

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

Juliana Caroline Lourenção

**Caracterização de uma região genômica  
relacionada a uma anomalia de viveiro em  
*Eucalyptus*.**

Botucatu-SP

2010

**Juliana Caroline Lourenção**

**Caracterização de uma região genômica relacionada a uma  
anomalia de viveiro em *Eucalyptus*.**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho" - Campus de  
Botucatu, para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências Biológicas - Genética.

**Orientador: Celso Luís Marino**

Botucatu-SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Lourenção, Juliana Caroline.

Caracterização de uma região genômica relacionada a uma anomalia de viveiro em *Eucalyptus* / Juliana Caroline Lourenção. – Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Celso Luís Marino

Assunto CAPES: 20200005

1. Eucalipto. 2. Anomalias (Planta). 3. Viveiros florestais.

Palavras chave: Anomalia; Caracterização molecular; *Eucalyptus*; Genes letais.

## **Agradecimentos**

A Deus pela força, saúde e proteção.

Ao Prof. Dr. Celso Luis Marino, pela orientação, oportunidade e por toda confiança.

Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado e por me darem o suporte que me fizeram chegar até aqui.

Às minhas irmãs Dani e Bruna, avó Catarina, primas Júlia e Luisa, tia Vá, pelo carinho e momentos de alegria.

Ao Paulo, pelo amor, companheirismo, apoio e incentivo.

A todos do laboratório CAGEN, Andréia, Júlio, Suzana, Helena, Leonardo, Tânia, Virgínia, Vanusa, Ateléia, Karine, Maurício, Cintia e Cecília pela convivência alegre e harmoniosa.

À Tânia pela orientação, apoio e amizade, me ajudando em todas as etapas do trabalho, sem ela esse trabalho não estaria concluído. Pela carona de São Manuel à Botucatu e vice-versa, todos os dias, com chuva, sol, pedágio, música, conversa fiada, discussões do trabalho, sono, etc.

Aos amigos do laboratório, Andréia, Léo, Vanusa, Julio e Suzana pelas divertidas horas de bate papo no almoço na copa. Ao Julio pela edição das fotos e ajuda nos *softwares*, Andréia pela revisão do português da minha qualificação, a Vanusa e Suzana pela extração de DNA, ao Léo pela disposição em ajudar sempre. Às amigas Virgínia e Helena, pelo carinho.

À Amiga Simone pela amizade e apoio.

Às amigas de graduação: Lígia, Juliana, Amanda e Josiela, pela amizade, pelos momentos de descontração e alegria.

Ao prof. Dr. Mario Moraes, pela oportunidade de estágio de iniciação científica, que me abriu portas.

A prof.<sup>a</sup> Dr. Cristina (Kitty), pelo aprendizado e carinho.

Aos colegas do laboratório BIOGEM, Jú Bravo e Bonsai pela imensa ajuda sempre que precisei.

À Companhia Suzano de Papel e Celulose pelo fornecimento do material vegetal e pela colaboração no trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

A todos que me apoiaram e de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho

“Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades,  
Muda-se o ser, muda-se a confiança;  
Todo o Mundo é composto de mudança,  
Tomando sempre novas qualidades”

(Luís Vaz de Camões)

## RESUMO

LOURENÇÃO, J. C. **Caracterização de uma região genômica relacionada a uma anomalia de viveiro em *Eucalyptus***. 2010. 96f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

Uma anomalia foi detectada na progênie F1 de um cruzamento controlado entre genitores normais e sem parentesco de *Eucalyptus grandis*, em um viveiro de mudas para plantios comerciais da empresa Suzano Papel e Celulose. As plantas anormais apresentaram altura reduzida, superbrotamento caulinar, redução drástica da área foliar e alteração na forma do limbo da folha. A proporção entre plantas afetadas e normais foi de 3:1 (3 plantas normais : 1 planta anômala), sugerindo uma segregação mendeliana do caráter, que foi confirmada pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2=2,32$ ;  $p>0,1$ ). Através da técnica de BSA (*Bulked Segregant Analysis*) utilizada em conjunto com marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) foi possível identificar um marcador ligado a essa anomalia de eucalipto, o qual foi convertido em SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*). A sequência SCAR apresentou identidade a sequências expressas de eucalipto do banco de dados de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) do projeto FORESTs-FAPESP, portanto, encontra-se em uma região do genoma que pode estar envolvida direta ou indiretamente com o caráter da anomalia. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo a caracterização molecular dessa região genômica relacionada à anomalia observada em mudas de eucalipto. Na análise de ligação das marcas, molecular e morfológica, estas apresentaram-se ligadas a uma distância de 0,0 cM com 0% de frequência de recombinação (LOD= 1000), demonstrando que o marcador molecular está relacionado à anomalia. A sequência SCAR apresentou

similaridade a um EST de 632 pb do banco de dados GenBank e a um consenso de 841pb do banco de dados FORESTs-FAPESP, os quais apresentaram o domínio *Bet v 1*, uma família de proteínas relacionadas à defesa da planta. Como a região em estudo está relacionada a uma família multigênica, esta se apresentou em várias cópias no genoma de eucalipto, dificultando sua clonagem. Tanto pela análise realizada no banco de dados FORESTs-FAPESP quanto pelo GenBank pôde-se observar que a identidade do SCAR aos ESTs restringe-se à região 5' do SCAR. Através da técnica de 3'race, foi possível verificar que a porção 3' do EST está completa e que possivelmente a região 3' do SCAR, que não apresenta identidade ao EST, seja um íntron. O marcador SCAR, quando testado nos indivíduos integrantes dos bulks anômalo e normal, segregou conforme o marcador RAPD. Porém, quando o marcador SCAR foi testado em um número maior de indivíduos da F1, este não apresentou a eficiência esperada. Um polimorfismo de dois pares de bases no sítio de pareamento do *primer* RAPD, na região 3'UTR do gene, identificado através da análise da sequência SCAR no banco de dados do genoma de eucalipto (*EucalyptusDB*), foi que impossibilitou o pareamento do *primer* RAPD em indivíduos normais da população F1 estudada. Essa alteração de apenas duas bases não foi suficiente para que o *primer* SCAR detectasse o polimorfismo e apresentasse a eficiência esperada.

**Palavras-chave:** *Eucalyptus*, anomalia, genes letais, caracterização molecular.

## ABSTRACT

From a controlled crossing between two normal genitors without parentage from relationship of a seedling nursery for commercial crops of Suzano Papel e Celulose it was observed a lethal anomaly in *Eucalyptus grandis* full sib family F1. The abnormal plants had reduced height, lack of apical dominance, drastic reduction in the leaf area and an alteration in leaf blade. Segregation ratio was 3:1 (3 normal plants : 1 anomalous plant). Thus, this anomaly is probably inherited in a mendelian manner ( $\chi^2=2,32$ ;  $p>0,1$ ). By using the BSA (Bulked Segregant Analysis) approach used with RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers, it was possible to identify one marker linked to this anomaly, which was later converted to SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). The SCAR sequence was similar to ESTs (Expressed Sequence Tag) from FOREST-FAPESP database, hence, it is inside a genome region that is supposed to be directly or indirectly involved in the anomaly character. Based on such pieces of information, the present research had as main objective to carry out the molecular characterization of the genomic region related to the anomaly observed in eucalyptus seedlings. During the linkage analyses of molecular and morphologic markers, the latter presented 0% recombination frequency and a distance of 0 cM with LOD=1000. The SCAR sequence was similar to EST of 632 bp from GenBank and a consensus of 841 bp from FORESTs, which presented the Bet v 1 domain, a protein family related to plant defense. As the analyzed region is related to a multigenic family, it was observed in several copies in the eucalyptus genome, making difficult its cloning. By the analyses carried out both in FORESTs and GenBank, it was noticed that the similarity between SCAR and EST is restricted to SCAR 5' region. In the 3'*race* technique it was verified that EST 3' region is complete and probably the SCAR 3' region, not similar to EST, is an intron. When the SCAR marker was tested in individuals from anomalous and normal

bulks, it segregated according to RAPD marker. However, when SCAR marker was tested in a higher number of individuals of full sib family F1, it did not present the expected efficiency. A polymorphism of two base pairs in the annealing site of RAPD primer, in 3' UTR region of gene, identified through SCAR sequence analysis in *Eucalyptus* DB, made impossible the primer RAPD annealing in normal individuals of full sib family F1. The alteration in only two base pairs was not sufficient for primer SCAR detecting the polymorphism and also presenting the expected efficiency.

**Key words:** *Eucalyptus*, anomaly, lethal gene, molecular characterization

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Fenótipos entre as mudas normais e anormais (de mesma idade) resultantes do cruzamento por polinização controlada entre duas árvores normais, da mesma espécie e sem grau de parentesco entre si.....	24
<b>Figura 2:</b> Esquema do cruzamento dos genitores G07 e G26 mostrando a ligação do alelo da anomalia com o marcador SCAR.....	25
<b>Figura 3:</b> Esquema de alinhamento entre a seqüência do SCAR e o consenso do banco de ESTs de Eucalipto.....	26
<b>Figura 4:</b> Organograma com as principais etapas desenvolvidas ao longo do trabalho.....	32
<b>Figura 5:</b> Esquema resumido da metodologia <i>race 3'</i> (Kit <i>3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends</i> - Invitrogen®).....	43
<b>Figura 6:</b> Eletroforese em gel de agarose (em A: 1%, em B: 1,5%) com amplificação dos indivíduos dos <i>bulks</i> normal e anômalo.....	55
<b>Figura 7:</b> Grupo de ligação, com a marca molecular e a marca morfológica da anomalia.....	56
<b>Figura 8:</b> Esquema de alinhamento entre a seqüência do SCAR e o consenso do banco de ESTs de eucalipto FORESTS- FAPESP.....	58
<b>Figura 9:</b> Esquema de alinhamento entre a seqüência do SCAR e o EST do banco de dados GenBank.....	59
<b>Figura 10:</b> Eletroforese em gel de agarose 0,8% com DNA extraído dos genitores pelo protocolo <i>maxi-prep</i> . descrito por Weising et al. (2005) com modificações.....	62
<b>Figura 11:</b> Gel de agarose virtual gerado pelo programa pDraw 32 1.1.100 da digestão da região alvo com algumas enzimas de restrição selecionadas.....	63
<b>Figura 12:</b> Eletroforese em gel de agarose 0,7% com DNA digerido utilizando as enzimas: XbaI e NdeI.....	64

<b>Figura 13:</b> Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da amplificação de indivíduos anômalos utilizando o <i>primer</i> SCAR.....	<b>64</b>
<b>Figura 14:</b> Amostras digeridas com endonucleases e chapas de raios X após variados tempos de exposição ao sinal quimioluminescente.....	<b>66</b>
<b>Figura 15:</b> Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação <i>nested</i> com o <i>primer</i> GSA2.....	<b>67</b>
<b>Figura 16:</b> Alinhamento das sequências dos consensos obtidas através da técnica de <i>race</i> 3'.....	<b>68</b>
<b>Figura 17:</b> Esquema de alinhamento dos consensos do <i>race</i> .....	<b>70</b>
<b>Figura 18:</b> Esquema com o alinhamento da sequência do SCAR, EST e <i>race</i> mostrando onde os <i>primers forward</i> e <i>reverses</i> foram desenhados.....	<b>72</b>
<b>Figura 19:</b> Esquema ilustrando a localização das sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificar o íntron.....	<b>72</b>
<b>Figura 20:</b> Eletroforese em gel de agarose 1% com produtos da amplificação com diversas combinações de <i>primers</i> para amplificar o possível íntron presente na região de interesse.....	<b>73</b>
<b>Figura 21:</b> Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos da amplificação com diversas combinações de <i>primers</i> para amplificar o possível íntron presente na região de interesse.....	<b>74</b>
<b>Figura 22:</b> Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da amplificação de indivíduos da população F1 segregante para o caráter da anomalia utilizando o <i>primer</i> SCAR à temperatura de 54°C.....	<b>76</b>
<b>Figura 23:</b> Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da amplificação de indivíduos da população F1 segregante para o caráter da anomalia utilizando o <i>primer</i> SCAR à temperatura de 55°C.....	<b>76</b>
<b>Figura 24:</b> Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da amplificação de indivíduos da população F1 segregante para o caráter da anomalia utilizando o <i>primer</i> SCAR.....	<b>77</b>
<b>Figura 25:</b> Esquema ilustrando o pareamento dos <i>primers</i> RAPD e SCAR nos	<b>78</b>

indivíduos anômalos e normais e conseqüente amplificação ou não do fragmento de 514 pb.....

**Figura 26:** Esquema ilustrando o alinhamento do EST com a região 1 do *scaffold* do banco de dados do genoma de eucalipto (*EucalyptusDB*)..... **82**

**Figura 27:** Esquema ilustrando a estrutura do gene de interesse e seu alinhamento com a sequência SCAR..... **83**

**Figura 28:** Esquema ilustrando a estrutura do gene de interesse, a posição de um possível íntron na região 3'UTR onde se encontra o polimorfismo que diferencia indivíduos normais e anômalo e seu alinhamento com a sequência SCAR..... **85**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Teste do $\chi^2$ para hipótese da ligação da marca molecular a marca morfológica.....	<b>57</b>
<b>Tabela 2-</b> Quantificação no espectrofotômetro NanoDrop (ND1000 <sup>®</sup> ) das amostras extraídas pelo protocolo de <i>maxi-prep.</i> descrito por Weising et al. (2005) com modificações.....	<b>61</b>
<b>Tabela 3-</b> Enzimas de restrição analisadas pelo <i>software</i> pDraw 32 1.1.100 quanto ao número de sítios alvo na seqüência de DNA utilizada como sonda na técnica de <i>southern blotting</i> .....	<b>62</b>
<b>Tabela 4-</b> Quantificação no espectrofotômetro NanoDrop (ND1000 <sup>®</sup> ) dos produtos amplificados com o <i>primer</i> SCAR e purificados através do Kit <i>PureLink<sup>TM</sup> Quick Gel Extraction Kit</i> (Invitrogen <sup>®</sup> ) .....	<b>64</b>
<b>Tabela 5-</b> Condições testadas para amplificação do possível íntron existente na região de interesse.....	<b>73</b>

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 O gênero <i>Eucalyptus</i> e sua importância econômica.....	19
2.2 Genes deletérios e anomalias em eucalipto.....	21
2.3 A população em estudo.....	23
2.4 Proteína <i>Bet v 1</i> e proteínas <i>pathogenesis-related</i> (PRs).....	26
3. OBJETIVO.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Material utilizado.....	31
4.2 Delineamento experimental .....	31
4.3 Teste da eficiência do marcador SCAR nos <i>bulks</i> .....	32
4.4 Análise de ligação das marcas.....	33
4.5 Análise <i>in silico</i> da seqüência SCAR.....	34
4.6 <i>Southern blotting</i> .....	34
4.6.1 Extração de grande quantidade de DNA.....	35
4.6.2 Restrição enzimática.....	36
4.6.3 Precipitação do DNA digerido.....	37
4.6.4 Reação de PCR para obtenção da sonda.....	37
4.6.5 Gel do DNA digerido.....	38
4.6.6 Lavagem do gel e transferência para a membrana.....	38

4.6.7 Secagem da membrana, marcação da sonda e hibridização.....	40
4.6.8 Lavagem da membrana e radiografia.....	40
4.7 Extração de RNA total .....	41
4.8 <i>Race 3'</i> .....	42
4.8.1 Preparação do cDNA.....	44
4.8.2 Reação de amplificação <i>nested</i> .....	45
4.8.3 Purificação das bandas.....	45
4.8.4 Clonagem.....	45
4.8.5 Seqüenciamento.....	47
4.8.6 Construção e análise da seqüência consenso .....	48
4.8.7 Preparação de cultura permanente .....	48
4.9 Desenho de iniciadores específicos .....	48
4.9.1 Testes dos iniciadores específicos .....	49
4.10 Teste do marcador SCAR na população F1 para aplicação em programas de melhoramento genético.....	50
4.11 Seqüenciamento do SCAR em diferentes indivíduos.....	50
4.11.1 Reação de PCR para obtenção do SCAR.....	51
4.11.2 Clonagem.....	51
4.11.3 Seqüenciamento.....	52
4.11.4 Construção e análise das sequências consenso.....	53
4.11.5 Preparação de cultura permanente.....	53
4.12 Análise no banco de dados do genoma de <i>Eucalyptus</i> ( <i>EucalyptusDB</i> )....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55

5.1	Teste da eficiência do marcador SCAR nos <i>bulks</i> .....	55
5.2	Análise de ligação das marcas .....	56
5.3	Análise <i>in silico</i> da sequência SCAR .....	58
5.3.1	Busca de homólogos em eucalipto– banco de dados FORESTs- FAPESP .....	58
5.3.2	Busca de homólogos em eucalipto – banco de dados GenBank ...	59
5.3.3	Busca de homólogos em outras espécies – banco de dados GenBank .....	60
5.3.4	Relação entre EST e SCAR .....	60
5.4	<i>Southern Blotting</i> .....	60
5.4.1	Extração de DNA.....	61
5.4.2	Restrição enzimática.....	62
5.4.3	Obtenção da sonda.....	64
5.4.4	Número de cópias da região de interesse.....	65
5.5	<i>Race 3'</i> .....	67
5.6	Desenho de iniciadores específicos .....	71
5.6.1	Testes dos iniciadores específicos.....	72
5.7	Teste do marcador SCAR na população F1 para aplicação em programas de melhoramento genético.....	75
5.8	Amplificação da sequência SCAR em diferentes indivíduos.....	79
5.9	Análise no banco de dados do genoma de <i>Eucalyptus</i> ( <i>EucalyptusDB</i> ).....	81
6.	CONCLUSÕES.....	87
7.	REFERÊNCIAS .....	88

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e inclui mais de 600 espécies, quase todas nativas da Austrália. É um gênero florestal de interesse econômico plantado comercialmente nas zonas tropicais e subtropicais do globo. Hoje, o eucalipto assume grande importância na economia brasileira, sendo destinado principalmente à produção de celulose, papel e carvão vegetal utilizado nas siderúrgicas. Seu uso pode ser destacado também na produção de lâminas, compensados, aglomerados, madeira serrada, móveis, além de outros produtos como o óleo essencial utilizado em produtos de limpeza, alimentos, perfumes, remédios e o mel produzido a partir do pólen de suas flores.

O Brasil figura como o maior exportador mundial de celulose de fibra curta de eucalipto. A produção brasileira desta celulose passou de 4,03 toneladas em 1995 para 10,0 milhões de toneladas em 2007 (SBS, 2008). Segundo a Sociedade Brasileira de Silvicultura (SBS), a área plantada de *Eucalyptus* no Brasil em 2007 era de 3,75 milhões de hectares (SBS, 2008). A produtividade média de *Eucalyptus* no país no ano de 2008 foi de 41 m<sup>3</sup>/ha/ano (Bracelpa, 2009).

Os programas de melhoramento genético de eucalipto são importantes para a garantia do aumento crescente de produtividade sendo o Brasil um país de referência nesse campo. Porém, um fator que dificulta a agilidade do processo de melhoramento é o longo tempo do ciclo reprodutivo das espécies florestais. Com isso, os marcadores moleculares recentemente incorporados aos programas de melhoramento revelaram-se ferramentas poderosas auxiliando na escolha dos genitores para futuros cruzamentos e uma técnica potencial para a seleção

precoce de indivíduos através da identificação de marcas ligadas a genes responsáveis por características de interesse.

Os principais alvos do melhoramento genético do eucalipto estão ligados ao aumento do volume, qualidade da madeira e rendimento de polpa de celulose (Grattapaglia e Kirst, 2008). Entre outras características silviculturais também estudadas no âmbito molecular estão resistência a patógenos (Junghans et al., 2003) e florescimento precoce (Missiaglia et al., 2005; Domingues et al., 2006; Bortoloto et al. 2009). Os aspectos silviculturais não focados na qualidade da madeira podem contribuir de maneira relevante para o conhecimento da biologia do eucalipto e influir diretamente nos programas de melhoramento genético do gênero florestal. Estudos que envolvam a caracterização molecular de características silviculturais de eucalipto têm grande importância e potencial impacto, tanto no conhecimento da biologia deste gênero florestal como na repercussão ao melhoramento genético da espécie.

A identificação e caracterização de genes relacionados a doenças ou anomalias são importantes para os programas de melhoramento florestal, tendo em vista as perdas causadas por esses genes na produção de mudas para plantios comerciais. A companhia Suzano de Papel e Celulose identificou o aparecimento de uma anomalia deletéria, na produção de mudas *E. grandis* para plantios comerciais de seu programa de melhoramento genético. Essa anomalia foi detectada em uma progênie F1 do cruzamento controlado entre árvores selecionadas e se caracteriza pela redução da altura da planta, superbrotamento caulinar, redução drástica da área foliar e a alteração na forma do limbo da folha. Essa característica está sendo estudada pelo grupo de pesquisa CAGEN (Centro de Análises Genômicas) do Departamento de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu desde o ano de 2004. A proporção entre plantas normais e afetadas dessa população F1 era de 3:1 (três plantas normais para uma planta anômala), indicando uma segregação mendeliana do caráter.

