRA11	53	52	-	0,01	92,2258 ns
locW7A	58	32	15	7,511	0,6132*	EMBRA18	48	49	8	0,01	91,9126 ns
locW7C	36	52	17	2,909	8,8082 ns						

Legenda: *: marcadores com valores abaixo do nível crítico estabelecido, não foram utilizados para o mapeamento; ns: valores não significativo, ou seja, acima do nível crítico estabelecido, selecionados para o mapeamento.

Das marcas analisadas pelos testes do X², as biparentais foram as que apresentaram maior distorção na segregação. Considerando todas as 419 marcas selecionadas, foi encontrado 27,2% de distorções da segregação mendeliana esperada, distorção semelhante à de 22,76% encontrados por Gan *et al.* (2001), que utilizou um nível crítico de 1%, se o nível fosse aumentado para 5%, como o utilizado aqui, a proporção de distorções também aumentaria. Beedanagari, *et al.* (2005) encontrou distorção de 14,4% e Grattapaglia e Sederoff (1994) de apenas 3,6% dos marcadores apresentaram distorção com nível de 5%.

Diversas razões podem ser associadas às altas frequências de marcadores com distorção, especialmente em árvores, como a migração de

múltiplas bandas no gel (Virk, *et al.*, 1998). Esses resultados também podem ser associados à alta frequência de alelos recessivos letais (Verhaegen e Plomion, 1996), ou podem estar relacionadas à ambigüidade dos marcadores RAPD, que muitas vezes apresentam bandas de difícil interpretação, que podem levar a erros de leitura nos géis. Para evitar esses erros, os marcadores que apresentaram distorção no teste do X^2 não entraram na confecção dos mapas.

Foram descartadas também as marcas que apresentaram mais de 35% de dados perdidos. Restando 230 marcas com segregação 1:1, sendo 107 do P-01 e 123 do P-02, e 70 marcas biparentais, com segregação 3:1, totalizando 299 marcas.

Devido à maioria das marcas possuírem segregação do tipo 1:1 e apenas 23% delas apresentarem segregação do tipo 3:1, não é indicado montar um mapa único para a população, sendo mais aconselhável confeccionar os dois mapas separadamente e posteriormente compara-los. Por isso, para a estruturação dos mapas, foram montadas duas planilhas, uma para cada genitor com as marcas específicas e as marcas biparentais.

Para os *primers* de microssatélites, quando os cruzamentos eram do tipo AB x CD, ou AB x AC, os alelos de cada genitor foram analisados separadamente, permitindo seu mapeamento na população, neste caso, para cada marcador, foi escolhido um dos alelos para receber o código 1 e o outro recebeu 0.

4.2.1. Mapa do genitor materno (florescimento precoce) P-01

A planilha de mapeamento foi composta de 164 marcadores RAPD, destes, 14 desenvolvidos por Bortoloto (2003), sete marcadores SSR (Farro, *et al.*, 2006), o marcador morfológico de florescimento e um fragmento amplificado pelo *primer* descrito por Dornelas *et al.*, (2004) (resultados serão discutidos a frente) totalizando 173 marcadores.

Destas marcas analisadas, 100 (57,8%) se ligaram formando 81 intervalos, originando 17 grupos de ligação. Além dos grupos, oito marcas se uniram, formando quatro pares de ligação. A figura 3 representa o mapa de ligação para o genitor com florescimento precoce.

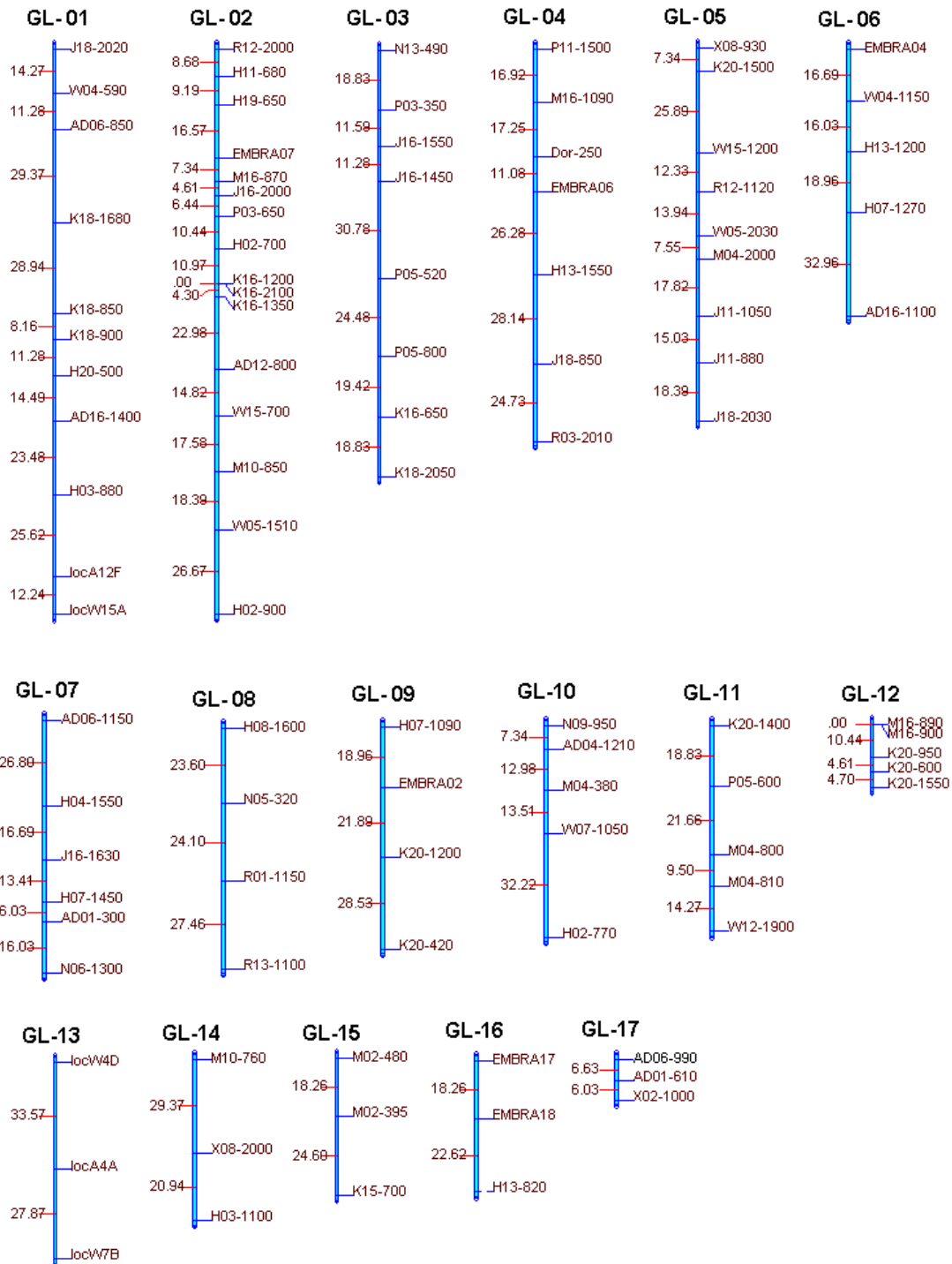


Figura 3. Mapa parcial de ligação do genitor materno P-01 da população F1 de *Eucalyptus grandis*, montado a partir da análise pelo software GQMOL. Os marcadores são apresentados do lado direito do grupo de ligação e os valores à esquerda representam as distâncias entre os marcadores em centimorgans (cM).

Foram considerados grupos de ligação, as ligações com três ou mais marcadores. As ligações entre dois marcadores, foram denominadas de pares de ligação. Na figura 4 podemos observar os quatro pares de ligação formados.

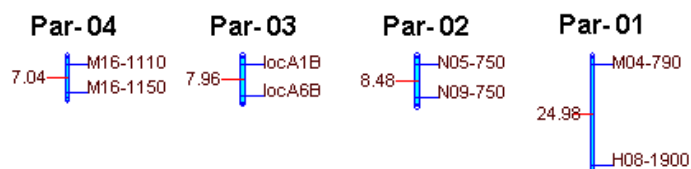


Figura 4. Pares de ligação do genitor materno P-01 da população F1 de *Eucalyptus grandis*, montado a partir da análise pelo software GQMOL. Os marcadores são apresentados do lado direito do grupo de ligação. Os valores à esquerda representam as distâncias entre os marcadores em centimorgans (cM).

A tabela 5 apresenta o número de marcadores total, número de intervalos, o comprimento e a média de distância entre os marcadores nos grupos de ligação formados.

Tabela 5. Análise dos grupos de ligação do mapa do genitor materno, pela análise com software GQMOL. O comprimento e a média de distância entre os marcadores são apresentados em centimorgans (cM).

