

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
Campus de Botucatu

Cíntia Helena Duarte Sagawa

"Identificação de regiões genômicas relacionadas ao
déficit hídrico em *Eucalyptus* por meio de marcadores
moleculares"

BOTUCATU

2012

Cíntia Helena Duarte Sagawa

"Identificação de regiões genômicas relacionadas ao déficit hídrico em *Eucalyptus* por meio de marcadores moleculares"

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Celso Luís Marino

Coorientadora: Dra. Juliana Érika de Carvalho Teixeira

BOTUCATU

2012

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

Sagawa, Cíntia Helena Duarte.

Identificação de regiões genômicas relacionadas ao déficit hídrico em
Eucalyptus por meio de marcadores moleculares / Cíntia Helena Duarte
Sagawa. – Botucatu ; [s.n.], 2012.

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

Orientador: Celso Luis Marino

Coorientador: Juliana Érica de Carvalho Teixeira

Capes: 20203004

1. Eucalipto – Identificação. 2. Fisiologia vegetal.

Palavras-chave: Déficit hídrico; *Eucalyptus*; Marcadores moleculares; Mapa de
ligação; QTL.

Aos meus pais, Massami Sagawa e
Maria do Carmo Duarte Sagawa,
por acreditarem nos meus sonhos e
sempre me darem todo o apoio.
São eles os meus grandes mestres.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, ao Prof. Celso Luis Marino pela oportunidade de fazer este curso de mestrado e realizar este projeto. Por todos os seus ensinamentos, amizade e conversas que sempre me deram muito estímulo para continuar apesar dos obstáculos que encontrávamos. Agradeço, também, a Dra. Juliana Érika de Carvalho Teixeira (Universidade de Delaware - EUA), que apesar da distância, sempre se fez presente em todas as etapas deste projeto, contribuindo muito no meu aprendizado e servindo de exemplo de determinação e proatividade. Sou grata a ambos pela orientação e por me ensinarem que os verdadeiros mestres não são os provedores de conhecimentos apenas, mas são aqueles que também sabem despertar no aluno a busca pelo saber.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética), coordenado pela Profa. Cláudia A. Rainho, por me fornecer todas as ferramentas necessárias para meu aprendizado nesta área tão fascinante que é a genética. A todos os colegas do Programa, que durante as disciplinas ou nas organizações de eventos, contribuíram para que cada dia fosse um dia de novas descobertas. Agradeço, também, a todos os professores e funcionários do Departamento de Genética do Instituto de Biociências, por todo o suporte fornecido nestes dois anos e pelas amizades.

Agradeço à Capes pela bolsa de estudos concedida, à Finep pelo suporte financeiro e à Empresa Fibria Celulose S/A e seu Programa de Melhoramento representada por César Bonine, que sempre deu muito apoio para a realização deste projeto. Ao Prof. Rinaldo César de Paula (UNESP-Jaboticabal) que coordenou as análises fenotípicas deste trabalho e sempre esteve disposto em esclarecer as minhas dúvidas. Sou grata, também, ao Prof. Luis Eduardo Aranha Camargo (ESALQ-USP) e a equipe do seu laboratório que me forneceram orientações e sugestões importantes para realização da técnica de AFLP. À Dra. Mariângela Cristofani-Yaly (Centro de Citricultura - IAC) que foi membro da minha banca de exame de qualificação e deu sugestões e ensinamentos que foram, sem dúvida, essenciais na execução das análises de mapeamento genético e de QTLs. Também foi relevante para as análises de mapeamento o meu conhecimento adquirido nas aulas ministradas pelo Prof. Antônio Augusto Franco Garcia (Biometria de Marcadores Genéticos) e Prof. Isaias Olívio Geraldi (Genética Quantitativa), ambos da ESALQ-USP. A eles sou grata por me aceitarem como aluna em suas disciplinas. Disciplinas que permitiram que eu conhecesse Evandro Tambarussi e Aline Miranda, que sou grata pela amizade e pelas tardes de estudos. Agradeço ao Prof. Irae Amaral Guerrini

(UNESP-Botucatu) pelas questões e sugestões que ofereceu como membro da minha banca de exame de qualificação.

Agradeço a Yogasudha Veturi da Universidade de Delaware (EUA) que gentilmente realizou as análises estatísticas dos dados fenotípicos deste projeto. Sou muito grata também ao apoio de todos os meus amigos que conheci no laboratório CAGEN, Karine Kettener, Lídia Carolina Arneiro, Paola Mazza Revolti, Maria Cecília Perantoni Fuchs, Leonardo Curi, Suzana Regina Silveira Costa, Andréia Santoro, e em especial, Vanusa Socorro Leite, Júlio César Otto, Tânia Mara Bortoloto e Helena Marcon que contribuíram diretamente na execução e elaboração deste trabalho, além de serem tornarem grandes amigos que desejo ter pra vida toda. Também agradeço a todos os membros do laboratório Biogen, especialmente a Dra. Juliana Bravo pela amizade e esclarecimento das minhas dúvidas.

Às minhas amigas de república Cristiane de Abreu Estanislau (Fiota), Luana Longon (Ostra), Bianca Balbino (Peks), Patrícia Fontes (Sê), Júlia Ávila de Oliveira (Minkia) e Mariana Ide (Losa), pelas palavras amigas e de estímulo, pela companhia e pelos jantares animados e divertidos depois de um dia duro no laboratório. Às minhas amigas, Thays Bragança Candido dos Santos, Aline Zandoná e Magali Lira Gomes (Balada) que sempre me incentivaram e, cada uma da sua maneira, contribuíram para que eu pudesse chegar onde estou.

Aos meus pais, Massami Sagawa e Maria do Carmo Duarte Sagawa, por todos incentivos, apoio, paciência e carinho que permitiram que eu conquistasse mais essa etapa. Ao meu irmão Cássio Massashi Duarte Sagawa por me ajudar na elaboração gráfica das minhas apresentações. Aos meus avós, Benedito Duarte Moreira (*in memorian*), Ana Luisa Duarte, Yassu Sagawa e Tsuguo Sagawa (*in memorian*), que sempre estiveram presentes na minha vida, apoiando e confiando em cada passo.

O meu muito obrigada a todos que permitiram, direta ou indiretamente, que eu conquistasse e finalizasse mais essa fase, pois esse curso de mestrado não apenas contribuiu muito para os meus conhecimentos na área de genética, mas também me deu importantes lições de vida.

“O rio atinge os seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos”

André Luiz

(Francisco Cândido Xavier)

RESUMO

Nas florestas de *Eucalyptus*, o déficit hídrico é apontado como um dos fatores abióticos mais importantes, pois afeta significativamente o crescimento e o rendimento das plantações. Para contornar esse problema, o uso de genótipos tolerantes ao déficit hídrico é uma das alternativas mais razoáveis. Entretanto, a tolerância ao déficit hídrico é uma característica complexa e a estratégia de mapeamento de QTLs pode ajudar a entender a arquitetura genética relacionada com a variação fenotípica que esta característica apresenta. Este estudo buscou identificar as regiões genômicas associadas ao déficit hídrico em *Eucalyptus*. Para isso, foi utilizada uma progênie segregante com 195 indivíduos oriunda de um cruzamento de clones híbridos (*E. grandis* x *E. urophylla*) contrastantes para o estresse por déficit hídrico. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação sob duas condições de irrigação (testemunha e estressado por déficit hídrico). Características fisiológicas foram utilizadas para a caracterização fenotípica da progênie e as análises estatísticas foram realizadas considerando as médias obtidas em cada experimento. O mapa genético foi construído com marcadores microssatélites e AFLP com auxílio do *software* JoinMap[®] 3.0. O mapeamento de QTLs seguiu duas abordagens: análise de marcas individuais e mapeamento múltiplo de QTLs (MQM). No mapa de ligação foram posicionados 99 marcadores em 13 grupos de ligação, totalizando 842,35 cM com distância média de 9,30 cM entre os marcadores. A análise de marcas individuais identificou vários QTLs de pequeno efeito e um QTL (LOD=6,11) localizado na posição do marcador EMBRA135 representando 20,8% da variação em condutância estomática (*gs*) nas plantas sob condição de estresse. Já o mapeamento MQM apontou dois QTLs, sendo um submetida a condições normais de irrigação (LOD=16,44) e outro na condição de estresse (LOD=15,25), representando 77,1% e 69,1%, respectivamente, na transpiração. Também identificou QTLs co-localizados no grupo 6 e QTLs de pequeno efeito. Portanto, este estudo identificou QTLs relacionados a tolerância ao déficit hídrico em *Eucalyptus* e estes QTLs identificados podem estar envolvidos em muitos mecanismos de tolerância que as plantas podem usar para evitar este estresse.

Palavras-chave: déficit hídrico, *Eucalyptus*, marcadores moleculares, mapa de ligação, QTL.

ABSTRACT

In *Eucalyptus* forests, drought stress has been pointed as one of the most important abiotic factor significantly affecting the growth and yield. The use of drought tolerant genotypes can be the most reasonable alternative to overcome this problem. Drought tolerance is a complex trait and QTLs mapping approach can help to understand the genetic architecture related to this trait. This study aims to identify genetic loci linked to phenotypic variation in drought tolerance in *Eucalyptus*. A progeny with 195 plants generated from a cross between two contrasting hybrid clones (*E. grandis* x *E. urophylla*) to drought stress was evaluated. The experiment took place in a greenhouse under two irrigation conditions (control and drought stress). Physiological traits were used for phenotypic characterization of the progeny and statistical analyzes were performed considering the means obtained in each experiment. For the genetic map of the progeny, the linkage analysis were executed on JoinMap® 3.0 software with microsatellite and AFLP markers. The QTL mapping followed two strategies: single locus analysis and multiple QTL models mapping (MQM). The linkage map resulted in 13 groups with 99 markers, and the map's length was 842,35 cM with an average distance of 9,30 cM between the markers. The single locus analysis identified several QTL with small effects and one QTL (LOD=6,11) at the EMBRA135 marker position which represents 20,8% of the stomatal conductance variation (*gs*) in drought stressed plants. The MQM mapping, otherwise, detected two QTL, one in control plants (LOD=16,44) and one in stressed plants (LOD=15,25), which represents 77,1% and 69,1%, respectively, of the transpiration variation. Co-localized QTL were also identified at group 6 and several small effects QTL. Therefore, this study identified QTL related to drought tolerance in *Eucalyptus* and these QTLs identified may be involved in many tolerance mechanisms that plants can use to avoid this stress.

Key words: drought stress, *Eucalyptus*, molecular markers, linkage map, QTL.

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT.....	08
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1. Tolerância ao déficit hídrico no gênero <i>Eucalyptus</i>	13
2.2. Marcadores moleculares.....	16
2.2.1. Marcadores microssatélites.....	16
2.2.2. Marcadores AFLP.....	18
2.3. Mapeamento genético.....	19
2.4. Análise Mapeamento de QTLs.....	21
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivo geral.....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Material vegetal.....	26
4.2. Análises fenotípicas.....	26
4.3. Extração do DNA.....	27
4.4. Marcadores microssatélites	28
4.5. Marcadores AFLP.....	28
4.6. Construção do mapa genético.....	30
4.7. Análise e mapeamento de QTLs.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1. Mapa genético.....	33
5.2. Análise e mapeamento de QTLs.....	41
5.2.1. Análise de marcas individuais.....	41
5.2.2. Mapeamento Múltiplo de QTLs (MQM).....	42
6. CONCLUSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

O eucalipto pertence à divisão Angiospermae, classe Dicotyledonea, ordem Myrtales, família Myrtaceae e gênero *Eucalyptus*. É nativo do continente australiano e ilhas da Indonésia e passou a ser um dos gêneros florestais mais plantados no mundo, devido a sua utilização na geração de diversos produtos madeireiros e não madeireiros (Grattapaglia e Kirst, 2008). No Brasil, foi introduzido no início do século XIX para fins comerciais, como o fornecimento de madeira para a produção de dormentes para os trilhos dos trens e materiais para a construção. Atualmente, a extensão das áreas plantadas e a sua produção aumentam a cada ano, pois as plantações brasileiras de *Eucalyptus* passaram a fornecer matéria-prima para a produção de carvão vegetal, painéis de madeira industrializada, madeira mecanicamente processada (compensados, serrados, portas, janelas, moldes para móveis, entre outros) e, principalmente, celulose e papel, destinados ao mercado interno e à exportação.

O Brasil já conta com 4.754.334 hectares cultivados, distribuídos por todo o país, com destaque para as regiões sudeste e sul (ABRAF, 2011). Em 2010, a Associação Brasileira de Celulose e Papel (BRACELPA) registrou o saldo comercial de US\$ 4,9 bilhões, o que gerou 115 mil empregos diretos e 575 mil indiretos (BRACELPA, 2011). Além disso, a utilização das plantações de *Eucalyptus* na geração de multiprodutos tem criado uma demanda por novos produtos florestais, como bioenergia, bioprodutos e pagamentos por serviços ambientais (créditos de carbono). Com isso, a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF) observa que será uma tendência para os próximos anos um crescimento das plantações em diferentes regiões brasileiras, principalmente centro-oeste, norte e nordeste, juntamente com uma estabilização e redução da atividade florestal nas regiões sudeste e sul do país (ABRAF, 2011).

Todavia, uma das limitações para a expansão das áreas cultivadas de *Eucalyptus*, especialmente nas regiões norte e nordeste, é o déficit hídrico. Quando há limitações hídricas e de nutrientes, as diferentes espécies do gênero *Eucalyptus*, apesar de adaptadas a diversas condições ambientais, não atingem o máximo do seu potencial (Whitehead e Beadle, 2004). Algumas espécies possuem atributos físicos, como o desenvolvimento de raízes profundas e a produção de lignotuber, que aumentam a tolerância das plantas à seca. Entretanto, nos primeiros estádios de desenvolvimento das plantas, e em especial nas espécies utilizadas comercialmente, estas características não estão desenvolvidas, levando-as a condições de sensibilidade ao déficit hídrico.

Diversas espécies vegetais passam a ter seu desenvolvimento afetado quando submetidos à condição de déficit hídrico, sendo que a severidade, a duração da exposição ao estresse, o estágio de desenvolvimento e o genótipo são fatores determinantes (Taiz e Zeiger, 2004). O estresse por déficit hídrico ocorre quando a baixa disponibilidade de água para planta afeta diversos processos fisiológicos, como transpiração, fotossíntese, abertura estomática (Flexas et al., 2002), produção de hormônios (Warren et al., 2011) e ajuste osmótico (Arndt et al., 2008).

A tolerância ao déficit hídrico é uma característica quantitativa, poligênica, com baixa herdabilidade e elevada interação genótipo por ambiente (Ashraf, 2010). Estes fatores tornam o melhoramento genético para tolerância ao déficit hídrico um processo complexo. Estimar parâmetros genéticos e fenotípicos, como herdabilidade e correlações genéticas e correlações fenotípicas, assim como ganhos esperados com seleção, é importante para os programas de melhoramento genético, pois permitem a escolha dos métodos mais apropriados de condução e seleção da população. Entender a arquitetura genética envolvida na tolerância ao déficit hídrico contribui, portanto, para a compreensão dos processos de adaptação à seca e também auxilia na seleção de genótipos capazes de aumentar a absorção e a eficiência do uso da água em ambientes secos.

A busca por novos genótipos inicia-se com a avaliação fenotípica das características de interesse e posterior seleção dos prováveis genótipos superiores. No trabalho realizado por Vellini et al. (2008) em *Eucalyptus*, os autores observaram, por meio de avaliações fisiológicas e de crescimento, diferentes respostas a tolerância à seca em um conjunto de clones submetidos a diferentes regimes de irrigação. Os clones contrastantes identificados (sensíveis e tolerantes ao estresse) foram utilizados em cruzamentos para análise da segregação das características e possuem grande valor genético e genômico para os trabalhos de melhoramento genético, que visam identificar as regiões genômicas envolvidas com a tolerância à seca.

A identificação de regiões genômicas pode ser realizada por meio do mapeamento genético. Quando características poligênicas são avaliadas, ou seja, características com padrão contínuo de variação fenotípica, estas regiões genômicas são denominadas loci de característica quantitativa ou QTLs (*Quantitative Trait Loci*). Assim, localização dos QTLs contribui para compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos em uma característica quantitativa.