Tambarussi (2006), utilizando a técnica BSA (*Bulked Segregant Analysis*) em conjunto com marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), identificou um marcador ligado a essa anomalia de eucalipto. A marca polimórfica, de 514 pares de bases (pb), presente em todas as plantas anômalas analisadas, foi isolada, seqüenciada e convertida em SCAR (Região amplificada de seqüência caracterizada). Em análises preliminares, foi determinado que a seqüência SCAR apresenta identidade a ESTs (*Expressed Sequence Tags*) provenientes do projeto FORESTs-FAPESP, sendo assim relacionada a genes expressos em eucalipto. Portanto, o marcador SCAR se encontra dentro de uma região do genoma que pode estar envolvida direta ou indiretamente com o caráter da anomalia. Como o marcador está presente em todos os indivíduos portadores da anomalia, deve existir um polimorfismo na região do sítio de pareamento do *primer*. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi a caracterização molecular dessa região genômica relacionada à anomalia observada em mudas de eucalipto.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O gênero *Eucalyptus* e sua importância econômica

O gênero *Eucalyptus* L'Hér, pertence a divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Myrtales e família Myrtaceae. O gênero é originário da Austrália, com exceção de *E. urophylla* e *E. deglupta*, que são naturais do Timor e Papua Nova Guiné, respectivamente (Pryor, 1985). Atingem em geral proporções gigantescas, havendo, porém, espécies de porte mediano e algumas arbustivas (Andrade, 1939).

A mais recente revisão taxonômica (Brooker, 2000 apud Grattapaglia e Kirst, 2008) do eucalipto reconhece mais de 700 espécies que pertencem a 13 principais linhagens evolutivas. A maioria das espécies pertencem ao subgênero *Symphyomyrtus*, e são principalmente espécies de três seções desse subgênero que são usados em plantações florestais, como *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* (seção *Transversaria*), *Eucalyptus globulus* (seção *Maidenaria*) e *Eucalyptus camaldulensis* (seção *Exsertaria*).

A cultura do *Eucalyptus* para exploração comercial da madeira teve início no Brasil por volta do início do século passado, por iniciativa da Companhia Paulista de Estradas de Ferro (Andrade, 1939). O gênero se adaptou muito bem às condições de clima e de solo do nosso país, sendo plantado atualmente em várias regiões brasileiras. Em termos climáticos para o cultivo do eucalipto, o Brasil possui duas regiões: tropical e subtropical. A região sudeste, predominantemente tropical e não sujeita a geadas de forte intensidade, concentra a maior área de plantio. As espécies indicadas para a região subtropical são *E. benthamii* (comprovadamente resistente à geada) e *E. dunnii* (resistência parcial a geadas). Para áreas de

clima predominantemente tropical, as mais indicadas são *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, e *E. cloeziana* (Embrapa Florestas, 2003).

As plantações de eucalipto têm alcançado um grande avanço no Brasil, tornando-se de grande importância econômica para o país. O gênero possui uma ampla e diversificada utilização na indústria, sendo destinado à produção de lâminas, compensado, aglomerados, madeira serrada, móveis, carvão vegetal, além de outros produtos como o óleo essencial utilizado em produtos de limpeza, alimentos, perfumes, remédios e o mel produzido a partir do pólen de suas flores. Porém, é principalmente utilizado como matéria-prima na produção de celulose e papel, considerado um dos segmentos mais bem sucedidos do setor florestal brasileiro.

O setor florestal brasileiro, principalmente aquele ligado à produção de *Eucalyptus* e seus derivados, tem elevada importância econômica e social. Os empregos em toda a cadeia produtiva da atividade florestal em 2007 foram da ordem de 8,6 milhões. O segmento de florestas plantadas proporcionou 4,6 milhões de empregos, incluindo diretos (656 mil), indiretos (1,8 milhão) e resultantes do efeito-renda (2,1 milhões). O setor arrecadou US\$ 9,1 bilhões com exportações em 2008, assumindo uma participação significativa no Produto Interno Bruto Nacional, representando 3,4% do PIB nacional (US\$ 44,6 bilhões). O segmento de celulose e papel foi o que teve maior participação nas exportações brasileiras de produtos florestais, com US\$ 4,7 bilhões e um crescimento de 18,0% em relação a 2006 (US\$ 4,0 bilhões). O setor de celulose e papel, composto por 220 empresas localizadas em 17 Estados apresentava em 2007, uma área de aproximadamente 1,71 milhão de hectares de florestas plantadas, compreendendo 1,36 milhão ha (79,7%) com eucalipto; 341,2 mil ha (19,9%) com pinus e 6,9 mil ha (0,4%) com outras espécies (SBS, 2008).

O Brasil figura como o maior exportador mundial de celulose de fibra curta de eucalipto. A produção brasileira desta celulose foi de 10 milhões de toneladas em 2007 (SBS, 2008). Em 2008, o Brasil subiu do sexto para o quarto lugar entre os produtores mundiais de celulose, com 12,7 milhões de toneladas produzidas, e passou do 12º para 11º lugar entre os principais fabricantes de papel do mundo, com a marca de 9,4 milhões de toneladas (Bracelpa, 2009). Segundo a Sociedade Brasileira de Silvicultura (SBS), a área plantada de *Eucalyptus* no Brasil em 2007 era de 3,75 milhões de hectares (SBS, 2008), sendo a sua produtividade média no ano de 2008 de 41 m<sup>3</sup>/ha/ano (Bracelpa, 2009).

## **2.2 Genes deletérios e anomalias em eucalipto**

Nas populações vegetais existem genes que reduzem a probabilidade de sobrevivência dos indivíduos que os carregam, os quais são denominados genes letais. No entanto, o grau de letalidade pode variar de moderado a completo. Muitos alelos recessivos deletérios permanecem ocultos em condições heterozigotas nas populações. Entretanto, o cruzamento entre indivíduos aparentados e a autofecundação podem reduzir a heterozigose e permitir que alelos recessivos de efeito desfavorável se manifestem em homozigose.

A identificação e caracterização de genes relacionados a doenças ou anomalias são importantes para os programas de melhoramento florestal, tendo em vista as perdas causadas por esses genes na produção de mudas para plantios comerciais. O estudo de genes deletérios tem sido foco de diversas pesquisas, desde estudos anteriores de Morton, Crow e Muller (1956) até trabalhos mais recentes de Lascoux e Lee (1998), Kuang et al. (1999), Charlesworth e Charlesworth (1999) e McCune et al. (2002). Porém, é geralmente difícil

caracterizar esses genes deletérios quanto a sua frequência, valor seletivo e dominância (Lascoux e Lee, 1998).

A depressão endogâmica precoce, ou seja, letais recessivos embrionários, matam uma grande proporção da progênie autofecundada durante o desenvolvimento do embrião (Karkkainen e Savolainen, 1993). Em coníferas, por exemplo, uma grande parte dos embriões autofecundados morre devido a genes letais recessivos durante o desenvolvimento da semente (Namkoong e Bishir, 1987; Savolainen et al., 1992).

O número de alelos para um gene letal tem sido estimado em muitas espécies de coníferas. Estimativas do número médio de alelos embrionários letais que cada árvore possui estendem-se de cinco em *Picea mariana* a 11 em *Larix laricina* e *Picea omorika* (Park e Fowler, 1982,1984; Savolainen et al. ,1992) sendo que a maioria está ao redor de nove a dez. Koski (1971,1973) estimou que *Pinus sylvestris* e *Picea abies* tem uma média de nove e dez recessivos letais, respectivamente, que devem eliminar 90% de embriões autofecundados. Savolainen et al. (1992) também encontraram uma média de nove letais para *Pinus sylvestris* através do método de Koski (1971).

As altas frequências de alelos letais para outras formas de letalidade tais como deficiência na clorofila, são também relatadas para espécies de *pinus* (Squillace e Kraus, 1963) e perda do vigor da muda são consideradas evidências da ação de genes recessivos deletérios (Franklin, 1972).

Nas populações vegetais os alelos deletérios podem ocasionar diversas formas de letalidade, desde plantas com anomalias brandas a anomalias severas, ocasionando a morte das plantas em um curto período de tempo. Poucos trabalhos são encontrados na literatura descrevendo anomalias em *Eucalyptus*. Maschio et al. (1996) relataram uma anomalia no crescimento de árvores de *Eucalyptus grandis*, em que as plantas apresentavam folhas secas e

deformadas, entretanto, o trabalho apenas caracteriza os sintomas da anomalia. Estopa (2006) observou nos descendentes das populações de clones e das populações híbridas, plantas com desenvolvimento anormal no campo na segregação de 15:1, provavelmente relacionado à presença de dois *loci* deletérios, com a manifestação do caráter em alelos recessivos para os dois genes. Porém, não foi identificada nenhuma marca morfológica ou molecular, que possibilitasse o reconhecimento precoce das plantas com anomalia.

### **2.3 A população em estudo**

Uma anomalia foi observada em mudas de *Eucalyptus grandis* para plantios comerciais da empresa Suzano Bahia Sul Papel e Celulose. As plantas anormais eram indivíduos de uma progênie F1 do cruzamento controlado entre genitores normais e sem parentesco. Esses genitores são árvores matrizes do programa de melhoramento da empresa e são utilizadas na produção de progênies destinadas a plantios comerciais.

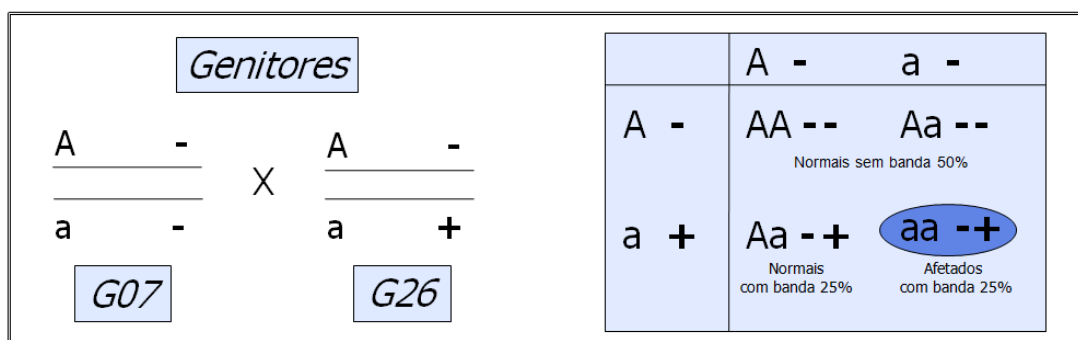
As plantas anômalas apresentavam superbrotamento caulinar, a redução da altura da planta, a redução drástica da área foliar e a alteração na forma do limbo da folha (figura 1). Esta anomalia provocava em poucos meses a morte dos indivíduos.



**Figura 1.** Fenótipos entre as mudas normais e anormais (de mesma idade) resultantes do cruzamento por polinização controlada entre duas árvores normais, da mesma espécie e sem grau de parentesco entre si. A muda anômala, como se pode observar, apresenta superbrotamento caulinar, redução da altura, redução drástica da área foliar e a alteração na forma do limbo da folha.

Dos 11.240 indivíduos da F1, 8.360 eram normais e 2.880 anormais, sugerindo uma segregação mendeliana 3:1 do caráter. A hipótese da segregação mendeliana 3:1 da anomalia foi confirmada pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2=2,32$ ;  $p>0,1$ ) (Tambarussi, 2006). Esse cruzamento foi repetido três vezes e a proporção se manteve em todos eles.

Tambarussi (2006), utilizando a técnica BSA em conjunto com marcadores RAPD, identificou um marcador ligado ao gene causador dessa anomalia. O autor avaliou 250 indivíduos, sendo 200 normais e 50 anormais. A marca esteve presente em todos os indivíduos anormais e em 31% dos indivíduos normais. Portanto supõe-se que a característica seja controlada por um gene de efeito principal e que o marcador encontra-se ligado a este gene, ou seja, o alelo recessivo da anomalia ligado a presença da marca (figura 2).

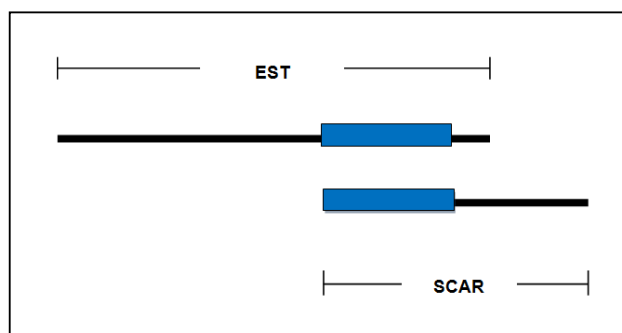


**Figura 2:** Esquema do cruzamento dos genitores G07 e G26 mostrando a ligação do alelo da anomalia com o marcador SCAR. **Legenda-** A: alelo dominante para normalidade. a: alelo recessivo para anomalia.

- : ausência da banda. + : presença da banda.

Pelo fato dos marcadores RAPD serem dominantes e apresentarem baixa reprodutibilidade (Ferreira e Grattapaglia, 1998), estes são convertidos em marcadores co-dominantes, chamados SCAR (Região amplificada de seqüência caracterizada), para aumentar sua confiabilidade (Paran e Michelmore, 1993). Após a seleção da marca RAPD, o fragmento é clonado e seqüenciado, e é sintetizado um par de oligonucleotídeos de aproximadamente 24 pares de bases, utilizados para amplificar as regiões específicas do DNA genômico. Desta maneira, o marcador RAPD (514pb) presente em todas as plantas anômalas, foi isolado, clonado e seqüenciado. A seqüência obtida foi utilizada no desenho de dois *primers* SCAR (*forward e reverse*) de 22 bases cada, das quais dez correspondem à seqüência original do *primer* RAPD, seguido de 12 bases internas das extremidades do fragmento de interesse.

A seqüência do SCAR (514pb) apresentou identidade a um consenso de seqüências expressas de eucalipto do banco de ESTs do projeto FORESTs-FAPESP (Figura 3). Desta forma, o marcador SCAR encontra-se em uma região do genoma que pode estar envolvida direta ou indiretamente com o caráter da anomalia. Como o marcador está presente em todos os indivíduos anômalos, deve existir um polimorfismo na região do sítio de pareamento do *primer* RAPD.



**Figura 3:** Esquema de alinhamento entre a sequência do SCAR e o consenso do banco de ESTs de Eucalipto. A barra azul simboliza a região em que as sequências são similares.

A sequência expressa de eucalipto relacionada ao marcador SCAR foi utilizada como *query* contra banco de dados públicos de proteínas e apresentou identidade à proteína *Bet v 1* a qual está relacionada à defesa da planta.

#### 2.4 Proteína *Bet v 1* e proteínas *pathogenesis-related* (PRs)

A proteína *Bet v 1* é o principal alérgeno do pólen em espécies do gênero *Betula*, e é homóloga aos principais alérgenos da família Betulaceae como *Aln g 1* em amieiro (*Alnus glutinosa*) (Breitener, 1992; Valenta et al., 1991); *Cor a 1* em avelã (*Corylus avelana*) e *Car b 1* em carpino (*Carpinus betulus*) (Valenta et al., 1991). Ela também está relacionada a alérgenos das famílias Rosaceae e Apiaceae, tais como em maçã (*Mal d 1*) (Gao et al., 2005; Schoning et al., 1996; Vanek- Krebitz et al., 1995); cenoura (*Dau c 1*) Hoffmann-Sommergruber et al., 1999 ; aipo (*Api g 1*) (Breitener et al, 1995; ) ; cereja (*Pru av 1*) (Scheurer et al., 1997) e morango (Karlsson et al., 2004).

Os homólogos da *Bet v 1* formam um abundante grupo de genes que codificam uma classe altamente conservada de proteínas relacionadas à defesa da planta que contêm

“ORFs”(Open Reading Frames) de 465 a 480pb (Wen et al., 1997). Suas seqüências genômicas geralmente consistem de dois éxons interrompidos por um íntron (Hoffmann-Sommergruber et al., 1997). O tamanho do íntron varia de 76pb para pfYpr10 de *Pisum fulvum* (nº de acesso GenBank U65425, Tewari et al. não publicado apud Wen et al., 1997) a 359 pb para STH-2 de *Solanum tuberosum* (Matton et al.,1993) A posição do íntron é altamente conservada, estando localizado entre o primeiro e segundo nucleotídeo do códon 62 (Handschuh et al., 2007; Hoffmann-Sommergruber et al., 1997; Schenk et al., 2009). Este sítio de *splice* conservado pode indicar uma relação estrutura/função (Hoffmann-Sommergruber et al., 1997).

A estrutura terciária da proteína *Bet v 1* já foi determinada por difração de raio-X (Gajhede et al., 1996) e por espectroscopia NMR- *Nuclear Magnetic Resonance* (Faber et al., 1996; Gajhede et al., 1996), assim como várias isoformas já foram descritas (Bollen et al., 2007; Schenk et al., 2009, 2006; Swoboda et al., 1995a). Swoboda et al. (1995b) sugeriram que proteínas *Bet v 1* têm um papel durante a germinação do pólen no estigma, protegendo os tecidos reprodutivos femininos de infecção por patógenos.

A proteína *Bet v 1*, de 17-KDa, foi originalmente identificada por Breiteneder et al. (1989) e sua seqüência mostrou homologia à família 10 das proteínas “*pathogenesis-related*” (PR), desde então, ela e suas homólogas foram incorporadas à classe das PR-10, as quais são induzidas por estresse, ataque de patógenos e estímulo abiótico (Hoffmann-Sommergruber, 2000).

Proteínas “*pathogenesis-related*” (PR) foram primeiro descobertas em plantas de tabaco infectadas com vírus mosaico (Van Loon e Van Kammen, 1970). O termo “PR-proteins” abrange um grande número de proteínas com diferentes (ou não identificadas) atividades bioquímicas e enzimáticas, tais como quitinases, glucanases, endoproteínases e

peroxidases, assim como pequenas proteínas como defensinas, tioninas e proteínas de transporte de lipídios (LTPs) (Hoffmann-Sommergruber, 2002).

Baseada na sua estrutura primária, relações imunológicas e propriedades enzimáticas, as proteínas PR são atualmente agrupadas em 17 famílias (PR-1 a PR-17), numeradas na ordem em que elas foram descobertas (Van Loon, 1999).

Estas proteínas são codificadas pelo hospedeiro e são induzidas por vários tipos de patógenos (vírus, bactérias e fungos), ou por substâncias químicas tais como etileno e ácido abscísico que “imitam” os efeitos da infecção patogênica (Stintzi et al., 1993). Sob ataque de insetos ou patógenos, muitas proteínas PR são induzidas por componentes de sinalização do ácido salicílico, jasmônico ou etileno, apesar de outros hormônios da planta, tais como ácido abscísico, poderem modular sua expressão (Van Loon et al., 2006). Mutantes de *Arabidopsis* afetados na produção ou ação dos componentes de sinalização do ácido salicílico, ácido jasmônico, ou etileno mostram uma maior susceptibilidade à doença quando infectados por patógenos específicos, indicando que estes reguladores têm um papel na resistência contra estes patógenos (Kunkel e Brooks, 2002; Thomma et al., 2001).

A ocorrência de PRs homólogas como uma pequena família em várias espécies de plantas, sua expressão tecido-específico durante o desenvolvimento e consistente localização no apoplasto, assim como no compartimento vacuolar, e sua indução por componentes de sinalização endógenos e exógenos, sugerem que as PRs podem ter funções importantes além de seu papel aparentemente limitado na defesa da planta. É possível, que as PRs sejam proteínas de estresse direcionadas para aliviar efeitos nocivos dos produtos da degradação celular (Van Loon, 1999).

Os membros da família PR-10 mostram homologia a ribonucleases e alguns membros tem uma fraca atividade ribonuclease (Bufe et al., 1996).

Os genes das PR-10 estão presentes abundantemente nos vegetais (Wen et al., 1997; Liu e Ekramoddoullah, 2004) e correspondem a famílias multigênicas que possuem mais de dez membros, muitas vezes localizados em *clusters*, como em maçã (Gao et al., 2005). As proteínas PR-10 são também chamadas de PRs intracelulares, já que são, ao contrário da maioria das PRs, expressas no citoplasma (Radauer et al., 2008). Todos os membros da classe das PR-10 são muito similares em seqüência de aminoácido, tamanho da proteína e carga total, indicando claramente um ancestral comum e uma função biológica idêntica ou relacionada (Wen et al., 1997).

O número de cópias dos genes das PR-10 varia entre diferentes espécies de bétula. Isto é causado por processos evolutivos, tais como duplicação, extinção e recombinação (Schenk et al., 2009).

### **3. OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi a caracterização molecular de uma região genômica relacionada a uma anomalia observada em mudas de eucalipto.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material utilizado

Todo o material vegetal utilizado neste trabalho pertence ao programa de melhoramento genético da empresa Suzano Papel e Celulose.