Grupo ligação	Nº Marcadores	Nº Intervalos	Comprimento (cM)	Média (cM)
1	11	10	179.13	17.91
2	16	14	178.98	12.78
3	8	7	135.21	19.32
4	7	6	124.40	20.73
5	9	8	118.29	14.79
6	5	4	84.64	21.16
7	6	5	78.96	15.79
8	4	3	75.16	25.05
9	4	3	69.38	23.13
10	5	4	66.05	16.51
11	5	4	64.26	16.07
12	5	3	19.75	12.78
13	3	2	61.44	30.72
14	3	2	50.31	12.16
15	3	2	42.86	21.43
16	3	2	40.88	20.44
17	3	2	12.69	6.35
Total	100	81	1402.39	17.31

O comprimento total do mapa foi de 1402,39 cM, que representa 86,6% dos 1620 cM do genoma da espécie (Grattapaglia e Sederoff, 1994), resultados desconsiderando os pares de ligação. Dos 17 grupos de ligação formados, 13 apresentaram quatro ou mais marcadores e três ou mais intervalos. Apenas quatro dos grupos formados apresentaram três marcadores ligados. O grupo que apresentou maior número de marcadores mapeados foi o GL-02 com 16 mapeados em 14 intervalos cobrindo 179,13 cM do genoma (11%). Os oito primeiros grupos de ligação cobrem sozinhos 60% do genoma (974,77 cM).

4.2.2. Mapa do genitor paterno (florescimento normal) P-02

A planilha para a confecção do mapa do genitor P-02 foi composta de 178 marcadores RAPD, sendo 18 desenvolvidos por Bortoloto (2003) e 160 desenvolvidas nesse trabalho, 13 marcadores SSR (Farro, 2001), o marcador morfológico de florescimento e o marcador SCAR desenvolvido por Domingues, (2003) (resultados serão discutidos a frente), totalizando 193 marcadores.

Destas marcas, 102 (52,9%) se ligaram em 17 grupos de ligação, totalizando 80 intervalos. Dezesseis marcas se ligaram em 8 pares de ligação. A figura 5 representa o mapa de ligação para o genitor com florescimento precoce.

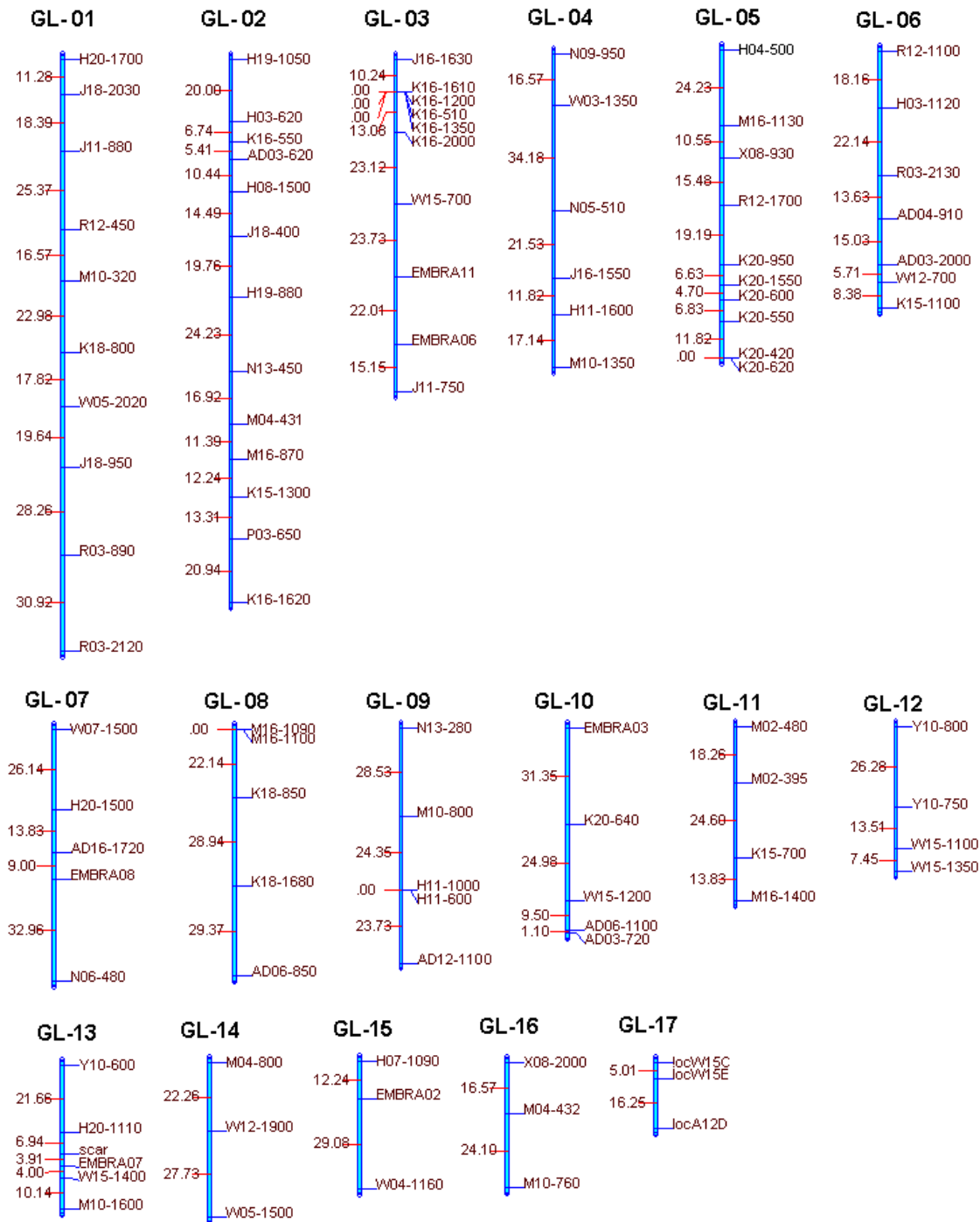


Figura 5. Mapa parcial de ligação do genitor paterno P-02 da população F1 de *Eucalyptus grandis*, montado a partir da análise pelo software GQMOL. Os marcadores são apresentados do lado direito do grupo de ligação e os valores à esquerda representam as distâncias entre os marcadores em centimorgans (cM).

Assim como no mapa do genitor P-01, foram considerados grupos de ligação as ligações com três ou mais marcadores. As ligações entre dois marcadores foram denominadas de pares de ligação. Na figura 6 podemos observar os pares de ligação formados.

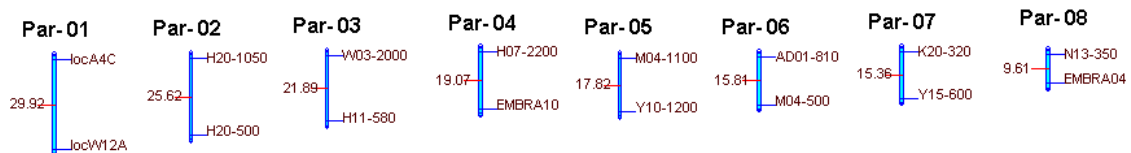


Figura 6. Pares de ligação do genitor paterno P-02 da população F1 de *Eucalyptus grandis*, montado a partir da análise pelo software GQMOL. Os marcadores são apresentados do lado direito do grupo de ligação. Os valores à esquerda representam as distâncias entre os marcadores em centimorgans (cM).

A tabela 6 apresenta o número de marcadores total, número de intervalos, o comprimento e a média de distância entre os marcadores nos grupos de ligação formados.

Tabela 6. Análise dos grupos de ligação do mapa do genitor paterno, pela análise com software GQMOL. O comprimento e a média de distância entre os marcadores são apresentados em centimorgans (cM).

Grupo ligação	Nº Marcadores	Nº Intervalos	Comprimento (cM)	Média (cM)
1	10	9	191,23	21,25
2	13	12	175,87	14,66
3	10	6	107,33	17,89
4	6	5	101,24	20,25
5	10	8	99,43	12,43
6	7	6	83,05	13,84
7	5	4	81,93	20,48
8	5	4	80,45	26,82
9	5	3	76,61	25,54
10	5	4	66,93	16,73
11	4	3	56,69	18,90
12	4	3	47,24	15,75
13	6	5	46,65	9,33
14	3	2	49,99	25,00
15	3	2	41,32	20,66
16	3	2	40,67	20,34
17	3	2	21,26	10,63
Total	102	80	1367,89	17,10

O comprimento total do mapa foi de 1367,89 cM, cobrindo 84,5% do genoma da espécie *Eucalyptus grandis* (Grattapaglia e Sederoff, 1994), resultados desconsiderando os pares de ligação. Dos 17 grupos de ligação formados, 13 apresentaram quatro ou mais marcadores e três ou mais intervalos, quatro grupos apresentaram três marcadores ligados. O grupo que apresentou maior número de marcadores mapeados foi o GL-02 com 13 marcadores mapeados em 12 intervalos cobrindo 175,87 cM do genoma (11%). Os oito primeiros grupos de ligação cobrem sozinhos 57% do genoma (920,53 cM).

