

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Qualidade da madeira de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* e
genotipagem a partir de marcadores moleculares TRAP e microssatélites para
estudos de associação**

Fernanda Trislitz Perassolo Guedes

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Recursos Florestais com
opção em: Tecnologia de Produtos Florestais

**Piracicaba
2010**

Fernanda Trislitz Perassolo Guedes
Engenheiro Florestal

Qualidade da madeira de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* e genotipagem a partir de marcadores moleculares TRAP e microssatélite para estudos de associação

Orientador:
Prof. Dr. **FRANCIDES GOMES DA SILVA JUNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Recursos Florestais com opção em: Tecnologia de Produtos Florestais

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Guedes, Fernanda Trisztz Perassolo

Qualidade da madeira de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e genotipagem a partir de marcadores moleculares TRAP e microssatélite para estudos de associação / Fernanda Trisztz Perassolo Guedes. - - Piracicaba, 2010.
59 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Controle genético 2. Densidade da madeira 3. Eucalipto 4. Fenótipos 5. Genótipos
6. Madeira - Qualidade 7. Marcador molecular 8. Química da madeira I. Título

CDD 674.142
G924q

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À minha família pelo apoio e amor incondicional.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, prof Dr. Francides Gomes da Silva Junior e prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo. Ao professor Francides pela orientação, oportunidade e sobretudo confiança em meu trabalho. Igualmente agradeço ao professor Luis Eduardo por sua colaboração para o desenvolvimento deste trabalho e pela orientação em todos estes anos, desde a iniciação científica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais pela formação acadêmica e suporte.

Aos colegas de laboratórios (Laboratório de Genética Molecular - LGM e Laboratório de Química Celulose e Energia - LQCE) pelo apoio durante o trabalho prático, por compartilhar seus conhecimentos e pelas discussões que ajudaram a enriquecer o trabalho e também pelos momentos de descontração: Ferchu, Carol Fazza (Close-up), Leandro, Jerônimo, Thayne (Venus), ThaisÊ (Pa-d-burerê), Mariana (Mafalda), GiselÊ, Raphael, Regina Buch, Mariane, Bia, Thiago (Ninho), Adriana, Aninha, Denis, Vilson, Guilherme, Christie, Marileide (Fava), Livia, Camila, Zé.

À equipe do Laboratório de Análises Estatísticas (LAE) do departamento de Ciências Exatas da ESALQ/USP sob supervisão do professor Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias pelo forte auxílio nas análises estatísticas deste estudo.

À Fibria pelo suporte financeiro e ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) pela concessão da bolsa.

A Juliana Érika de Carvalho Teixeira por todo conhecimento transmitido desde minha iniciação científica. Agradeço ainda pela amizade, pelo incentivo, pelos conselhos e por me ajudar na interface com a Fibria.

Ao Rodrigo dos Santos, técnico em melhoramento genético da Fibria, pelo apoio nas atividades de campo.

À Francismara Ap. Sanches Duarte, líder de laboratório e toda equipe do CDTC - Fibria, unidade de Jacareí, pela excelente recepção e pela disposição em me ajudar no aprendizado de novas técnicas de análise.

À Carol Fazza (Close-up) pelo carinho e por sempre compartilhar seu conhecimento, sua e experiência científica, acadêmica e de vida.

Ao amigo e colega de trabalho, Bruno Marco de Lima (Tãpico), pela amizade em primeiro lugar e pela imensa ajuda nas análises, sempre pronto e muito simpático.

À Regina Buch, técnica do LQCE, pela enorme ajuda nas análises químicas, pelos ensinamentos, pelo carinho e pela amizade: *merci beaucoup* !

À Ferchu pelo apoio moral nos trabalhos de laboratório e pela ajuda na finalização do trabalho. E, sobretudo, pelo carinho e amizade.

Aos amigos Bárbara e Julio pelo apoio, amizade e companhia nos finais de semana ensolarados, regados a café e muito trabalho.

À Rapha (Ti-keti), pelo carinho, pelo incentivo e pelos conselhos. À Lara (Jãgada), pelas canções que animavam nossas extrações de DNA, e à ambas pela amizade que nunca há de se perder.

À Carol e ao Fred pelo imenso carinho e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À Kurí (Berenice) e Raya (Aline) amigas com quem dividi uma casa, muitas contas, e ainda algumas discussões de cunho científico. Agradeço pelo apoio nos momentos difíceis e assustadores e por muita descontração nos poucos momentos livres. À Volkis (Janaina) por estes anos todos de amizade e pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Igor (JK), pelo encorajamento e paciência nos momentos de maior dificuldade. Por me contagiar com sua felicidade e seus sorrisos. Pelos abraços e chocolates. Pelo enorme carinho e amizade acima de tudo e sempre. Enfim, por participar dos meus planos, por participar da minha vida.