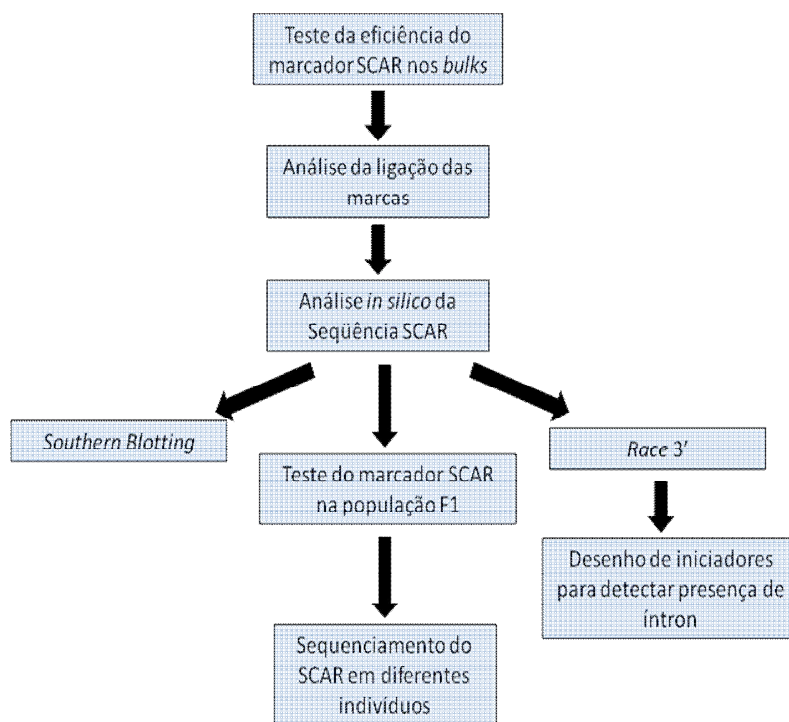
Folhas frescas das árvores de *E. grandis* G07 e G26, genitores da população F1 segregante para o caráter da anomalia, foram coletadas para extração de DNA. Essas árvores são matrizes utilizadas na produção de progênies para plantios comerciais da empresa Suzano Papel e Celulose.

O DNA dos indivíduos usados por Tambarussi (2006) para compor os *bulks* anômalo e normal também foi utilizado.

Devido às plantas anômalas apresentarem um curto tempo de vida, foi necessário realizar um novo cruzamento para a obtenção de uma população F1 segregante para o caráter da anomalia. O cruzamento entre os genitores G07 e G26 foi realizado pela empresa Suzano e as mudas geradas foram utilizadas para extração de DNA e RNA.

### 4.2 Delineamento Experimental

O organograma abaixo ilustra os procedimentos realizados ao longo do trabalho.



**Figura 4:** Organograma com as principais etapas desenvolvidas ao longo do trabalho.

#### 4.3 Teste da eficiência do marcador SCAR nos *bulks*

O teste de amplificação do marcador SCAR foi feito utilizando-se o par de *primers* que detecta o SCAR em uma PCR com o *bulk* normal e anômalo, os genitores, os dez indivíduos integrantes do *bulk* anômalo e nove dos dez indivíduos integrantes do *bulk* normal.

A reação constou de 200 ng de DNA; 1x Tampão PCR; 1,5 mM de  $MgCl_2$ ; 0,5 mM de dNTPs; 0,25  $\mu M$  de cada *primer* e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). O volume da reação foi completado para 20  $\mu l$  com água milli-Q autoclavada.

A amplificação foi realizada em um aparelho termociclador utilizando o seguinte programa: 5 min a 94°C, seguidos de 34 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 66°C, 1 min 35 seg a 72°C e uma extensão final de 10 min a 72°C.

As amostras amplificadas foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 1% preparado com tampão Tris-borato (TBE 1x pH 8,0) e corado com brometo de etídio. A visualização do gel foi realizada em um transiluminador de luz UV, no sistema de fotodocumentação digital *Eagle Eye* (Stratagene®).

#### **4.4 Análise de ligação das marcas**

As marcas, morfológica e molecular, foram analisadas para cálculo da porcentagem de recombinação e distância entre elas. O software utilizado para as análises de ligação entre as marcas foi o GQMOL 2.1 (Cruz, 1999). Os géis de agarose foram analisados e uma planilha foi preenchida no Excel com a presença e ausência de bandas no gel. Como o marcador morfológico tem segregação de 3:1 (cruzamento entre dois heterozigotos) e o marcador molecular tem segregação 1:1, foram utilizados códigos diferentes para cada uma das marcas para análise de ligação. Nas linhas foram colocadas as marcas e os indivíduos formaram as colunas.

A planilha gerada foi utilizada para o mapeamento da marca molecular com a morfológica. A opção “mapa de ligação” “segregação mista” foi selecionada, pois permite a análise de segregação do tipo 1:1 com segregação 3:1. Para conversão da frequência de recombinação para distância em centi-Morgans, foi utilizada a opção “distância de Kossambi” (Kosambi, 1944). 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.

Este programa também foi utilizado para teste do qui-quadrado da segregação (1:1) da marca molecular.

#### **4.5 Análise *in silico* da seqüência SCAR**

A seqüência do SCAR (514pb) foi comparada com seqüências expressas de eucalipto do banco de dados FORESTs-FAPESP (Vicentini et al., 2005) utilizando a ferramenta BLASTN (Altschul et al., 1997) e o melhor resultado de identidade foi selecionado. Foram também identificadas por BLASTN (Altschul et al., 1997) seqüências expressas de eucalipto relacionadas ao SCAR no banco de dados GenBank (est\_others) e o melhor resultado obtido para *Eucalyptus gunnii* foi selecionado.

O melhor resultado de identidade obtido no banco FORESTs foi traduzido no site *Expasy* (Gasteiger et al., 2003) e determinado uma proteína putativa no site *Softberry* (www.softberry.com). A proteína predita foi analisada no PFAM (Finn et al. , 2008) para a identificação de domínios conservados.

Adicionalmente foi feito BLASTX (Altschul et al., 1997) das seqüências expressas de eucalipto selecionadas no FORESTs e GenBank contra o banco de dados NR do GenBank. O melhor resultado de BLASTX foi então analisado no PFAM (Finn et al. , 2008).

#### **4.6 *Southern blotting***

A técnica de *southern blotting* foi utilizada para identificar o número de cópias da região de interesse. Utilizou-se o Kit Amersham AlkPhos Direct™ Labeling and Detection Systems.

A descrição das etapas da técnica estão a seguir:

#### **4.6.1 Extração de grande quantidade de DNA**

Para a realização da técnica de *southern blotting* é necessária grande quantidade de DNA de qualidade. O protocolo utilizado para extração de DNA foi o descrito por Weising et al. (2005). O protocolo precisou ser padronizado a fim de se obter DNA com qualidade ideal para digestão com endonucleases. Foi extraído DNA de folhas frescas dos genitores normais G7 e G26. Segue abaixo o protocolo já otimizado:

O tampão de extração composto de: CTAB (2%), NaCl (1,4 M), EDTA (20 mM, pH 8,0), Tris-HCl (100 mM, pH 8,0) e  $\beta$  mercaptoetanol (1%), foi aquecido a temperatura de 60°C e 12 ml desse tampão foi separado em tubos com capacidade de 50 ml onde foi adicionado 1 g de material foliar macerado em cadinho na presença de nitrogênio líquido. Essa mistura foi mantida sob agitação a 60°C por 60 min, foi adicionado, então, 12 ml de CIA (24 partes de clorofórmio para 1 parte de álcool isoamílico). As amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 20 min com agitação. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 min e a fase superior (aquosa) foi transferida para um novo tubo onde adicionou-se 2 ml de CTAB 5% e repetiu-se a lavagem com CIA. A fase superior foi transferida para um novo tubo onde foi realizada digestão de RNAs com a adição de 6  $\mu$ l de RNase a 20 mg/ml e incubação por 30 min a 37°C. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 0,8 volumes de isopropanol e centrifugado por 20 min a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 10 ml de etanol 70% foram utilizados para lavagem do pellet de DNA com centrifugação de 20 min a 5000 rpm. O etanol foi descartado, o pellet foi seco à temperatura ambiente e depois foi eluído em 500  $\mu$ l de TE (pH 8,0).

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (ND1000<sup>®</sup>), e a qualidade do DNA foi verificada em eletroforese em gel de agarose a 1% preparado com tampão Tris-borato (TBE 1x pH 8,0) corado com brometo de etídio. Comprovada a qualidade do DNA este foi digerido com as enzimas de restrição selecionadas.

#### **4.6.2 Restrição enzimática**

Para realização da técnica de *southern blotting* é necessário utilizar enzimas de restrição que não cortem a seqüência de DNA que será usada como sonda. O programa pDraw 32 1.1.100 foi utilizado para analisar a seqüência de DNA do SCAR e selecionar as enzimas. As enzimas analisadas foram: BamHI, EcoRI, HindIII, NdeI , PstI, KpnI e XbaI.

A técnica também exige uma digestão total do DNA, assim a reação de digestão precisou ser padronizada para obtenção de uma digestão ideal. O DNA dos genitores foi digerido em duplicata com duas diferentes endonucleases: NdeI e XbaI. Foi utilizado para a reação de digestão: 20 µg de DNA; 60 unidades de enzima (Biolabs– New England<sup>®</sup>); 1x tampão da enzima; 0,1 mg de Bovine Serum Albumin (Invitrogen<sup>®</sup>); o volume foi completado para 1 ml com água milli-Q autoclavada. Após incubação a 37°C por 16 h as enzimas foram inativadas a 65°C por 20 min. Para confirmar que o processo de digestão das amostras de DNA ocorreu adequadamente, 1 µg das amostras de DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,7% preparado com tampão Tris-borato (TBE 1x pH 8,0) e corado com brometo de etídio.

#### 4.6.3 Precipitação do DNA digerido

Ao DNA digerido foi adicionado 0,1 volumes de acetato de amônio 7,8 M gelado e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. As amostras foram deixadas a -20°C até o dia seguinte e depois centrifugadas a 10.000 rpm por 60 min a 4°C. Em seguida, descartou-se o sobrenadante, o *pellet* foi lavado em 1 ml de etanol 70% gelado e centrifugado a 10.000 rpm por 30 min a 4°C. O etanol foi descartado, o *pellet* foi seco em centrífuga a vácuo e posteriormente eluído em 40 µl de TE (Tris-EDTA, pH 8). As amostras foram armazenadas a -20°C até a sua utilização.

#### 4.6.4 Reação de PCR para obtenção da sonda

Para obtenção da sonda, a seqüência SCAR foi amplificada utilizando-se o par de *primers* SCAR *foward* e *reverse* em uma reação contendo DNA diluído de indivíduos anômalos integrantes do *bulk*.

A reação constou de 200 ng de DNA; 1x Tampão PCR; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM de dNTPs; 0,25 µM de cada *primer* e 2 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), o volume foi completado para 20 µl com água milli-Q autoclavada.

A amplificação foi realizada em um aparelho termociclador utilizando o seguinte programa: 5 min a 94°C, seguido de 34 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 66°C, 1 min 35 seg a 72°C e uma extensão final de 10 min a 72°C.

As amostras amplificadas foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 1% preparado com tampão Tris-borato (TBE 1x pH 8,0) e corado com brometo de etídio. A

visualização do gel foi realizada por um transiluminador de luz UV, no sistema de fotodocumentação digital *Eagle Eye* (Stratagene<sup>®</sup>).

O produto amplificado de aproximadamente 500pb (SCAR) foi recortado do gel e purificado utilizando-se o kit *PureLink<sup>TM</sup> Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen<sup>®</sup>). O DNA purificado foi eluído em 50 µl de água milliQ autoclavada e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (ND1000<sup>®</sup>). A amostra que apresentou a melhor qualidade e maior quantidade de DNA foi selecionada para utilizar como sonda.

#### **4.6.5 Gel do DNA digerido**

Adicionou-se 8 µl de Sacarose (40%) aos 40 µl de cada amostra digerida. Utilizou-se 10 ng do DNA purificado da banda polimórfica como controle positivo. Como marcador de peso molecular utilizou-se um ladder de 1Kb (Invitrogen<sup>®</sup>).

As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1% preparado com tampão Tris-Borato-EDTA (TBE 0,5X pH 8,0) corado com brometo de etídio e submetidas à eletroforese por 15 horas a 35 V.

A visualização do gel foi realizada em um transiluminador de luz UV (*Molecular Imager ChemiDoc XRS Bio-Rad Laboratories, Inc.*) e foi fotografado com régua ao lado do marcador de peso molecular com zero na altura dos poços.

#### **4.6.6 Lavagem do gel e transferência para a membrana**

##### ***Lavagem do gel***

Após visualizar e fotografar o gel, este foi cortado retirando-se as partes não utilizadas

e a parte do marcador de peso molecular, deixando apenas as amostras e o controle positivo. O gel foi medido e fez-se um pequeno corte no canto esquerdo inferior para permitir sua posterior orientação. Em seguida, realizou-se a depuração do gel através da incubação em HCL 0,25 M sob agitação suave por 10 min; lavando-o a seguir com água milliQ. Seguiu-se a desnaturação do gel por 30 min sob agitação suave em NaCL 1,5 M , NaOH 0.5M; lavando-o após com água milliQ. Finalmente, o gel foi neutralizado em solução de Tris HCL 0,5M pH 7.5 , NaCL 1.5 M por 30 min sob agitação suave.

#### ***Transferência do gel para a membrana***

Os papéis utilizados na transferência foram recortados de acordo com as dimensões do gel (14 x 16 cm).

Em uma vasilha colocou-se 500 ml da solução de transferência 20X SSC (NaCL 3 M;  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0,3 M, pH 7,0) e montou-se sobre uma plataforma uma ponte com o papel de cromatografia 3MM (*Whatman<sup>®</sup> 3MM CHR Chromatography Paper*). A ponte de papel foi molhada e as pontas da ponte de papel foram deixadas em contato com a solução 20X SSC. O gel foi colocado cuidadosamente sobre a ponte e sobre ele a membrana (*Amersham Hybond<sup>™</sup> N+*) cortada nas dimensões do gel e corretamente identificada. Sobre a membrana foi colocada três folhas, já recortadas, do papel absorvente (*Amersham Hybond<sup>™</sup> Blotting Paper*) e finalmente 6 cm de papel absorvente comum. O processo de transferência, que promove por capilaridade a passagem do DNA contido no gel para a membrana, ocorreu em um período de 20 h.

#### **4.6.7 Secagem da membrana, marcação da sonda e hibridização**

##### ***Secagem da membrana***

Terminada a transferência, a membrana protegida por um envelope de papel absorvente (*Amersham Hybond™ Blotting Paper*) e papel alumínio foi mantida a 80°C por 2 h para a fixação do DNA à membrana.

##### ***Marcação da Sonda***

A sonda já obtida como descrita anteriormente (item 3.5.4) foi diluída na concentração de 10 ng/μl com água estéril. Em seguida, adicionou-se a 10 μl da sonda já diluída: 10 μl de *Reaction buffer*, 2 μl de *Labelling Reagent* e 10 μl de *Cross-linker* diluído (1 *cross linker* : 4 água estéril), todos reagentes do Kit *Amersham AlkPhos Direct™ Labeling and Detection Systems*.

##### ***Hibridização***

A membrana foi colocada na garrafa de hibridização contendo o tampão de hibridização (NaCl 5 M; *Blocking reagent* 4%; *Hybridization buffer* q.s.p 40 ml) previamente aquecido a 55°C, e foi deixada por 15 min a 55 °C. Acrescentou-se 200 ng da sonda já marcada ao tampão (5 ng/ml de tampão) e deixou-se hibridizar a 55°C por 21 h sob agitação.

#### **4.6.8 Lavagem da membrana e radiografia**

##### ***Lavagem da membrana***

A solução anterior foi removida e adicionou-se 300 ml do 1º Tampão de Lavagem

(Urea 2 M, SDS 0,1%; Na Phosphate 50 mM, pH 7.0; NaCl 0,15 M; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; Blocking reagent 0,2%) já aquecido a 55°C à garrafa de hibridização contendo a membrana, deixando sob agitação por 10 min a 55°C. Repetiu-se a lavagem com mais 300 ml do 1º tampão.

Em seguida, a membrana foi colocada em um recipiente limpo e incubada em 100 ml do 2º Tampão de Lavagem (Tris base 0,1 M; NaCl 0,05 M; MgCl<sub>2</sub> 2 mM) sob agitação por 5 min a temperatura ambiente. Uma segunda lavagem com 100 ml do 2º tampão foi realizada.

#### ***Geração de Sinal e Detecção***

Terminada a lavagem, retirou-se o excesso de líquido da membrana e esta foi colocada em um saco plástico aberto. Sobre a superfície da membrana espalhou-se 5 ml da solução de detecção (*Kit Amersham AlkPhos Direct™ Labeling and Detection Systems*), em seguida fechou-se o plástico deixando a solução agir por 5 min. O excesso de líquido foi retirado, o plástico foi selado e a membrana colocada dentro do cassete de raios X. Uma chapa de raios X corretamente identificada foi colocada em cima da membrana e aguardou-se um tempo variável (30 min - 2h) para retirar a chapa do cassete para revelação. Após o tempo de exposição necessário, a chapa foi retirada e revelada por 4 min, em seguida fixada por 15 min e por fim lavada em água milliQ.

#### **4.7 Extração de RNA total**

Extraíu-se RNA total de um indivíduo de *Eucalyptus grandis* normal e de um indivíduo anômalo da população F1 segregante para anomalia, e também de um indivíduo *E. grandis* de outra população não relacionada. O RNA foi extraído de folhas, caule e raiz dos indivíduos da população F1 em estágio de plântula e de folhas do indivíduo da outra

população. O RNA extraído foi utilizado na técnica de *race 3'*. O protocolo seguido foi o descrito por Chang et al. (1993) com modificações.

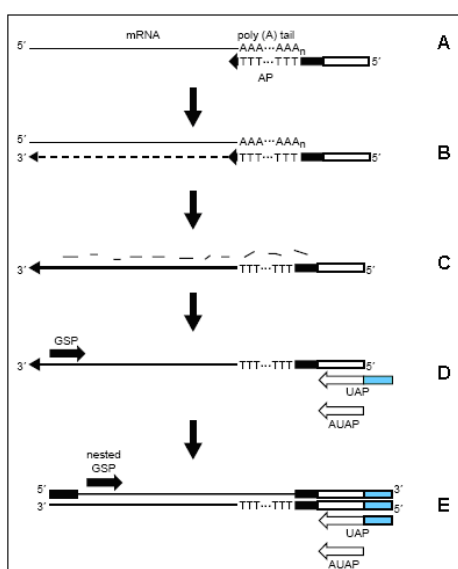
A 200 mg de tecido macerado em nitrogênio líquido foi adicionado 1 ml de tampão de extração CTAB pré aquecido a 65°C (2% CTAB; 2% PVP; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 25 mM; NaCl 2 M), o macerado foi mantido a 65°C por 15 min. Após atingir a temperatura ambiente, foi adicionado 1 ml de CIA (24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico) e foi centrifugado a 10000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e uma nova lavagem com CIA foi realizada nas mesmas condições anteriores. Foi adicionado um volume de cloreto de lítio (LiCl 5 M), as amostras foram deixadas a 4°C até o dia seguinte para precipitação. No dia seguinte foi centrifugado por 30 min a 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi eluído em 200 µl de TE-SDS (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH=8,0; SDS 1%) e adicionado 100 µl de NaCl 5 M e 300 µl de isopropanol. As amostras foram armazenadas por 30 min a - 20°C para precipitação, após esse período foi centrifugado a 12000 rpm por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi lavado com 1 ml de etanol 70%, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm (4°C) por 5 min. O *pellet* foi eluído em 30 µl de água DEPC autoclavada e o RNA foi armazenado à temperatura de -70°C.

#### **4.8 *Race 3'***

A técnica de *race 3'* foi realizada na tentativa de elucidar a região 3' transcrita da região de interesse.

O RNA total extraído, conforme descrito anteriormente, de um indivíduo normal e de um anômalo da população F1; e de um indivíduo normal de outra população não relacionada foram utilizados na técnica.

O protocolo foi realizado com o uso do kit 3' *RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen®). Um esquema simplificado da técnica está representado na figura 5.



**Figura 5:** Esquema resumido da metodologia *race 3'* (Kit 3' *RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* - Invitrogen®). **A:** pareamento do *primer* adaptador (AP) com cauda dT ao RNA mensageiro; **B:** extensão da fita complementar a partir de AP utilizando *SuperScript<sup>TM</sup> II RT*; **C:** degradação da fita molde de RNA utilizando RNase H; **D:** PCR para amplificação do cDNA utilizando os *primers* GSP 1 e o UAP ou AUAP; **E:** PCR para amplificação do produto primário, utilizando os *primers* UAP ou AUAP e GSP 2 (*nested*).