4.2.3. Análise e comparação dos mapas

Na técnica de mapeamento é esperado que cada grupo de ligação formado seja representante de um cromossomo. A espécie *Eucalyptus grandis* possui $n=11$ cromossomos e os mapas desenvolvidos apresentaram cada um 17 grupos de ligação. Não houve marcadores suficientes capazes de unir todos os grupos localizados num mesmo cromossomo. Essas lacunas nos mapas resultando em dois ou mais grupos de ligação por cromossomo tem sido freqüentemente observado. Gan *et al.*, (2003) encontraram 23 grupos de ligação, 18 com mais de três marcadores ligados para *E. urophylla* e 15 para *E. tereticornis*, ambas as espécies também com $n=11$. O mesmo é apresentado em outros gêneros (Beedanagari, *et al.*, 2004; Kema, *et al.*, 2002).

Os mapas representaram 86,6% e 84,5% do genoma da espécie *E. grandis*, para P-01 e P-02, respectivamente e apresentaram uma densidade moderada de marcadores, com média de 17 cM no tamanho dos intervalos entre dois marcadores.

A comparação dos mapas, levando em consideração as marcas biparentais, também mostra similaridades entre eles.

A figura 7 apresenta a comparação entre os grupos de ligação do genitor materno (barras azuis) com os grupos do genitor paterno (barras vermelhas). As marcas sinalizadas do GL-01 do genitor materno e do GL-08 do genitor paterno apresentam-se na mesma ordem, e mesma distância (figura 7A).

Nos grupos GL-14 e GL-16 dos genitores materno e paterno, respectivamente, as marcas apresentam, e distâncias semelhantes, ocorreu a inserção de outro marcador entre as marcas do grupo GL-16 e na extremidade do grupo GL-14 (figura 7D), o mesmo foi observado entre os grupos GL-15 e GL-11

dos genitores materno e paterno respectivamente, com a ligação de um marcador a 13,83 cM na extremidade (figura 7E). Essas análises indicam que os grupos comparados podem ser, na verdade, o mesmo grupo de ligação mapeado em cada um dos genitores.

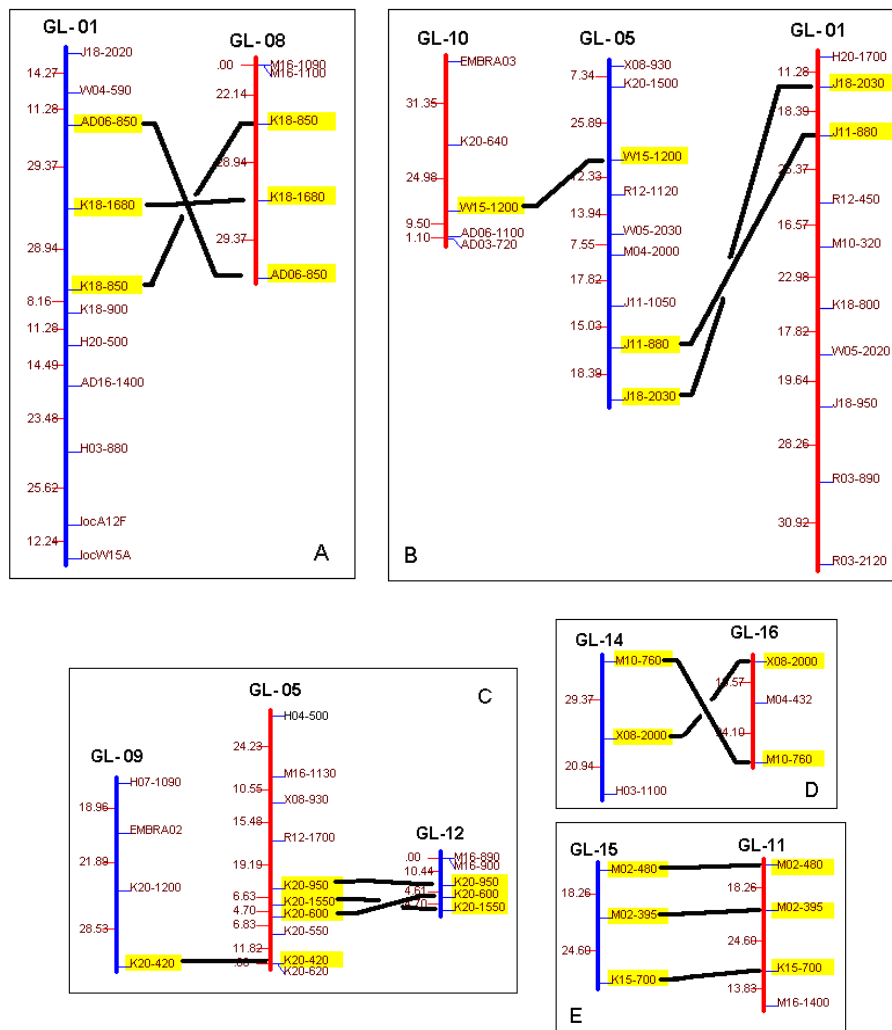


Figura 7. Comparação entre os mapas de ligação dos genitores da população F1 de *Eucalyptus grandis*. As barras azuis representam os grupos de ligação do mapa do genitor materno e barras vermelhas mapa do genitor paterno, estão destacados as marcas comuns entre os dois mapas.

Outro caso semelhante foi observado no grupo GL-05 do genitor paterno que apresentou marcas em comum com os grupos GL-09 e GL-12 do genitor materno (figura 7B), indicando que eles os GL-09 e GL-12 do genitor materno podem ser, na verdade, um único grupo que não se uniu pela falta de alguns marcadores nessas regiões.

A figura 8 mostra o GL-02 do mapa do genitor materno comparado com os GL-03 e GL-02 do mapa do genitor paterno, como no caso anterior, este fato indica que um aumento na densidade de marcadores permitiria a união desses grupos menores formando agrupamentos maiores, reduzindo o número de grupos de ligação, para o número de cromossomos da espécie.

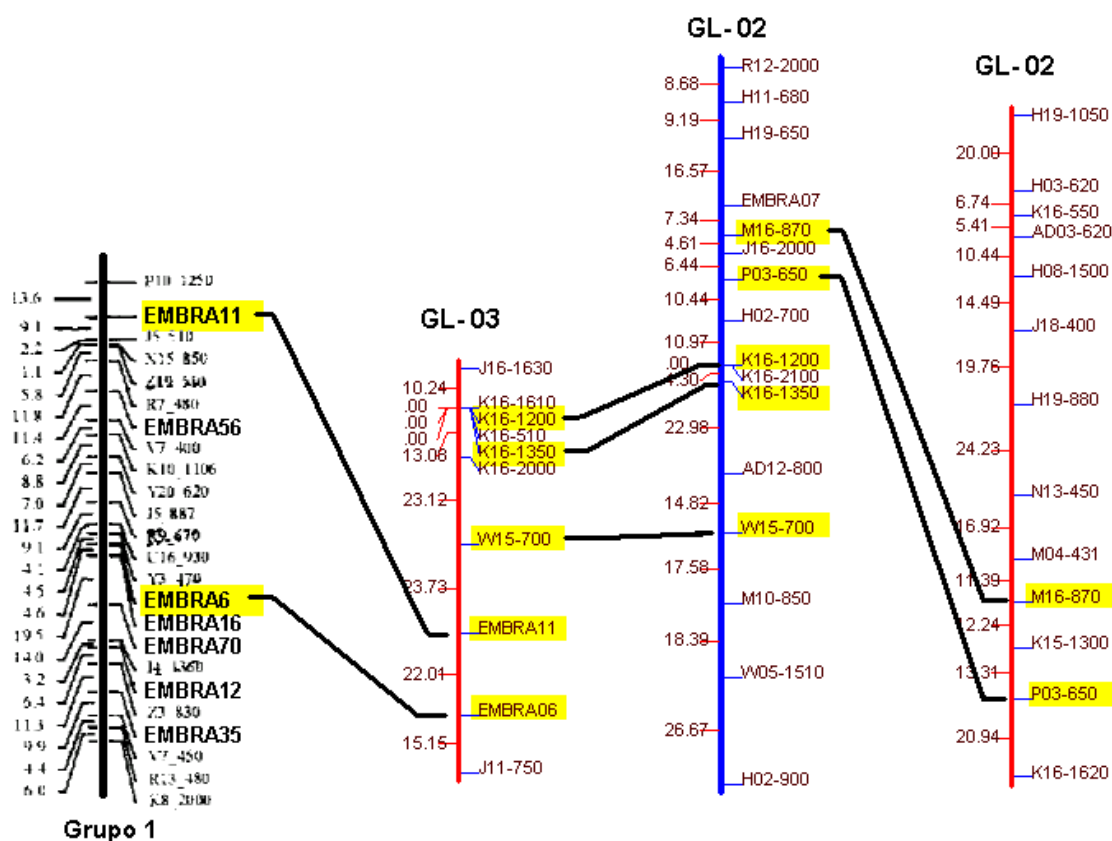


Figura 8. Comparação entre o grupo de ligação 1 do mapa de *Eucalyptus grandis* de Brondani *et al.* (2002) e os grupos GL-02 do genitor materno e GL-02 e GL-03 do genitor paterno da população F1 de *E. grandis*. A barra azul representa o grupo de ligação do mapa do genitor materno, as barras vermelhas mapa do genitor paterno e a barra preta grupo 1 do mapa de Brondani *et al.* (2002). O grupo 01 está em escala diferente dos demais.