A caracterização da arquitetura genética de um caráter busca a compreensão e a descrição de todos os possíveis fatores genéticos e ambientais envolvidos com a característica

quantitativa. Basicamente, consiste de associações entre o genótipo e o fenótipo, com estimativas do número, posições no genoma, frequências e efeitos dos loci que controlam os QTLs, assim como interações dos alelos dos QTLs dentro (dominância) e entre (epistasia) loci, efeitos pleiotrópicos entre QTLs e interações entre QTLs e ambiente (Zeng et al., 1999). Inúmeros trabalhos identificaram QTLs relacionados à tolerância a seca em diversas espécies vegetais, como salgueiro, pópulus, batata, amendoim, entre outras (Rönnberg-Wästljung et al., 2005; Street et al., 2006; Anithakumari et al., 2011; Ravi et al., 2011).

A compreensão da arquitetura genética envolvida na tolerância ao déficit hídrico possibilita, portanto, a busca direcionada das regiões controladoras do fenótipo, contribuindo para compreensão dos mecanismos envolvidos na adaptação e, conseqüentemente, poderá auxiliar na seleção de genótipos capazes de aumentar a absorção e a eficiência do uso da água em ambientes secos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Tolerância ao déficit hídrico no gênero *Eucalyptus*

Diversas definições já foram elaboradas para seca ou déficit hídrico, sendo que Kramer e Kozlowsk (1979) definiram-na como uma ocorrência meteorológica, geralmente descrita como um período sem chuvas com duração suficiente para o esgotamento da umidade do solo. Contudo, Passioura (1996) pondera definições como essa por serem puristas e meteorológicas, por isso propõe que a seca deve ser compreendida como uma situação na qual as plantas passam a reduzir seu crescimento e/ou produção devido à indisponibilidade hídrica. Assim, os conceitos de seca podem variar de acordo com o enfoque, pois se trata de uma situação complexa caracterizada por múltiplos parâmetros climatológicos e hidrológicos, que afetam a todos os organismos direta ou indiretamente (Mishra e Singh, 2010).

Para a maioria das plantas a falta de água é uma condição estressante, pois afeta processos fisiológicos e de crescimento, além de exigir elevado gasto metabólico para possibilitar a sobrevivência (Pita et al., 2005). Estas consequências fazem com que o estresse por déficit hídrico seja considerado um dos fatores abióticos de maior impacto, especialmente em espécies utilizadas comercialmente, visto que a produção da planta é diretamente afetada.

Em espécies arbóreas, que possuem ciclo de vida longo, estresses ambientais como a seca podem ser frequentes. Em geral, estas espécies desenvolveram mecanismos de adaptação que possibilitam o ajuste da homeostase metabólica (Shulaev et al., 2008). No gênero *Eucalyptus*, as várias espécies apresentam diferentes respostas ao estresse hídrico, desde alterações no crescimento até ajuste osmótico do tecido foliar. Neste gênero, Merchant et al. (2006) observaram que as respostas fisiológicas relacionadas ao estresse devido ao déficit hídrico podem estar diretamente associadas aos grupos taxonômicos estudados.

O gênero *Eucalyptus* inclui mais de 700 espécies que estão distribuídas em 15 subgêneros (Merchant et al., 2006). Quando submetidas a condições de déficit hídrico, as espécies do subgênero *Symphyomyrtus* e *Corymbia* apresentam mecanismos mais eficientes de adaptação, pois ocorrem naturalmente em regiões áridas e sujeitas a longos períodos de seca na Austrália (Boland, 1992). Já as espécies do subgênero *Eucalyptus* são originárias de regiões com maior disponibilidade de água, como as regiões costeiras, sudeste e sudoeste do continente australiano (Gill et al., 1985), sendo, portanto, espécies geralmente mais sensíveis ao estresse por déficit hídrico.

As principais espécies do gênero *Eucalyptus* exploradas comercialmente no mundo são dos subgêneros *Symphyomyrtus*, *Idiogenes* e *Monocalyptus* (Fonseca et al., 2010). As espécies pertencentes a estes grupos possuem características similares de produção e adaptação às condições ambientais. Entre as características utilizadas para caracterizar a produção estão a densidade (kg/m^3), o teor de lignina, o rendimento de celulose e o potencial de crescimento (Resende e Assis, 2009). Entre as características de adaptação, por exemplo, estão o sistema radicular profundo, o ajuste osmótico, a elasticidade celular e a abertura e fechamento de estômatos. Por exemplo, *Eucalyptus camaldulensis* e *E. saligna* procuram desenvolver sistemas radiculares com raízes mais profundas para a busca de água no solo. Já *E. leucoxylon* e *E. platypus* reduzem o potencial osmótico e ajustam ao máximo o módulo de elasticidade celular (White et al., 2000). Em *E. grandis*, *E. viminalis* e *E. tereticornis*, assim como a espécie *E. camaldulensis*, também, observou-se uma diferença significativa entre os ajustes osmóticos sob déficit hídrico (Lemcoff et al., 1994). As reduções do potencial osmótico juntamente com outras características de adaptação, como a abertura e fechamento dos estômatos e a disposição e tamanho da área foliar (Whitehead e Beadle, 2004), aumentam a capacidade das espécies de *Eucalyptus* a suportarem baixos potenciais hídricos externos. As diferenças encontradas entre as espécies se devem a vasta diversidade intra e interespecífica do gênero *Eucalyptus* (Grattapaglia, 2008).

Entretanto, a expressão destas características que conferem tolerância ao déficit hídrico provoca alterações, geralmente com consequências negativas, em outros mecanismos fisiológicos. O fechamento dos estômatos, por exemplo, provoca diminuição na assimilação de carbono, assim como o aumento no crescimento de raízes diminui o crescimento da parte aérea (Taiz e Zeiger, 2004), podendo, assim, ocasionar redução na produção. Provavelmente, plantas adaptadas ao déficit hídrico apresentam características mais associadas à sobrevivência que ao crescimento (Pereira e Palardy, 1989). Como já citado anteriormente, essa relação se deve ao custo metabólico necessário para o desenvolvimento destas características de adaptação (Pita et al., 2005).

Diante do exposto, os melhoristas buscam selecionar os melhores genótipos com base em um equilíbrio entre as características que aumentam o crescimento/produção com aquelas que proporcionam maior tolerância ao déficit hídrico (Pita et al., 2005). Dentre as características consideradas relevantes nestes estudos, destacam-se o potencial hídrico foliar (Morgan, 1992), o potencial osmótico, o conteúdo relativo de água (Gesch et al., 1992), a condutância estomática e a transpiração (Eckstein e Robinson, 1996).

A busca dos melhores genótipos para certas condições ambientais ou biológicas também envolve a compreensão da arquitetura genética das características que serão utilizadas para desenvolvimento dos mesmos, ou seja, das relações entre os fatores genéticos e ambientais. A partir da identificação de uma região de QTL há a possibilidade da identificação de um gene específico, entretanto tal região pode conter dezenas de genes relacionados, portanto dificultando a análise. Além disso, o intervalo do QTL mapeado e as interações que podem ocorrer entre os genes, como epistasia, também deixam as análises mais complexas (Broman e Sen, 2009).

Diversos genes já foram identificados como diferencialmente expressos nas espécies vegetais submetidas a condições de déficit hídrico. Segundo Street et al. (2006), entre os genes *upregulated*, ou seja, os genes que aumentam sua expressão devido a sinalização celular recebida, estão os genes ligados ao fator de ligação e ao modulador negativo da atividade do ácido abscísico (ABA), às enzimas de conjugação da ubiquitina, às proteínas de resposta precoce, genes envolvidos no fechamento de estômatos induzidos por ABA, além dos genes relacionados a osmoprotetores, chaperonas, glutationa-transferase, fatores de transcrição (*bzips*, família *zinc finger* e família *myb*), álcool desidrogenase, entre outros. Já entre os genes *downregulated*, ou seja, que genes diminuem sua expressão durante o estresse hídrico estão os genes relacionados ao número de ciclos celulares e ao controle da expansão foliar.

Villar et al. (2011) compararam os perfis de expressão dos genes de duas espécies híbridas comerciais de *Eucalyptus* que diferiam em produtividade durante a estação de seca. Neste estudo, os autores demonstraram que a capacidade de expressar um amplo conjunto de genes em resposta à disponibilidade de água é uma característica essencial para a manutenção do crescimento/produção da planta durante o período de déficit hídrico. Além disso, também observaram que a diminuição da atividade fotossintética associada a grandes mudanças na expressão de genes relacionados ao metabolismo primário pode ser uma das estratégias que a planta adota durante o déficit hídrico (Villar et al., 2011).

Todos estes estudos contribuem com informações importantes para a compreensão da arquitetura genética para a tolerância ao déficit hídrico no gênero *Eucalyptus*. Contudo, não foram relatados trabalhos que descrevessem possíveis QTLs envolvidos nos mecanismos de tolerância a este estresse no gênero.

2.2. Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são marcadores genéticos baseados em qualquer alteração na sequência de DNA, podem estar relacionados a um gene expresso ou região genômica específica (Ferreira e Grattapaglia, 1998) e permitem a diferenciação entre dois ou mais indivíduos. Os marcadores moleculares identificam regiões específicas do genoma (locus) e as variações genéticas devido ao tamanho ou sequência de nucleotídeos que podem existir em um único locus. Estas variações são denominadas de alelos (Griffiths et al., 2006).

Entre os primeiros marcadores moleculares desenvolvidos estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), gerados a partir da técnica de *Southern Blot* (Botstein et al., 1980). Estes marcadores são do tipo codominante, ou seja, permitem a diferenciação de genótipos com alelos homozigotos e heterozigotos, e por isso são considerados mais informativos. Contudo, devido à técnica utilizada para a sua obtenção ser muito laboriosa, outros marcadores codominantes foram desenvolvidos a partir da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Mullis et al., 1986), como os microssatélites (Litt e Luty, 1989) e os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Wang, 1998).

A PCR consiste em uma técnica que permite a amplificação de qualquer região genômica sem a necessidade de clonagem ou isolamento de grandes quantidades de DNA genômico ultra puro. Esta técnica caracteriza-se por ser uma reação de amplificação exponencial de pequenas sequências de DNA com o auxílio de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que se ligam a regiões complementares no DNA.

Além dos marcadores codominantes também existem os marcadores dominantes. Estes marcadores apresentam apenas duas classes, presença ou ausência do marcador, e, portanto, identificam apenas alelos dominantes e recessivos, não sendo possível identificar loci heterozigotos. Apesar de não fornecerem muitas informações sobre os alelos, os marcadores dominantes são altamente polimórficos, ou seja, amplificam muitos loci. Como exemplos de marcadores dominantes destacam-se os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams et al., 1990) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos et al., 1995).

2.2.1. Marcadores microssatélites

Os microssatélites (Litt e Luty, 1989), também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Tautz, 1989), são pequenas repetições em *tandem* de segmentos curtos de DNA, geralmente de um a sete nucleotídeos (motivos). Estas sequências repetitivas estão distribuídas em abundância nos genomas das diferentes espécies. A obtenção destes

marcadores é por meio da análise dos produtos de PCR gerados com *primers* específicos que flanqueiam as regiões com microssatélites. As análises podem ser realizadas através de géis de eletroforese de alta resolução com detecção das fluorescências dos *primers* em sequenciadores automáticos de DNA. A técnica permite que diferenças nos pares de bases de cada fragmento sejam identificadas, e os diferentes tipos de fragmentos são denominados de alelos. Assim, os marcadores microssatélites são caracterizados como marcadores codominantes, podendo ser classificados como homozigotos e heterozigotos.

Em plantas, as análises genéticas com microssatélites são empregadas em testes de genotipagem, paternidade, caracterização do germoplasma e estudos com genética de populações (Faria et al., 2011). Para estes testes, os marcadores SSR são amplamente utilizados, pois além de serem codominantes, são multialélicos, altamente variáveis, facilmente reproduzíveis e podem ser analisados em sistemas *multiplex* (análises de vários microssatélites em uma única reação) (Brondani et al., 1998).

Os microssatélites estão amplamente dispersos no genoma, podendo ser encontrados em regiões codificadoras e não codificadoras do genoma, porém com frequência maior em regiões codificadoras, especialmente em regiões ditas UTRs (*untranslated regions*) (Morgante et al., 2002). Essa característica permite o desenvolvimento de marcadores microssatélites a partir da análise de sequências depositadas em bancos de dados. Estas sequências são, na grande maioria, sequências expressas (ESTs – *Expressed Sequence Tags*) e com o auxílio de programas computacionais específicos pode-se realizar a busca dos motivos. Após a identificação dos microssatélites por meio das bibliotecas de ESTs, são desenhados *primers* que flanqueiam as repetições para que os loci microssatélites possam ser amplificados pela PCR. Estes *primers* darão origem a marcadores microssatélites derivados de ESTs (SSR-EST), que são vantajosos nos estudos de busca por genes, por poderem fazer parte do gene controlador do caráter (Thiel et al., 2003).

Em *Eucalyptus*, a utilização de marcadores microssatélites, derivados de regiões genômicas, se deve ao elevado polimorfismo e facilidade de obtenção, auxiliando nos estudos de diversidade genética (Marcucci-Poltri et al., 2003), relações filogenéticas (Ochieng et al., 2007) e mapeamento genético (Brondani et al., 1998). Entretanto, os marcadores derivados de regiões genômicas não proporcionam alta precisão de genotipagem devido a pequenas diferenças no número de pares de nucleotídeos entre os alelos, o que dificulta a comparação dos resultados entre laboratórios diferentes e a total reprodutibilidade dos dados (Faria et al., 2011). Já os SSR-EST, por serem derivados de regiões expressas, são conservados e permitem a elevada reprodutibilidade dos dados. Portanto, após a divulgação dos estudos sobre a

abundância dos marcadores SSR-EST em *Eucalyptus* (Ceresini et al., 2005; Rabello et al., 2005; Faria et al., 2010), passou-se a associar estes dois tipos de marcadores, especialmente em estudos de mapeamento de QTLs.

2.2.2. Marcadores AFLP

Os marcadores AFLP são gerados a partir da completa digestão do DNA com enzimas endonucleases, seguida das etapas de amplificação seletiva por PCR e eletroforese do conjunto de fragmentos em géis de poliacrilamida desnaturante, resultando em um perfil polimórfico para cada amostra de DNA (Vos et al., 1995). Os fragmentos são gerados de acordo com a distribuição dos sítios de restrição das enzimas e com a complementaridade dos *primers* utilizados na amplificação seletiva. As diferenças de peso molecular entre os fragmentos amplificados determinam o nível de polimorfismo dos genótipos avaliados.

Apesar de algumas limitações como a necessidade de amostras de DNA de alta pureza e envolver várias etapas para obtenção dos resultados, a técnica para obtenção de marcadores AFLP é eficiente na busca de loci polimórficos, principalmente nos casos em que a variabilidade genética é baixa. Além disso, não requerem informações prévias das sequências do genoma, visto que os *primers* possuem uma parte baseada nas sequências dos adaptadores ligados às regiões de corte das enzimas e outra parte constituída de nucleotídeos aleatórios. Esta técnica é muito utilizada em espécies agrônômicas e florestais, pois detecta um grande número de fragmentos (entre 50 e 800 pb) e possibilita a análise de vários loci simultaneamente (Meudt e Clarke, 2007).

A técnica de AFLP mostrou-se satisfatória na identificação de marcas ligadas a características de interesse econômico nas espécies vegetais, pois foram identificados marcadores e genes ligados à tolerância a estresses abióticos (Raman et al., 2002; Altinkut et al., 2003; Kang et al., 2010), a resistência a doenças (Ouédraogo et al., 2001; Petro et al., 2011), a reprodução (Agarwal et al., 2011) entre outras características. Além disso, os marcadores AFLP ao serem utilizados no mapeamento genético podem ser uma poderosa ferramenta quando combinada a características fenotípicas para o mapeamento de QTLs. Em *Eucalyptus*, por exemplo, a combinação de marcadores AFLP com marcadores mais informativos, como os microssatélites, foram utilizados na elaboração de mapas para posterior busca por QTLs (Freeman et al., 2006).