A partir da seqüência do SCAR foram desenhados *primers* gene - específicos externos e internos (GSA1 e GSA2, respectivamente). Para o desenho dos *primers* utilizou-se a ferramenta OligoAnalyser 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>).

#### 4.8.1 Preparação do cDNA

Primeiramente 1 µg de RNA foi tratado com 1 unidade da enzima DNase (DNase I, RNase *free*) e foi incubado a 37°C para digestão do DNA. A enzima DNase foi inativada à temperatura de 65°C por 10 min na presença de EDTA (2,5 mM).

Em tubos estéreis adicionou-se 1 µg do RNA tratado, *primer* adaptador AP (0,83 µM) e volume final de 12 µl completados com água deionizada autoclavada. Essa mistura foi mantida a 70°C por 10 min. e em seguida levada ao gelo por 1 min. Foi adicionado então uma mistura contendo tampão (1x), MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), dNTP (0,5 mM) , DTT (0,1 M) e *SuperScript™ II RT* (200 unidades), essa mistura (volume final de 20 µl) foi incubada a 42°C por 55 min e inativada a 70°C por 15 min. Foi levada ao gelo para adição de RNase H (2 unidades) e incubada por 20 min a 37°C para a digestão da fita molde de RNA.

#### 4.8.2 Reação de Amplificação *Nested*

O cDNA obtido foi submetido a reações de amplificação utilizando os *primers* GSA1 e GSA2. Na primeira reação foi utilizado o *primer* gene – específico externo (GSA1) e na segunda o *primer* gene – específico interno (GSA2).

As reações se deram em um volume final de 50 µl e continham tampão (1x), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), *primer* GSA (0,2 µM), *primer* AUAP (0,2 µM), enzima Taq DNA polimerase do tipo *hot start* (1 unidade) e 2 µl de cDNA.

O ciclo de amplificação foi o seguinte: extensão inicial de 94°C; 35 ciclos de 94°C por 3 min, 60°C por 45 seg, 72°C por 1 min.; e uma extensão final de 72°C por 7 min.

Para a reação *nested*, o DNA amplificado na primeira reação foi diluído em água deionizada na proporção 1:50. Foi utilizado 1 µl do DNA amplificado diluído, o mesmo ciclo de amplificação e a mesma mistura de reagentes com exceção do *primer* GSA que na segunda reação foi o *primer* mais interno GSA2.

#### **4.8.3 Purificação das bandas**

As bandas selecionada foram cortadas do gel de agarose e purificadas através do uso do kit *Pure Link™ Quick Gel Extraction* (Invitrogen®). O DNA foi eluído com 50 µl de tampão TE.

#### **4.8.4 Clonagem**

##### ***Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor***

O vetor utilizado foi o *pGEM®-T Easy* (Promega). Para ligação do fragmento de DNA ao vetor foi utilizado 12 ng do produto da amplificação purificado, 3 unidades de T4 DNA ligase ; 50 ng de vetor , 1x tampão da enzima e água deionizada para completar 20 µl de reação. Essa reação foi incubada a 16°C por 16 horas.

##### ***Transformação das células competentes***

A célula competente utilizada foi a *Escherichia coli* da cepa DH5α. Foram misturados 20 µl de produto de ligação a 50 µl de células competentes. A mistura foi incubada em gelo por 30 min. Foi submetido um choque térmico a 42°C por 1 min e 30 seg, as amostras foram transferidas para gelo por 5 min. Foram adicionados 400 µl de meio de cultura líquido *circle*

*grow* (CG) e incubados por agitação leve por 50 min a 37°C. As amostras foram plaqueadas em placa de petri com 25 ml de meio sólido CG+ agar com ampicilina (100 µg/ml), Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranoside (IPTG) (0,4 mM) e X-galactose (XGAL) (0,1 µg/ml).

As placas foram incubadas a 37°C de um dia para o outro. As colônias brancas foram selecionadas e transferidas para meio líquido e mantidas em estufa a 37°C para crescerem e realizar a extração do DNA através de minipreparação de plasmídeo.

### ***Minipreparação de plasmídeo***

As células crescidas em meio líquido foram transferidas para um novo tubo e centrifugadas. Em seguida, foram eluídas em solução contendo Tris-HCl (50 mM, pH 8,0), EDTA (10 mM, pH 8,0), RNase (100 µg/ml) e homogeneizadas. A lise alcalina foi realizada com uma solução de NaOH (200 mM) e SDS (1%) por 5 min. A reação foi neutralizada com uma solução de acetato de potássio 3 M, pH 5,5, as amostras foram incubadas em gelo por 20 min e então foram centrifugadas por 30 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado isopropanol, nesta etapa, as amostras foram incubadas a -20°C por pelo menos 1 h. As amostras foram centrifugadas novamente e o *pellet* foi lavado com etanol 70% e após secagem o DNA foi eluído em água deionizada autoclavada.

O plasmídeo extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (ND1000®). Para confirmar a presença do inserto no plasmídeo, foi realizada uma reação com o *primer* M13, o qual se parecia a uma região do plasmídeo, amplificando uma parte deste e o fragmento de interesse. Desta forma, através da visualização do tamanho das bandas amplificadas, verifica-se quais colônias contêm o fragmento de interesse. As reações de PCR constaram de

20 ng de DNA; 1x Tampão PCR; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM de dNTPs; 0,25 μM de cada *primer* e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). O volume da reação foi completado para 20 μl com água milli-Q autoclavada.

A amplificação foi realizada em um aparelho termociclador utilizando o seguinte programa: 3 min a 94°C, seguidos de 38 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a 55°C, 1 min a 72°C e uma extensão final de 5 min a 72°C.

As amostras amplificadas foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 1% preparado com tampão Tris-borato (TBE 1x pH 8,0) e corado com brometo de etídio. A visualização do gel foi realizada em um transiluminador de luz UV.

#### 4.8.5 Sequenciamento

Foram selecionadas para sequenciamento: 8 colônias do indivíduo normal da população não relacionada a anomalia, 5 colônias do indivíduo anormal e 4 colônias do indivíduo normal da população F1. Para a reação de sequenciamento foi utilizado de 100 a 200 ng de DNA plasmidial, 1x tampão de seqüenciamento; 1,8 μl de *Big Dye; primer* M13 (1 μM); a reação foi completada com água deionizada para um volume final de 10 μl.

As condições de amplificação foram as seguintes: extensão inicial de 96°C; 40 ciclos de 96°C por 10 seg, 50°C por 10 seg, 60°C por 4 min.

Antes do sequenciamento, a reação foi purificada com 80 μl de isopropanol 75%, por 15 min, a placa foi centrifugada por 45 min a 4000 rpm, o álcool foi descartado e foi adicionado etanol 70% para lavagem dos *pellets*, foi realizada uma nova centrifugação nas condições anteriores por 10 min. O álcool foi descartado e após os *pellets* estarem secos adicionou-se 40 μl de formamida. Em seguida, deu-se a desnaturação a 95°C por 5 min e

choque térmico em gelo. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador automático 3100 Applied Biotechnology . O seqüenciador 377 Applied Biotechnology foi utilizado para seqüenciamento de apenas duas colônias do indivíduo normal da população não relacionada à anomalia, já que estas foram feitas em um período anterior às demais.

#### **4.8.6 Construção e análise da seqüência consenso**

Com os dados do seqüenciamento das colônias do *race* - PCR foram construídas seqüências consenso no *software* ChromasPro 1.5. As seqüências consenso foram alinhadas no *software* ClustalX 2.0.11. Através da ferramenta bl2seq (Altschul et al., 1997) as seqüências consenso do *race* foram comparadas com a seqüência do SCAR e com os ESTs dos bancos de dados FORESTs-FAPESP e GenBank.

#### **4.8.7 Preparação de cultura permanente**

Culturas permanentes dos clones seqüenciados foram feitas transferindo-se para um novo tubo 850 µl da cultura de bactéria e 150 µl de glicerol. As culturas foram armazenadas a -80°C.

#### **4.9 Desenho de iniciadores específicos**

Iniciadores específicos foram desenhados a partir dos resultados da técnica de *race* 3' para verificar a presença do íntron na região de interesse. Três iniciadores foram desenhados, um *forward* (F2) e dois *reverses* (R1 e R2), através do software *PerlPrimer* 1.1.17.

#### 4.9.1 Teste dos iniciadores específicos

Os iniciadores desenhados foram utilizados em reações de amplificação contendo DNA genômico de plantas anômalas, normais e de *E. grandis* puros de outra população. Diferentes combinações de *primers* foram testadas em diferentes temperaturas de pareamento (41°C - 47°C e 52°C) e programas de amplificação. Os três *primers* descritos anteriormente (F2, R1e R2), o *primer GSA2* da técnica de 3' *race* (chamado aqui de F1) e o *primer SCAR forward* (chamado aqui de SCAR F) foram utilizados nos seguintes programas de amplificação:

- PCR padrão: 5 min a 94°C, seguidos de 34 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a x°C (x= 41°C a 47°C e 52°C) , 1 min 35 seg a 72°C e uma extensão final de 10 min a 72°C.

- *Hemi-nested touchdown* PCR (Huang e Cloutier, 2007): 5 min a 94°C, seguidos de 20 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a x°C -0,5°C a cada ciclo, 1 min 35 seg a 72°C seguidos de 15 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a x°C, 1 min 35 seg a 72°C e uma extensão final de 10 min. No primeiro teste, a temperatura de pareamento (x°C) do *primer* foi progressivamente reduzida de 65°C para 55°C, diminuindo 0,5°C a cada ciclo, seguidos por 15 ciclos adicionais de 55°C; já em um segundo teste, a temperatura de pareamento do *primer* foi progressivamente reduzida de 55°C para 45°C, diminuindo 0,5°C a cada ciclo, seguidos por 15 ciclos adicionais de 45°C.

#### **4.10 Teste do marcador SCAR na população F1 para aplicação em programas de melhoramento genético**

O marcador SCAR foi testado nos indivíduos da população F1 segregante para o caráter da anomalia.

Reações de PCR com gradiente de temperatura foram realizadas com os *primers* SCAR *Reverse* e *Foward* para obter a temperatura ideal de amplificação do par de *primers*, já que estes foram sintetizados novamente. As reações de PCR constaram de 20 ng de DNA; 1x Tampão PCR; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM de dNTPs; 0,25 µM de cada *primer* e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). O volume da reação foi completado para 20 µl com água milli-Q autoclavada.

A amplificação foi realizada em um aparelho termociclador utilizando o seguinte programa: 5 min a 94°C, seguidos de 34 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 54 - 58,1°C, 1 min 35 seg a 72°C e uma extensão final de 10 min a 72°C.

As amostras amplificadas foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 1% preparado com tampão Tris-borato (TBE 1x pH 8,0) e corado com brometo de etídio. A visualização do gel foi realizada em um transiluminador de luz UV.

#### **4.11 Sequenciamento do SCAR em diferentes indivíduos**

Os *primers* SCAR, *foward* e *reverse*, foram utilizados em reações de PCR em baixa temperatura para amplificação do fragmento em diferentes indivíduos: três indivíduos anormais do *bulk* (A1, A3 e A5), um indivíduo normal do *bulk* (N12) e dois indivíduos normais de população não relacionada (BAC e Brasuz).

#### 4.11.1 Reação de PCR para obtenção do SCAR

As reações de PCR constaram de 20 ng de DNA; 1x Tampão PCR; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM de dNTPs; 0,25 μM de cada *primer* e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). O volume da reação foi completado para 20 μl com água milli-Q autoclavada.

A amplificação foi realizada em um aparelho termociclador utilizando o seguinte programa: 5 min a 94°C, seguidos de 34 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 53°C, 1 min 35 seg a 72°C e uma extensão final de 10 min a 72°C.

Para verificar se a amplificação ocorreu perfeitamente, uma quantidade da reação de amplificação foi aplicada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e visualizado em um transiluminador de luz UV. Verificado a amplificação da banda, e ausência de bandas inespecíficas, o produto da amplificação foi ligado a um vetor para clonagem e posterior seqüenciamento.

#### 4.11.2 Clonagem

##### *Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor*

O vetor utilizado foi o *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* (Promega). Para ligação do fragmento de DNA ao vetor foi utilizado 1 μl do produto da amplificação, 3 unidades de T4 DNA ligase ; 50 ng de vetor , 1x tampão da enzima e água milli-Q autoclavada para completar 20 μl de reação. Essa reação foi incubada a 16°C por 16 horas.

### ***Transformação das células competentes***

A célula competente utilizada foi a *Escherichia coli* da cepa DH5 $\alpha$ . A transformação se deu como já descrito anteriormente.

As colônias brancas foram selecionadas e transferidas para um tubo contendo uma reação de PCR com o *primer* M13 já pronta, contendo: 1x Tampão PCR; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM de dNTPs; 0,25  $\mu$ M de cada *primer* e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), em um volume final de 20  $\mu$ l. A amplificação foi realizada em um aparelho termociclador utilizando o seguinte programa: 3 min a 94°C, seguidos de 38 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a 55°C, 1 min a 72°C e uma extensão final de 5 min a 72°C.

Uma quantidade do produto da reação de amplificação foi aplicada em gel de agarose corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de luz UV para verificar as colônias que continham o inserto de interesse. Os produtos das reações das colônias selecionadas foram purificadas com a enzima ExoSAP-IT (USB, Cleveland, USA). Utilizou-se 4  $\mu$ l do produto da reação e 1  $\mu$ l da enzima, a mistura foi incubada a 37°C por 16 min e conseqüentemente a 80°C por 15 min . Esse produto da reação purificado foi utilizado no seqüenciamento.

### **4.11.3 Sequenciamento**

Foram selecionadas para seqüenciamento: 6 colônias do indivíduo anormal A1, 6 colônias do indivíduo anormal A3, 3 colônias do indivíduo anormal A5, 6 colônias do indivíduo normal A12, 6 colônias do indivíduo normal BAC e 6 colônias do indivíduo Brasuz. Para a reação de seqüenciamento foi utilizado 1  $\mu$ l do produto da reação purificado,

1x tampão de seqüenciamento; 1,8 µl de *Big Dye*; *primer* M13 (1 µM) em um volume final de 10 µl.

As condições de amplificação foram as seguintes: extensão inicial de 96°C; 40 ciclos de 96°C por 10 seg, 50°C por 10 seg, 60°C por 4 min.

Antes do seqüenciamento, a reação foi precipitada com isopropanol como já descrito anteriormente e o seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador automático 3100 Applied Biotechnology.

#### **4.11.4 Construção e análise das sequências consenso**

Com os dados do seqüenciamento das colônias foram construídas sequências consenso no *software* ChromasPro 1.5. As sequências consenso foram alinhadas no *software* ClustalX 2.0.11.

#### **4.11.5 Preparação de cultura permanente**

Culturas permanentes dos clones seqüenciados foram feitas transferindo-se para um novo tubo 850 µl da cultura de bactéria e 150 µl de glicerol. As culturas foram armazenadas a -80°C.

#### **4.12 Análise no banco de dados do genoma de *Eucalptus* (*EucalyptusDB*)**

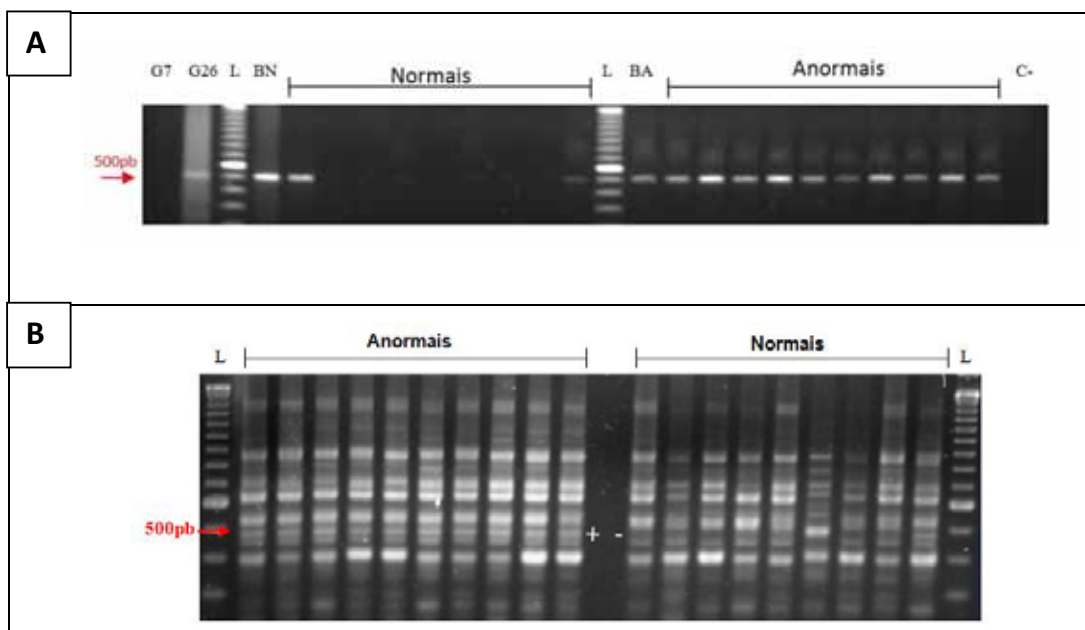
A sequência do SCAR e do EST do FORESTs- FAPESP e do GenBank foram comparadas ao genoma completo de eucalipto no bando de dados *EucalyptusDB*

(<http://eucalyptusdb.bi.up.ac.za/>) utilizando a ferramenta BLASTN (Altschul et al., 1997). Como o genoma não está completamente coberto, e os dados ainda estão sendo organizados, a análise pode ser considerada com algumas restrições.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Teste da eficiência do marcador SCAR nos *bulks*

No teste de amplificação dos indivíduos dos *bulks* utilizando o *primer* SCAR, a marca polimórfica de aproximadamente 500 pb esteve presente em todos os indivíduos integrantes do *bulk* anômalo (figura 6a). Nos indivíduos normais, dois indivíduos apresentaram a marca (22,2%), isto se deve ao fato do marcador estar ligado ao alelo recessivo presente em apenas um dos genitores que apresentou a banda (G26). Assim, o marcador mostrou-se eficiente para identificar todos os indivíduos anômalos.



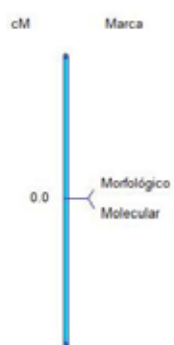
**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose (em A: 1%, em B: 1,5%) com amplificação dos indivíduos dos *bulks* normal e anômalo. **A:** amplificação com *primer* SCAR utilizando os genitores e os indivíduos integrantes dos *bulks* normal e anômalo. **B:** amplificação com *primer* RAPD utilizando os indivíduos integrantes dos *bulks* anômalo e normal. A marca polimórfica de 500pb está presente em todos os indivíduos do *bulk* anômalo e em dois indivíduos normais quando amplificados tanto com o *primer* RAPD quanto com o *primer* SCAR. **Legenda-** G7 e G26: genitores. BN: *bulk* normal. BA: *bulk* anômalo. L: *ladder* 100 pb (Invitrogen®). C-: controle negativo.

Quando a amplificação dos indivíduos dos *bulks* com o *primer* SCAR é comparada à amplificação com o *primer* RAPD, os mesmos resultados são observados (figura 6). Na amplificação com o *primer* RAPD a marca polimórfica de 500 pb está presente também em todos os indivíduos anormais e nos mesmos dois indivíduos normais (22,2%) (figura 6b). Isto demonstra que os *primer* SCAR apresentou um fragmento único e que o mesmo está relacionado à região de estudo.

## 5.2 Análise de ligação das marcas

A hipótese de segregação de 1:1 do marcador molecular foi confirmada pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2=2,7$ ;  $p=0,1$ ).

As marcas, morfológica e molecular (derivada do *primer* RAPD), foram analisadas para cálculo da frequência de recombinação e distância entre elas. As marcas apresentaram 0% de frequência de recombinação e distância de 0,0 cM com LOD= 1000 (figura 7).



**Figura 7:** Grupo de ligação, com a marca molecular e a marca morfológica da anomalia. À direita é apresentada a distância em centimorgans (cM) e à esquerda os marcadores. As análises foram realizadas pelo software GQMOL 2.1 (Cruz, 1999)

Zamprogno et al., 2008 identificaram um marcador RAPD localizado a uma distância genética estimada de 20 cM do gene de resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em eucalipto. No trabalho de Teixeira, 2009 os marcadores mais próximos ao loco de resistência à ferrugem encontravam-se a uma distância de 4,3 cM e 6,8 cM, sendo um marcador AFLP e outro RGA, respectivamente. A marca mais informativa obtida por Junghans et al, 2003 apresentou co-segregação completa e zero recombinantes com o gene de resistência à ferrugem em eucalipto.

O cálculo do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para a ligação das marcas também foi realizado e confirma a hipótese de ligação ( $\chi^2=0,49$ ;  $p>0,7$ ) (tabela 1).