Alguns grupos de ligação apresentaram similaridade com o mapa de marcadores SSR desenvolvido por Brondani *et al.*, (2002) em uma população derivada de um cruzamento interespecífico de *E. urophilla* com *E. grandis*. A similaridade foi observada no mapa do *E. grandis*, indicando que os GL-02 (genitor materno), GL-03 e GL-02 (genitor paterno) podem representar o grupo 01 do mapa de Brondani *et al.* (2002) (figura 8) e o GL-16 (materno) pode representar o grupo 09 do mesmo mapa (figura9).

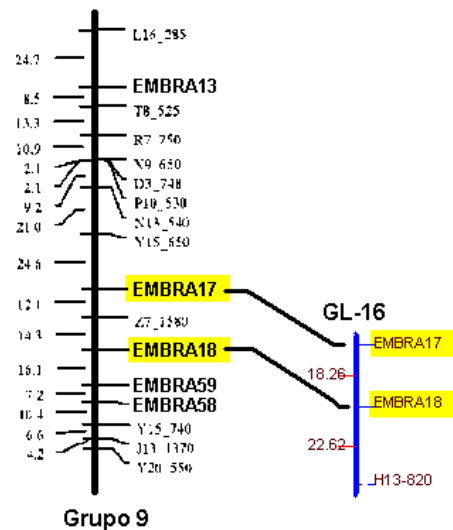


Figura 9. Comparação do Grupo 9 descrito por Brondani *et al.* (2002) com o GL-16 do genitor materno. Os grupos são apresentados em escalas diferentes.

A comparação entre o mapa desenvolvido aqui e entre o desenvolvido com SSR por Brondani *et al.* (2002) (figuras 8 e 9) demonstram similaridades entre eles. Neste estudo foi utilizado um número reduzido de marcadores SSRs, o aumento de marcadores desse tipo poderia revelar maior similaridade entre esses dois mapas.

Algumas marcas SSRs se ligaram apenas a marcadores RAPD, isso ocorreu com os grupos GL-02, GL-04, GL-06, GL-09 e GL-16, no mapa do genitor materno (figura 3), esses SSRs estão localizados nos grupos 9, 1, 4, 6 e 9, respectivamente, do mapa de Brondani *et al.*, (2002), indicando que os grupos GL-02 e GL-16 podem ser, na verdade, um único grupo de ligação por apresentarem marcas que estão ligadas no grupo 9 no mapa desenvolvido por Brondani, *et al.* (2002).

O mesmo acontece com os grupos GL-03, GL-07, GL-10, GL-13, GL-15, Par-04 e Par-08, do mapa do genitor paterno (figuras 5 e 6), que tiveram marcas

SSRs ligadas a marcas RAPD, esses SSRs são encontrados, respectivamente, nos grupos 1, 6, 10, 9, 11, 10 e 4 do mapa desenvolvido por Brondani *et al.* (2002), esses resultados indicam que os grupos GL-10 e o Par-04 desse genitor podem se tratar de um único grupo de ligação.

Com base nos resultados acima e comparando os grupos de ambos os genitores, o GL-02 do genitor materno pode ser o mesmo grupo que o GL-13 do paterno, pois ambos apresentam o EMBRA-07, este marcador é encontrado no grupo 9 do mapa de Brondani *et al.*, (2002). O mesmo acontece com os grupos GL-09 (materno) com o GL-07 (paterno) que apresentam, respectivamente, as marcas EMBRA-02 e EMBRA-08, ambas ligadas no grupo 6 do mapa de Brondani *et al.*, (2002).

Apesar das médias de bandas polimórficas por *primer* terem se apresentado superiores à de outros estudos e da rigorosa seleção dessas, os mapas desenvolvidos apresentaram um alto grau de marcas não mapeadas, cerca de 45%. Valor muito alto se comparado com os 14% de loci não ligados no mapa desenvolvido por Gan *et al.*, (2003) e aos 4,5% no mapa de Grattapaglia e Sederoff (1994). Uma possível explicação para esse ocorrido é que a maioria dos mapas de eucaliptos publicados, inclusive os citados acima, utilizaram cruzamentos interespecíficos, permitindo um maior desequilíbrio de ligação entre as marcas comparando-se com cruzamentos entre indivíduos da mesma espécie como é caso desse trabalho. Isso também explica o fato de que algumas marcas biparentais que se ligaram a grupos em um genitor não se agruparam em outro.

4.3. Cálculo da BSA

Para aumentar a eficiência da técnica de mapeamento, na tentativa de localizar um gene ou região genômica de controle do tempo de florescimento na população em estudo, foi utilizada a técnica de BSA, descrita por Michelmore (1991). Foram realizadas reações para análise de polimorfismo entre os *bulks*, essas reações foram distribuídas nos géis de eletroforese após as reações com os genitores, permitindo a verificação do polimorfismo e a origem genitora das marcas.

Com a análise dos 234 *primers*, foi possível identificar 57 (9% do total de marcas polimórficas entre os genitores) marcas polimórficas entre os *bulks*, destas, 32 marcas puderam ser mapeadas com os indivíduos F1. As 16 marcas restantes não foram mapeadas, sete delas devido a não confiabilidade nas marcas que se apresentaram muito fracas, as demais por falhas na amplificação dos *primers* com os indivíduos da população, ou os mesmos não apresentaram padrões definidos de bandejamento.

A tabela 7 mostra as marcas polimórficas analisadas na população e a recombinação com a marca morfológica de florescimento.

Tabela 7. Recombinação da marca SCAR (Domingues, 2003) e das marcas polimórficas entre os *bulks*, em relação ao marcador morfológico de florescimento nas análises realizadas pelo software GQMOL.

Marca	Recombinação (%)	Marca	Recombinação (%)
SCAR	48,3	M10-800	36,4
AD01-1050	48,7	R12-1100	46,0
AD04-1100	47,1	Y15-1700	*
H20-1050	42,2	N08-1500	*
J11-1050	43,1	N09-1300	44,8
M16-900	47,8	N09-750	45,9
AD12-1100	*	P03-600	*
M04-380	44,3	P05-650	*
N06-900	41,3	P05-1600	41,5
N06-480	*	AD16-300	48,6
N08-950	*	H02-1400	*
P05-2100	48,8	H13-1110	44,6
P11-700	*	K15-1300	48,6
X02-580	38,8	M01-1130	*
W07-1200	45,4	J16-750	*
Y10-900	47,6	N09-1500	*
P11-650	49,5		

Legenda: *: marcas em que a recombinação foi maior que 50%.

A marca que apresentou menor frequência de recombinação foi a M10-800 com 36,4% de recombinantes, essa marca apresentou uma distância ao marcador morfológico de florescimento de 46,2 cM num LOD=1,13, em seguida aparece a marca X02-580 com uma distância de 51,8 cM num LOD=1,1 as distâncias foram calculadas com o software GQMOL, utilizando a opção Kossambi (1944).

Trabalhos vêm sendo reportados mostrando a necessidade de um *screening* dos bulks com centenas e às vezes milhares de marcadores para a localização de algumas bandas flaqueadoras de genes e regiões gênicas. Farinhó *et al.*, (2004) num estudo com brócolis analisou 600 primers RAPD e 87 combinações AFLP, conseguindo 5 marcadores ligados ao gene de resistência a “*downy mildew*”. Hagihara *et al.*, (2005) utilizou 814 marcadores RAPD

encontrando 2 marcadores ligados a 5,7 e 24,5 cM e 2721 combinações AFLP encontrando 8 fragmentos ligados a um gene de fertilidade em beterraba.

Em *Eucalyptus*, Junghans *et al.*, (2003) utilizou 980 *primers* para encontrar 6 marcadores ligados a característica de resistência à ferrugem, um deles não apresentou recombinantes e outros 2 flanquearam o gene numa região menor que 5cM.