Aos meus pais João e Regina e às minhas irmãs Ana Carolina e Mariana que simplesmente me apoiaram, nunca questionaram e sempre acreditaram nos meus sonhos e sonharam comigo. Pelo carinho e apoio incondicionais a vida toda e especialmente neste momento.

Enfim, a todos os amigos que encontrei no decorrer destes anos e que serão eternos como o conhecimento que adquiri.

“Transportando um simples punhado de terra todos os dias, chegará o momento em que terá transportado uma montanha.” (Confúcio)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2.1 Propriedades da madeira.....	21
2.2 Marcadores moleculares.....	25
2.3 Estudos de associação.....	27
2.4 Material e métodos	29
2.4.1 Material vegetal.....	29
2.4.2 Avaliação das características da madeira	29
2.4.2.2 Métodos	29
2.4.2.2.1 Densidade básica	29
2.4.2.2.2 Teor de extrativos totais	29
2.4.2.2.3 Teor de lignina.....	30
2.4.2.2.4 Teor de holocelulose.....	30
2.4.3 Genotipagem da população	30
2.4.3.1 Coleta de material vegetal para genotipagem.....	30
2.4.3.2 Extração de DNA.....	30
2.4.3.3 Quantificação do DNA	32
2.4.3.4 Identificação de ESTs.....	32
2.4.3.6 Reações de amplificação	34
2.4.3.7 Eletroforese dos produtos amplificados	35
2.4.3.8 Análise dos géis	35
2.4.3.9 Marcadores microssatélites.....	36
2.5 Análise estatística e bioinformática.....	36
2.6 Resultados e discussão	38
2.6.1 Otimização da extração de DNA.....	38
2.6.2 Caracterização do material	38

2.6.1 Densidade básica.....	39
2.6.1 Teor de extrativos totais.....	39
2.6.2 Teor de lignina Klason.....	40
2.6.3 Teor de holocelulose.....	41
2.7 Estudo das interações entre as características e os indivíduos.....	42
2.8 Genotipagem utilizando marcadores TRAP.....	44
2.9 Genotipagem utilizando marcadores microssatélites.....	49
3 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS.....	55

RESUMO

Qualidade da madeira de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* e genotipagem a partir de marcadores moleculares TRAP e microssatélite para estudos de associação

Neste trabalho foi realizado um estudo sobre a associação entre características da madeira importantes na produção de polpa celulósica e o genótipo dos indivíduos de uma população de híbridos de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* aos quatro anos de idade. Em termos de características da madeira determinou-se a densidade básica, teor de lignina klason, extrativos totais e holocelulose. A genotipagem foi realizada utilizando 14 combinações entre o iniciador arbitrário TRAP2 e iniciadores fixos relacionados às características de interesse. 36 marcadores microssatélites também foram utilizados na genotipagem. A densidade básica bem como os teores dos componentes químicos da madeira encontrados estão dentro do esperado para espécies do gênero. O estudo de associação fenótipo-genótipo, detectou oito associações, sendo quatro delas entre marcadores TRAP e as quatro entre marcadores microssatélites. As associações significativas detectadas foram principalmente entre marcadores e densidade básica sendo as maiores associações com os marcadores TRAP2/COMT (210 pb) (26%) e E2010 (24%). Igualmente e, em segundo lugar, entre marcadores e teor de lignina e extrativos totais. O maior grau de associação significativo foi detectado entre o marcador TRAP2/HCT (190 pb) e o teor de lignina sendo a associação de 32 %. Não foi detectada associação entre marcadores e teor de holocelulose. Mais de uma marca foi relacionada com uma característica o que reforça teorias de controle genético exercido por mais de um gene. Também foi detectada associação entre uma marca e duas características diferentes sugerindo que um mesmo gene possa exercer o controle sobre mais de uma característica. O estudo mostrou portanto correlações entre as propriedades da madeira e associação, em diferentes níveis, entre essas e marcas genéticas.

Palavras-chave: Características químicas; Densidade básica; Marcador molecular; Controle genético; Associação fenótipo-genótipo

ABSTRACT

Wood quality of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* and genotyping from TRAP and microsatellite molecular markers for association studies