2.3. Mapeamento genético

Os experimentos de Gregor Mendel (1860) estabeleceram as relações entre fenótipo e genótipo permitindo a compreensão dos mecanismos de hereditariedade. Baseados nestes experimentos, Tomas Hunt Morgan e colaboradores em 1910 observaram distorções das Leis de Mendel em *Drosophila melanogaster*. Morgan, então, definiu como causa das distorções as trocas de segmentos entre os cromossomos homólogos, processo denominado como permuta ou *crossing-over* (Carneiro e Vieira, 2002). Os indivíduos em que a permuta ocorresse, processo que pode ocorrer ao longo de todos os cromossomos, passaram a ser denominados como recombinantes, ou seja, possuíam fenótipos diferentes dos pais. Com isso surgiu a base teórica dos estudos de mapeamento.

Sturtevant (1913), analisando os eventos de permuta sugeriu que as frequências de aparecimento dos indivíduos recombinantes poderia ser uma medida da fração de recombinação entre os genes, visto que a possibilidade de recombinação no cromossomo é maior para genes mais distantes do que para aqueles mais proximamente ligados. Com base nessas premissas, pode-se realizar o mapeamento genético, onde a taxa de recombinação entre os loci é utilizada na ordenação e posicionamento dos genes nos grupos de ligação (Carneiro e Vieira, 2002). Os grupos de ligação são representações lineares do posicionamento dos loci (marcadores) nos cromossomos.

Inicialmente, os mapas genéticos nas espécies vegetais eram baseados em marcadores morfológicos e citológicos, que se originavam de estoques cromossômicos, ou seja, da presença de aneuploidias, translocações, deleções e inversões (Carneiro e Vieira, 2002). Entretanto, os estoques cromossômicos limitavam o mapeamento genético a apenas algumas espécies, pois eram restritos às espécies com citologia conhecida. A descoberta das isoenzimas (Markert e Moller, 1959), então, possibilitou a construção de mapas genéticos em, potencialmente, todas as espécies de plantas. Contudo, os marcadores isoenzimáticos também geram baixa quantidade de loci isoenzimáticos (menos de 30 loci), o que é uma condição limitante para os estudos de mapeamento (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Somente a partir do desenvolvimento e utilização dos marcadores moleculares é que os mapas genéticos passaram a ser saturados com um número ilimitado de marcadores, sendo uma alternativa para qualquer espécie (Carneiro e Vieira, 2002).

A obtenção dos mapas genéticos envolve várias etapas: (i) escolha de populações segregantes adequadas; (ii) genotipagem dos loci na população de mapeamento e nos seus genitores; (iii) verificação da segregação individual dos loci e (iv) análise estatística do

conjunto dos dados gerados para a verificação de ligação, ordenação dos marcadores nos grupos de ligação e estimativa das distâncias entre os loci (Tanksley, 1993).

As populações segregantes podem ser populações experimentais, e as mais utilizadas são as populações de retrocruzamentos, população F2, linhagens endogâmicas recombinantes (RILs), delineamento III e populações F1's segregantes. Para a geração destas populações, com exceção das F1's segregantes, é necessário à obtenção de linhagens endogâmicas. Nas espécies com populações F1's segregantes, os genitores são altamente heterozigóticos e, devido à depressão por endogamia, autoincompatibilidade, dioicismo e tempo para a obtenção de gerações, não é possível gerar linhagens endogâmicas.

As populações F1's segregantes possuem vários alelos segregando para cada locus. Além disso, a fase de ligação dos marcadores é desconhecida, uma vez que não há informações das gerações precedentes. Assim, para contornar essas características, foram desenvolvidas diferentes abordagens, como a estratégia do *pseudo-testcross* (Grattapaglia e Sederoff, 1994). Esta estratégia utilizou apenas marcadores dominantes e se baseou nos princípios dos retrocruzamentos com linhagens endogâmicas, com isso, eram gerados dois mapas de ligação, um de cada genitor. Porém, a presença exclusiva de marcadores dominantes dificulta a análise detalhada do genoma e não possibilita estimar diretamente as diferenças de recombinação entre os genitores (Maliepaard et al., 1997). Esta estratégia também não possibilita a utilização de marcadores com outros tipos de segregação e não permite integrar em um único mapa os marcadores que segregam para cada genitor. Logo, manteve-se ainda a necessidade da geração de um mapa integrado o que serviu de estímulo para a criação de estratégias que buscavam estimar as fases de ligações entre os loci (Maliepaard et al., 1997).

A construção de mapas de ligação pode utilizar métodos baseados em estimativas de máxima verossimilhança da frequência de recombinação entre os marcadores e, também, algoritmos para determinar a ordenação dos marcadores nos grupos de ligação. Para isso, foram desenvolvidos programas computacionais com base no método da máxima verossimilhança, como o LINKAGE-1 (Suiter et al., 1983); MAPMAKER (Lander et al., 1987); GMendel (Liu e Knapp, 1990); JoinMap (Stam, 1993); OneMap (Margarido et al., 2007) entre outros.

Mesmo após um século dos estudos de Morgan, os mapas genéticos ainda são considerados uma importante ferramenta na caracterização da arquitetura genética e genômica. Mapas genéticos com alta resolução permitem descobertas a partir da comparação entre os genomas das espécies e são indispensáveis no posicionamento preciso das sequências geradas pelas novas tecnologias de sequenciamento (Lewin et al., 2009). Assim, o

mapeamento genético auxilia nos programas de melhoramento, visto que um ou mais marcadores podem estar ligados a um ou mais genes responsáveis por características qualitativas e quantitativas (Bhering e Cruz, 2008).

Nas espécies florestais, a maioria das características de interesse econômico são características quantitativas, como as características envolvidas na floração, qualidade da madeira, tolerância ao frio e a déficit hídrico (Krutovsky e Neale, 2005). No gênero *Eucalyptus*, as progênies estudadas são populações F1's segregantes, e o primeiro mapa genético da espécie foi proposto por Grattapaglia e Sederoff (1994). Este trabalho possibilitou diversos outros para as espécies do gênero, como o mapeamento realizado por Marques et al. (1998), que utilizou marcadores AFLP e clones das espécies *E. tereticornis* e *E. globulus*. O desenvolvimento e a utilização de marcadores moleculares mais informativos, como os microssatélites, na construção de grupos de ligação das espécies *E. grandis* e *E. urophylla* mostrou-se eficiente e possibilitou a geração de um mapa genético referência para o gênero (Brondani et al., 2006).

Com as informações fornecidas pelos marcadores moleculares, é possível mapear individualmente os loci que controlam os QTLs, o que é essencial para o entendimento da heranças dos caracteres poligênicos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Com a construção dos mapas genéticos em *Eucalyptus*, passou-se a buscar o mapeamento de QTLs de características relacionadas a propriedades da madeira (Gion et al., 2011), crescimento (Freeman et al., 2009), resistência à doenças (Mamani et al., 2010), produção de metabólitos (O'Reilly-Wapstra et al., 2011), entre outras características de interesse dos programas de melhoramento genético.

2.4. Análise e mapeamento de QTLs

O mapeamento de QTLs permite que sejam detectados os loci que contribuem na variação de uma característica quantitativa. Por meio de cruzamentos experimentais, tais loci são mapeados e identificados, e permitem que sejam feitas inferências em todo o genoma sobre as relações entre genótipo e fenótipo de características quantitativas. Tal procedimento auxilia na compreensão da arquitetura genética, pois a partir destas inferências, podem-se obter informações sobre posição, número, efeitos pleiotrópicos dos QTLs, interações dos alelos dos QTLs dentro e entre os loci e interações entre QTLs e ambientes (Zeng et al., 1999). A detecção e mapeamento dos QTLs possibilitam, portanto, o melhor entendimento do controle genético das características quantitativas, que possuem importância agrônômica e econômica, e, eventualmente, permite a realização da seleção assistida em algumas espécies.

A localização de um QTL pela ligação ao locus marcador baseia-se na ligação genética entre os marcadores e o QTL, e depende da existência de desequilíbrio de ligação entre os mesmos, o qual gera efeitos quantitativos associados ao marcador, que pode ser detectado e estimado por meio de análises estatísticas adequadas. Se diferenças entre as médias dos fenótipos referentes às classes de marcas moleculares são identificadas, pode-se inferir que há um QTL ligado ao marcador (Falconer e Mackay, 1996).

Com a grande quantidade de informação molecular disponível atualmente é fácil constatar que diferentes poligenes apresentam, em geral, efeitos desiguais para a maioria das características. Pelos vários QTLs detectados experimentalmente, a proporção cumulativa explicada tem variado de 30 até 70% dependendo de diversos fatores, tais como o cruzamento analisado, a característica analisada, o delineamento experimental e a resolução do mapa em termo de número de marcadores (Bernardo, 2002).

Os valores das estimativas de herdabilidade de uma característica, apesar de serem específicos para os genótipos e ambientes distintos, podem ser úteis no fornecimento de informações iniciais. Intuitivamente, a probabilidade da existência de genes de maior efeito para uma característica de baixa herdabilidade é menor comparada às características de herdabilidade alta. Entretanto, não se podem descartar possíveis experimentos de mapeamento de QTLs baseando-se nisso, pois mesmo com baixa herdabilidade, as características ainda poderiam exibir QTL de maior efeito, podendo, assim, fazer com que a seleção assistida por marcadores tenha maior impacto (Grattapaglia, 2001).

Ao longo dos anos foram sendo desenvolvidos diferentes métodos de detecção e estimação de QTLs. As metodologias abrangem desde técnicas simples como a análise de marcas individuais até modelos que incluem simultaneamente múltiplas regiões do genoma (Weller, 1986; Lander e Botstein, 1989; Zeng, 1994; Kao e Zeng, 1997; Kao et al., 1999).

A análise de marcas individuais baseia-se na comparação entre as médias das classes genotípicas dos marcadores e na distribuição dos valores da característica que é examinada separadamente para cada marcador. Nesta análise cada teste é realizado independentemente da informação dos outros loci e pode ser realizada por meio de testes estatísticos como o teste t, análise de variância, regressão linear simples e teste da razão de verossimilhança (Lynch e Walsh, 1998; Weller, 1986). As suas principais vantagens são a simplicidade e rapidez de execução, além disso não é necessário o conhecimento da posição dos marcadores no genoma, o que faz que esta análise seja muito utilizada como um passo preliminar para a utilização de metodologias mais complexas. Mediante uma análise de varredura de todas as marcas existentes no genoma e eliminação das marcas consideradas menos informativas pode-se

contribuir para o aumento da eficiência de metodologias mais complexas, como os métodos de mapeamento por intervalo composto e múltiplo (Zeng, 1994; Kao e Zeng, 1997). Portanto, faz-se necessária a utilização de outras metodologias, pois a análise de cada marcador individualmente não permite a distinção entre posição e efeito dos QTLs, resultando em baixo poder de detecção quando os marcadores não saturam completamente no genoma e/ou quando as amostras são pequenas (Broman, 2001), além disso não é possível inferir sobre a localização dos QTLs.

Buscando contornar as limitações da análise de marcas individuais, Lander e Botstein (1989) propuseram o método de mapeamento por intervalo (*Interval Mapping* - IM). Esse método considera um par de marcadores adjacentes para inferir se há um QTL contido nessa região e, assim, dentro de um intervalo, várias posições são testadas para a presença de um QTL. Essa abordagem combina a análise de marcas individuais com estatísticas baseadas em verossimilhança, por meio de um modelo de regressão linear simples. Com o emprego dessa metodologia é possível inferir a provável posição dos QTLs ao longo do genoma, uma vez que se tem conhecimento do mapa de ligação. Contudo, o IM não considera todos os marcadores simultaneamente, portanto desconsiderando a interferência de possíveis QTLs fora do intervalo analisado. Toda a variação genética devido a estes outros QTLs é residual, o que pode diminuir a precisão das estimativas e o poder dos testes. Assim, podem ocorrer falsos positivos, também chamados de “QTLs fantasmas” (Martinez e Curnow, 1992).

Zeng (1994) e Jansen e Stam (1994), de forma independente, propuseram modelos que, além de considerar os marcadores adjacentes ao intervalo sendo mapeado, levam em consideração o efeito dos marcadores localizados em outras regiões do genoma (cofatores), aumentando o poder do teste e eliminando os “QTLs fantasmas”. A denominação proposta por Zeng (1994) foi mapeamento por intervalo composto (*Composite Interval Mapping* - CIM) e a proposta por Jansen e Stam (1994) foi de mapeamento múltiplo de QTL (*Multiple QTL Models* - MQM).

Os modelos propostos combinam o método IM com um modelo de regressão múltipla e assim controlam a variação fora do intervalo investigado. A inclusão de cofatores com efeitos significativos sobre o QTL do intervalo analisado diminui o resíduo do modelo, aumentando o poder de detecção de QTLs, além de melhorar consideravelmente as estimativas de efeito e posição. A seleção dos cofatores é baseada nos dados experimentais e pode ser realizada por meio dos resultados gerados pelo IM. Assim, os marcadores mais próximos da posição estimada do QTL no mapa ou mesmo os dois marcadores adjacentes desta posição podem ser utilizados como cofatores. Entretanto, a inclusão excessiva de vários

marcadores como cofatores pode reduzir sensivelmente a precisão do método em função de superparametrizações (Lynch e Walsh, 1998).

Os métodos CIM ou MQM detectam efeitos de QTLs em diferentes regiões genômicas separadamente, portanto não é possível ser diretamente estendida para análise de epistasia (Zeng et al., 1999). Para isso, Kao et al. (1999) desenvolveram o modelo de mapeamento de múltiplos intervalos (*Multiple Interval Mapping* - MIM) que incorpora a estimativa de epistasia ao modelo.

O mapeamento de QTLs relacionados a características de tolerância ao déficit hídrico tem sido realizado em diferentes espécies vegetais comerciais, como arroz (Nguyen et al., 2004), milho (Lu et al., 2006), cevada (Guo et al., 2007), trigo (Mathews et al., 2008), algodão (Levi et al., 2009) e amendoim (Ravi et al., 2011). Estes estudos demonstram a complexidade da tolerância ao déficit hídrico, visto que está associada a muitos QTLs, sendo alguns QTLs de pequeno efeito e epistáticos. Entretanto, os estudos com tolerância ao déficit hídrico ainda não identificaram QTLs nas espécies de *Eucalyptus*.

A tolerância a seca depende de ajustes fisiológicos que ocorrem em diversos órgãos, envolve a interação de cascatas de sinalização e, portanto, assume-se que possui respostas integradas de nível molecular a planta inteira (Cohen et al., 2010). Com isso, o mapeamento de QTLs, passa a ser uma forma eficaz de identificação de componentes específicos que possibilitam a avaliação direta das respostas ao estresse por déficit hídrico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificação de regiões genômicas associadas ao déficit hídrico em *Eucalyptus*.

3.2. Objetivos específicos

- Construção de mapa genético para posicionamento dos marcadores nos grupos de ligação;
- Identificação e análise de QTLs para características relacionadas ao estresse por déficit hídrico em uma progênie segregante de *Eucalyptus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

O material vegetal consistiu de uma progênie segregante gerada a partir do cruzamento entre dois clones híbridos (*E. urophylla* x *E. grandis*) pertencente ao Programa de Melhoramento da Empresa Fibria Celulose e Papel S/A e classificados como sensível e tolerante ao déficit hídrico. Esta progênie F1 foi composta por 195 irmãos-completos.

Os parentais e os 195 indivíduos desta progênie foram avaliados por meio de caracteres fisiológicos para determinação dos fenótipos relacionados à tolerância ao déficit hídrico. Amostras de folhas jovens destes materiais foram coletadas e utilizadas nas análises de genotipagem.

4.2. Análises fenotípicas

As avaliações fenotípicas foram realizadas pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Rinaldo César de Paula do Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista, *Campus* de Jaboticabal – SP. O local dos experimentos foi a casa de vegetação do Viveiro Experimental de Plantas Ornamentais e Florestais da FCAV, localizado na cidade de Jaboticabal - SP.

Os 195 indivíduos da progênie foram divididos em grupos e avaliados em etapas. Os parentais foram avaliados em todos os experimentos realizados para avaliação da progênie e foram utilizados como controle, permitindo assim a comparação dos indivíduos avaliados em experimentos diferentes. Todos os genótipos foram avaliados em estágio de muda com cerca de 70 dias. Todas as mudas foram submetidas a dois regimes de irrigação, sendo um regime sem restrição na disponibilidade de água (testemunha) e outro com a irrigação suspensa até o aparecimento dos primeiros sintomas de estresse por déficit hídrico, correspondente a murcha (estressado). O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, no esquema fatorial $c \times 2$ (c clones e 2 regimes de irrigação), com quatro repetições.