**Tabela 1-** Teste do  $\chi^2$  para hipótese da ligação da marca molecular à marca morfológica

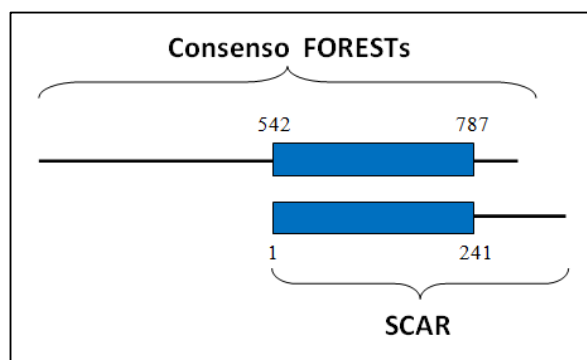
	Observado (O)	Esperado (E)	$\chi^2 = \frac{(O - E)^2}{E}$
<b>Normal com banda</b>	62	66,67	0,33
<b>Normal sem banda</b>	138	133,33	0,16
<b>Anormal com banda</b>	50	50	0,0
<b>Total</b>	250	250	0,49

A ligação da marca molecular com o marcador morfológico mostra que a região do genoma em que se encontra o SCAR está relacionada à anomalia.

### 5.3 Análise *in silico* da seqüência SCAR

#### 5.3.1 Busca de homólogos em eucalipto – banco de dados FORESTs-FAPESP

No banco de dados de ESTs de eucalipto FORESTs-FAPESP a seqüência SCAR apresentou similaridade a um consenso de 841 pb (score 165, 3e -40). O EST e o SCAR alinharam-se em uma região de 246 pb com identidade de 84%. A figura 8 esquematiza o alinhamento da seqüência do SCAR com o consenso do banco de dados FORESTs- FAPESP.



**Figura 8:** Esquema de alinhamento entre a seqüência do SCAR e o consenso do banco de ESTs de eucalipto FORESTs- FAPESP. A barra azul simboliza a região em que as seqüências são similares.

O consenso do FORESTs foi traduzido no site *Expasy* (Gasteiger et al., 2003) e a proteína gerada de 159 aminoácidos, quando analisada no PFAM (Finn et al. , 2008), apresentou identidade ao domínio *Bet v 1*, sendo o alinhamento do aminoácido 1 ao 155 (2.3e -56) . Resultados idênticos foram obtidos utilizando a proteína predita no site *softberry*. A proteína *Bet v 1*, de 17-KDa, pertence à família 10 das proteínas *pathogenesis-related* (PR-

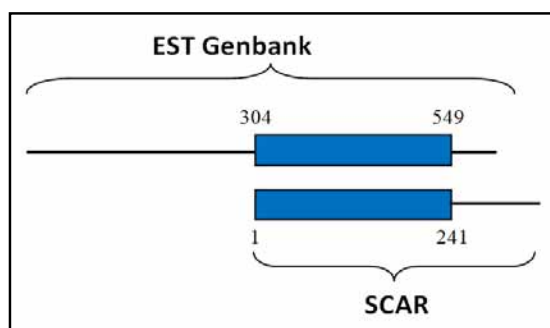
10) (Breiteneder et al., 1989) as quais são induzidas por estresse, ataque de patógenos e estímulo abiótico (Hoffmann-Sommergruber, 2000).

A proteína predita no *softberry* apresentou uma ORF (*Open Reading Frames*) de 480 pb, que corresponde a região da posição 84 até 563 do EST. Os genes das homólogas da *Bet v 1* possuem ORFs de 465 a 480 pb (Wen et al., 1997), reforçando que a sequência de eucalipto estudada é um provável membro dessa família.

Os nucleotídeos 561, 562 e 563 do consenso do FORESTs correspondem ao códon de parada (stop códon). A região a partir do nucleotídeo 563, portanto, corresponde a região 3' UTR do gene. O SCAR começa a similaridade com o EST a partir do nucleotídeo 542 do EST, bem próximo ao stop códon, assim, praticamente toda a sequência genômica do SCAR corresponde à região 3'UTR do gene em questão.

### 5.3.2- Busca de homólogos em eucalipto – Banco de dados *GenBank*

No banco de dados GenBank, a sequência SCAR apresentou similaridade a um EST de 632 pb (score 246,  $9e-62$ ) em uma região de 246pb com identidade de 84%. A figura 9 esquematiza o alinhamento da sequência do SCAR com a sequência do EST do banco de dados GenBank.



**Figura 9:** Esquema de alinhamento entre a sequência do SCAR e o EST do banco de dados GenBank. A barra azul simboliza a região em que as sequências são similares.

A proteína predita para o EST do GenBank de 92 aa também apresentou o domínio *Bet v 1*, a identidade foi do aminoácido 1 a 88 (2e -18).

### **5.3.3 Busca de homólogos em outras espécies – banco de dados GenBank**

O EST do GenBank e o consenso do FORESTs apresentaram como primeiro resultado de BLASTX uma proteína hipotética de *Vitis vinifera* de 159 aminoácidos . A similaridade foi em uma região de 100 aminoácidos, com identidade de 67% (8e -33). Em análise no PFAM, essa proteína hipotética também apresentou o domínio bet v1.

### **5.3.4 Relação entre o EST e o SCAR**

Tanto pela análise realizada no banco de dados FORESTs quanto pelo GenBank pode-se observar que a identidade do SCAR ao EST restringe-se a região 5' do SCAR. A região 3' do SCAR, que não apresenta similaridade aos ESTs, é então potencialmente relacionada ao polimorfismo dos indivíduos anômalos e normais desta população. É importante ressaltar que a região 5' do SCAR que inclui o *primer* RAPD, apresentou 100% de identidade aos dois ESTs.

## **5.4 Southern Blotting**

A técnica de *southern blotting* foi utilizada para identificar o número de cópias da região de interesse

### 5.4.1 Extração de DNA

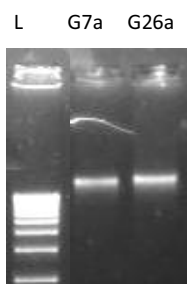
Para a técnica de *southern blotting* é necessária grande quantidade de DNA de qualidade para digestão com endonucleases, porém o eucalipto possui muitos compostos secundários que dificultam a extração de DNA. Para se obter DNA em grande quantidade e próprio para uso na técnica, foram necessárias algumas padronizações no protocolo de extração. Padronizado o protocolo de extração, extraiu-se DNA de tecido foliar dos genitores G7 e G26. O DNA extraído apresentou quantidade e qualidade de DNA satisfatórias (tabela 2).

**Tabela 2-** Quantificação no espectrofotômetro NanoDrop (ND1000<sup>®</sup>) das amostras extraídas pelo protocolo de *maxi-prep*. descrito por Weising et al. (2005) com modificações

Espécie – Amostra	Concentração (ng/ µl)	Concentração	
		260/280*	260/230*
G07a	1198,0	1,99	1,99
G07b	732,3	1,97	1,79
G26a	1669,5	1,97	1,99
G26b	1406,8	1,97	1,98

\*razões de absorbância

As amostras G7a e G26a apresentaram as maiores quantidades de DNA, e por isso, foram selecionadas para digestão enzimática. A ausência de arrasto no gel de agarose (figura 10) confirma que o DNA das amostras selecionadas não estava degradado.



**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% com DNA extraído dos genitores pelo protocolo *maxi-prep*, descrito por Weising et al. (2005) com modificações. **Legenda- G7a:** genitor G07. **G26a:** genitor G26. **L:** *ladder* 1 Kb (Invitrogen®).

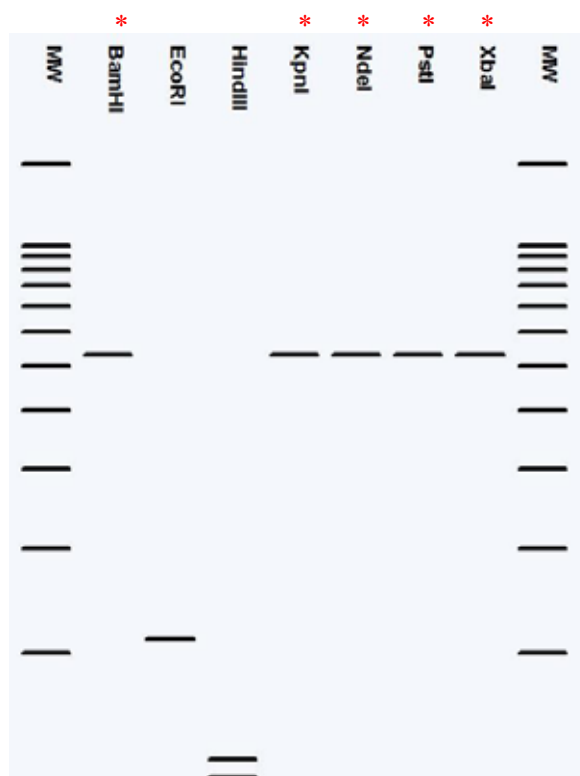
#### 5.4.2 Restrição enzimática

Dentre as enzimas analisadas para uso na técnica de *southern blotting*: EcoRI, HindIII, BamHI, NdeI, PstI, KpnI e XbaI, as cinco últimas não possuíam sítio de restrição na seqüência alvo (Tabela 3).

**Tabela 3-** Enzimas de restrição analisadas pelo *software* pDraw 32 1.1.100 quanto ao número de sítios de restrição na seqüência de DNA utilizada como sonda na técnica de *southern blotting*

Enzima	número de sítios
EcoRI	1
HindIII	1
NdeI	0
PstI	0
KpnI	0
XbaI	0
BamHI	0

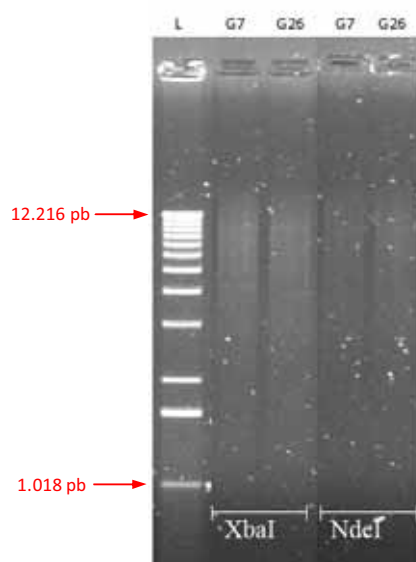
A figura 11 mostra a digestão do DNA alvo com as enzimas selecionadas em um gel de agarose virtual gerado no programa pDraw 32 1.1.100.



**Figura 11:** Gel de agarose virtual gerado pelo programa pDraw 32 1.1.100 da digestão da região alvo com algumas enzimas de restrição selecionadas. As enzimas marcadas com asterisco são aquelas que não possuem sítio de restrição na região alvo, sendo estas as selecionadas para a técnica de *southern blotting*. **Legenda-** MW: marcador molecular *ladder* 50 pb (Invitrogen®).

As enzimas NdeI, PstI, KpnI, XbaI e BamHI foram testadas para digestão do DNA, porém os produtos das digestões com as enzimas PstI, KpnI e BamHI, apresentaram excesso de DNA não digerido na parte superior do gel e presença de algumas bandas no decorrer dos arrastos de DNA, e essas enzimas foram descartadas. Somente as digestões com as enzimas

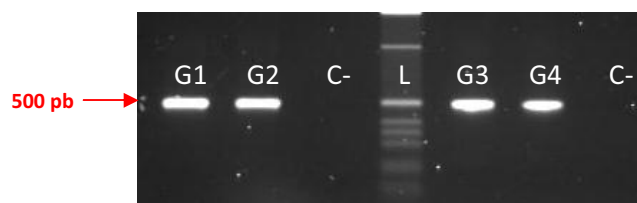
Nde e Xba mostraram-se ideais (figura 12) e foram então selecionadas para uso na técnica de *southern blotting*.



**Figura 12:** Eletroforese em gel de agarose 0,7% com DNA digerido utilizando as enzimas: XbaI e NdeI. **Legenda- L:** marcador *ladder* 1 kb (invitrogen®).

#### 5.4.3 Obtenção da sonda

Para a realização da técnica de *southern blotting* utiliza-se uma sonda que se hibridiza ao DNA alvo, para isso, utilizou-se o par de *primers* SCAR a fim de reproduzir a seqüência polimórfica entre os materiais contrastantes (figura 13).



**Figura 13:** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da amplificação de indivíduos anômalos utilizando o *primer* SCAR. **Legenda- L:** marcador *ladder* 1 Kb (invitrogen®). **C-:** controle negativo.

Os produtos amplificados quando recortados do gel e purificados com o kit *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen®) apresentaram as concentrações e razões de absorbância descritas na tabela 4.

**Tabela 4-** Quantificação no espectrofotômetro NanoDrop (ND1000®) dos produtos amplificados com o *primer* SCAR e purificados através do Kit *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen®).

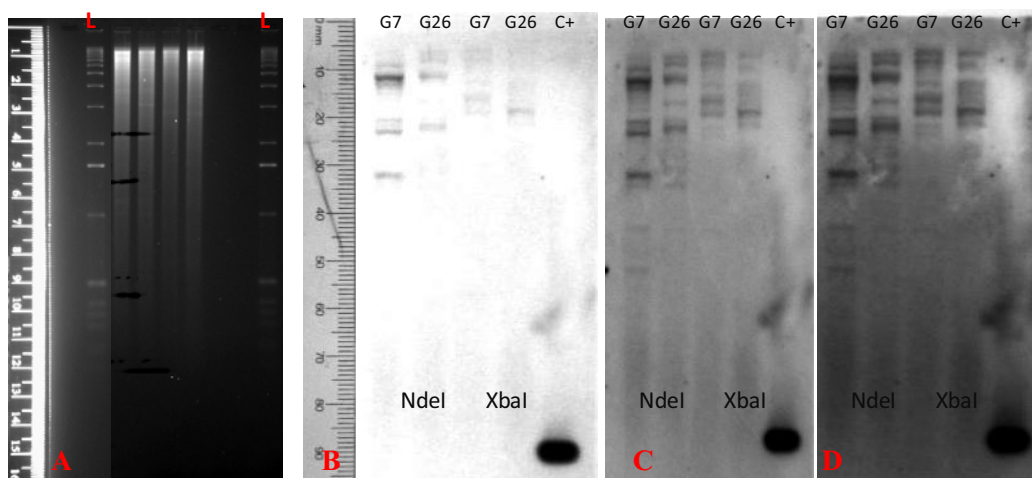
Espécie – Amostra	Concentração		
	(ng/ µl)	260/280*	260/230*
G1	3,77	3,08	0,26
G2	3,17	2,38	0,30
G3	1,57	-3,41	0,17
G4	13,10	1,79	0,22

\* razões de absorbância

A amostra G4, por apresentar maior quantidade e qualidade de DNA, foi selecionada como sonda na técnica.

#### 5.4.4 Número de cópias da região de interesse

A figura 14 mostra o gel de agarose com as amostras digeridas e as chapas de raios X após variados tempos de exposição ao sinal quimioluminescente. As amostras foram feitas em duplicata, porém aqui foi mostrada apenas uma das réplicas já que o resultado se repetiu.



**Figura 14:** Amostras digeridas com endonucleases e chapas de raios X após variados tempos de exposição ao sinal quimioluminescente. **A:** Gel de agarose 1% das amostras digeridas com NdeI e XbaI. **B:** chapa de raios X revelada após 30 minutos de exposição ao sinal. **C:** chapa de raios X revelada após 1 hora de exposição ao sinal. **D:** chapa de raios X revelada após 2 horas de exposição. **Legenda-** L: marcador ladder 1 Kb (Invitrogen®); **G07:** genitor (indivíduo de *E. grandis*); **G26:** genitor (indivíduo de *E. grandis*); **C+:** controle positivo.

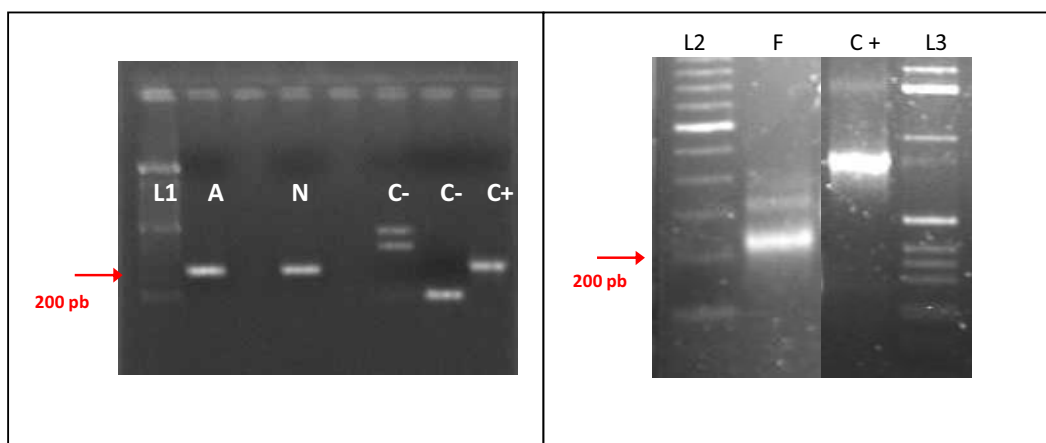
Nas chapas de raios X podem-se observar múltiplas bandas, demonstrando a existência de várias cópias desta região no genoma de eucalipto, isso porque o gene em estudo faz parte de uma família multigênica. O número de cópias dos genes das PR-10 varia entre diferentes espécies de bétula, devido a processos evolutivos, tais como duplicação, extinção e recombinação (Schenk et al., 2009). Gao et al., 2005 demonstraram que a família de genes Mal d 1 consiste de pelo menos 18 membros.

A existência de várias cópias no genoma dificulta a clonagem da região relacionada à anomalia. Uma estratégia seria repetir a técnica com maior número de enzimas e com outra sonda mais específica. A sonda poderia ser obtida utilizando iniciadores desenhados na região do SCAR não similar ao EST. Assim, com uma sonda mais específica talvez seria possível identificar a cópia de interesse. Outra estratégia seria utilizar o banco de dados do genoma completo do eucalipto que estará totalmente disponível ainda este ano.

### 5.5 *Race 3'*

A técnica de *race 3'* foi realizada na tentativa de elucidar a região 3' transcrita da região de interesse.

Na técnica de *race 3'* duas reações de amplificação foram realizadas. Na primeira amplificação utilizou-se o *primer* gene-específico externo (GSA1) e na segunda utilizou-se o produto da primeira amplificação e o *primer* gene-específico interno (GSA2). A figura 15 apresenta os géis de agarose dos produtos amplificação *nested* com o *primer* GSA2.

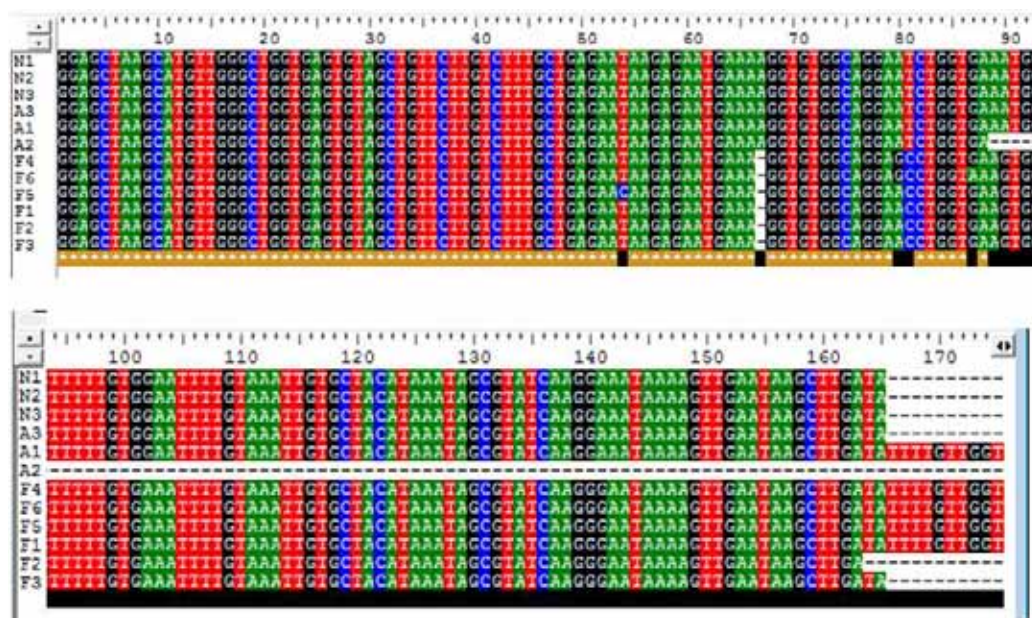


**Figura 15:** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação *nested* com o *primer* GSA2. **Legenda-** A: indivíduo anormal da população F1. N: indivíduo normal da população F1. F: indivíduo de *E. grandis* de outra população não relacionada à anomalia. C+: controle positivo. C-: controle negativo. L1: marcador ladder 100pb (Fermentas®). L2: marcador ladder 100 pb (Invitrogen®). L3: marcador ladder 1 Kb (Invitrogen®).