A BSA unida à técnica de RAPD não se apresentou eficiente nesse trabalho. As marcas contrastantes entre os bulks apareciam fortes, mas segregaram na população com altas frequências de recombinação com a marca morfológica de florescimento. Isso pode ter ocorrido pelo número de marcas analisadas e pela população F-1 ter sido originada por um cruzamento entre indivíduos da mesma espécie, que resulta num menor desequilíbrio de ligação, comparado a cruzamentos interespecíficos.

4.4. Marca SCAR

Na confecção do mapa, foi utilizado também o marcador SCAR desenvolvido por Domingues (2003), nesta mesma população com o auxílio da técnica BSA. Como esse marcador foi presente no genitor paterno ele foi mapeado com os marcadores que segregaram para esse genitor, ele se apresentou ligado ao GL-13 com quatro marcadores RAPD e com o SSR EMBRA-7 (figura 10), esse SSR se apresentou mapeado no grupo 9 do mapa de Brondani *et al.*, (2002).

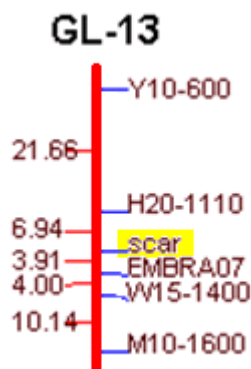


Figura 10. Grupo GL-13 do mapa do genitor paterno, mostrando a marca SCAR ligada a 4 marcas do tipo RAPD e ao SSR EMBRA 7, mapeado no grupo de ligação 1 do mapa desenvolvido por Brondani *et al.*, (2002). À direita são apresentadas as distância em centimorgans (cM) e à esquerda os marcadores moleculares. As análises foram realizadas pelo software GQMOL.

O marcador tipo SCAR apresentou uma eficiência de 60% (Domingues, 2003), resultados semelhantes foram observados com esse marcador nesse trabalho. Ele se apresentou ligado ao GL-13, que é um grupo de ligação pequeno com apenas 46,65 cM, levando-se em consideração a frequência de recombinação de cerca de 40% do SCAR com o florescimento, esse pequeno grupo pode representar uma parte do cromossomo onde esteja presente a região do genoma que controla o caráter florescimento precoce nessa população. Esses resultados abrem a perspectiva de uma investigação mais detalhada desse grupo de ligação, através da incorporação de um maior número de marcas nessa região. Outra estratégia seria procurar essa região através de bibliotecas de BAC e cloná-la.

4.5. Gene candidato *EgLFY*

Dornelas et al., (2004) constataram um homólogo do gene *LEAFY*, de *Arabidopsis thaliana*, em *Eucalyptus grandis*, o gene *EgLFY*.

A amplificação dos *primers* desenvolvidos foi testada nesta população inicialmente com os *bulks*, depois com os genitores e por último com a população F1.

Nos teste iniciais, a temperatura de anelamento utilizada foi de 58°C, intermediária entre as temperaturas especificadas para cada um dos *primers* indicadas pelo fabricante dos mesmos. O produto amplificado apresentou tamanho de aproximadamente 450bp, comparado com ladder 1Kb (Invitrogen), superior aos 235bp encontrado por Dornelas *et al.*, (2004). Com a finalidade de deixar a reação com maior especificidade, a temperatura foi aumentada para 60°C, 61°C e 62°C, porém a banda gerada permaneceu com o mesmo tamanho.

A figura 11 apresenta uma reação com temperatura de anelamento de 62°C e diferentes concentrações de cloreto de magnésio.

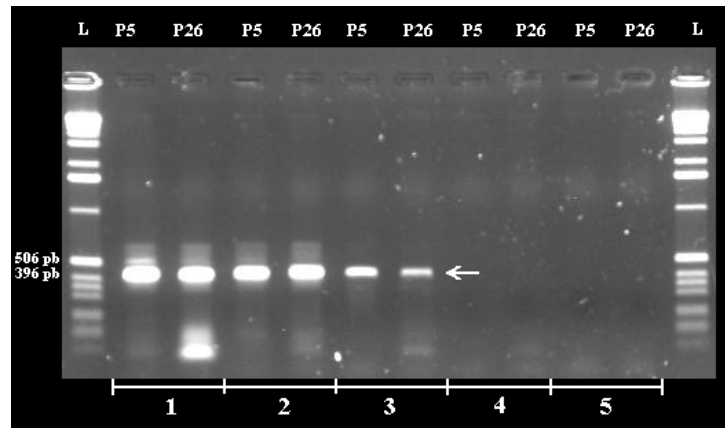


Figura 11. Amplificação do primer desenhado a partir do gene *EgLFY* de florescimento de *Eucalyptus grandis* (Dornellas *et al.*, 2004) com os genitores da população F-1 à temperatura de 62°C. Sigla: P5 = genitor com florescimento precoce, P26 = genitor de florescimento normal, L indica o ladder 1Kb (Invitrogen). Os números 1, 2, 3, 4 e 5 indicam as diferentes concentrações de cloreto de magnésio: 1mM, 0,75mM, 0,5mM, 0,25mM e 0,125mM respectivamente.

Para fazer uma análise com um maior índice de temperaturas, foi utilizado um termociclador com gradiente de temperaturas. A temperatura de anelamento utilizada por Dornellas *et al.* (2004) foi de 45°C, foi realizado um gradiente utilizando essa temperatura como intermediária, o gradiente de temperatura de anelamento foi de 41,3°C até 53,5°C.

A figura 12 mostra uma foto de amplificação com os *primers* de florescimento com dois indivíduos da população F1, um deles com florescimento normal e o outro com florescimento precoce em diferentes temperaturas. Observe que a banda mais pesada, de aproximadamente 450pb, começa a aparecer a partir da temperatura de 45,2°C, e com o aumento da mesma, as outras bandas menores, na faixa de tamanho esperado (300bp) não estão presentes.

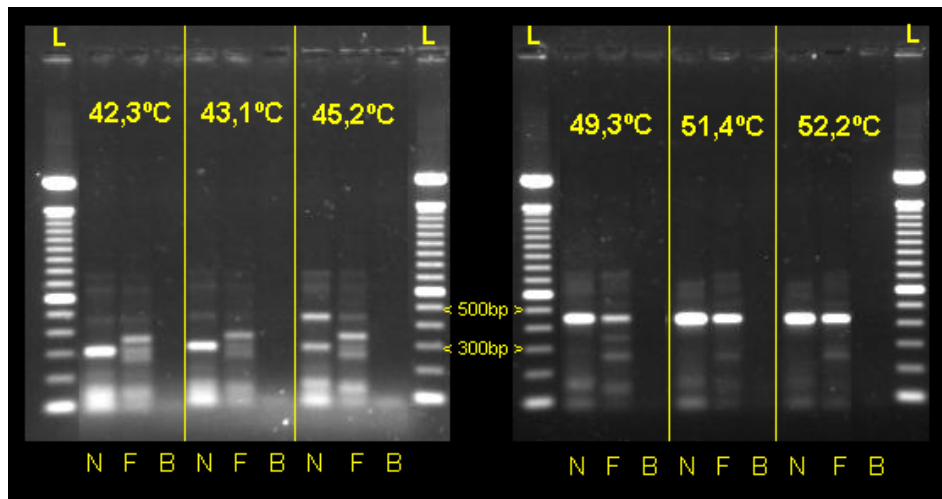


Figura 12. Amplificação do primer desenhado a partir do gene *EgLFY* de florescimento de *Eucalyptus grandis* (Dornellas, *et al.*, 2004) com um indivíduo com florescimento normal e outro com florescimento precoce, utilizando gradiente de temperatura. Siglas: L=ladder 100bp (Invitrogen), N= indivíduo com florescimento normal, F= indivíduo com florescimento precoce, B= branco (reação sem DNA).

Na amplificação do indivíduo com florescimento precoce, apareceram três bandas de tamanhos variando entre 250 e 350pb aproximadamente (figura 12), com exceção da banda com tamanho intermediário, elas não apareceram no indivíduo com florescimento normal. Foram realizadas reações com esses primers com os genitores e com os indivíduos da população, para observar o comportamento dessas bandas. A maior, com aproximadamente 350bp (Dor-350) e a menor, com aproximadamente 250bp (Dor-250) segregam tanto nos indivíduos com florescimento normal quanto nos com florescimento precoce (figura 13).