Os caracteres fisiológicos utilizados para caracterização fenotípica da progênie quanto à tolerância ao déficit hídrico foram: taxa líquida de fotossíntese (A), condutância estomática (gs), transpiração (E), eficiência intrínseca (A/E) e instantânea no uso da água (A/g_s), conteúdo relativo de água nas folhas (CRA), eficiência fotoquímica do fotossistema II (F_v/F_m), índice de conteúdo de clorofila (ICC) e potencial hídrico foliar (Ψ_f). A avaliação destas características foi realizada assim que os primeiros genótipos manifestavam sinais de estresse hídrico. Detalhes da metodologia foram descritas por Vellini (2007).

Em cada experimento, as plantas foram submetidas a vários períodos de estresse e as análises estatísticas foram realizadas considerando as médias obtidas em cada experimento. Os dados fenotípicos recebidos foram analisados através da rotina *proc mixed* do programa SAS[®] (Littell et al., 1996) por meio de análises univariadas para cada característica. Os efeitos de genótipo (indivíduos da progênie dentro de cada combinação de bloco, tratamento e época), tratamento (estressado e controle) e interação entre genótipo e tratamento foram considerados efeitos fixos; e os efeitos de bloco e interação entre bloco e tratamento foram considerados aleatórios. As médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos (LSMeans) obtidas foram utilizadas nas análises de QTLs.

4.3. Extração do DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o método de CTAB descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998), com modificações. As folhas mais jovens amostradas foram maceradas com o auxílio de nitrogênio líquido e homogeneizadas com 700 µL de solução de extração (com 2% de CTAB p/v, 1% de PVP p/v e 2ul de β-mercaptoetanol por ml). Em seguida, a solução resultante foi deixada a 65°C em um intervalo de 40 a 60 minutos. A primeira extração foi realizada com 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA 25:1) misturando-se a solução no equipamento vórtex com posterior centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos.

Com a centrifugação ocorreu a separação do material genético dos demais componentes das folhas, constatando-se a formação de três fases de solução. A fase superior foi transferida para outro tubo para ser utilizada em uma nova etapa de extração e as demais foram descartadas. Destaca-se aqui a necessidade de um protocolo com mais etapas de lavagem do material, visto que para a execução da técnica de AFLP necessita-se de um DNA de elevada pureza. Assim, a solução extraída da primeira etapa foi submetida a uma nova extração com a adição de 100 µL de CTAB 5% e repetição das etapas de adição de CIA descritas anteriormente, homogeneização em vórtex, centrifugação e separação da fase superior da solução.

À solução final foram adicionados 400 µL de álcool isopropílico gelado e centrifugada nas mesmas condições anteriores. Posteriormente, observou-se a formação de um precipitado e caso este não se formasse, a etapa anterior era repetida. O sobrenadante do tubo foi descartado e o precipitado lavado com 800 µL de etanol 70% por 10 minutos, com posterior lavagem com 800 µL etanol 95% por 3 minutos.

O precipitado foi seco em estufa a aproximadamente 50°C e ressuspendido em 100 µL de tampão TE (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, pH 7,5) contendo 10 mg/µL de RNase. Para

que ocorresse a digestão RNA pela RNase, a solução foi incubada a 37°C até a diluição do precipitado por um período de até 120 minutos.

A verificação da integridade do DNA obtido foi realizada após eletroforese nas condições de 3 V/cm por 1 hora a 25°C em tampão TBE 1X em gel de agarose 1% (Invitrogen) corado com brometo de etídeo. As amostras também foram quantificadas e a análise da pureza observada em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000). A partir dos resultados gerados, o DNA de cada amostra foi diluído para a concentração final de 100 ng/μL.

4.4. Marcadores microssatélites

A genotipagem da progênie segregante com os marcadores microssatélites foi realizada pela empresa Heréditas (Brasília-DF). As análises utilizaram 120 loci de microssatélites (SSR e SSR-EST) previamente localizados em grupos de ligação descritos por Brondani et al. (1998, 2002, 2006) e por Faria (2008) e Faria et al. (2011). O protocolo de análise dos loci, condições de reação PCR, detecção e genotipagem automatizada em sequenciador *ABI Prism 3100XL* foram descritos anteriormente por Faria et al. (2010).

4.5. Marcadores AFLP

O protocolo utilizado nas reações de AFLP foi o desenvolvido por Vos et al. (1995) adaptado por Hazen & Ward (2010) (<https://www.msu.edu/user/hazensam/aflp/AFLPprotocolMSU.html>) com modificações. Portanto, para a reação de digestão foram utilizados 250 ng de DNA, 0,625 U da enzima *MseI* e da enzima *EcoRI*, 1,25 μL do tampão universal 10X (100 mM de Tris-acetato pH 7.5, 100 mM de acetato de magnésio, 500 mM de acetato de potássio), 0,5 μL de BSA (10μg/μL) (New England) em um volume final de 50 μL. A reação foi incubada a 37°C por 16 horas.

Para a verificação do resultado, 250 ng do produto da digestão foi aplicado em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese por 50 minutos em tampão TBE 1X (Tris-noBorato-EDTA) e corado com brometo de etídeo para visualização em transiluminador de luz UV. Em seguida, as enzimas do restante do produto da digestão foram desnaturadas por inativação térmica a 70°C por 15 minutos.

O passo seguinte foi a ligação dos adaptadores. Este passo foi realizado com os adaptadores *forward* e *reverse* da *EcoRI* (diluídos a 5 pM em solução contendo 0,5X de tampão universal 10X) e os adaptadores *forward* e *reverse* da *MseI* (diluídos a 50 pM em solução 0,5X de tampão universal 10X) (Tabela 1). Realizou-se a hibridização dos

adaptadores em termociclador, modelo PTC-100 (MJ Research), por 10 minutos a 65°C, 10 minutos a 37°C e 10 minutos a 25°C.

Tabela 1: Enzimas e sequências dos adaptadores e dos *primers* utilizados nas reações de amplificação.

Enzimas	Adaptadores e <i>primers</i>	Sequência de nucleotídeos
<i>EcoRI</i>	Adaptadores	5' CTCGTAGACTGCTACC 3' 5' AATTGGTACGCAGTCTAC 3'
	<i>primers</i> da pré-amplificação N: A ou T	5' GACTGCGTACCAATTCN 3'
	<i>primers</i> da amplificação seletiva NNN: AAA, AAC, AAG, ACA, ACC, ACG, ACT, AGA, AGC, AGG, TAC, TAG, TAT, TCG, TTC, TTG, TTT.	5' GACTGCGTACCAATTCNNN 3'
<i>MseI</i>	Adaptadores	5' GACGATGAGTCCTGAG 3' 5' TACTCAGGAACTCAT 3'
	<i>primers</i> da pré-amplificação N: G ou C	5' GATGAGTCCTGAGTAAN 3'
	<i>primers</i> da amplificação seletiva NNN: CGG, CGT, CTA, CTC, CTG, CTT, GAA, GAC, GAG, GAT, GCC, GCG, GCT, GGA, GGC, GGG, GGT, GTA, GTC, GTG, GTT.	5' GATGAGTCCTGAGTAANNN 3'

A ligação com os fragmentos de DNA foi realizada em uma reação contendo 2 µL de tampão da enzima *T4 DNA Ligase* (10X) (Invitrogen), 5 e 50 µM de cada um dos adaptadores, 2 U de *T4 DNA Ligase* (Invitrogen), 4 µL de água ultrapura e 40 µL de solução de DNA digerido. A ligação foi realizada a 17°C por 16 horas.

Para as reações de pré-amplificação foram utilizadas combinações de *primers* com sequências complementares a cada um dos adaptadores mais um nucleotídeo seletivo na extremidade 3' (Tabela 1). As reações de pré-amplificação foram compostas por 0,25 µM de cada um dos *primers* com apenas um nucleotídeo; 10 µL de *PCR Master Mix 2X* (Promega), 6 µL de *Nuclease Free Water* (Promega) e 2 µL de DNA digerido e ligado, em um volume final de 20 µL. O programa para pré-amplificação no termociclador modelo PTC-100 (MJ Research) foi de 94°C por 2 minutos, 26 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 5 minutos. Posteriormente, o produto desta reação foi diluído em 80 µL de água ultrapura estéril.

Nas reações de amplificação seletiva foram utilizados adaptadores e *primers* com sequências contendo dois nucleotídeos seletivos a mais na extremidade 3' (Tabela 1) e foram

compostas por 0,5 μM de cada *primer*; 10 μL de *PCR Master Mix 2X* (Promega), 6 μL de *Nuclease-Free Water* (Promega) e 2 μL de reação de pré-amplificação diluída, com o volume final de 20 μL . O programa para amplificação seletiva foi de 94°C por 2 minutos, 12 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com queda de 0,7°C em cada ciclo, 23 ciclos de 94°C 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com extensão final de 72°C por 2 minutos.

A seleção das enzimas e das combinações de *primers* realizou-se baseada no trabalho de Gaiotto et al. (1997), que demonstrou que estas combinações produzem fragmentos mais definidos e de fácil visualização, apesar de serem em menor número.

Após a amplificação seletiva foram adicionados 2,5 μL de tampão de carregamento (10 mL de formamida; 200 μL de EDTA 0,5 M pH 8,0; 10 mg de azul de bromofenol e 10 mg de xileno cianol). Em seguida, as amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 94°C e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% de 0,5 mm de espessura com o sistema “*Sequi-gen GT*” (BioRad) de 38 x 50 cm. A pré-corrída foi realizada a potência constante de 80 W por 2 horas em média, seguida de corrida eletroforética por 3 horas a 80 W.

Para a revelação dos géis foi utilizado o método de coloração com nitrato de prata de acordo com o protocolo proposto por Creste et al. (2001). Nos casos de fragmentos polimórficos, o tamanho dos mesmos foi estimado por comparação com padrão de peso molecular 50 pb e 100 pb (Fermentas).

4.6. Construção do mapa genético

Para a análise do mapa genético, utilizaram-se os dados dos marcadores moleculares SSR, SSR-EST e AFLP genotipados a partir da progênie F1's segregante. O padrão de segregação esperado para os marcadores AFLP foi avaliado pelo teste de aderência Qui-quadrado (χ^2), em nível de 5% de significância, com correção pelo método de Bonferroni para todos os loci. As proporções esperadas para os marcadores AFLP eram de 1:1 (locus segregando em apenas um genitor) e 3:1 (locus segregando nos dois genitores). O teste de aderência foi realizado também para os dados dos SSR e SSR-EST, porém não foi levado em consideração para estes marcadores, pois o número de marcadores fora dos padrões de segregação segundo o teste era baixo e não influenciariam negativamente as análises (Xu, 2008).

Na construção do mapa de ligação, portanto, foram analisados 152 marcadores (71 SSR, 45 SSR-EST e 36 AFLP) em 195 indivíduos da progênie. A análise de ligação e a determinação da ordem dos marcadores foram realizados pelo *software* JoinMap[®] 3.0 (Van

Ooijen e Voorrips, 2001). Os marcadores foram classificados de acordo com os tipos de segregação para uma população CP (*Cross Pollinators*), que é o recomendado pelo programa para o mapeamento de populações resultantes dos cruzamentos entre genitores heterozigotos, cujas fases de ligação dos loci são desconhecidas. Os padrões de segregação dos marcadores foram codificados de acordo com a tabela 2, conforme anotação empregada pelo *software* JoinMap[®], sendo os marcadores AFLP codificados como <hkxhk>, <nnxnp> e <lmxll>; e os marcadores SSR e SSR-EST codificados como <abxcd>, <hkxhk>, <lmxll> e <nnxnp>.

Tabela 2: Códigos de anotação dos padrões de segregação esperados em uma população *Cross Pollinator*^[1].

Código	Descrição	Possíveis genótipos	Segregação esperada
<ab x cd>	<i>Locus</i> heterozigoto em ambos os genitores, quatro alelos	ac, ad, bc, bd, --	1:1:1:1
<ef x eg>	<i>Locus</i> heterozigoto em ambos os genitores, três alelos	ee, ef, eg, fg, --	1:2:1
<hk x hk>	<i>Locus</i> heterozigoto em ambos os genitores, dois alelos	hh, hk, kk, h-, k-, --	3:1
<lm x ll>	<i>Locus</i> heterozigoto no primeiro genitor	ll, lm, --	1:1
<nn x np>	<i>Locus</i> heterozigoto no segundo genitor	nn, np, --	1:1

- [1]Nota: 1. Conforme anotação empregada pelo *software* JoinMap 3.0[®] (Van Ooijen; Voorrips, 2001). As duas primeiras letras nesses códigos representam os alelos do genitor masculino e as duas últimas o genitor feminino.
2. cada letra de **a** à **p** representa um alelo distinto; "-" significa alelo desconhecido.
3. **h-** e **k-** são genótipos dominantes: **h-** pode ser **hh** ou **hk**, e **k-** pode ser **kk** ou **hk**.

As marcas foram agrupadas utilizando-se um LOD $\geq 3,5$, fração de recombinação $\leq 0,40$ e valor de ripple = 1. As frequências de recombinação, estimadas em análise multiponto, foram convertidas em distâncias de mapa em centiMorgans (cM) por meio da função de mapeamento de Kosambi. Os diagramas representativos dos grupos de ligação foram obtidos pelo *software* MapChart 2.2 (Voorrips, 2002) com base no arquivo texto dos grupos de ligação gerados pelo JoinMap[®]. Os diagramas foram montados em formato de figuras, constituindo o mapa de ligação.

4.7. Análise e Mapeamento de QTLs

Para as análises de QTLs foram utilizadas médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos das nove características avaliadas, ou seja, taxa líquida de fotossíntese (A), conteúdo relativo de água nas folhas (CRA), transpiração (E), eficiência instantânea no uso de água (A/E), eficiência intrínseca no uso de água (A/g_s), eficiência fotoquímica média do fotossistema II (Fv/Fm), condutância estomática (g_s), potencial hídrico foliar (Ψ_f) e índice

de conteúdo de clorofila (ICC), em condições normais (testemunha) e condições de déficit hídrico (estressado). O total de 150 indivíduos avaliados fenotipicamente foi utilizado para o mapeamento de loci quantitativos.

As análises dos QTLs foram realizadas com auxílio do *software* MapQTL[®] 4.0 (Van Ooijen et al., 2002) e as características sob condições normais e de estresse foram avaliadas separadamente. Inicialmente foi executada a análise de mapeamento por intervalo (IM) para todos os marcadores sem as informações do mapa de ligação, ou seja, foi realizada a análise de marcas individuais e os QTLs putativos foram avaliados. Em seguida, foi fornecido ao *software* o mapa dos marcadores e executada a análise de IM em cada um dos grupos. Como resultado, os possíveis cofatores foram selecionados e avaliados pela análise de seleção automática de cofatores. Os cofatores que apresentaram p-valor <0,02 foram selecionados para a análise de mapeamento múltiplo de QTL (MQM). O valor de LOD *score* limiar (*threshold*) para determinar a presença ou ausência de cada QTL foi determinado por meio de teste permutação ($\alpha=5\%$, $n=1000$ repetições) (Churchill e Doerge, 1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Mapa genético

Os dados genotípicos obtidos com a análise dos marcadores SSR, SSR-EST e AFLP na população F1's segregante foram utilizados na construção do mapa genético. Para a genotipagem com os marcadores microssatélites (SSR e SSR-EST), 120 *primers* foram genotipados nos genitores e na progênie, porém os resultados de quatro *primers* foram excluídos posteriormente da análise devido a erros na técnica de genotipagem. Assim, 116 *primers* foram avaliados para a construção dos grupos de ligação, sendo 71 (61%) microssatélites genômicos e 45 (39%) microssatélites originados de bibliotecas de EST. Dentre os microssatélites genômicos, nove loci foram desenvolvidos e descritos inicialmente por Brondani et al. (1998), que foram os primeiros autores a mapear e revelar a abundância de SSR no genoma de *Eucalyptus*.