Os fragmentos de aproximadamente de 200 pb dos indivíduos A, N e F foram recortadas do gel e purificadas.

O fragmento isolado e purificado de cada indivíduo foi clonado e as colônias foram selecionadas para seqüenciamento. O seqüenciamento de algumas colônias resultaram em seqüência de má qualidade, e por isso foram descartadas. Em seguida, um consenso foi formado para cada colônia: seis consensos para o indivíduo de *E. grandis* da população não

relacionada a anomalia (F1 a F6), três consensos para o indivíduo normal (N1 a N3) e três consensos para o indivíduo anormal (A1 a A3) (figura 16).



**Figura 16:** Alinhamento das seqüências dos consensos obtidas através da técnica de *race 3'*. As seqüências foram alinhadas no programa ClustalX 2.0.11. **Legenda-** N: indivíduo normal da população F1 segregante para anomalia (clones 1, 2 e 3). A: indivíduo anômalo da população F1 segregante para anomalia (clones 1, 2 e 3). F: indivíduo normal da população não relacionada a população F1 segregante para anomalia (clones 1,2 3, 4, 5 e 6).

A partir do alinhamento de todas as seqüências consensos obtidas, verificou-se dois tipos de seqüências referentes ao tamanho: a seqüência do tipo 1 com 174 nucleotídeos e a seqüência do tipo 2 com 164 nucleotídeos. Quando se fez a comparação entre as duas seqüências observou-se 100% de identidade entre elas (1e -85) e 0% de *gaps*. A seqüência do tipo 1 apresentou 10 nucleotídeos a mais que a seqüência do tipo 2. Essa diferença de tamanho dos clones pode ser devida a presença de várias cópias do gene no genoma. Na reação de PCR as várias cópias podem ter sido amplificadas gerando uma população de seqüências com pequenas variações de tamanhos constituindo uma única banda em gel de agarose. Mas é importante ressaltar a alta similaridade entre elas.

No alinhamento de todos os consensos, não houve diferença entre o indivíduo normal do indivíduo anômalo, todos apresentaram os dois tipos de sequência.

Pode-se observar que todos os clones do indivíduo F (F1 a F6) não apresentam na posição 67 o nucleotídeo “A” que os outros indivíduos apresentam. Na posição 81 todos os clones do indivíduo F (F1 a F6) apresentam o nucleotídeo “C” enquanto nos demais existe um “T”, na posição 90 apresentam “G” enquanto nos demais é um “A” e na posição 141 apresentam um “G” no lugar do “A”. O clone 2 do indivíduo A (A2) possui uma sequência menor que as demais, de apenas 88 nucleotídeos.

#### ***Comparação dos Consensos do Race com a sequência SCAR***

Na comparação entre as sequências do *race* e a sequência SCAR, a sequência 1 (174 pb) apresentou identidade de 88% ao SCAR (514 pb) em uma região de 120 pb ( $4e^{-40}$ ). O mesmo resultado foi encontrado para a sequência 2 (164 pb).

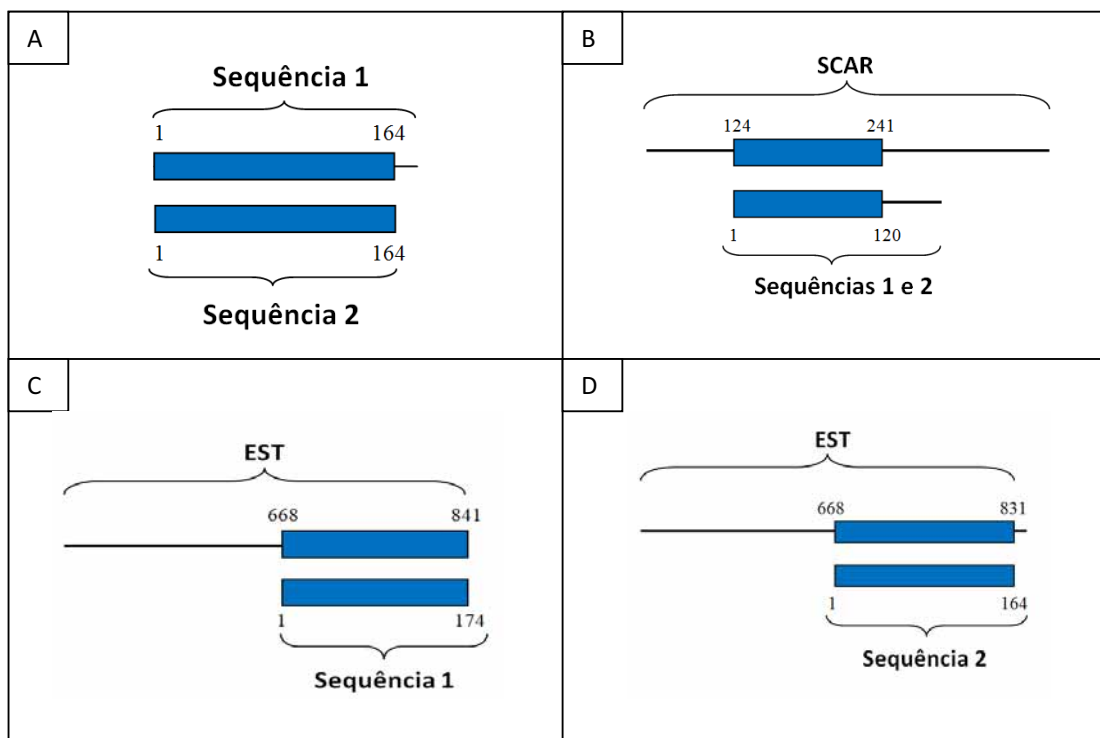
#### ***Comparação dos consensos do Race com o consenso do FORESTs***

Na comparação da sequência 1 (174 pb) com a sequência do consenso do FORESTs, as sequências apresentaram similaridade em uma região de 174 pb com identidade de 95% ( $1e^{-79}$ ). A sequência 2 (164 pb) foi similar ao consenso do FORESTs em uma região de 164pb, com identidade de 95% ( $3e^{-74}$ ).

#### ***Comparação dos consensos do Race com o EST do GenBank***

Quando se comparou a sequência 1 (174 pb) com o EST do GenBank as sequências foram similares em uma região de 164 pb, com identidade de 93% ( $1e^{-71}$ ). Os mesmos resultados foram obtidos para a sequência 2.

Para simplificar e facilitar as comparações escolheu-se o consenso do FORESTs para esquematizar o alinhamento das seqüências e realizar o restante das análises. A figura 17 esquematiza os alinhamentos das seqüências.



**Figura 17:** Esquema de alinhamento dos consensos do *race*. **A:** alinhamento entre a seqüência 1 e a seqüência 2. **B:** alinhamento do SCAR com as seqüências 1 e 2. **C:** alinhamento entre o consenso do banco de ESTs de eucalipto FORESTs-FAPESP e a seqüência 1. **D:** alinhamento entre o consenso do banco de ESTs de eucalipto FORESTs-FAPESP e a seqüência 2. A barra azul simboliza a região em que as seqüências são similares.

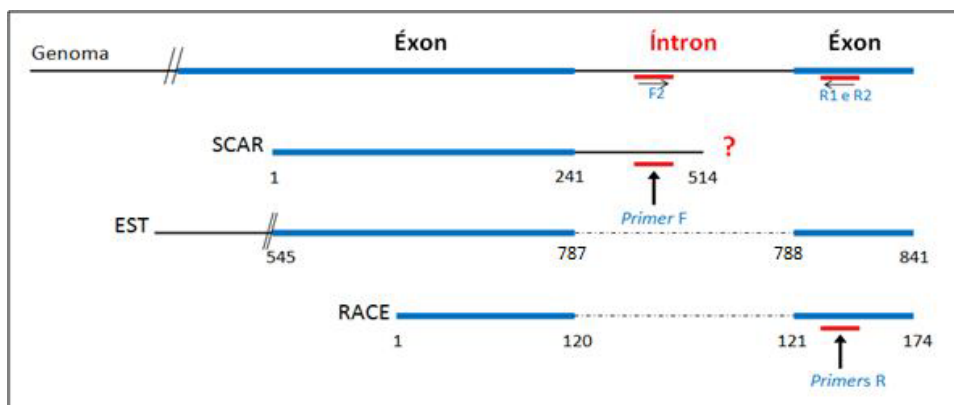
Em relação à similaridade entre o EST e o *race*, a seqüência do *race* foi similar até as últimas bases do EST, indicando que a seqüência transcrita está completa na porção 3'. Podemos observar que a similaridade existente entre as seqüências obtidas com a técnica de *race* 3' e a seqüência do EST é a partir do nucleotídeo 668 do EST, após o código de parada (nucleotídeos 561, 562, 563), portanto, as seqüências obtidas com o *race* 3' correspondem à região 3' UTR do gene.

Tanto os ESTs quanto o *race* terminam a similaridade com o SCAR no mesmo ponto (base 241 do SCAR). Como o EST e o *race* têm similaridade entre si até o final da porção 3' e a sequência do *primer* RAPD não está presente no consenso do *race*, isto sugere que a porção 3' final do SCAR (241 - 514) seja um íntron. Este íntron, portanto, estaria localizado entre os nucleotídeos 787 e 788 do EST do FOREST e 549 e 550 do EST do GenBank, o que corresponde à região 3' UTR do gene.

A maioria dos íntrons são encontrados dentro de sequências codificantes (CDS), porém um pequeno, mas significativo número de íntrons são também encontrados dentro de regiões não traduzidas (5'UTR e 3'UTR) de sequências expressas (Chung et al., 2006). Os íntrons são muitas vezes necessários para a plena expressão de genes em organismos tão diversos como plantas, insetos, nematóides, levedura e mamíferos (Rose, 2004), são eles que efetivamente modulam a expressão gênica, tanto no sentido positivo quanto no sentido negativo (Bourdon et al, 2001). Chung et al., 2006 demonstraram que a presença de um íntron na região 5'UTR do gene EF1 $\alpha$  de *A. Thaliana* afetava a expressão do gene.

## 5.6 Desenho de iniciadores específicos

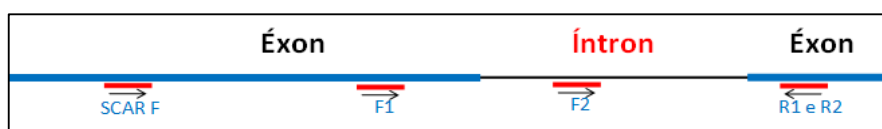
A fim de verificar a presença do íntron na região de interesse, foram desenhados e sintetizados iniciadores específicos a partir do resultado da técnica de *race* 3', sendo um *primer forward* e dois *primers reverses*. O *primer forward*, F2, foi desenhado na porção 3' da sequência do SCAR (396 - 415 nt). Os *primers reverses*, R1 e R2, foram desenhados na região 3' (não similar ao SCAR) do consenso do *race* (R1: 130 - 161 nt e R2: 138 - 158 nt). O esquema que mostra onde os *primers* foram desenhados aparece na figura 18.



**Figura 18:** Esquema com o alinhamento da sequência do SCAR, EST e *race* mostrando onde os *primers forward* e *reverse* foram desenhados.

### 5.6.1 Testes dos iniciadores específicos

Várias combinações de *primers* foram testadas a fim de amplificar a sequência completa do possível íntron. A figura 19 ilustra os *primers* utilizados para a amplificação.



**Figura 19:** Esquema ilustrando a localização das sequências dos *primers* utilizados para amplificar o íntron. **Legenda-** **F1:** *primer forward* 1 (GSA2 da técnica 3'race). **F2:** *primer forward* 2. **R1:** *primer reverse* 1. **R2:** *primer reverse* 2. **SCAR F:** *primer forward* SCAR.

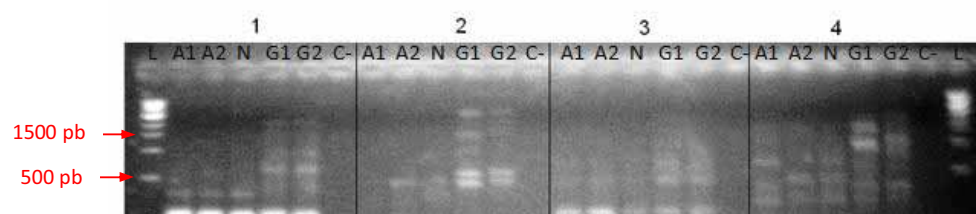
As combinações de *primers* testadas aparecem na tabela 5. O primeiro teste de amplificação foi realizado com a combinação 4 em diferentes temperaturas de pareamento dos *primers* (42°C a 47°C). Utilizou-se na reação de amplificação 1x master mix (Promega<sup>®</sup>), 100 ng de DNA e 0,25 µM de cada *primer*. A reação foi realizada em programa

de amplificação PCR padrão. Porém em todas as temperaturas testadas nenhum fragmento foi observado.

**Tabela 5-** Condições testadas para amplificação do possível íntron existente na região de interesse.

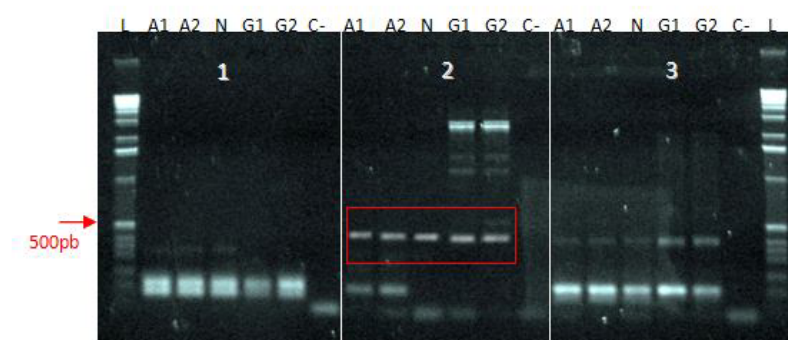
Combinação	Primers	Temperatura de pareamento dos primers	Programa de amplificação
1	R1XF1	41°C; 45°C; 52°C	PCR padrão; <i>Hemi-nested</i> (55°C); <i>Hemi-nested</i> (45°C)
2	R1 X F2	41°C; 45°C	PCR padrão
3	R2 X F1	41°C; 45°C	PCR padrão ; <i>Hemi-nested</i> (45°C)
4	R2 X F2	41°C; 42°C; 43°C, 44°C; 45°C; 46°C; 47°C	PCR padrão
5	SCAR F X R2	45°C	PCR padrão
6	SCAR F X R1	52°C	PCR padrão

Outro teste de amplificação foi realizado com as combinações 1, 2, 3 e 4 modificando a temperatura de pareamento dos *primers* para 41°C em uma reação com 1 unidade de Taq DNA polimerase, 50 ng de DNA, 0,5 mM de dNTPs . Desta vez houve a amplificação de muitos fragmentos, impossibilitando identificar o de interesse (Figura 20).



**Figura 20:** Eletroforese em gel de agarose 1% com produtos da amplificação com diversas combinações de *primers* para amplificar o possível íntron presente na região de interesse. **Combinações:** 1- R1XF1. 2- R1 X F2. 3- R2 X F1. 4- R2 X F2. **Legenda-** A1: indivíduo anormal do *bulk*. A2: indivíduo anormal do *bulk*. N: indivíduo normal do *bulk*. G1 e G2: indivíduos *E. grandis* puros de outra população. C-: controle negativo. L: marcador *ladder* 1 Kb (*New England- Biolabs*®).

Outro teste foi realizado com as combinações de *primers* 1, 2 e 3, alterando somente a temperatura de pareamento do *primer* para 45°C a fim de tornar a reação mais específica (figura 21). Um fragmento de aproximadamente 500 pb (figura 21) foi isolado e posteriormente clonado e seqüenciado. Porém, quando as seqüências foram analisadas verificou-se que não era a de interesse.



**Figura 21:** Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos da amplificação com diversas combinações de *primers* para amplificar o possível íntron presente na região de interesse. Combinações: 1- R1XF1. 2- R1 X F2. 3- R2 X F1. **Legenda-** A1: indivíduo anormal do *bulk*. A2: indivíduo anormal do *bulk*. N: indivíduo normal do *bulk*. G1: indivíduo *E. grandis* puro de outra população. G2: indivíduos *E. grandis* puro de outra população. L: marcador *ladder* 1 Kb (Invitrogen®).

Em outro teste, optou-se por realizar uma reação *Hemi-nested touchdown* PCR, descrita por Huang e Cloutier (2007), na qual a temperatura de pareamento do *primer* foi progressivamente reduzida de 65°C para 55°C, diminuindo 0,5°C a cada ciclo; seguidos por 15 ciclos adicionais de 55°C. Nesse tipo de PCR, utiliza-se o produto da primeira amplificação em uma segunda reação com um dos *primers* da primeira amplificação e um *primer* mais interno à região alvo. Neste caso, foi usado na primeira amplificação a combinação de *primers* 1 (F1 x R1) e na segunda amplificação seria utilizada a combinação 2 (F2 x R1).

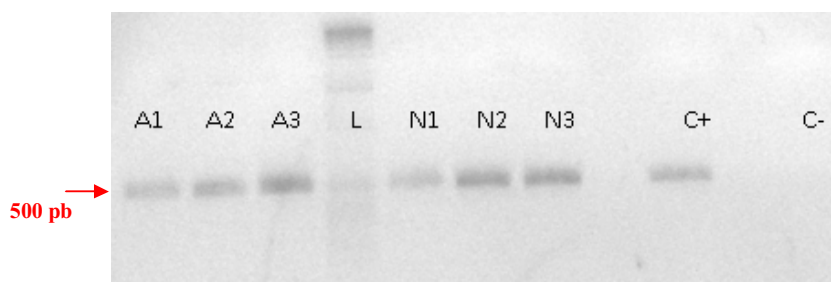
Porém, quando se realizou a primeira amplificação o fragmento gerado não correspondia ao fragmento de interesse, pois possuía um tamanho menor que o mínimo esperado. Outra reação foi realizada com as combinações 1 e 3 utilizando o mesmo programa *Hemi-nested touchdown* PCR porém com a temperatura de pareamento do *primer* progressivamente reduzida de 55°C para 45°C, diminuindo 0,5°C a cada ciclo, seguidos por 15 ciclos adicionais de 45°C. Novamente o fragmento gerado não correspondia ao fragmento de interesse.

As combinações 1 e 6 foram realizadas em temperatura de pareamento de 52°C, e a combinação 5 em temperatura de 45°C utilizando o programa de amplificação PCR padrão. Porém, não obteve-se o fragmento de interesse nas combinações de *primers* testadas.

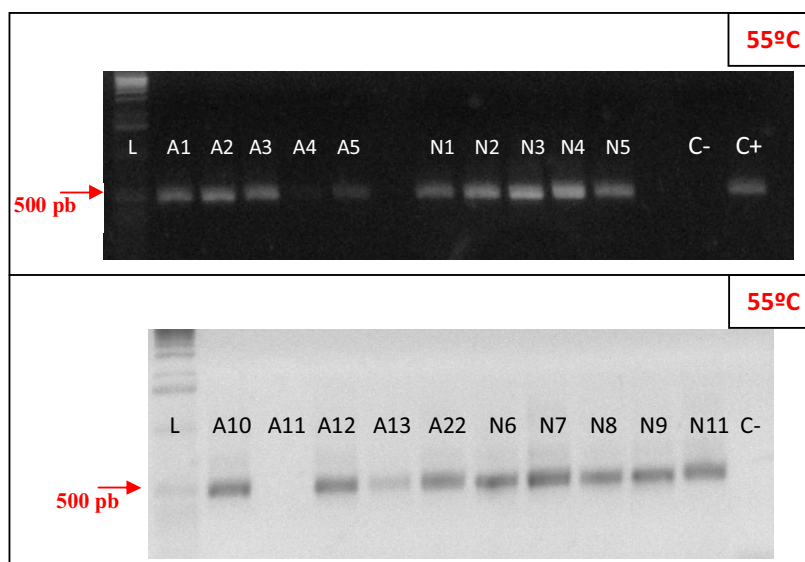
Até o momento, apesar de vários testes realizados com diversas combinações de *primers* em diferentes temperaturas de pareamento e programas de amplificação, não foi possível amplificar a seqüência do íntron da região de interesse.