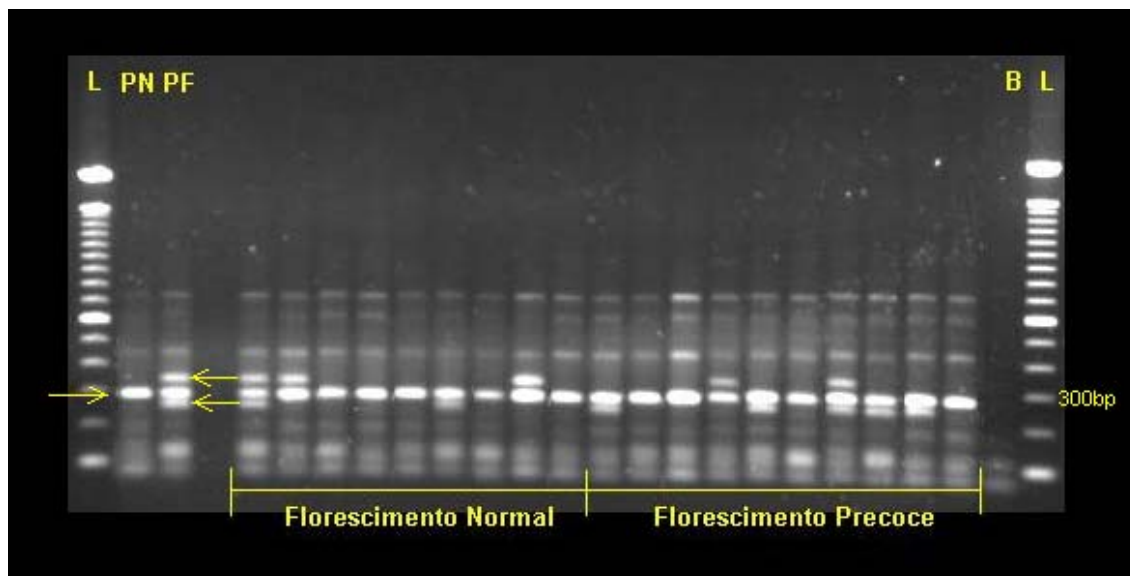


Figura 13. Amplificação do primer desenhado a partir do gene *EgLFY* de florescimento de *Eucalyptus grandis* (Dornellas *et al.*, 2004) à temperatura de 43°C com os genitores e alguns indivíduos da população. A seta apontada para a direita indica o fragmento monomórfico de aproximadamente 300bp. As setas apontadas para a esquerda indicam as bandas de 350bp (seta superior) e 250bp (inferior) que segregaram na população F1. Siglas: L=ladder 100bp (Invitrogen), PN= Genitor com florescimento normal, PF= Genitor com florescimento precoce, B= branco (reação sem DNA).

Essas bandas foram analisadas em toda a população e mapeadas junto ao mapa do genitor P-01 que era o portador das bandas. A marca Dor-250 foi mapeada no grupo GL-04 do genitor materno e aparece ligada à marca EMBRA-06 à distância de 11,08 cM (LOD=14,0) (figura 3 mapa de ligação P-1). A marca Dor-350 apresentou distorção no teste do X^2 para a segregação 1:1, por isso ela não entrou na confecção final do mapa. Mas a ligação desta marca, com os outros marcadores, foi analisada separadamente, foi encontrada ligação com as marcas de RAPD M04-2000 (4,4 cM e LOD=20), J11-1050 (17,8 cM e LOD=7,8) e R12-1120 (28,3 cM e LOD=4,2).

As marcas Dor-250 e Dor-350 não se ligaram à marca de florescimento e suas freqüências de recombinação foram respectivamente 48,4% e 52,5%.

Essas marcas também foram testadas no genitor paterno, porém não se ligaram a nenhum marcador desse genitor.

É possível que essas três marcas façam parte de uma região gênica de controle de florescimento, por ter sido produto de amplificação dos *primers* que amplificam parte do gene *EgLFY* (Dornelas, *et al.*, 2004). Uma análise mais profunda dessas marcas, incluindo a marca de tamanho 450pb poderia revelar polimorfismos moleculares nos genitores e indivíduos da população.

5. CONCLUSÕES

- Os marcadores RAPD se mostraram eficientes na construção dos mapas cobrindo 80% do genoma de eucalipto.

- O uso de população obtida através do cruzamento entre indivíduos da mesma espécie em eucalipto dificulta a construção de mapas moleculares devido ao baixo desequilíbrio de ligação encontrado.

- O SCAR desenvolvido por Domingues foi mapeado indicando um grupo de ligação como alvo para identificar a região do genoma que controla o caráter em estudo.

- O gene *EgLFY* não demonstrou correlação com o tipo de florescimento precoce estudado nessa população.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR IB de, KAGEYAMA PY, Desenvolvimento floral de *Eucalyptus grandis* HILL EX MAIDEN em Mogi Guaçu - SP **IPEF**. 37: 5-11, 1987.
- ALCOCHETE AAN, RANGEL PHN, FERREIRA ME, Mapping of quantitative trait loci for thermosensitive genic male sterility in *indica* rice **Pesq. agropec. bras.** 40(12): 1179-1188, 2005.
- ATIENZA, SG, SATOVIC, Z, PETERSEN, KK, DOLSTRA, O, MARTÍN, A, Preliminary genetic linkage map of *Miscanthus sinensis* with RAPD markers. **Theor Appl Genetic**. 105(6/7):946-952, 2002.
- BAENA ES, A Rentabilidade Econômica da Cultura do Eucalipto e sua Contribuição ao Agronegócio Brasileiro; **Conhecimento Interativo**, 1(1): 3-9, 2005.
- BEATTIE, AD, LARSEN, J, MICHAELS, TE, PAULS, KP, Mapping quantitative trait loci for a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ideotype. **Genome**. 46(3):411-22, 2003.
- BEEDANAGARI, SR, DOVE, SK, WOOD, BW, CONNER, PJ, A first linkage map of pecan cultivars based on RAPD and AFLP markers. **Theor Appl Genet**. 110: 1127-1137, 2005.
- BEKESSY, SA, ALLNUTT, TR, PREMOLI, AC, LARA, A, ENNOS, RA, BURGMAN, MA, CORTES, M, NEWTON, AC, Genetic variation in the

- vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. **Heredity**. 88(4):243-9, 2002.
- BENKO-ISEPPON, AN, WINTER, P, HUETTEL, B, STAGINNUS, C, MUEHLBAUER, FJ KAHL, G, Molecular markers closely linked to fusarium resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related genes located on Arabidopsis chromosomes 1 and 5. **Theor Appl Genet**. 107 (2): 379-86, 2003.
- BOITEUX, LS, BELTER, JG, ROBERTS, PA, SIMON, PW, RAPD linkage map of the genomic region encompassing the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) resistance locus in carrot. **Theor Appl Genet**. 100: 439-446, 2000.
- BORTOLOTO, TM, **Mapeamento de marcadores RAPD em uma população F1 de *Eucalyptus grandis***. Botucatu, 2003, 29p. Monografia (exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- BRONDANI, RPV, BRONDANI, C, TARCHINI, R, GRATTAPAGLIA, D, Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theor. Appl. Genet.**, 97, 816-827, 1998.
- BRONDANI, RPV, BRONDANI, C, GRATTAPAGLIA, D, Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. **Mol Genet Genomics**. 267: 338–347, 2002.
- BURGESS, IP, **The natural occurrence of *Eucalyptus grandis*, its distribution patterns in natural forests, its characteristics and conservation**. Canberra, CSIRO, 1980. 11p. – apud Aguiar, (1987).
- CAIXETA, ET, BORÉM, A, FAGUNDE S de A, NIESTCHE, S, BARROS, EG de, MOREIRA, MA, Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and indentification of RAPD markers linked to the resistance gene. **Euphytica**. 134(3): 297-303, 2003.
- CRUZ, CD, **Programa GQMOL - Análise de dados moleculares e associação com caracteres quantitativos**. Viçosa, 1999. (software) – disponível em <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.html>>

- DOMINGUES, DS, **Identificação de marcador RAPD e SCAR relacionado ao caráter florescimento precoce em *Eucalyptu grandis***. Botucatu, 2003, 24p. Trabalho científico (exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- DORNELAS, MC, AMARAL, WAN, RODRIGUEZ, APM, *EgLFY*, the *Eucalyptus grandis* homolog of the *Arabidopsis* gene *LEAFY* is expressed in reproductive and vegetative tissues. **Braz. J. Plant Physiol.** 16(2):105-114, 2004.
- DORNELAS, MC, RODRIGUEZ, APM, Identifying *Eucalyptus* expressed sequence tags related to *Arabidopsis* flowering-time pathway genes. **Braz. J. Plant Physiol.** 17(2): 255-266, 2005.
- DORNELAS, MC, RODRIGUEZ, APM, The tropical cedar tree (*Cedrela fissilis* Vell, Miliaceae) homolog of the *Arabidopsis* *LEAFY* gene is expressed in reproductive tissues and can complement *Arabidopsis leafy* mutants. **Planta.** 223: 306-314, 2006.
- ELDRIGE, KG, Genetic Improvement of Eucalyptus. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.27, n.5, p.173-216, 1978 (apud Paula, 2002).
- FARINHÓ, M, COELHO, P, CARLIER, J, SVETLEVA, D, MONTEIRO, A, LEITÃO, J, Mapping of a locus for adult plant resistance to downy mildew in broccoli (*Brassica oleracea* convar. *Italica*). **Theor Appl Genet.** 109: 1392-1398, 2004.
- FARRO, APC, **Desenvolvimento de um mapa de microssatélites de *Eucalyptus grandis***. Botucatu, 2001. 55p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Genética) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- FARRO, APC, MELO, EJ, ODA, S, MARINO, CL, Evaluation of early flowering trait in na *Eucalyptus grandis* population through microsatellite markers. **Bragantia.** (submetido)
- FERREIRA, ME, GRATTAPAGLIA, D, **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 3 ed. 220p. 1998.
- FLOYD, AG, Some aspects of the silviculture and regeneration in Flooded Gum - ***Eucalyptus grandis*** (Hill.) Maiden, in New South Wales, Austrália. In:

- CONFERÊNCIA MUNDIAL DO EUCALIPTO, 2, São Paulo, 1961.
Relatórios. Jundiaí, CPEF, 1961.v.2, p.857-65. – apud Aguiar, (1987).
- GAIOTTO, FA, CIAMPI, AY, GRATTAPAGLIA, D, **AFLP in Eucalyptus: fast construction of a linkage maps and estimation of mating system and genetic variation in a breeding population.** Plant and Animal Genome V (San Diego), Abstract P276, 1997.
- GAN, S, SHI, J, LI, JM, WU, K, WU, J, BAI, J, Moderate-density molecular maps of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake and *E. tereticornis* Smith genomes based on RAPD markers. **Genetica.** 118: 59-67, 2003.
- GAN, S, SHI, J, BAI, J, WU, K, WU, J, Segregation of RAPD markers: a case in interspecific cross of *Eucalyptus* (in Chinese). **Forest Res.** 14: 125–130, 2001.
- GRATTAPAGLIA, D, BERTOLUCCI, FLG, PENCHEL, R, SEDEROFF, RR, Genetic mapping of Quantitative Trait Loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers. **Genetics**, 144:1205-1214, 1996.
- GRATTAPAGLIA, D, SEDEROFF, RR, Genetic linkage map of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, 37: 1121-37, 1994.
- GRATTAPAGLIA, D, SEDEROF, RR, Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. **Theor Appl Genet.** 90:933-947, 1995.
- HAGIHARA, E, ITCHODA, N, HABU, Y, IIDA, S, MIKAMI, T, KUBO, T, Molecular mapping of a fertility restored gene for Owen cytoplasmic male sterility in sugar beet. **Theor Appl Genet.** 111: 250-255, 2005.
- HAYASHI, E, KONDO, T, TERADA, K, KURAMOTO, N, KAWASAKI, S, Identification of AFLP markers linked to a resistance gene against pine needle gall midge in Japanese black pine. **Theor Appl Genet.** 108(6):1177-1181, 2004.
- HECHT, V, FOUCHER, F, FERRANDIZ, C, MACKNIGHT, R, NAVARRO, C, MORIN, J, VARDY, ME, ELLIS, N, BELTRAN, JP, RAMEAU, C, WELLER, JL, Conservation of Arabidopsis flowering genes in model legumes. **Plant Physiol.** 137(4):1420-34 2005.

- JUNGHANS, DT, **Quantificação da severidade, herança de resistência e identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis***. Viçosa, 2000. 53p. Tese (doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa.
- JUNGHANS, DT, ALFENAS, AC, BROMMONSCHENKEL, SH, ODA, S, MELLO EJ, GRATTAPAGLIA, D, Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in eucalyptus: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theor Appl Genet.** 175-80. 2003.
- KARDAILSKY, I, SHUKLA, VK, AHN, JH, DAGENAIS, N, CHRISTENSEN, SK, NGUYEN, JT, CHORY, J, HARRISON, MJ, WEIGEL, D, Activation tagging of the floral inducer FT. **Science.** 286(5446):1962-5, 1999.
- KAYA, Z, NEALE, DB, Random amplified polymorphic DNA (RAPD) polymorphism in *Pinus nigra* subsp. *Pallasiana* and *Pinus brutia*. **Tr J Agr For.** 17: 295-306, 1993.
- KEMA, GHJ, GOODWIN, SB, HAMZA, S, VERSTAPPEN, ECP, CAVALETTO, JR, VAN DER LEE, TAJ, WEERDT, M de, BONANTS, PJM, WAALWIJK, C, A Combined Amplified Fragment Length Polymorphism and Randomly Amplified Polymorphism DNA Genetic Linkage Map of *Mycosphaerella graminicola*, the Septoria Tritici Leaf Blotch Pathogen of Wheat. **Genetics.** 161: 1497–1505, 2002.
- KESSELI, R, WITSENBOER, H, STANGHELLINI, M, VANDERMARK, G, MICHELMORE, R, Recessive Resistance to *Plasmopara lactucae-radicis* maps by Bulk Segregant Analysis to a Cluster Disease Resistance Genes in Lettuce. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, n.6, p.722-728, 1993.
- KOBAYASHI, Y, KAYA, H, GOTO, K, IWABUCHI, M, ARAKI, T, A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. **Science.** 286(5446):1960-1962 1999.
- KOORNNEEF, M, HANHART, CJ, VAN DER VEEN, JH, A genética and physiological analysis of late-flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Gen. Genet.** 229, 57-66, 1991. apud Levy e Dean, 1998.
- KOSAMBI, DD, The estimation of map distances from recombination values. **Ann Eugen** v.12, p.172-175, 1944.

- KUITTINEN, H, MATTILA, A, SAVOLAINEN, O, Genetic variation at marker loci and in quantitative traits in natural populations of *Arabidopsis thaliana*. **Heredity**. 79:144-52, 1997.
- KUTCHER, HR, BAILEY, KL, ROSSNAGEL, BG, LEGGE, WG, Identification of RAPD markers for common root rot and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) resistance in barley. **Genome**, v.39, n.1, p. 206-215, 1996.
- LANGE, WJ de, WINGFIELD, BD, VILJOEN, CD, WINGFIELD, MJ, RAPD fingerprinting to identify *Eucalyptus grandis* clones. **Southern African Forestry Journal**. 167: 47-50,1993.
- LE GUEN, V, LESPINASSE, D, OLIVER, G, RODIER-GOUD, M, PINARD, F, SEGUIN, M, Molecular mapping of genes conferring field resistance to South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) in rubber tree. **Theor Appl Genet**.108(1):160-7, 2003.
- LEVI, A, THOMAS, CE, JOOBEUR, T, ZHANG, X, DAVIS, A, A genetic linkage map for watermelon derived from a testcross population: (*Citrullus lanatus*var. *Citroides* x *C. lanatus*var. *lanatus*) x *Citrullus colocynthis*. **Theor Appl Genet**. 105:555–563, 2002.
- LEVY, YY, DEAN, C, Control of flowering time. **Curr Opin Plant Biol**. 1(1):49-54, 1998.
- MA, H, **Genes Dev**, 8, 745-756, 1994. – apud Mouradov *et al.*, (1998)
- MACHADO, C de F, **Repetibilidade, correlações fenotípicas e mapeamento de QTLs em populações segregantes de café arábica** - 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 “*Doctor Scientiae*”. VIÇOSA MG – BRASIL 2004.
- MACHADO MA, SCHUSTER I, MARTINEZ ML, CAMPOS AL, Genetic Diversity of Four Cattle Breeds Using Microsatellite Markers. **R. Bras. Zootec.**, 32(1): 93-98, 2003.
- MAMMADOV, JA, ZWONITZER, JC, BIYASHEV, RM, GRIFFEY, CA, JIN, Y, STEFFENSON, BJ, SAGHAI MAROOF, MA, Molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Rph5* in barley. **Crop Sci**. 43:388-393, 2003.
- MANDEL, MA, GUSTAFSON-BROWN, C, SAVIDGE, B, YANOFSKY, MF. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APETALA1. **Nature**. 19; 360(6401):273-277, 1992.