Os 116 *primers* avaliados pela análise de cosegregação dos alelos apresentaram diferentes padrões de segregação que podem ser esperados em uma população CP (Tabela 3). Portanto, observou-se 77 (66,4%) dos marcadores microssatélites classificados como completamente informativos (1:1:1:1) e nenhum com segregação 1:2:1, em que ambos os pais são heterozigotos. Brondani et al. (2006) também não relataram a ocorrência de loci com padrão de segregação 1:2:1 em *Eucalyptus* e 55% dos marcadores microssatélites eram também completamente informativos (1:1:1:1).

Tabela 3: Padrões de segregação encontrados na população CP com os marcadores microssatélites (SSR e SSR-EST) conforme anotação empregada pelo *software* JoinMap 3.0[®].

Tipos de segregação	Marcadores Microssatélites	Segregação esperada
<ab x cd>	77	1:1:1:1
<ef x eg>	-	1:2:1
<hk x hk>	6	3:1
<lm x ll>	16	1:1
<nn x np>	17	1:1

A genotipagem com os marcadores AFLP na progênie foi iniciada com a busca por marcadores mais polimórficos entre os dois genitores. Foram testadas 144 combinações de *primers* AFLP nos genitores e 136 (94,4%) destas combinações de *primers* geraram 447 marcadores informativos. As combinações de *primers* geraram números diferentes de

marcadores informativos (1 a 11 marcadores) e algumas combinações não geraram nenhum marcador informativo; assim, a média de marcadores por combinação de *primers* foi de aproximadamente três.

A partir do conjunto de combinações testado nos genitores, foram selecionadas sete combinações de *primers* (tabela 4) que apresentaram de 8 a 11 marcadores informativos por combinação. Estas combinações de *primers* foram analisadas em 94 F1's da progênie com repetição dos genitores para comparação e confirmação das marcas (figura 1).

Tabela 4: Combinações de *primers* seletivos (AFLP) amplificados em 94 F1's da progênie.

<i>Primer</i> <i>EcoRI</i>	Sequência	<i>Primer</i> <i>MseI</i>	Sequência
E11	5'GACTGCGTACCAATT CACG 3'	M21	5'GATGAGTCCTGAGTAAG TC 3'
E18	5'GACTGCGTACCAATT CTTA 3'	M15	5'GATGAGTCCTGAGTAA CTG 3'
E21	5'GACTGCGTACCAATT CTCG 3'	M7	5'GATGAGTCCTGAGTAA CAC 3'
E21	5'GACTGCGTACCAATT CTCG 3'	M15	5'GATGAGTCCTGAGTAA CTG 3'
E24	5'GACTGCGTACCAATT CTAG 3'	M12	5'GATGAGTCCTGAGTAA CGT 3'
E24	5'GACTGCGTACCAATT CTAG 3'	M15	5'GATGAGTCCTGAGTAA CTG 3'
E25	5'GACTGCGTACCAATT CTTT 3'	M9	5'GATGAGTCCTGAGTAA CAT 3'

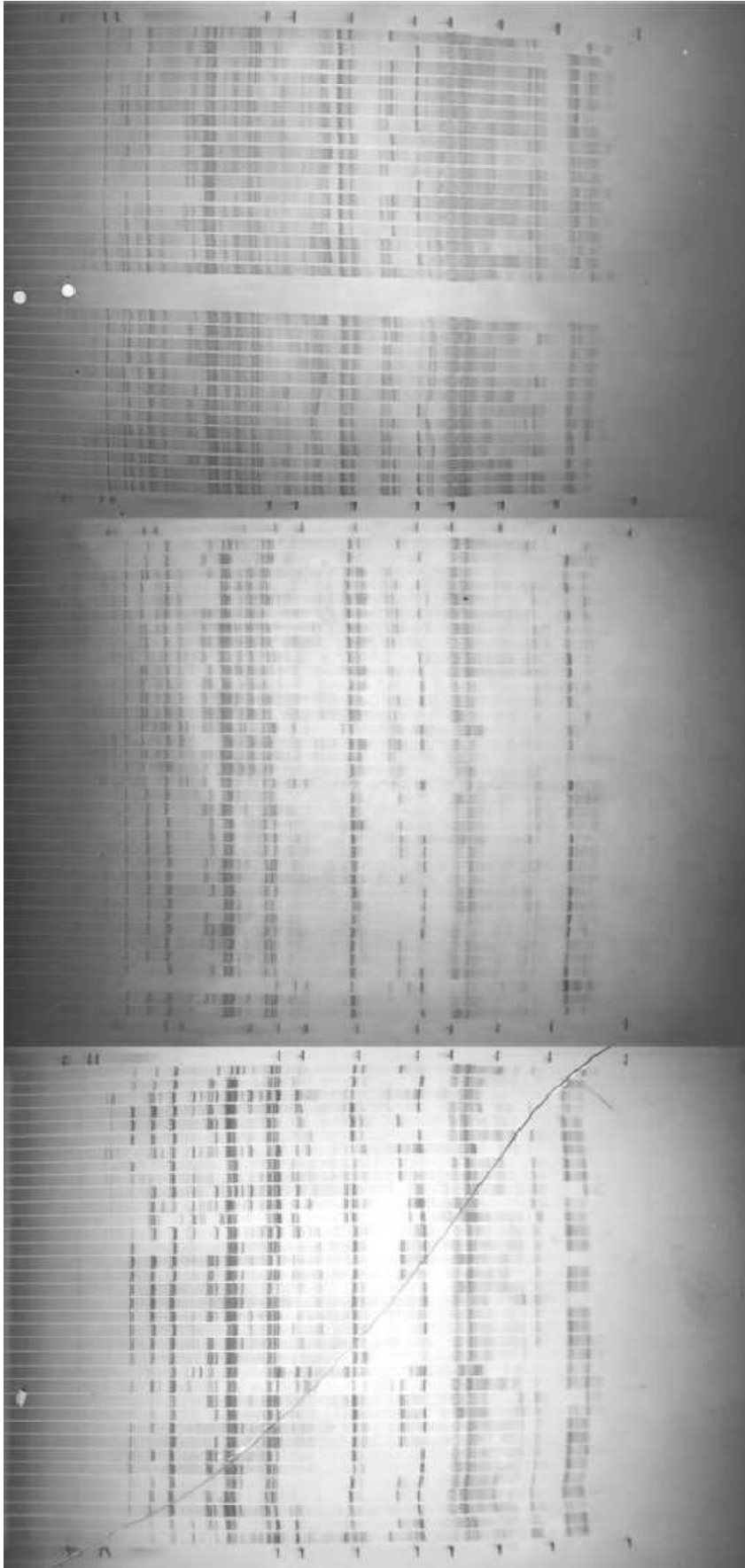


Figura 1: Géis de poliacrilamida 6% corados com nitrato de prata apresentando os fragmentos amplificados pela combinação de *primers* AFLP E24_M12 nos genitores e em 94 indivíduos da progênie. Os genitores foram utilizados como controle e repetidos em cada gel (antepenúltima e penúltima colunas dos géis). Marcador de peso molecular de 50 pb (primeira e última colunas dos géis).

A progênie apresentou ao todo 195 F1's; entretanto, foram selecionados apenas 94 F1's para a genotipagem com o marcador AFLP e os demais indivíduos foram codificados como dados perdidos (“--”) na análise para a construção do mapa. Nas 94 F1's da progênie, o total de marcas polimórficas de AFLP geradas foi de 64, com segregações dos tipos 3:1 e 1:1. Como resultado do teste de χ^2 com correção de Bonferroni, apenas 56,25% dos marcadores AFLP foram considerados dentro dos padrões de segregação conforme tabela 5. A distorção de segregação pode ser devida a vários fatores, como viés estatístico, razões biológicas e principalmente, neste caso, erros de genotipagem. A distorção de natureza biológica é causada pela proximidade física dos loci marcadores com regiões ou genes que afetam a formação dos gametas antes da fertilização ou a viabilidade dos genótipos após a fertilização (Vogl e Xu, 2000). Já os erros de genotipagem podem ter ocorrido devido a problemas de revelação dos géis de poliacrilamida, que muitas vezes podem gerar padrões de amplificação que não se repetem com precisão, logo algumas marcas podem ter sido omitidas.

Tabela 5: Padrões de segregação encontrados na população CP com os marcadores AFLP conforme anotação empregada pelo *software* JoinMap 3.0[®].

Tipos de segregação	Marcadores AFLP	Segregação esperada
<ab x cd>	-	1:1:1:1
<ef x eg>	-	1:2:1
<hk x hk>	16	3:1
<lm x ll>	12	1:1
<nn x np>	8	1:1

Portanto, a análise dos grupos de ligação foi realizada no *software* JoinMap 3.0[®] com 152 marcadores (116 SSR/SSR-EST e 36 AFLP) em 195 indivíduos da progênie. Nesta análise, a partir das frequências genotípicas dos indivíduos e dos loci adotou-se o critério de exclusão dos indivíduos que possuíssem mais de 53 marcadores com dados perdidos, ou seja, mais de 35% do total de marcadores, e também a exclusão dos loci microssatélites que tivessem mais de 50% dos indivíduos com dados perdidos. Esse critério foi adotado conforme sugere o tutorial do programa, pois a presença de muitos dados perdidos podem influenciar negativamente no resultado final. Já para os marcadores AFLP, visto que apenas 94 indivíduos da progênie foram genotipados, foi considerado aceitável locus com até 101 indivíduos com dados perdidos. Ao final, apenas um indivíduo e dez loci foram excluídos da análise.

A análise final resultou em 99 marcadores mapeados em 13 grupos de ligação. Os grupos foram identificados e nomeados com base nos loci microssatélites em comum com o mapa genético de *Eucalyptus* proposto por Brondani et al. (2006) e Neves et al. (2011). Dos 99 marcadores ligados, 59 loci são do tipo SSR, 37 são SSR-EST e três são AFLP (Tabela 6). Os marcadores AFLP ligados (M9, M23 e M32) foram gerados pelas combinações de *primers* E24_M12, E18_M15 e E24_M15. O tamanho do mapa gerado foi de 842,35 cM e apresentou uma distância média entre os marcadores de 9,30 cM como mostra o resumo apresentado na tabela 7 e na figura 2.

Tabela 6: Marcadores moleculares analisados para a construção dos grupos de ligação.

Tipo de marcador	Código	Quantidade analisada	Quantidade mapeada	Porcentagem dos marcadores mapeados (%)
AFLP	M	36	3	8,3
SSR	EMBRAn*; EG e ES	71	59	83,1
SSR-EST	EMBRAnn*	45	37	82,2
	Total	152	99	

n* = < 900; nn* = > 900

Tabela 7: Resumo do mapa genético do híbrido interespecífico *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, indicando o número de marcadores em cada um dos grupos de ligação, o número e o tipo de marcadores, o tamanho de cada grupo e a distância média entre marcadores em cada um dos grupos (função de mapeamento de Kosambi e distâncias em centiMorgans). As letras a e b indicam que são partes de apenas um grupo nos mapas propostos por Brondani et al. (2006) e Neves et al. (2011).

Grupo de ligação	Marcadores	Número e tipo de marcadores	Tamanho do grupo de ligação (cM)	Distância média (cM)
1	9	5 SSR, 4 SSR-EST	80,36	8,93
2a	8	5 SSR e 3 SSR-EST	69,25	8,66
2b	2	1 SSR-EST e 1 AFLP	18,82	9,41
3	6	3 SSR e 3 SSR-EST	38,97	6,49
4	3	2 SSR e 1 SSR-EST	30,90	10,30
5	11	5 SSR e 6 SSR-EST	71,40	6,49
6	17	12 SSR, 4 SSR-EST e 1 AFLP	121,11	7,12
7	3	2 SSR e 1 SSR-EST	49,38	16,46
8a	3	2 SSR e 1 AFLP	33,31	11,10
8b	6	3 SSR e 3 SSR-EST	57,67	9,61
9	11	5 SSR e 6 SSR-EST	93,85	8,53
10	10	6 SSR e 4 SSR-EST	83,68	8,37
11	10	9 SSR e 1 SSR-EST	93,66	9,37
13	99		842,35	9,30

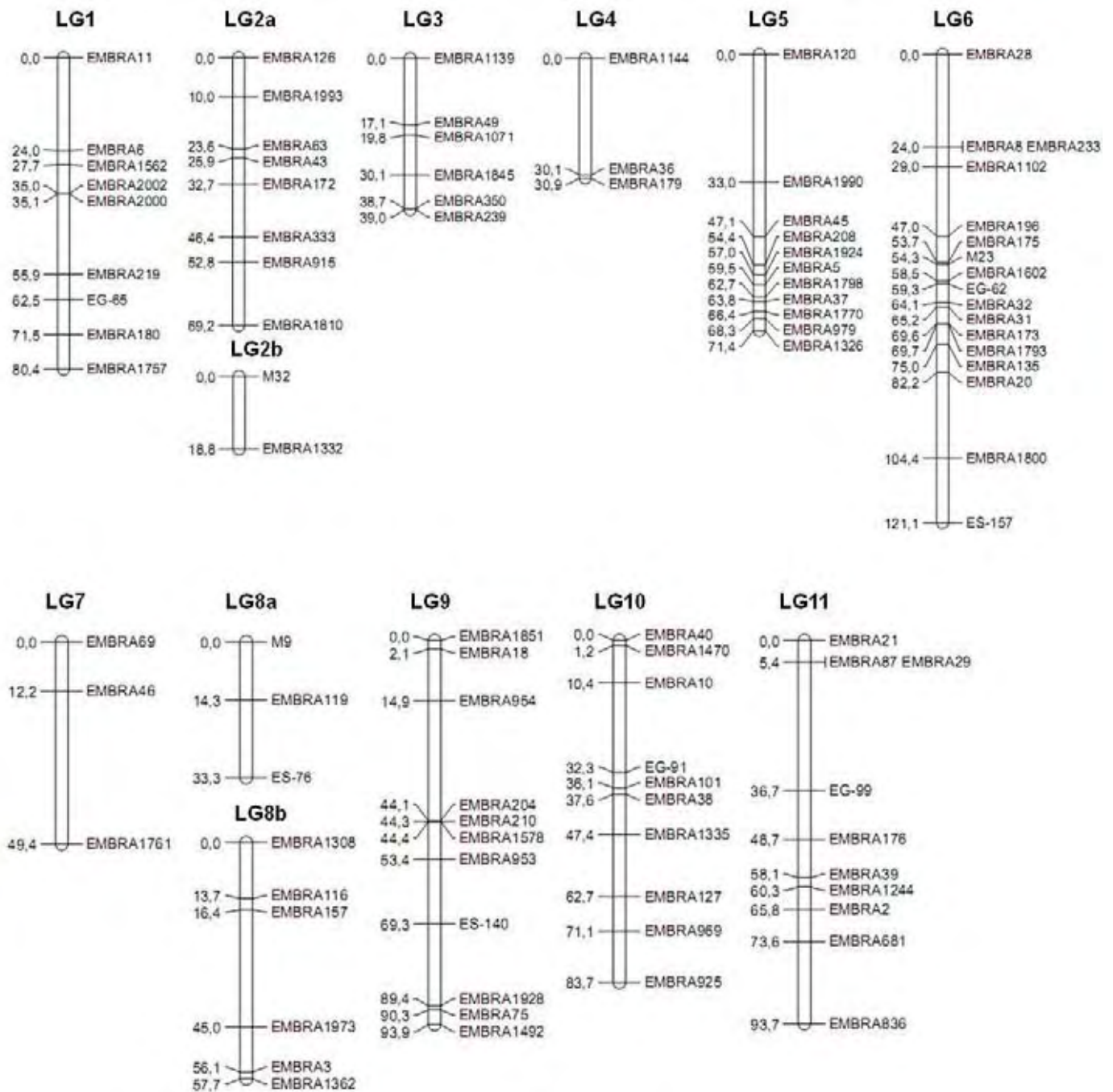


Figura 2: Mapa genético intergado de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Marcadores SSR e SSR-EST identificados por EMBRA, EG e ES. Marcadores AFLP identificados por M. Distâncias em centiMorgan e função de mapeamento de Kosambi. Grupos de ligação numerados de acordo com os mapas de *Eucalyptus* propostos por Brondani et al. (2006) e Neves et al. (2011).