### **5.7 Teste do marcador SCAR na população F1 para aplicação em programas de melhoramento genético**

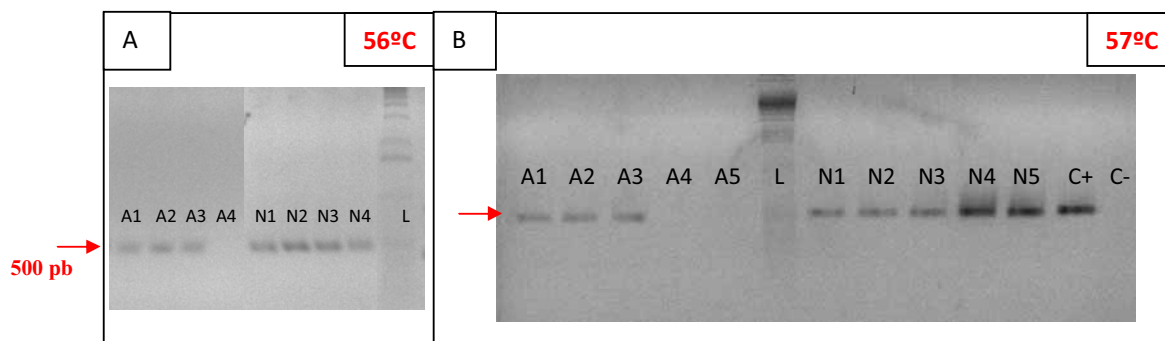
Nos testes de amplificação do marcador SCAR nos indivíduos da população F1 a maioria dos indivíduos, normais e anômalos, amplificaram o fragmento de 514 pb. Nas reações de PCR com gradiente de temperatura, quando a temperatura é baixa, e portanto a reação menos específica, a banda aparece em todos os indivíduos testados, normais e anômalos (figura 22). À medida que se aumenta a temperatura, alguns indivíduos anômalos não apresentam mais a marca (figuras 23 e 24).



**Figura 22:** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da amplificação de indivíduos da população F1 segregante para o caráter da anomalia utilizando o *primer* SCAR à temperatura de 54°C. **Legenda-** L: marcador *ladder* 1 Kb (invitrogen®). C+: controle positivo. C-: controle negativo. A: indivíduo anormal. N: indivíduo normal

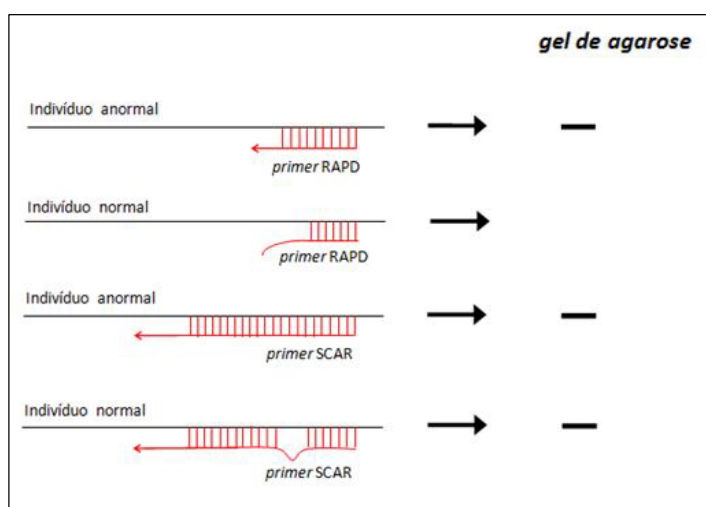


**Figura 23:** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da amplificação de indivíduos da população F1 segregante para o caráter da anomalia utilizando o *primer* SCAR à temperatura de 55°C. **Legenda-** L: marcador *ladder* 1 Kb (invitrogen®). C+: controle positivo. C-: controle negativo. A: indivíduo anormal. N: indivíduo normal



**Figura 24:** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da amplificação de indivíduos da população F1 segregante para o caráter da anomalia utilizando o *primer* SCAR. **A:** temperatura de 56°C. **B:** temperatura de 57°C. **Legenda-** L: marcador *ladder* 1 Kb (invitrogen®). C+: controle positivo. C-: controle negativo. A: indivíduo anormal. N: indivíduo normal

Outros indivíduos foram testados nas mesmas temperaturas e os resultados se repetiram. Portanto, o polimorfismo existente na região do sítio de pareamento do *primer* RAPD deve ser do tipo SNP, ou então, uma diferença em poucas bases, na região de pareamento dos *primers*, entre os indivíduos normais e anômalos da população, uma vez que *primer* RAPD só amplificou o fragmento nos indivíduos anômalos e em um terço (1/3) dos normais (os heterozigotos para o gene de efeito principal da anomalia) e apresentou ligação completa ao gene de efeito principal para a característica da anomalia. Como a região alvo é conservada, quando 12 bases são acrescentadas ao *primer* RAPD para formar o *primer* SCAR, essas bases adicionais dão estabilidade ao *primer* que se parecia com a região (mesmo que não seja um pareamento completo) e amplifica o fragmento de 514pb na maioria dos indivíduos normais também. A figura 25 mostra um esquema do pareamento dos *primers* RAPD e SCAR à região alvo. Lembrando que, o polimorfismo existente é na região 3', portanto, no sítio de pareamento do *primer* SCAR *Reverse*.



**Figura 25:** Esquema ilustrando o pareamento dos *primers* RAPD e SCAR nos indivíduos anômalos e normais e conseqüente amplificação ou não do fragmento de 514 pb.

É importante ressaltar que o *primer* RAPD amplificou o fragmento polimórfimo de 514pb em todos os indivíduos anômalos e em 33% dos indivíduos normais testados por Tambarussi, 2006. Assim, o marcador RAPD foi eficiente em identificar 100% dos indivíduos afetados e identificar os normais heterogizotos, o que demonstra que a hipótese é consistente e confiável. Porém, o *primer* SCAR obtido a partir do RAPD não apresentou a eficiência esperada, devendo ser re-desenhado.

A técnica de *GenomeWalker* pode representar uma estratégia a ser desenvolvida. Através da técnica, a região 3' e 5' do gene pode ser obtida, assim como os sítios do pareamento do *primer* RAPD. Desta maneira, pode ser possível identificar o polimorfismo existente e então desenvolver um *primer* mais específico. O desenvolvimento de um marcador que seja eficiente em identificar precocemente indivíduos portadores de um alelo deletério é de extrema importância para seleção assistida em programas de melhoramento da espécie.

A seleção assistida por marcadores (SAM), ainda não é empregada como rotina em programas de melhoramento de espécies florestais, apesar de, em eucalipto existir vários

mapas genéticos e marcadores moleculares ligados a genes de características de interesse, como qualidade da madeira (Grattapaglia et al., 1996 ; Verhaegen et al., 1997; Myburg, 2001; Thamarus et al, 2004), florescimento precoce (Missiaglia et al., 2005; Domingues et al., 2006, Bortoloto et al., 2009) e resistência à ferrugem (Junghans et al., 2003; Zamprogno et al., 2008; Teixeira, 2009). A SAM é empregada com sucesso nos programas de melhoramento de culturas como tomate (Foolad e Sharma, 2005), trigo (Kunchell et al, 2007) e arroz (Nguyen et al., 2003).

### **5.8 Amplificação da sequência SCAR em diferentes indivíduos**

A sequência SCAR foi obtida para os diferentes indivíduos: três indivíduos anormais do *bulk* (A1, A3 e A5), um indivíduo normal do *bulk* (N12) e dois indivíduos normais de população não relacionada (BAC e Brasuz).

Das amostras seqüenciadas, algumas apresentaram sequência de má qualidade e foram excluídas. Apenas três colônias do indivíduo A1, duas colônias do indivíduo A3, três colônias do indivíduo A5, três colônias do indivíduo N12, três colônias do indivíduo BAC e três colônias do indivíduo Brasuz apresentaram seqüências de boa qualidade e foram utilizadas para formar os consensos. Assim, formou-se um consenso para cada colônia de cada indivíduo, ou seja, para o indivíduo A1 formou-se três consensos (A1 colônia 1, A1 colônia 2, A1 colônia 3) e assim por diante. A diversidade existente entre as seqüências dos diferentes clones de um mesmo indivíduo impossibilitaram a formação de um consenso para cada indivíduo.

As seqüências geradas no sequenciamento do SCAR nos diferentes indivíduos apresentaram grandes diferenças, tanto entre os diferentes indivíduos quanto entre os

diferentes clones do mesmo indivíduo. Essa diferença dentro do mesmo indivíduo, pode ser porque o indivíduo seja heterozigoto, ou então, devido a existência de várias cópias no genoma da região de interesse. Vários SNPs foram observados, assim como deleções e inserções. Porém, nenhuma diferença que fosse exclusiva dos indivíduos anômalos e que os diferenciasse dos demais foi observada. Uma colônia de um indivíduo normal (N clone5) e uma colônia de um indivíduo anormal (A5 clone 1), foram as que apresentaram as maiores diferenças em relação as demais. A sequência do indivíduo normal, de 547 pb, apresentou adição de 43 nucleotídeos na posição 406 a 448; e uma deleção (GAP) de duas bases na posição 186/187. A sequência do indivíduo anômalo de 462 pb, apresentou deleção (GAP): de um nucleotídeo na posição 74/75 e 100/101, 17 nucleotídeos na posição 240/241, 11 nucleotídeos na posição 247/248, 9 nucleotídeos na posição 256/257, 8 nucleotídeos na posição 271/272, 3 nucleotídeos na posição 317/318; além da inserção de duas guaninas (G) nas posições 110 e 111 e uma Adenina (A) na posição 125.

Essa diversidade de sequências reforça que a região de interesse pertence a uma família multigênica, apresentando-se assim em várias cópias no genoma da espécie. Gao et al., 2005 identificaram 37 diferentes sequências de DNA genômico para Mal d 1 em maçã, que representavam 18 genes.

Uma análise mais detalhada e o seqüenciamento de um número maior de indivíduos, inclusive de outras populações se faz necessária para avaliar a grande diversidade de cópias existentes no genoma de eucalipto.

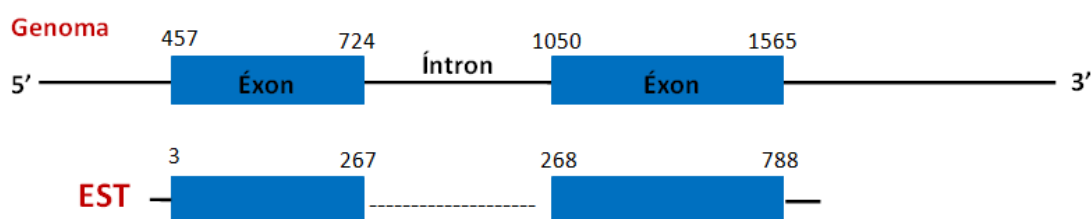
### 5.9 Análise no banco de dados do genoma de *Eucalyptus* (*EucalyptusDB*)

O genoma de *Eucalyptus grandis* está sendo atualmente seqüenciado pelo Instituto *Joint Genome* (<http://eucalyptusdb.bi.up.ac.za/>). Porém, a cobertura do genoma ainda não está completa, apresentando apenas 4,5x do genoma coberto. O objetivo é cobrir 8x o genoma de aproximadamente 600 Mbp. Desta maneira, esta análise pode ser considerada com algumas restrições, uma vez que o banco de dados de eucalipto (*EucalyptusDB*) encontra-se em construção e ainda os dados estão sendo organizados. Porém essa análise possibilita discutir e confirmar alguns resultados e hipóteses.

O Blast realizado com a sequência do SCAR no *EucalyptusDB* possibilitou a identificação de um *Scaffold* (score 476). O SCAR apresentou identidade a várias regiões deste *scaffold*, reforçando a existência de várias cópias da região de interesse no genoma. Das regiões do *scaffold* que apresentaram identidade ao SCAR, duas podem ser destacadas, a região 1 (por volta das posições 49-52mil pb) e a região 2 (por volta das posições 115-118mil pb), essas duas regiões apresentaram identidade à sequência quase completa do SCAR (1 a 512pb) (Figura 27). A identidade do SCAR às duas regiões foi de 94% (e-value 0.0). Quando essas duas regiões foram preditas em proteínas e conseqüentemente analisadas no PFAM, as duas apresentaram identidade à proteína bet v 1 (e-value 5,8e<sup>-24</sup> e 4,6e<sup>-10</sup>, respectivamente).

Segundo Hoffmann-Sommergruber et al. (1997), os homólogos da Bet v 1 geralmente possuem seqüências genômicas que consistem de dois éxons interrompidos por um íntron. A posição deste íntron é altamente conservada (Wen et al, 1997) estando localizado entre o 1º e 2º nucleotídeo do códon 62 (Hoffmann-Sommergruber et al., 1997; Handschuh et al, 2007; Schenk et al., 2009), o que corresponde à região entre o nucleotídeo 267 e 268 do EST do

FORESTs- FAPESP. O alinhamento entre o EST e as duas regiões do *scaffold* (região 1 e 2) sugerem a presença de um íntron nessa mesma posição. Com a comparação do EST do FORESTs-FAPESP (841 pb) à região 1 do *scaffold*, verificou-se a identidade da região entre os nucleotídeos 3 e 268 do EST com a região entre os nucleotídeos 457 e 725 do *scaffold* (82%, e-value  $8e^{-72}$ ) e da região do nucleotídeo 266 a 788 do EST com região entre os nucleotídeos 1048 e 1565 do *scaffold* (82%, e-value  $3e^{-178}$ ). Na comparação com a região 2 do *scaffold*, a identidade foi da região entre os nucleotídeos 3 e 268 do EST com a região entre os nucleotídeos 834 e 1106 (83%, e-value  $3e^{-77}$ ) e da região entre os nucleotídeos 265 e 788 do EST com a região do nucleotídeo 1399 a 1905 do *scaffold* (83%,  $5e^{-163}$ ). A figura 26 ilustra o alinhamento do EST à região 1 do *scaffold*.

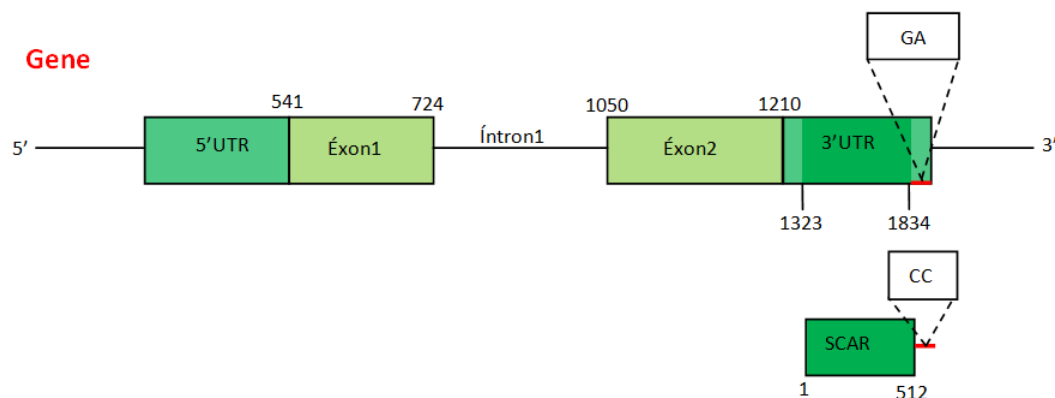


**Figura 26:** Esquema ilustrando o alinhamento do EST com a região 1 do *scaffold* do banco de dados do genoma de eucalipto (*EucalyptusDB*). As barras em azul representam as regiões em que as sequências são similares.

Através da predição da estrutura do gene no site *softberry* (opção FGGENESH) utilizando a região 1 e 2 do *scaffold* foi possível identificar que o gene é formado por 2 éxons interrompidos por um íntron na posição 724 a 1051 da região 1 (figura 27) e na posição 1105 a 1407 da região 2, que correspondem à posição entre o 1º e 2º nucleotídeo do códon 62. A presença de um sítio doador de *splice*, ou seja, um sítio de *splice* 5' na posição 725 (Threshold

6.099 -90%) e um sítio receptor de *splice*, ou seja, um sítio de *splice* 3' na posição 1049 (Threshold 4.175 - 90%) confirmam a posição do íntron entre os nucleotídeos 724 a 1051 da região 1 do *scaffold* (figura 27). Um sítio doador de *splice* na posição 1106 (Threshold 6.099 - 90%) e um sítio receptor de *splice* na posição 1401 (Threshold 4.175 - 90%), confirmam a presença de um íntron na posição 1105 a 1407 da região 2 do *scaffold*.

O alinhamento do SCAR ao *scaffold* e a estrutura do gene predita no site *softberry* utilizando a região 1 do *scaffold* apresenta-se ilustrado na figura 27.

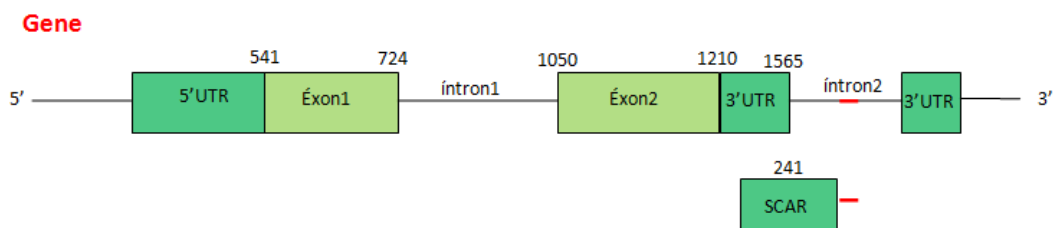


**Figura 27:** Esquema ilustrando a estrutura do gene de interesse e seu alinhamento com a sequência SCAR. A sequência de eucalipto utilizada é a região 1 do *scaffold* do banco de dados de *Eucalyptus* (*EucalyptusDB*) que apresentou maior identidade ao SCAR. São representados no esquema as regiões UTRs, éxons e íntron. Pode-se visualizar que a identidade do SCAR ao gene é da região da posição 1 a 512 do SCAR com região da posição 1323 a 1834 do gene. As duas últimas bases do SCAR (513 e 514 - em vermelho) que representam as duas primeiras bases da porção 5' do *primer* RAPD (CC) não possuem identidade à sequência genômica do banco de dados de eucalipto, na qual as bases são GA.

O alinhamento tanto da região 1 quanto da região 2 do *scaffold* com a sequência SCAR, demonstraram que as duas últimas bases da porção 3' do SCAR (CC) nas posições 513 e 514, que correspondem às duas primeiras bases da porção 5' do *primer* RAPD, não apresentam similaridade às duas bases correspondentes (GA) na sequência genômica do

banco de dados de eucalipto. Como o genoma completo de eucalipto foi obtido com o seqüenciamento de um indivíduo que não apresenta a anomalia em estudo (Brasuz), isso indica que essas duas bases iniciais do *primer* RAPD que diferem na sequência do *EucalyptusDB*, poderia ser uma das causas do não pareamento do *primer* RAPD e conseqüente não produção do fragmento de 514pb em indivíduos normais da população F1 estudada. Desta maneira, pode-se dizer que existe um polimorfismo no sítio de pareamento do *primer* RAPD em indivíduos anormais, que permite a amplificação do fragmento de 514 pb. O polimorfismo é na região 3'UTR do gene de interesse, e até o momento não foi possível determinar se é esse polimorfismo que determina o fenótipo da anomalia, mas é esse polimorfismo que diferencia indivíduos anômalos e normais. Porém, fica claro que o marcador molecular RAPD é um marcador eficiente em diferenciar indivíduos normais e anômalos. Como já discutido anteriormente, o marcador SCAR não apresentou a eficiência esperada na identificação do caráter. Os dados apresentados acima podem justificar o porquê da amplificação do fragmento em indivíduos normais, ou seja, a diferença de apenas duas bases não foram suficientes para que o *primer* SCAR (22 pb) detectasse o polimorfismo. Por outro lado, o *primer* RAPD que é constituído por 10 pb consegue detectar esse polimorfismo.

Como já discutido anteriormente no item 5.5, o alinhamento entre o consenso do *race*, os ESTs e o SCAR sugerem que a porção 3' final do SCAR (241 - 514) seja um íntron. O alinhamento do consenso do FORESTS-FAPESP e do EST do GenBank ao *scaffold* do banco de dados do genoma de eucalipto também reforçam essa hipótese, já que os dois apresentam identidade até a posição 1565 do *scaffold* que corresponde a posição 241 do SCAR. Deste modo, o polimorfismo existente no sítio de pareamento do *primer* RAPD poderia estar nesse íntron (figura 28). Porém, a hipótese da presença de um íntron ainda não foi confirmada.



**Figura 28:** Esquema ilustrando a estrutura do gene de interesse, a posição de um possível íntron na região 3'UTR onde se encontra o polimorfismo que diferencia indivíduos normais e anômalos e seu alinhamento com a sequência SCAR. A sequência de eucalipto utilizada é uma região de um *scaffold* do banco de dados de *Eucalyptus* (*EucalyptusDB*) que apresentou maior identidade ao SCAR. São representados no esquema as regiões UTRs, éxons e íntrons. Pode-se visualizar que a região a partir da posição 1565 do gene e 241 do SCAR correspondem a um íntron. A região onde se encontra o polimorfismo que diferencia indivíduos normais e anômalos está em vermelho

O polimorfismo molecular encontrado demonstrou ser eficiente na identificação de indivíduos portadores da anomalia. Iniciadores mais específicos devem ser confeccionados e validados e poderão ser disponibilizados para programas de seleção assistida por marcadores. Em relação a causa da anomalia e qual a real participação desta região genômica na formação do caráter, novos experimentos necessitam ser delineados envolvendo expressão gênica e utilização de plantas modelos. A proteína *bet v 1*, que pertence ao grupo das PRs-10, são induzidas por estresse, ataque de patógenos e estímulo abiótico (Hoffmann-Sommergruber, 2000), podendo ser moduladas por substâncias químicas, tais como, etileno, ácido abscísico, salicílico e jasmônico. Este gene parece ter funções biológicas não somente na defesa a patógenos, mas também no crescimento e desenvolvimento vegetal (Liu e Ekramoddoullah, 2004). Certas isoformas de proteínas PRs são expressas constitutivamente em alguns órgãos ou durante determinados estágios do desenvolvimento (Hoffmann-Sommergruber, 2002).