- MARTINS FILHO, S, SEDIYAMA, CS, MOREIRA, MA, BARROS EG, RAPD and SCAR markers linked to resistance to frog-eye leaf spot in soybean. *Genetics and Molecular Biology*, v.25, n.3, p.317-321, 2002.
- MEHLENBACHER SA, BROWN RN, NOUHRA ER, GOKIRMAK T, BASIL NV, KUBISIAK, TL, A genetic linkage map for hazelnut (*Corylus avellana* L.) based on RAPD and SSR markers. **Genome** 49(2):122-33, 2006.
- MICHELMORE, RW, PARAN, I, KESSELI, RV, Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 88, p. 9828-9832, 1991.
- MISSIAGIA, AA, PIACEZZI, AL, GRATTAPALGIA, D, Genetic mapping of *Eef1*, a major effect QTL for early flowering in *Eucalyptus grandis*. **Tree Genet Genomes**. 1:79-84, 2005.
- MOTA JH, SOUZA RJ de, YURI JE, RESENDE GM de, PAIVA LV, Diversidade genética de cultivares de alho (*Allium Sativum* L.) por meio de marcador molecular RAPD. Genetic diversity of the cultivars of garlic (*Allium sativum* L.) for molecular marker RAPD **Ciênc. agrotec.**, 28(4) 764-770, 2004.
- MORETZSON, MC, NUNES, CDM, FERREIRA, ME, GRATTAPAGLIA, D, RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Eloeis guineensis* Jacq.) **Theor Appl Genetic**. 100:63-70, 2000.
- MOURADOV, A, GLASSICK, T, HAMDORF, B, MURPHY, L, FOWLER, B, MARLA, S, TEASDALE RD, *NEEDLY*, a *Pinus radiata* ortholog of *FLORICAULA/LEAFY* genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems. **Plant Biology**, 95, 6537-6542, 1998.
- MYBURG, AA, GRIFFIN, AR, SEDEROFF, RR, WHETTEN, RW, Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F1 hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach **Theor Appl Genet** 107:1028–1042, 2003.
- NELSON CD, KUBISIAK TC, STINE M NANCE WL A genetic Linkage Map of Loblolly Pine (*Pinus palustris* Mill.) Based on Random Amplified Polymorphic DNAs. **The journal of Heredity**, 85:433-439, 1994.

- NESBITT, KA, POTTS, BM, VAILLANCOURT, RE, WEST, AK, REID, JB
Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species,
Eucalyptus globulus (Myrtaceae). **Heredity**. 74: 628-637, 1995.
- NINAMANGO-CÁRDENAS, FE, GUIMARÃES, CT, MARTINS, PR, PARENTONI,
SN, CARNEIRO, NP, LOPES, MA, MORO, JR, PAIVA, E, Mapping QTLs
for aluminium tolerance in maize. **Euphytica**. 130(2): 223-232, 2003.
- NKONGOLO, KK, MICHAEL, P, GRATTON, WS, Identification and
characterization of RAPD markers inferring genetic relationships among
Pine species. **Genome**. 45(1):51-8, 2002.
- PAULA, RN de, **Ferramentas Utilizadas no Melhoramento Genético do
*Eucalyptus***, 2002 (disponível em
<<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/MELHOR/MHR019.htm>> Acesso em: 12
de fevereiro de 2006).
- PARCY, F, BOMBLIES, K, WEIGEL, D, Interaction of LEAFY, AGAMOUS and
TERMINAL FLOWER1 in maintaining floral meristem identity in
Arabidopsis. **Development**. 129(10):2519-27, 2002.
- PATIÑO-VALENA, F, KAGEIAMA, PY, Parámetros genéticos y espaciamento em
progenies de *Eucalyptus saligna* Smith. **IPEF**, 48/49, 61-76, 1995. apud
Farro, (2001).
- PENA, L, MARTIN-TRILLO, M, JUAREZ, J, PINA, JA, NAVARRO, L, MARTINEZ-
ZAPATER, JM, Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or
APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. **Nat Biotechnol**.
19(3):263-267, 2001.
- PINTO JÚNIOR JE, **REML / BLUP para a análise de múltiplos experimentos,
no melhoramento genético de *Eucalyptus grandis* W. HILL EX
MAIDEN**. Curitiba, 2004, Tese (exigência parcial para a obtenção do título
de Doutor em Ciência área de concentração em Produção Vegetal) -
Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências
Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- RAMEAL, C.; DÉNOUE, D.; FRAVAL, F.; HAUROGNÉ, K.; JOSSERAND, J.;
LAUCOU, V.; BATGE, S.; MURFET, I.C.; Genetic mapping in pea. 2
identification of RAPD and SCAR markers linked to gene affecting plant
architecture. **Theor Appl Genet**, 97: 916-928, 1998.

- RAMÍREZ, L, MUEZ, V, ALFONSO, M, BARRENECHEA, AG, ALFONSO, L, PISABARRO, AG, Use of molecular markers to differentiate between commercial strains of the button mushroom *Agaricus bisporus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.198, p.45-48, 2001.
- RATCLIFFE, OJ, BRADLEY, DJ, COEN, ES, Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*. **Development**. 126(6): 1109-1120, 1999.
- SCARPINELLA GA, **Reflorestamento no Brasil e o Protocolo de Quioto**. São Paulo, 2002, Dissertação (exigência para obtenção do título de mestre em energia) – Instituto de Eletrotécnica e Energia – IEE, Universidade de São Paulo.
- SILVA GF da, SANTOS JB dos, RAMALHO MAP, Identification of SSR and RAPD markers linked to a resistance allele for angular leaf spot in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) line ESAL 550 **Genetics and Molecular Biology**. 26(4), 459-463, 2003.
- SIMPSON, GG, GENDALL, AR, DEAN, C, When to Switch to Flowering. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 99: 519-550, 1999.
- SOUTHERTON, SG, MARSHALL, H, MOURADOV, A, TEASDALE, RD, Eucalypt MADS-box Genes Expressed in Developing Flowers. **Plant Physiolol.** 118: 365-372, 1998.
- SOUTHERTON, SG, STRAUSS, AH, OLIVE, MR, HARCOURT, RL, DECROOQ, V, ZHU, X, LLEWELLYN, DJ, PEACOCK, WJ, DENNIS, ES, *Eucalyptus* has a functional equivalent of the *Arabidopsis* floral meristem identity gene *LEAFY*. **Plant Molecular Biology**. 37:897-910, 1998.
- TANKSLEY, SD, GANAL, MW, PRINCE, JP, VICENTE, MC de, BONIERBALE, MW, BROUN, P, FULTON, TM, GIOVANNONI, JJ, GRANDILLO, S, MARTIM, GB, MESSEGUER, R, MILLER, JC, MILLER, L, PATERSON, AH, PINEDA, O, RÖDER, MS, WING, RA, WU, W, YOUNG, ND, High Density Molecular Linkage Maps of the Tomato and Potato Genomes. **Genetics**. 132: 1141-1160, 2002.
- TAR'AN, B, WARKENTIN, T, SOMERS, DJ, MIRANDA, D, VANDENBERG, A, BLADE, S, WOODS, S, BING, D, XUE, A, DEKOEYER, D, PENNER, G, Quantitative trait loci for lodging resistance, plant height and partial resistance to mycosphaerella blight in field pea (*Pisum sativum* L.). **Theor Appl Genet**. 107(8):1482-1491, 2003.

- THAMARUS, KA, GROOM, MURREL, J, BYRNE, M, MORAN, GF, A genetic linkage map for *Eucalyptus globules* with candidate loci for wood, fibre and floral traits. **Theor Appl Genet.** 104: 379-387, 2002.
- VERHAEGEN, D, PLOMION, C, Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers. **Genome.**39: 1051-1061, 1996.
- VERHAEGEN, D, GION, JM, PLOMION, C, BOUVET, JM, POITEL, M, 1997. **Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus grandis* using RAPD markers: QTL detection of wood density and stability of QTL expression across different ages.** In: Proceedings of the IUFRO conference on silviculture and improvement of *Eucalyptus*; volume 2: Biotechnology applied to genetic improvement of tree species. 1997 Aug. 24-29. Salvador, Brazil, p. 149-155.
- VIRK, PS, FORD-LLOYD, BV, NEWBURY, HJ, Mapping AFLP markers associated with subspecific differentiation of *Oryza sativa* (rice) and an investigation of segregation distortion. **Heredity.** 81: 613-620, 1998.
- WELSH, J, MCCLELLAND, M, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.** 18(24):7213-7218, 1990.
- YANOFSKY, MF, MA, H, BOWMAN, JL, DREWS, GN, FELDMANN, KA, MEYEROWITZ, EM. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. **Nature.** 346(6279):35-39, 1990.
- ZANG, WK, WANG, YJ, LUO, GZ, ZHANG, JS, HE, CY, WU, XL, GAI, JY, CHEN, SY, QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. **Theor Appl Genet.** 108(6):1131-9. 2004.
- ZHANG, T, YUAN, Y, YU, J, GUO, W, KOHEL, RJ, Molecular tagging of a major QTL for fiber strength in Upland cotton and its marker-assisted selection. **Theor Appl Geneti.** 106:262-268, 2003.
- ZOGBI O, Desempenho do setor em 2005. **Informativo da Associação Brasileira de Celulose e Papel**, nº 574, 2006.

Sites consultados:

BRACELPA - Associação Brasileira de Celulose e Papel

<<http://www.bracelpa.org.br/>> Acesso em 21 de março de 2006.

IPEF – INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS. **Ciência e tecnologia no setor florestal brasileiro: diagnóstico, prioridades e modelo de financiamento.** (disponível em

<http://www.ipef.br/mct/MCT_02.htm> Acesso em: 07 de março de 2006).

SBS – Sociedade Brasileira de Silvicultura.

<<http://www.sbs.org.br>> Acesso em 21 de março de 2006