Quando comparado, o mapa gerado é menor que outros mapas desenvolvidos anteriormente para espécies do gênero *Eucalyptus* (1552 cM — Grattapaglia e Sederoff, 1994; 1415 cM — Verhaegen e Plomion, 1996; 1375 cM — Thamarus et al., 2002; 1335 cM — Myburg et al., 2003; 1505 cM — Gan et al., 2003; 1568 cM — Brondani et al. 2006; 1275 cM — Neves et al., 2011; 1107,6 cM — Kullan et al., 2012). Esta diferença pode estar relacionada aos diferentes *software* de mapeamento utilizados nas análises de ligação, assim, como o número de marcadores analisados. O *software* JoinMap[®] possui algumas diferenças na análise quando comparado com o programa MAPMAKER, que foi utilizado na maioria dos trabalhos de mapeamento citados anteriormente. Ambos os programas utilizam o método de máxima verossimilhança entre os loci, porém o MAPMAKER assume ausência de interferência por *crossover*, enquanto o JoinMap[®] considera um certo nível de interferência, apesar de ambos utilizarem a função de Kosambi (Kullan et al., 2012).

O baixo número de marcadores utilizados na presente análise também não permitiu a geração de um mapa maior, visto que apenas três (8%) dos 64 marcadores AFLP genotipados na progênie foram mapeados. Marques et al. (1998) construíram um mapa para *E. tereticornis* e *E. globulus* baseado em apenas marcadores AFLP. Após o teste de Qui-quadrado, 80% dos marcadores AFLP genotipados apresentavam segregação dentro dos padrões esperados. Dentre os marcadores segregantes, 40% foram mapeados para *E. tereticornis* e 55% mapeados em *E. globulus*.

Em geral, as espécies de *Eucalyptus* possuem 11 cromossomos, assim esperava-se encontrar 11 grupos de ligação. Os dois grupos extras de ligação foram gerados devido ao baixo número de marcadores que geraram intervalos maiores entre os marcadores e o *software* não pode ligar todos os grupos de um mesmo cromossomo, como ocorreu com o grupo 2 e 8. Entretanto, estes grupos por possuírem marcadores SSR em comum com o mapa referência de *Eucalyptus* foi possível realizar a comparação e constatar que os quatro grupos (2a, 2b, 8a e 8b) correspondem a dois grupos de ligação (2 e 8). Número de grupos de ligação diferente do número haplóide de cromossomos da espécie já foi relatado em alguns outros trabalhos (Grattapaglia e Sederoff, 1994; Marques et al., 1998; Thamarus et al., 2002; Gan et al., 2003).

Comparações entre o presente mapa, o mapa referência (Brondani et al., 2006) e o mapa publicado por Neves et al (2011), permitiram confirmar que nenhum marcador microsatélite agrupou-se em grupos distintos, mesmo quando a cobertura em um determinado grupo de ligação era baixa. Notou-se apenas diferenças de ordenação, porém tal fato deve-se as diferenças entre as metodologias de mapeamento. Portanto, o mapa gerado mostrou-se consistente para a análises de mapeamento de QTLs.

5.2. Análise e mapeamento de QTLs

5.2.1. Análise de marcas individuais

Análise de QTL por marcas individuais mostrou vários marcadores com forte associação com os caracteres avaliados, indicando a possível presença de QTL. Foram consideradas relevantes as relações entre marcadores e caracteres com $LOD \geq 2$ (Tabela 8).

Tabela 8: Listagem dos marcadores que foram consideradas relevantes ($LOD \geq 2$) em relação a ligação com QTL a partir da análise de marcas individuais e a porcentagem da variação explicada (%expl).

Caráter	Testemunha			Estressado		
	LOD	%expl	Marcador	LOD	%expl	Marcador
A	2.62	9.6	EMBRA2000	2.43	7.2	EMBRA11
	3.81	11.2	EMBRA196	4.01	14.1	EMBRA135
	2.11	6.4	EMBRA1761	3.31	9.7	EMBRA196
CRA	2.37	7.1	EMBRA1990	2.30	10.3	EMBRA1770
	2.01	6.0	EMBRA173	3.28	12.7	EMBRA135
	2.46	7.5	EMBRA196	-	-	-
E	4.41	12.9	EMBRA196	2.36	7.0	EMBRA196
	-	-	-	2.05	6.4	EMBRA953
	-	-	-	2.66	8.4	EMBRA2
	-	-	-	2.62	7.7	EMBRA681
	-	-	-	2.51	7.4	EMBRA176
	-	-	-	3.21	9.8	EMBRA1244
	-	-	-	-	-	-
A/E	-	-	-	2.57	8.0	EMBRA11
	-	-	-	3.25	9.6	EMBRA196
A/g _s	2.52	7.5	EMBRA1990	3.43	11.7	EMBRA1770
	4.53	15.4	EMBRA1770	2.15	7.0	EMBRA120
	2.16	6.5	EMBRA20	2.29	6.8	EMBRA233
	3.79	13.2	EMBRA135	2.22	6.6	EMBRA8
	-	-	-	3.53	12.6	EMBRA135
	-	-	-	2.03	6.1	EMBRA69
	-	-	-	2.05	6.1	EMBRA953
Fv/Fm	-	-	-	2.17	6.8	EMBRA40
	2.09	6.2	EMBRA350	3.19	10.8	EMBRA1770
	2.03	6.1	EMBRA239	2.15	7.1	EMBRA75
	2.10	6.2	EMBRA173	2.48	7.3	ES-140
	2.30	7.0	EMBRA1470	-	-	-
g _s	2.17	6.5	EG-99	-	-	-
	2.47	7.3	EMBRA1990	2.43	8.1	EMBRA1770
	3.29	11.4	EMBRA1770	6.11	20.8	EMBRA135
	3.03	10.8	EMBRA135	2.02	6.3	EMBRA1761
Ψ _f	-	-	-	2.37	7.5	EMBRA40
	2.11	6.5	EMBRA1757	2.41	9.6	EMBRA135
ICC	2.78	8.2	EMBRA1071	-	-	-
	2.60	8.6	EMBRA1757	2.13	8.6	EMBRA1770
	3.30	11.3	EMBRA120	2.41	7.5	EMBRA29
	2.38	7.5	EMBRA210	-	-	-
	2.01	6.0	EMBRA1578	-	-	-
	2.47	7.6	EMBRA953	-	-	-

Legenda: A - taxa líquida de fotossíntese; CRA - conteúdo relativo de água nas folhas; E- transpiração; A/E - eficiência instantânea no uso de água; A/g_s - eficiência intrínseca no uso de água; Fv/Fm - eficiência fotoquímica média do fotossistema II; g_s - condutância estomática, Ψ_f - potencial hídrico foliar; ICC - índice de conteúdo de clorofila.

Nas plantas submetidas a estresse causado por déficit hídrico ocorre o fechamento dos estômatos assim como o aumento da eficiência instantânea do uso de água. Estas condições são condizentes com os resultados encontrados, em que as plantas estressadas possuem um QTL de grande efeito na condutância estomática (g_s) e as plantas testemunhas não apresentam nenhum QTL na eficiência instantânea do uso de água (A/E). O aumento da A/E é um fenômeno documentado na literatura (Johnson, 1993), embora a resposta de A/E seja dependente da intensidade de déficit hídrico. Em trigo, condições moderadas de déficit hídrico podem levar a um aumento significativo da A/E (Rekika et al., 1998), já em condições severas de déficit hídrico ocorre uma diminuição (Shangguan et al., 2000). Tal fato se deve a diminuição da taxa de transpiração pela fotossíntese quando os estômatos estão parcialmente fechados, o que leva, assim, a diminuição da A/E em condições severas de déficit hídrico quando a capacidade fotossintética é afetada (Tambussi et al., 2007)

Contudo, na análise de marcas individuais, vários marcadores podem apresentar associações significativas com o fenótipo em avaliação, visto que as marcas não são independentes entre si, assim, apenas um ou alguns marcadores podem realmente estar diretamente associados ao QTL (Liu, 1998). Esta análise utiliza os marcadores possivelmente mais associados ao QTL, sendo os demais marcadores utilizados para os efeitos não controlados, como a variação genética não controlada e os erros de amostragem. Com isso, essa análise serviu apenas de base para a análise seguinte de mapeamento múltiplo de QTL (MQM).

5.2.2. Mapeamento Múltiplo de QTL (MQM)

A partir dos dados gerados da análise de marcas individuais, os marcadores com $LOD \geq 2$ (tabela 8) e que apresentaram p -valor $< 0,02$ na análise de seleção automática de cofatores do *software* foram selecionados como cofatores para a análise de mapeamento MQM.

Como o mapa de ligação não está totalmente saturado com marcadores, provavelmente todos os QTLs associados com a característica podem não terem sido revelados nesta análise. Além disso, os QTLs apontados para as características A (grupos de ligação 7 e 8a), CRA (grupo de ligação 4) e Ψ_f (grupo de ligação 8a) sob condições normais (testemunha) presentes na tabela 9 não serão considerados, visto que indicaram a presença de QTLs em grupos de ligação muito pequenos e também não saturados (três marcadores apenas) (Tabela 7).

Tabela 9: Análise de mapeamento MQM com nove características (caráter) em 13 grupos de ligação.

Caráter	Cofator	Testemunha					Estressado					
		Grupo de ligação	LOD (threshold)	LOD	%expl	Região do QTL	Cofator	Grupo de ligação	LOD (threshold)	LOD	%expl	Região do QTL
A	EMBRA196!	2a	2,7	2,89	8,8	EMBRA333 - EMBRA915						
		6	3,1	3,57	10,4	EMBRA196	EMBRA196!	6	3,1	3,96	17,9	EMBRA1102 - EMBRA196
		7	2,3	2,57	8,9	EMBRA46 - EMBRA1761						
		8a	2,2	2,5	11,0	M9						
CRA	EMBRA1990!	4	2,3	2,54	6,9	EMBRA179	EMBRA196!	-	-	-	-	-
E	EMBRA1993!	2a	2,8	3,13	23,0	EMBRA1993	EMBRA1993!	2a	14,6	15,25	69,1	EMBRA126 - EMBRA1993
	EMBRA196!	6	3,2	16,44	77,1	EMBRA1102 - EMBRA196						
A/E	EMBRA196!	-	-	-	-	-	EMBRA196!	6	3,1	4,05	17,1	EMBRA1102 - EMBRA196
A/gs	EMBRA1990!	5	2,9	3,67	12,0	EMBRA1990 - EMBRA45	EMBRA120!;					
	EMBRA175!; EMBRA20!	6	3,2	4,75	19,9	EMBRA20 - EMBRA1800	EMBRA1770!; EMBRA40!	5	3,0	3,04	8,4	EMBRA120
Fv/Fm	EMBRA40!; EG-99!	-	-	-	-	-	EMBRA1770!; ES-140!	9	2,6	2,63	9,6	ES-140 - EMBRA1928
gs	EMBRA1990!	-	-	-	-	-	EMBRA915!; EMBRA1810!	-	-	-	-	-
Ψ _f	EMBRA1757!;	1	2,8	3,68	11,7	EMBRA1757						
	EMBRA1071!;	3	2,5	5,94	16,9	EMBRA1071						
	EMBRA1800!	8a	2,3	2,63	8,5	EMBRA119						
ICC	EMBRA1757!;	5	2,9	3,00	9,0	EMBRA120	EMBRA953!;	9	2,7	2,76	9,3	EMBRA1578 - EMBRA953
	EMBRA120!	6	3,1	3,61	18,2	EMBRA1102 - EMBRA196	EMBRA29!					

Legenda: A - taxa líquida de fotossíntese; CRA - conteúdo relativo de água nas folhas; E- transpiração; A/E - eficiência instantânea no uso de água; A/gs - eficiência intrínseca no uso de água; Fv/Fm - eficiência fotoquímica média do fotossistema II; gs - condutância estomática, Ψ_f - potencial hídrico foliar; ICC - índice de conteúdo de clorofila.

Portanto, na análise das plantas submetidas a condições normais (testemunha) foram encontrados dez QTLs em cinco grupos de ligação (Figuras 3 e 4), sendo dois QTLs no grupo de ligação 2a (A e E), dois no grupo de ligação 5 (A/gs e ICC) e quatro no grupo de ligação 6 (A/gs, ICC, E e A). Já a análise das plantas submetidas a condições de déficit hídrico (estressado) revelou seis QTLs em quatro grupos de ligação (Figura 5), sendo que nos grupos 6 e 9 foram encontrados dois QTLs em cada grupo (A, A/E e Fv/Fm, ICC respectivamente).

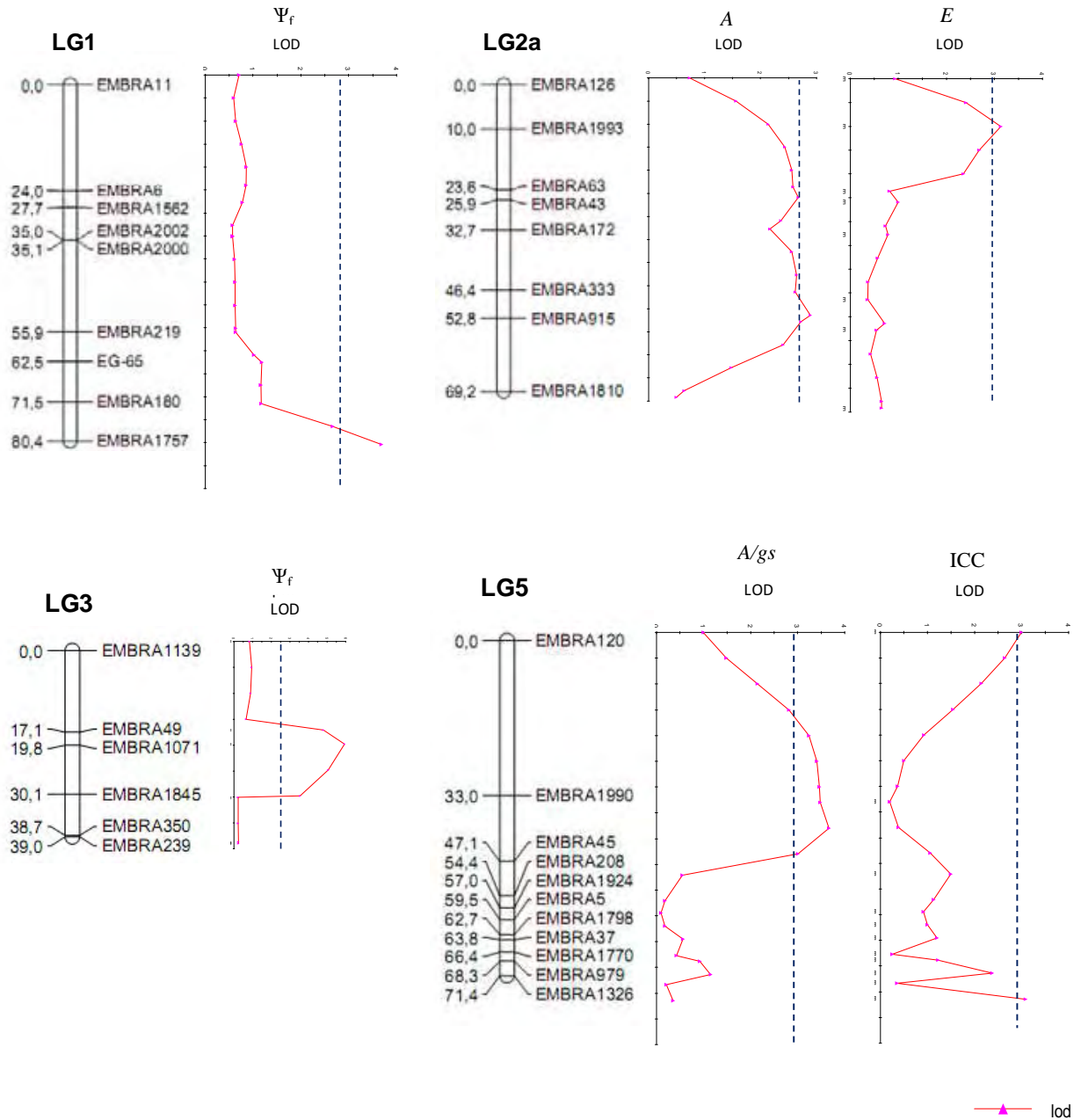


Figura 3: Mapeamento de QTLs pela análise de mapeamento MQM nas plantas testemunhas sendo um QTL no grupo de ligação (LG) 1 (Ψ_f com LOD=3,68), dois QTLs no LG2a (A com LOD=2,89 e E com LOD=3,13), um no LG3 (Ψ_f com LOD=5,94) e dois no LG5 (A/gs com LOD=3,67 e ICC com LOD=3,00). A linha pontilhada representa o valor do LOD limiar (*threshold*).