Por outro lado, existe a hipótese de que o polimorfismo encontrado esteja estritamente ligado a outra região genômica que poderia ser a responsável direta ou indireta pelo caráter estudado.

## 6. CONCLUSÕES

- As marcas, morfológica e molecular, encontram-se ligadas e não há taxa de recombinação entre elas, portanto, o marcador molecular está relacionado à anomalia.
- A sequência estudada é homóloga da proteína *bet v 1* e está presente em várias cópias no genoma de eucalipto.
- A região 5' do SCAR que inclui a sequência do *primer* RAPD, apresenta identidade completa aos ESTs dos bancos de dados GenBank e FORESTs-FAPESP, ao consenso do *race* 3' e ao *scaffold* do banco de dados do genoma de eucalipto, portanto não está relacionada ao polimorfismo existente entre indivíduos normais e anômalos.
- A região 3' do SCAR que inclui a sequência do *primer* RAPD apresenta um polimorfismo de dois pares de bases em relação ao *scaffold* do banco de dados do genoma de eucalipto que diferencia indivíduos normais e anômalos.
- O polimorfismo de dois pares de bases encontrado no sítio de pareamento do *primer* RAPD impossibilitou o pareamento do *primer* RAPD em indivíduos normais da população F1 estudada.
- O gene relacionado à anomalia apresenta dois éxons interrompidos por um íntron.

## 7. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.

ANDRADE, E. D. *O eucalipto*. 1.ed. S. Paulo: Chácaras e quintais, 1939, p.8-13.

BOLLEN, M. A.; GARCIA, A.; CORDEWENER, J. H. G.; WICHERS, H. J.; ELSPER, J. P. F. G.; SAVELKOUL, H. F. J. ; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Purification and characterization of natural *Bet v 1* from birch pollen and related allergens from carrot and celery. *Molecular Nutrition & Food Research*, v.51, p.1527-1536, 2007.

BORTOLOTO, T. M.; FARRO, A. P. C.; ODA, S.; MELLO, E. J.; MARINO, C. L. Identification of molecular markers related to early flowering in *Eucalyptus grandis*. *New Forests*, 2009 (submetido).

BOURDON, V.; HARVEY, A.; LONSDALE, D. M. Introns and their positions affect the translational activity of mRNA in plant cells. *EMBO reports*, v.2, n. 5, p. 394–398, 2001.

BRACELPA- Associação Brasileira de Celulose e Papel. **Relatório anual 2008/2009**. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br>>. Acesso em: 2 mar. 2010

BREITENEDER, H; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; O'RIORDAIN, G.; SUSANI, M.; AHORN, H.; EBNER, C.; KRAFT, D.; SCHEINER, O. Molecular characterization of Api g 1, the major allergen of celery (*Apium graveolens*) and its immunological and structural relationships to a group of 17kDa tree pollen allergens. *European Journal of Biochemistry*, v.233, p.484-489. 1995.

BREITENEDER, H.; PETTENBURGER, K.; BITO, A.; VALENTA, R.; KRAFT, D.; RUMPOLD, H.; SCHEINER, O.; BREITENBACH, M. The gene coding for the major birch pollen allergen BetvI, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *The EMBO Journal*, v.8, p.1935-1938, 1989.

BREITENEDER, H.; FERREIRA, F.; REIKERSTORFER, A.; DUCHEN, M.; VALENTA R.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; EBNER, C.; BREITENBACH, M.; KRAFT, D.; SCHEINER, O. Complementary DNA cloning and expression in *Escherichia coli* of Aln g 1,

the major allergen in pollen of alder (*Alnus glutinosa*). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.90, p.909-917, 1992.

BUFE, A.; SPANGFORT, M.D.; KAHLERT, H. ; SCHLAAK, M. ; BECKER, W.M. The major birch pollen allergen, *Bet v 1*, shows ribonuclease activity. *Planta*, v.199, p.413-415, 1996.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.11, n.2, p.113-116, 1993.

CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D. The genetic basis of inbreeding depression. *Genetical Research*, v.74, p.329-340, 1999.

CHUNG, B. Y.W. ; SIMONS, C. ; FIRTH, A. E. ; BROWN, C. M. ; HELLENS, R. P. . Effect of 5'UTR introns on gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, v.7, 2006.

CRUZ, C.D. Programa GQMOL , versão 2.1: Análise de dados moleculares e associação com caracteres quantitativos. Viçosa: UFV, 1999. (software). Disponível em:  
<<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.html>>

DOMINGUES, D.S.; FARRO, A.P.C.; COSCRATO, V.E.; ODA, S.; MELLO, E.J. ; MARINO, C.L. Identificação de marcador RAPD e SCAR relacionado ao caráter florescimento precoce em *Eucalyptus grandis*. *Ciência Florestal*, v.16, p.251-260, 2006.

EMBRAPA FLORESTAS. *Sistemas de Produção*, 4 ago. 2003. Disponível em:  
<[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto/02\\_indicacao\\_de\\_especies.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto/02_indicacao_de_especies.htm)> Acesso em: 2 mar. 2010.

ESTOPA, R.A. *Comparação do desempenho no viveiro e no campo dos descendentes de clones de Eucalyptus spp. autofecundados e cruzados*. 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

FABER, C. ; LINDEMANN, A.; STICHT,H.; EJCHART, A.; KUNGL, A.; SUSANI, M.; FRANK, R.W.; KRAFT, D.; BREITENBACH, M.; ROSCH, P. Secondary structure and tertiary fold of the birch pollen allergen *Bet v 1* in solution. *The Journal of Biological Chemistry*, v.271, p.19243-19250, 1996.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas*. 3 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998, 220p

FINN, R.D.; TATE, J.; MISTRY, J.; COGGILL, P.C.; SAMMUT, J.S.; HOTZ, H.R.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; EDDY, S.R.; SONNHAMMER, E.L. ; BATEMAN, A. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, v.36, p.281-288, 2008.

FOOLAD, M.R.; SHARMA, A. Molecular markers as selection tools in tomato breeding. *Acta Horticulture*, v. 695, p. 225-240, 2005.

FRANKLIN, E. C. Genetic load in loblolly pine. *The American Naturalist*, v.106, n.948, p.262-265, 1972.

GAJHEDE, M.; OSMARK,P.; POULSEN, F.M.; IPSEN, H.; LARSEN, J.N.; VAN NEERVEN, R.J.J.; SCHOU, C.; LOWENSTEIN, H.; SPANGFORT, M.D. X-ray and NMR structure of *Bet v 1*, the origin of birch pollen allergy. *Nature Structural Biology*, v.3, n.12, p.1040- 1045, 1996.

GAO, Z.S.; VAN de WEG, W.E.; SCHAART, J.G.; SCHOUTEN, H.J.; TRAN, D.H.; KODDE, L.P.; VAN der MEER, I.M.; VAN der GEEST, A.H.; KODDE, J.; BREITENEDER, H.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER , K.; BOSCH, D.; GILISSEN, L.J. Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theoretical and Applied Genetics*, v.111, n.1, p.171-183, 2005.

GASTEIGER, E.; GATTIKER, A. ; HOOGLAND, C. ; IVANYI, I. ; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, v.31, p.3784-3788, 2003.

GRATTAPAGLIA, D.; BERTOLUCCI, F.L.G.; PENCHEL, R.; SEDEROFF, R.R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers. *Genetics*, v. 144, p. 1205 -1214, 1996.

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

HANDSCHUH, L.; FEMIAK, I.; KASPERSKA, A.; FIGLEROWICZ, M.; SIKORSKI, M. M.. Structural and functional characteristics of two novel members of pathogenesis-related

multigene family of class 10 from yellow lupine. *Acta Biochimica Polonica*, v.54, n.4, p.783-796, 2007.

HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. ; VANEK-KREBITZ, M.; RADAUER, C.; WEN, J; FERREIRA, F.; SCHEINER, O.; BREITENEDER, H. Genomic characterization of members of the *Bet v 1* family: genes coding for allergens and pathogenesis-related proteins share intron positions. *Gene*, v.197, p.91-100, 1997.

HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; O'RIORDAIN, G.; AHORN, H. ; EBNER, C.; MACHADO, M.L.C.; PUHRINGER, H.; SCHEINER, O.; BREITENEDER, H. Molecular characterization of Dau c 1, the *Bet v 1* homologous protein from carrot and its cross-reactivity with *Bet v 1* and Api g 1. *Clinical and Experimental Allergy*, v.29, p.840-847, 1999.

HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. Plant allergens and pathogenesis-related proteins. What do they have in common? *International Archives of Allergy and Immunology*, v.122, p.155-166, 2000.

HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochemical Society Transactions*, v.30, p.930-935, 2002.

HUANG, X.Q. ;CLOUTIER, S. Hemi-nested touchdown PCR combined with primer-template mismatch PCR for rapid isolation and sequencing of low molecular weight glutenin subunit gene family from a hexaploid wheat BAC library. *BMC Genetics*, v.8, p.18, 2007.

JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; ODA, S.; MELLO, E.J.; GRATTAPAGLIA, D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, v.108, n.1, p.175-180, 2003.

KARKKAINEN, K.; SAVOLAINEN, O. The degree of early inbreeding depression determines the selfing rate at the seed stage: model and results from *Pinus sylvestris* (Scots pine). *Heredity*, v.71 160-166, 1993.

KARLSSON,A.L.; ALM, R.; EKSTRAND,B. ; FJELKNER-MODIG, S.; SCHIOTT,A. ;BENGTSSON, U.; BJORK, L.; HJERNO, K.; ROEPSTORFF,P.; EMANUELSSON,C.S.. *Bet v 1* homologues in strawberry identified as IgE-binding proteins and presumptive allergens. *Allergy*, v.59, p.1277-1284, 2004.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics*, v.12, p.172-175, 1944.

KOSKI, V. Embryonic lethals of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. *Commun. Inst. For. Fenn.* v.75, p.1-30, 1971.

KOSKI, V. On self-pollination, genetic load and subsequent inbreeding in some conifers. *Commun. Inst. For. Fenn.* v.78, p.1-42, 1973.

KUANG, H.; RICHARDSON, T.E.; CARSON, S.D.; WILCOX, P.; BONGARTEN B.C. Genetic analysis of inbreeding depression in plus tree 850.55 of *Pinus radiata* D. Don. II. Genetics of viability genes. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 99, p.140-146, 1999.

KUCHEL, H.; FOX, R.; REINHEIMER, J.; MOSIONEK, L.; WILLEY, N.; BARIANA, H.; JEFFERIES, S. The successful application of a marker- assisted wheat breeding strategy. *Molecular Breeding*, v.20, p.295- 308, 2007.

KUNKEL, B.N.; BROOKS, D.M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, v.5, p.325-331, 2002.

LASCOUX, M.; LEE, J. K. One step beyond lethal equivalents: characterization of deleterious loci in the rapid cycling *Brassica rapa* L. base population. *Genetica*, v.104, p.161-170, 1998.

LIU, J.J.; EKRAMODDOULLAH, A.K.M. Characterization, expression and evolution of two novel subfamilies of *Pinus monticola* cDNAs encoding pathogenesis-related (PR)-10 proteins. *Tree Physiology*, v.24, n.12, p.1377-1385, 2004.

MASCHIO, L.M.A.; FERREIRA, C.A.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; WIECHETECK, M.R.S.; NARDELLI, A.M.B.; BERNARDI, C.A. Descrição de uma anomalia ocorrida em *Eucalyptus grandis* na região de Arapoti-PR, Brasil. *Boletim de Pesquisa Florestal*, n.32-33, p.85-87, 1996.

MATTON, D.P.; PRESCOTT, G.; BERTRAND, C.; CAMIRAND, A. ; BRISSON, N.; Identification of *cis*-acting elements involved in the regulation of the pathogenesis-related gene STH-2 in potato. *Plant Molecular Biology* , v.22, p.279-291, 1993.

MCCUNE, A. R. ; FULLER, R. C. ; AQUILINA, A. A. ; DAWLEY, R. M. ; FADOOL, J. M. ; HOULE, D.; TRAVIS, J. ; KONDRASHOV, A. S.. A Low Genomic Number of

Recessive Lethals in Natural Populations of Bluefin Killifish and Zebrafish. *Science*, v.296, p.2398-2401, 2002.

MISSIAGIA, A.A.; PIACEZZI, A.L. ; GRATTAPAGLIA, D. Genetic mapping of *Eef1*, a major effect QTL for early flowering in *Eucalyptus grandis*. *Tree Genetics and Genomes*, v.1, p.79-84, 2005.

MORTON, N. E.; CROW, J.F.; MULLER, H. J. An Estimation of the Mutational Damage in Man from Data on Consanguineous Marriages. *Proceeding National Academy of Sciences*, v.42, 855-863, 1956.

MYBURG, A.A. *Genetic architecture of hybrid fitness and Wood quality traits in a wide interspecific cross of Eucalyptus tree species*. Tese (Ph. D.) North Carolina State University, 2001.

NAMKOONG, G. ; BISHIR, I. The frequency of lethal alleles in forest tree populations. *Evolution*, v.41, p.1123-1127, 1987.

NGUYEN, B.D.; BRAR, D.S.; BUI, B.C.; NGUYEN, T.V.; PHAM, L.N.; NGUYEN, H.T. Identification and mapping of the QTL for aluminum tolerance introgressed from the new sources, *Oryzae rufipogon* Griff., into indica rice *Oryzae sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 106, p. 583-593, 2003.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.85, p.985-993, 1993.

PARK, Y.S.; FOWLER, D.P. Effects of inbreeding and genetic variances in a natural populacion of tamarack (*Larix laricina* (DuRoi) K. Koch) in eastern Canada. *Silvae. Genetic*, v.31, p.21-26, 1982.

PARK, Y.S.; FOWLER, D.P. Inbreeding in black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.: Self-fertility, genetic load, and performance. *Canadian Journal of Forest Research*, v.14, p.17-21, 1984.

PRYOR, L. *Eucalyptus*. In: Halevy, A. *CRC Handbook of Flowering*. 1.ed. Boca Raton: Franklin Book Company, 1985. v.2, p. 476-482.

RADAUER, C.; LACKNER, P.; BREITENEDER, H. The *Bet v 1* fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evolutionary Biology*, v.8, p.286, 2008.

ROSE, A.B. The effect of intron location on intron-mediated enhancement of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, v.40, p. 744-751, 2004.

SAVOLAINEN, O.; KARKKAINEN, K.; KUITTINEN, H. Estimating numbers of embryonic lethals in conifers. *Heredity*, v.69, p.308-314, 1992.

SBS- Sociedade Brasileira de Silvicultura. **Fatos e Números do Brasil Florestal**, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.sbs.org.br/estatisticas.htm>> Acesso em: 2 mar. 2010

SCHENK, M.F.; GILISSEN, L.J.W.J.; ESSELINK, G.D. SMULDERS, M.J.M., Seven different genes encode a diverse mixture of isoforms of *Bet v 1*, the major birch pollen allergen, *BMC Genomics*, v.7, p.168, 2006.

SCHENK, M. F.; CORDEWENER, J. H.G.; AMERICA, A. H.P.; WESTENDE, W.P.C.V.; SMULDERS, M.J.M.; GILISSEN, L.J.W.J. Characterization of PR-10 genes from eight *Betula* species and detection of *Bet v 1* isoforms in birch pollen *BMC Plant Biology*, v.9, p.24, 2009.

SCHEURER, S.; METZNER, K.; HAUSTEIN, D.; VIETHS, S. Molecular cloning, expression and characterization of Pru a 1, the major cherry allergen, *Molecular Immunology*, v.34, p. 619-629, 1997.

SCHONING, B. ; ZIEGLER, W. H. ; VIETHS, S. ; BALTES, W. Apple Allergy: The cDNA Sequence of the Major Allergen of Apple, Determined by Performing - PCR with a Primer Based on the N-Terminal Amino Acid Sequence, is Highly Homologous to the Sequence of the Major Birch Pollen Allergen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.71, p.475-482, 1996.

SQUILLACE, A.E.; KRAUS, J.F. The degree of natural selfing in slash pine as estimated from albino frequencies. *Silvae Genetica*. v.12, p.42-50, 1963.

STINTZI, A.; HEITZ, V. ; PRASAD, V. ; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S. ; KAUFFMANN, S. ; GEOFROY, P. ; LEGRAND, M. ; FRITIG, B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, v.75, 687-706, 1993.

SWOBODA, I.; JILEK, A.; FERREIRA, F.; ENGEL, E.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. ; SCHEINER, O.; KRAFT, D.; BREITENEDER, H.; PITTENAUER, E.; SCHMIDT, E.; VICENTE, O.; HEBERLE-BORS, E.; AHORN, H.; BREITENBACH, M. Isoforms of *Bet v 1*, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. *The Journal of Biological Chemistry*, v.270, p.2607-2613, 1995a.

SWOBODA, I.; DANG, T.C.H. ; HEBERLE-BORS, E.; VICENTE, O. Expression of *Bet v 1*, the major birch pollen allergen, during anther development. An in situ hybridization study. *Protoplasma*, v.187, p.103-110, 1995b.

TAMBARUSSI, E. V. *Associação de marcador RAPD e desenvolvimento de marcador SCAR para um tipo de anomalia de viveiro em Eucalyptus grandis*. 2006. 31f. Monografia (Bacharelado em Engenharia Florestal)- Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2006.

TEIXEIRA, J.E.C. *Análise da herança da resistência a Puccinia psidii Winter em progênies de híbridos inter-específicos de eucalipto e mapeamento genético de um loco de resistência à ferrugem*. 2009. 58f. Tese (doutorado em genética e melhoramento de plantas)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

THAMARUS, K.A.; GROOM, K.; BRADLEY, A.; RAYMOND, C.A.; SCHILECK, L.R.; WILLIAMS, E.R.; MORAN, G.F. Identification of quantitative trait loci for wood and fiber properties in two full-sib progenies of *Eucalyptus globulus*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 190, p. 8569- 864, 2004.

THOMMA, B.P.H.J; PENNINCKX, I.A.M.A.; BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P.A. The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current Opinion in Immunology*. v.13, p.63-68, 2001.

VALENTA, R; BREITENEDER, H; PETTERNBURGER, K; BREITENBACH, M; RUMPOLD, H; KRAFT, D; SCHEINER, O. Homology of the major birch-pollen allergen, *Bet v I*, with the major pollen allergens of alder, hazel, and hornbeam at the nucleic acid level as determined by cross-hybridization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.87, n.3, p.677-682, 1991.

VAN LOON, L.C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in

protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, v.40, p.190-211, 1970.

VAN LOON, L. C. *Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Boca Raton: CRC Press, 1999, p.1-19.

VAN LOON, L.C. ; REP, M. ; PIETERSE, C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, v.44, p.135-162, 2006.

VANEK-KREBITZ, M.; HOFFMANN SOMMERGRUBER, K.; MACHADO, M. L. D. ; SUSANI, M.; EBNER, C.; KRAFT, D.; SCHEINER, O.; BREITENEDER, H. Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to *Bet v 1*, the major birch pollen allergen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.214, n.2, p.538-551, 1995.

VERHAEGEN, D.; PLOMION, C.; GION, J.M.; POITEL, M.; COSTA, P.; KREMER, A. Quantitative trait dissection analysis in Eucalyptus using RAPD markers, 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression cross different ages. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 95, p. 597- 608, 1997.

VICENTINI, R.; SASSAKI, F. T. ; GIMENES, M. A. ; MAIA, I. G.; MENOSSI, M. In silico evaluation of the Eucalyptus transcriptome. *Genetics and Molecular Biology*, v.28, n.3 (suppl), p.487-495, 2005.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K. *DNA fingerprinting in plants: Principles, methods and applications*. 2. ed., Boca Raton: CRC Press, 2005, 472 p.

WEN, J.; VANEK-KREBITZ, M.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. ; SCHEINER, O. ; BREITENEDER, H. The Potential of *Bet v 1* Homologues, a Nuclear Multigene Family, as Phylogenetic Markers in Flowering Plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.8, n.3, p.317-333, 1997.

ZAMPROGNO, K.C.; FURTADO, E.L.; MARINO, C.L.; BONINE, C.A.V.; DIAS, D.C. Utilização de análise de segregantes agrupados na identificação de marcadores ligados a genes que controlam resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus* spp. *Summa Phytopathologica*, v.34, p. 253-255, 2008.