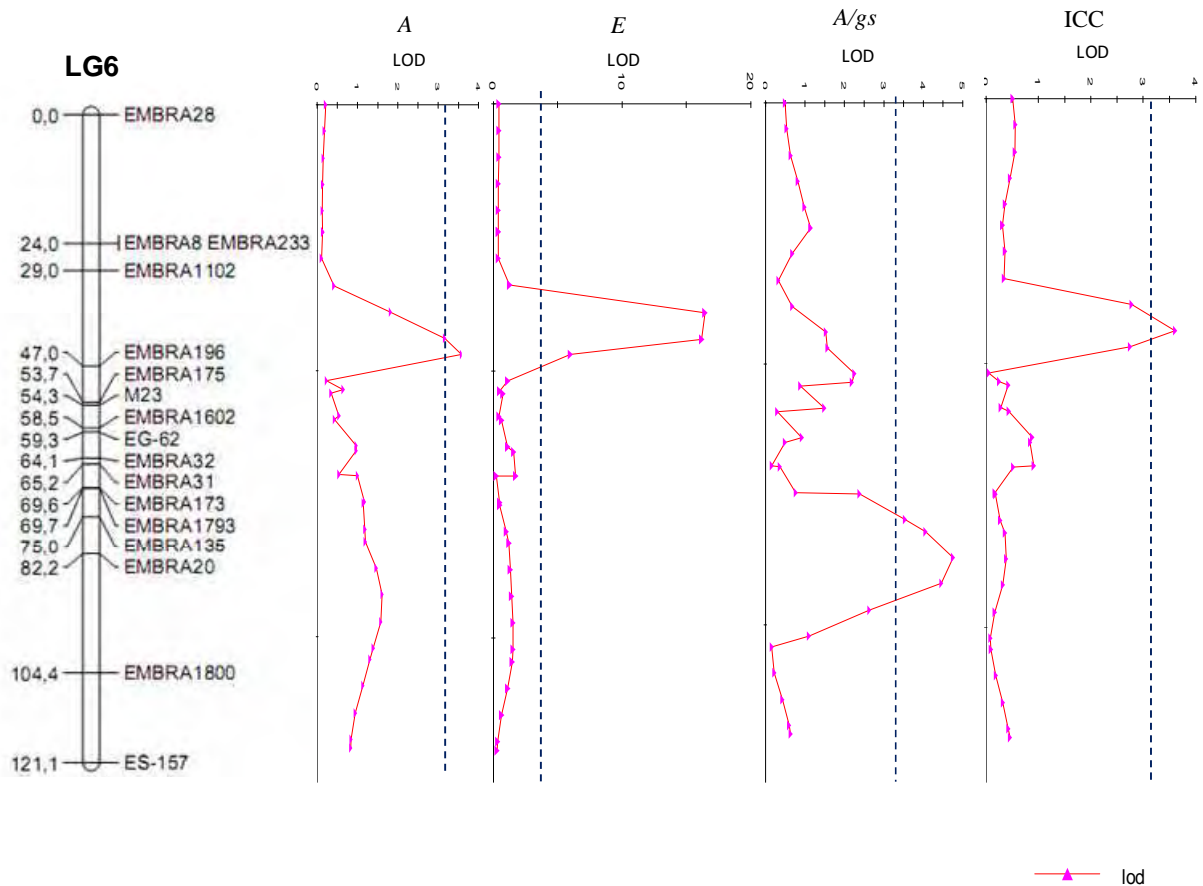


Figura 4: Mapeamento de quatro QTLs no grupo de ligação 6 pela análise de mapeamento MQM nas plantas testemunhas. Neste grupo foram detectados três QTLs co-localizados entre os marcadores EMBRA1102 e EMBRA196 para as características A (LOD=3,57), E (LOD=16,44), A/gs (LOD=4,75) e ICC (LOD=3,61). A linha pontilhada representa o valor do LOD limiar (*threshold*).

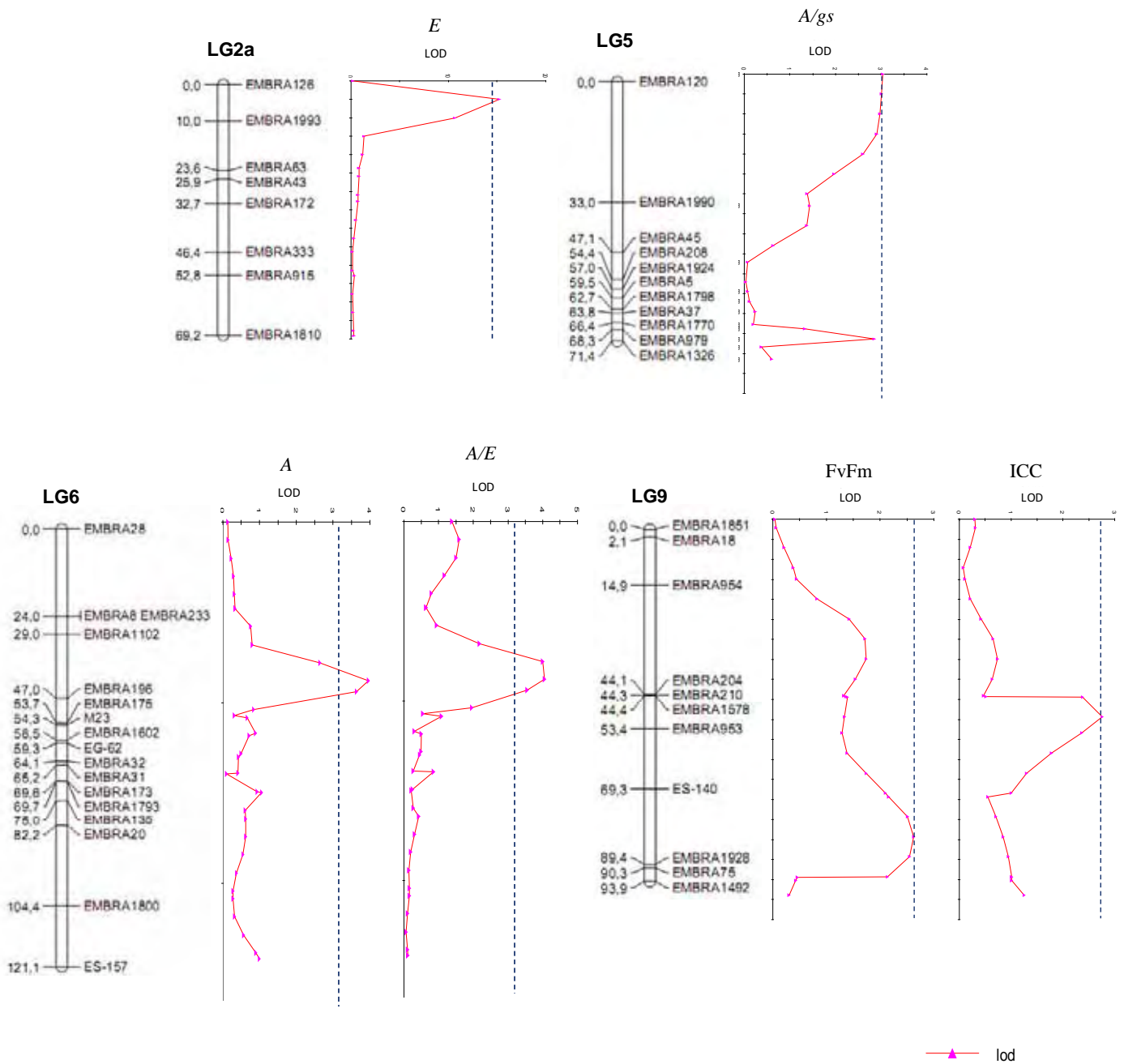


Figura 5: Mapeamento de QTLs pela análise de mapeamento MQM nas plantas estressadas por déficit hídrico. Identificou-se um QTL no grupo de ligação (LG) 2a (*E* com LOD=15,25), um QTL no LG5 (*A/gs* com LOD=3,04), dois QTLs co-localizados no LG6 (*A* com LOD=3,96 e *A/E* com LOD=4,05) e dois QTLs no LG9 (*Fv/Fm* com LOD=2,63 e *ICC* com LOD=2,76). A linha pontilhada representa o valor do LOD limiar (*threshold*).

Ambas análises apontaram QTLs de maior efeito para transpiração (*E*) (77,1% para Testemunha e 69,1% para Estressado). QTLs associados à transpiração podem ocorrer devido a elevadas taxas de fotossíntese, como em condições de déficit hídrico (Zhao et al. 2008), e também podem ocorrer em condições normais de irrigação, pois elevadas taxas de transpiração também mantêm a superfície das folhas frias, especialmente em condições ambientais quentes (Lu et al., 1994).

Nesta progênie também encontrou-se uma única região genômica no grupo de ligação 6 que apresentou cinco QTLs para quatro diferentes características avaliadas (*A* apresentou QTL para ambas as condições), sendo três em condições normais de irrigação e dois em condições de déficit hídrico. As características com QTL colocalizados no grupo de ligação 6 são taxa líquida de fotossíntese (*A*), transpiração (*E*) e índice de conteúdo de clorofila (ICC) em condições normais de irrigação (Figura 4); e taxa líquida de fotossíntese (*A*) e eficiência intrínseca no uso de água (*A/E*) sob condições de estresse por déficit hídrico (Figura 5). A transpiração e a fotossíntese são reguladas pela condutância estomática, e diminuem conforme aumenta o déficit hídrico. Os estômatos são principalmente sensíveis a presença de água nas folhas, tendendo a se fecharem com a diminuição do potencial hídrico foliar (Tezara et al., 2002).

A co-localização de QTLs para características relevantes é um dos critérios geralmente utilizados para a escolha de genes candidatos responsáveis pela característica em estudo, sendo necessária também a exata localização do QTL e compreensão das suas causas genéticas (Grattapaglia, 2004). Contudo, a resolução do mapa de ligação e os métodos de mapeamento de QTLs utilizado neste estudo não permitem a identificação das causas genéticas dos QTLs co-localizados. Estes poderiam ocorrer devido a pleiotropia, na qual um mesmo QTL contribui em diferentes características, ou ainda poderiam ocorrer devido a associação significativa de alelos de dois ou mais QTLs. Situação semelhante foi relatada no estudo de QTLs associados a eficiência do uso de água e características relacionadas em *Quercus robur* L. (Brendel et al., 2008).

6. CONCLUSÃO

A escolha da população segregante, o conjunto de marcadores moleculares selecionados, assim como as características fenotípicas relacionadas a tolerância ao déficit hídrico analisadas, permitiram a construção de um mapa de ligação consistente para a população segregante de *Eucalyptus* e o mapeamento de QTLs relacionados aos caracteres.

A análise de marcas individuais identificou vários QTLs de pequeno efeito e um QTL representando 20,8% da variação em condutância estomática (*gs*) nas plantas estressadas.

Já o mapeamento MQM apontou dois QTL, sendo um nas plantas testemunhas e outro nas estressadas, representando 77,1% e 69,1%, respectivamente, na transpiração (*E*). Além disso, a análise detectou QTLs co-localizados no grupo 6 e QTLs de pequeno efeito em outros grupos de ligação nas plantas sob condições normais de irrigação e sob condições de estresse por déficit hídrico.

Tais dados confirmam a variabilidade genética entre os indivíduos analisados, como também a existência de QTLs relacionados a tolerância ao déficit hídrico em *Eucalyptus*, que podem estar envolvidos em muitos mecanismos de tolerância que as plantas podem usar para evitar este estresse.

7. REFERÊNCIAS

ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF 2011 ano base 2010**. Brasília, 2011

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Development of sex-linked AFLP markers in *Simmondsia chinensis*. **Plant Breeding**, v. 130, p. 114-116, 2011.

ALTINKUT, A.; KAZAN, K.; GOZUKIRMIZI, N. AFLP marker linked to water-stress-tolerant bulks in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 77-82, 2003.

ANITHAKUMARI, A. M.; DOLSTRA, O.; VOSMAN, B.; VISSER, R. G. F.; LINDEN, C. G. In vitro screening and QTL analysis for drought tolerance in diploid potato. **Euphytica**, v. 181, p. 357-369, 2011.

ARNDT, S. K.; LIVESLEY, S. J.; MERCHANT, A.; BLEBY, T. M.; GRIERSON, P. F. Quercitol and osmotic adaptation of field-grown *Eucalyptus* under seasonal drought stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 31, p. 915-24, 2008.

ASHRAF, M. Inducing drought tolerance in plants: recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 1, p. 169-183, 2010.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Stemma Press, 2002. v. 1 p. 369

BHERING, L. L.; CRUZ, C. D. Tamanho de população ideal para mapeamento genético em famílias de irmãos completos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 379-385, 2008.

BOLAND, D. J. **Forest Trees of Australia**. Collingwood, Australia: CSIRO, 1992.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BRACELPA. **Dados do Setor**. São Paulo, 2011

BRENDEL, O.; THIEC, D.; SCOTTI-SAINTAGNE, C. *et al.* Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, n. 2, p. 263-278, 2008.

BROMAN, K W. Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. **Lab Animal**, v. 30, n. 7, p. 44-52, 2001.

BROMAN, K. W.; SEN, S. **A guide to QTL mapping with R/qtl**. New York: Springer, 2009. p. 396

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 816-827, 1998.

- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, I. C.; GRATTAPAGLIA, D. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 267, p. 338-347, 2002.
- BRONDANI, R.P. V.; WILLIAMS, E. R.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D.. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. **BMC Plant Biology**, v. 6, p. 20, 2006.
- CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, v. 61, p. 89-100, 2002.
- CERESINI, P. C.; LACERDA, C.; PETRAROLHA, S. *et al.* *Satellyptus*: Analysis and database of microsatellites from ESTs of *Eucalyptus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 589-600, 2005.
- CHURCHILL, G. A.; DOERGE, R. W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v. 138, p. 963-971, 1994.
- COHEN, D.; BOGEAT-TRIBOULOT, M-B.; TISSERANT, E.; BALZERGUE, S.; *et al.* Comparative transcriptomics of drought responses in *Populus*: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. **BMC Genomics**, v. 11, p.630, 2010.
- CRESTE, S.; NETO TULMANN, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299-306, 2001.
- ECKSTEIN, K.; ROBINSON, J. C. Physiological response of banana (Musa AAA; Cavendish sub-group) in subtropics. IV. Seasonal responses of leaf gas exchange to short-term water stress. **Journal of Horticultural Science**, v. 71, p. 679-692, 1996.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. Longman, 1996 v. 4 p. 464
- FARIA, D. A. **Estudos genômicos em *Eucalyptus*: Mapeamento de genes candidatos e QTLs , estimativa de desequilíbrio de ligação e análise de estrutura de populações**. Tese. Universidade Católica de Brasília, 2008.
- FARIA, D. A.; MAMANI, E. M. C.; PAPPAS, G. J.; GRATTAPAGLIA, D. Genotyping systems for *Eucalyptus* based on tetra-, penta-, and hexanucleotide repeat EST microsatellites and their use for individual fingerprinting and assignment tests. **Tree Genetics & Genomes**, v. 7, p. 63-77, 2011.
- FARIA, D. A; MAMANI, E. M. C.; PAPPAS, M. R.; PAPPAS, G. J.; GRATTAPAGLIA, D. A selected set of EST-derived microsatellites, polymorphic and transferable across 6 species of *Eucalyptus*. **The Journal of Heredity**, v. 101, p. 512-520, 2010.

- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 220
- FLEXAS, J.; BOTA, J.; ESCALONA, J. M.; SAMPOL, B.; MEDRANO, H. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 461-471, 2002.
- FONSECA, S. M.; RESENDE, M. D. V.; ALFENAS, A C; *et al.* **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 2010. p. 200
- FREEMAN, J. S.; POTTS, B. M.; SHEPHERD, M.; VAILLANCOURT, R. E. Parental and consensus linkage maps of *Eucalyptus globulus* using AFLP and microsatellite markers. **Silvae Genetica**, v. 55, p. 202-217, 2006.
- FREEMAN, J.; WHITTOCK, S.; POTTS, B.; VAILLANCOURT, R. QTL influencing growth and wood properties in *Eucalyptus globulus*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 5, p. 713-722, 2009.
- GAIOTTO, F. A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, p. 842-849, 1997.
- GAN, S.; SHI, J.; LI, M. *et al.* Moderate-density molecular maps of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake and *E. tereticornis* Smith genomes based on RAPD markers. **Genetica**, v. 118, n. 1, p. 59-67, 2003.
- GESCH, R. W.; KENEFICK, D. G.; KOEPKE, J. A. Leaf water adjustment and maintenance in hard red wheat. **Crop Science**, v. 32, p. 180-186, 1992.
- GILL, A. M.; BELBIN, L.; CHIPPENDALE, G. M. **Phytogeography of *Eucalyptus* in Australia**. Canberra, Australia.: Bureau of Flora and Fauna, 1985.
- GION, J.-M.; CAROUCHÉ, A.; DEWEER, S. *et al.* Comprehensive genetic dissection of wood properties in a widely-grown tropical tree: *Eucalyptus*. **BMC Genomics**, v. 12, p. 301, 2011.
- GRATTAPAGLIA, D. Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 3, p. 369-379, 2004.
- GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies vegetais: *Eucalyptus* como modelo. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES - INGLIS, M.C. (Ed.) **Recursos genéticos & melhoramento - plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. cap. 30, p.967-993.
- GRATTAPAGLIA, D. Perspectives on genome mapping and marker-assisted breeding of eucalypts. **Southern Forests**, v. 70, p. 69-75, 2008.
- GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **The New Phytologist**, v. 179, p. 911-929, 2008.

GRATTAPAGLIA, D; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v. 1137, p. 1121-1137, 1994.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. .; LEWONTIN, R. C. *et al.* **Introdução à genética**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

GUO, P.; BAUM, M.; VARSHNEY, RAJEEV K; *et al.* QTLs for chlorophyll and chlorophyll fluorescence parameters in barley under post-flowering drought. **Euphytica**, v. 163, n. 2, p. 203-214, 2008.

JANSEN, R. C.; STAM, P. High Resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, v. 136, p. 1447-1455, 1994.

JOHNSON, R. C. Carbon isotope discrimination, water relations, and photosynthesis in tall fescue. **Crop Science Society of America**, v. 33, n. 1, p. 169-174, 1993.

KANG, S.; LEE, K. J.; LEE, G. *et al.* Development of AFLP and STS markers linked to a waterlogging tolerance in Korean soybean landraces. **Biologia Plantarum**, v. 54, p. 61-68, 2010.

KAO, C-H.; ZENG, Z-B. General formulas for obtaining the MLES and the asymptotic variance-covariance matrix in mapping quantitative trait loci when using the EM algorithm. **Biometrics**, v. 53, n. 2, p. 653-665, 1997.

KAO, C-H.; ZENG, Z-B.; TEASDALE, R. D. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, v. 125, p. 1203-1216, 1999.

KRAMER, P. J.; KOZLOWSKI, T. T. **Physiology of woody plants**. New York, USA: Academic Press, 1979. p. 811

KRUTOVSKY, K.; NEALE, D. Forest genomics and new molecular genetic approaches to measuring and conserving adaptive genetic diversity in forest trees. In: GEBUREK, T.; J, T. (Eds.). **Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe**. Zvolen: Arbora Publishers, 2005. .

KULLAN, A. R. K.; DYK, M. M.; JONES, N. *et al.* High-density genetic linkage maps with over 2,400 sequence-anchored DArT markers for genetic dissection in an F2 pseudo-backcross of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, n. 1, p. 163-175, 2012.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v. 121, p. 185-199, 1989.

LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J. *et al.* MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v. 1, p. 174-181, 1987.

LEMCOFF, J. H.; GUARNASCHELLI, A. B.; GARAU, A. M.; BASCIAULI, M. E.; GHERSA, C. M. Osmotic adjustment and its use as a selection criterion in *Eucalyptus* seedlings. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 24, p. 2404–2408, 1994.

LEVI, A.; PATERSON, A. H.; BARAK, V. *et al.* Field evaluation of cotton near-isogenic lines introgressed with QTLs for productivity and drought related traits. **Molecular Breeding**, v. 23, n. 2, p. 179-195, 2009.

LEWIN, H. A.; LARKIN, D. M.; PONTIUS, J. Every genome sequence needs a good map. **Genome Research**, v. 19, p. 1925-1928, 2009.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 397-401, 1989.

LITTELL, R.; MILLIKEN, G.; STROUP, W.; WOLFINGER, R. **SAS[®] System for Mixed Models**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1996

LIU, B H; KNAPP, S. J. GMENDEL: A program for mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratios. **Journal of Heredity**, v. 81, n. 5, p. 407-407, 1990.

LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis**. New York: CRC Press, 1998. p. 611

LU, G. H.; TANG, J. H.; YAN, J. B. *et al.* Quantitative trait loci mapping of maize yield and its components under different water treatments at flowering time. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, n. 10, p. 1233-1243, 2006.

LU, Z. M.; RADIN, J. W.; TURCOTTE, E. L.; PERCY, R.; ZEIGER, E. High yields in advanced lines of pima cotton are associated with higher stomatal conductance, reduced leaf-area and lower leaf temperature. **Physiologia Plantarum**, v. 92, n. 2, p. 266-272, 1994.

LYNCH, M.; WALSH, B. QTL detection and estimation via maximum likelihood. **Genetics and Analysis of Quantitative Traits**, n. ML, p. 445-457, 1998.

MALIEPAARD, C.; JANSEN, J.; OOIJEN, J. W. V. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species : overview and consequences for applications. **Genetical Research**, v. 70, p. 237-250, 1997.

MAMANI, E. M. C.; BUENO, N.; FARIA, D. A. *et al.* Positioning of the major locus for *Puccinia psidii* rust resistance (Ppr1) on the *Eucalyptus* reference map and its validation across unrelated pedigrees. **Tree Genetics & Genomes**, v. 6, p. 953-962, 2010.

MARCUCCI POLTRI, S. N.; ZELENER, N.; RODRIGUEZ TRAVERSO, J.; GELID, P.; HOPP, H. E. Selection of a seed orchard of *Eucalyptus dunnii* based on genetic diversity criteria calculated using molecular markers. **Tree Physiology**, v. 23, p. 625-632, 2003.

MARGARIDO, G. R. A.; SOUZA, A. P.; GARCIA, A. A. F. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas**, v. 144, n. 3, p. 78-79, 2007.

MARKERT, C. L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 45, p. 753-763, 1959.

MARQUES, C. M.; ARAÚJO, J. A.; FERREIRA, J. G. *et al.* AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p. 727-737, 1998.

MARTINEZ, O.; CURNOW, R. N. Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. **Theoretical And Applied Genetics**, v. 85, p. 480-488, 1992.

MATHEWS, K. L.; MALOSETTI, M.; CHAPMAN, S. *et al.* Multi-environment QTL mixed models for drought stress adaptation in wheat. **Theoretical And Applied Genetics**, v. 117, n. 7, p. 1077-1091, 2008.

MERCHANT, A.; TAUSZ, M.; ARNDT, S. K.; ADAMS, M. A. Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 *Eucalyptus* species suggest contrasting physiological responses to water deficit. **Plant, Cell & Environment**, v. 29, p. 2017-29, 2006.

MEUDT, H. M.; CLARKE, A. C. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 106-17, 2007.

MISHRA, A. K.; SINGH, V. P. A review of drought concepts. **Journal of Hydrology**, v. 391, p. 202-216, 2010.

MORGAN, J. M. Adaptation to water deficits in three grain legume species. Mechanisms of turgor maintenance. **Field Crops Research**, v. 29, p. 91-106, 1992.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, p. 194-200, 2002.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. LI, p. 263-273, 1986.

MYBURG, A A; GRIFFIN, A R.; SEDEROFF, R. R.; WHETTEN, R. W. Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F1 hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p. 1028-42, 2003.

NEVES, L. G.; MC MAMANI, E.; ALFENAS, ACELINO C; KIRST, MATIAS; GRATTAPAGLIA, DARIO. A high-density transcript linkage map with 1,845 expressed genes positioned by microarray-based Single Feature Polymorphisms (SFP) in *Eucalyptus*. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 189, 2011.

NGUYEN, T. T. T.; KLUEVA, N.; CHAMARECK, V. *et al.* Saturation mapping of QTL regions and identification of putative candidate genes for drought tolerance in rice. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 272, n. 1, p. 35-46, 2004.

OCHIENG, J. W.; STEANE, D. A.; LADIGES, P. Y. *et al.* Microsatellites retain phylogenetic signals across genera in eucalypts (*Myrtaceae*). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 1134, p. 1125-1134, 2007.

OUÉDRAOGO, J. T.; MAHESHWARI, V.; BERNER, K. *et al.* Identification of AFLP markers linked to resistance of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to parasitism by *Striga gesnerioides*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 849, p. 1029-1036, 2001.

O'REILLY-WAPSTRA, J.; FREEMAN, J.; DAVIES, N. *et al.* Quantitative trait loci for foliar terpenes in a global eucalypt species. **Tree Genetics & Genomes**, v. 7, p. 485-498, 2011.

PASSIOURA, J. B. Drought and drought tolerance. **Plant Growth Regulation**, v. 20, p. 79-83, 1996.

PEREIRA, J.; PALARDY, S. Water stress limitations to tree productivity. **Biomass Production by Fast-Growing Trees**. Dordrecht:Kluwer Academic, 1989. p. 37-56.

PETRO, D.; ONYEKA, T. J.; ETIENNE, S.; RUBENS, S. An intraspecific genetic map of water yam (*Dioscorea alata* L.) based on AFLP markers and QTL analysis for anthracnose resistance. **Euphytica**, v. 179, p. 405-416, 2011.

PITA, P.; CAÑAS, I.; SORIA, F.; RUIZ, F.; TOVAL, G. Use of physiological traits in tree breeding for improved yield in drought-prone environments. The case of *Eucalyptus globulus*. **Water**, v. 14, p. 383-393, 2005.

RABELLO, E.; SOUZA, A. N. D.; SAITO, D.; TSAI, S. M. In silico characterization of microsatellites in *Eucalyptus* spp.: abundance, length variation and transposon associations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 582-588, 2005.

RAMAN, H.; MORONI, S.; SATO, K.; READ, J.; SCOTT, J. Identification of AFLP and microsatellite markers linked with an aluminium tolerance gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, p. 458-464, 2002.

RAVI, K.; VADEZ, V.; ISOBE, S. *et al.* Identification of several small main-effect QTLs and a large number of epistatic QTLs for drought tolerance related traits in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 122, p. 1119-1132, 2011.

REKIKI, D.; NACHIT, M. M.; ARAUS, J. L.; MONNEVEUX, P. Effects of water deficit on photosynthetic rate and osmotic adjustment in tetraploid wheats. **Photosynthetica**, v. 35, n. 1, p. 129-138, 1998.

RESENDE, M. D. V.; ASSIS, T. F. **Genética e melhoramento do eucalipto**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2009.

RÖNNBERG-WÄSTLJUNG, A. C.; GLYNN, C.; WEIH, M. QTL analyses of drought tolerance and growth for a *Salix dasyclados* x *Salix viminalis* hybrid in contrasting water regimes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, p. 537-549, 2005.

- SHANGGUAN, Z.; SHAO, M.; DYCKMANS, J. Nitrogen nutrition and water stress effects on leaf photosynthetic gas exchange and water use efficiency in winter wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, n. 2, p. 141-149, 2000.
- SHULAEV, V.; CORTES, D.; MILLER, G.; MITTLER, R. Metabolomics for plant stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 132, p. 199-208, 2008.
- STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. **The Plant Journal**, v. 3, n. 5, p. 739-744, 1993.
- STREET, N. R.; SKOGSTRÖM, O.; SJÖDIN, A. *et al.* The genetics and genomics of the drought response in *Populus*. **The Plant Journal**, v. 48, p. 321-341, 2006.
- SUITER, K. A.; WENDEL, J. F.; CASE, J. S. LINKAGE-1: a PASCAL computer program for the detection and analysis of genetic linkage. **The Journal of Heredity**, v. 74, n. 3, p. 203-204, 1983.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 719
- TAMBUSSI, E. A.; BORT, J.; ARAUS, J. L. Water use efficiency in C3 cereals under Mediterranean conditions: a review of physiological aspects. **Annals of Applied Biology**, v. 150, n. 3, p. 307-321, 2007.
- TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v. 27, p. 205-233, 1993.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.
- TEZARA, W.; MITCHELL, V.; DRISCOLL, S. P.; LAWLOR, D. W. Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 375, p. 1781-1791, 2002.
- THAMARUS, K. A.; GROOM, K.; MURRELL, J.; BYRNE, M.; MORAN, G. F. A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre, and floral traits. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 2-3, p. 379-387, 2002.
- THIEL, T.; MICHALEK, W.; VARSHNEY, R K; GRANER, A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 411-422, 2003.
- VAN OOIJEN, J.W.; BOER, M.P.; JANSEN, C.M. **MapQTL[®] 4.0, Software for the calculation of QTL positions on genetic maps**. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands, 2002.
- VAN OOIJEN, J.W.; VOORRIPS, R.E. **JoinMap[®] 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps**. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands, 2001

- VELLINI, A. L. T. T. **Desempenho e divergência genética entre clones de *Eucalyptus* spp. em diferentes regimes de irrigação em cada de vegetação.** Tese. Universidade Estadual Paulista campus de Jaboticabal, 2007.
- VELLINI, A. L. T. T.; PAULA, N. F.; ALVES, P. L. C. A. *et al.* Respostas fisiológicas de diferentes clones de eucalipto sob diferentes regimes de irrigação. **Revista Árvore**, v. 32, p. 651-663, 2008.
- VERHAEGEN, D; PLOMION, C. Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers. **Genome**, v. 39, n. 6, p. 1051-1061, 1996.
- VILLAR, E.; KLOPP, C.; NOIROT, C. *et al.* RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in *Eucalyptus*. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 538, 2011.
- VOGL, C.; XU, S. Multipoint mapping of viability and segregation distorting loci using molecular markers. **Genetics**, v. 155, n. 3, p. 1439-1447, 2000.
- VOORRIPS, R E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **Journal of Heredity**, v. 93, p. 77-78, 2002.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M. *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.
- WANG, D. G. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science**, v. 280, p. 1077-1082, 1998.
- WARREN, C.; ARANDA, I.; CANO, F. J. Responses to water stress of gas exchange and metabolites in *Eucalyptus* and *Acacia* spp. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, p. 1609-1629, 2011.
- WELLER, J. I. Maximum likelihood techniques for the mapping and analysis of quantitative trait loci with the aid of genetic markers. **Biometrics**, v. 42, n. 3, p. 627-640, 1986.
- WHITE, D. A.; TURNER, N. C.; GALBRAITH, J. H. Leaf water relations and stomatal behavior of four allopatric *Eucalyptus* species planted in Mediterranean southwestern Australia. **Tree Physiology**, v. 20, p. 1157-1165, 2000.
- WHITEHEAD, D.; BEADLE, C. L. Physiological regulation of productivity and water use in *Eucalyptus*: a review. **Forest Ecology and Management**, v. 193, p. 113-140, 2004.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- XU, S. Quantitative trait locus mapping can benefit from segregation distortion. **Genetics**, v. 180, n. 4, p. 2201-2208, 2008.
- ZENG, Z-B; KAO, C-H.; BASTEN, C. J. Estimating the genetic architecture of quantitative traits. **Genetical Research**, v. 74, n. 3, p. 279-289, 1999.

ZENG, Z-B. Precision mapping of Quantitative Trait Loci. **Genetics**, v. 1136, p. 1457-1468, 1994.

ZHAO, X-Q.; XU, J-L.; ZHAO, M. *et al.* QTLs affecting morph-physiological traits related to drought tolerance detected in overlapping introgression lines of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, v. 174, n. 6, p. 618-625, 2008.