It was studied in this work the association between wood characteristics that are important to the cellulosic pulp and paper production and the hybrid population individual genotype *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* at the age of four years. The basic density, characteristic of mayor interest, was valuated using the maximum humidity content method. The amount of Klason lignin, total extract and holocellulose were obtained using conventional analysis methods. The genotyping was done using 14 combinations between the arbitrary primer TRAP2 and fixed primers related to the characteristics of interest. 36 microsatellite markers were also used during the genotyping process. The basic density and the wood chemical components amounts were found between the expected values for each genus. The study revealed that there are negative co-relationships between the wood chemical characteristics. The relationship between the holocellulose amount and the total extracts value is approximately 71% as the co-relationship between the holocellulose amount and the lignin value is 55%. It was detected a positive relationship between the Klason lignin amount and the basic density. The phenotype-genotype association study detected eight associations, four of them being between TRAP markers and the other four between microsatellite markers. The significant associations detected were mainly between the markers and the basic density, especially the association with the markers TRAP2/COMT (210 bp) (26%) and E2010 (24%). Equally and in second place it stands the association between the markers and the lignin value and the total extracts. The mayor significant association degree was detected between the TRAP2/HCT marker (190 bp) and the lignin value, being it 32 %. It was not detected any relationship between the markers and the holocellulose amount. More than one mark was related to one characteristic which enhances genetic control theories carried by more than one gene. It was also detected an association between one mark and two different characteristics suggesting that one same gene can have control over more than one characteristic. The study revealed therefore co-relationships between wood properties and association in different levels between those and genetic marks.

Keywords: Chemical characteristics; Basic density; Mollecular marker; Genetic control; Phenotype-genotype association

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação da variação da densidade básica entre os indivíduos da população.....39
- Figura 2 - Representação da variação do teor de extrativos total entre os indivíduos da população.....40
- Figura 3 - Representação da variação do teor de lignina Klason entre os indivíduos da população.....40
- Figura 4 - Representação da variação do teor de holocelulose entre os indivíduos da população.....41
- Figura 5 - Representação gráfica da análise de componentes principais (PCA) evidenciando a interação entre os indivíduos da população e os parâmetros de qualidade da madeira avaliados.....42
- Figura 6 - Representação gráfica da análise de correlação entre indivíduos em função da interação entre as características químicas: (a) correlação entre o teor de holocelulose e o teor de extrativos totais; (b) correlação entre o teor de holocelulose e o teor de lignina Klason.....43
- Figura 7 - Representação gráfica da análise de correlação entre indivíduos em função da interação entre o teor de lignina Klason e densidade básica.....44
- Figura 8 - Imagem de um gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata de acordo com metodologia proposta por Creste et al. (2001) evidenciando dois locos polimórficos gerados pela combinação TRAP2/HCT.....47

Figura 9 - Representação gráfica da correlação entre características da madeira e marcadores moleculares TRAP: (a) correlação entre a densidade básica e o marcador COMT_210; (b) correlação entre o teor de extrativos totais e o iniciador CCR_140; (c) correlação entre o teor de lignina Klason e o iniciador HCT_190; (d) correlação entre a densidade básica e o iniciador HCT_205.....48

Figura 10 - Exemplo de resultado gerado pela genotipagem com marcadores microssatélites utilizando seqüenciador automático.....50

Figura 11 - Representação gráfica da correlação entre características da madeira e marcadores moleculares microssatélites: (a) correlação entre o teor de lignina Klason e o loco E1339; (b) correlação entre a densidade básica e o loco E1661; (c) correlação entre a densidade básica e o loco E2010; (d) correlação entre o teor de extrativos totais e o loco E1320..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüências dos iniciadores arbitrário e fixos utilizados para os marcadores TRAP.....	33
Tabela 2 - Descrição resumida da função dos ESTs utilizados e respectiva fonte de informação.....	34
Tabela 3 - Resumo da análise dos géis para todas as combinações entre iniciadores fixos e arbitrário testadas.....	45
Tabela 4 - Resultado da análise de associação entre marcadores TRAP e características da madeira.....	46
Tabela 5 - Resultado da análise de associação entre marcadores microsatélites e características da madeira.....	50
Tabela 6 - Resultado da análise de correlação múltipla entre marcadores microsatélites e características da madeira.....	52

1 INTRODUÇÃO

As florestas do mundo somam aproximadamente 4 bilhões de hectares, sendo o Brasil o detentor da segunda maior área, com 477,7 milhões de hectares (FAO, 2007). Dentre estas florestas, as plantadas têm um papel de destaque na economia global. Os plantios homogêneos de maior representatividade no mundo são aqueles feitos com as espécies do gênero *Eucalyptus*, representando 8% do total, e as do gênero *Pinus*, representando 32% (FAO, 2007).

No Brasil, as espécies do gênero *Eucalyptus* têm grande destaque na produção de biomassa lenhosa. Em 2009, as florestas plantadas no país totalizaram cerca de 6,8 milhões de hectares, sendo 66,5% com espécies deste gênero (ABRAF, 2010). No período compreendido entre os anos de 2004 e 2009, o aumento em área plantada com *Eucalyptus* foi de 41,1%, aproximadamente 1 milhão de hectares (ABRAF 2010).

Além da expansão das áreas plantadas, medidas contínuas tem sido tomadas para ampliar a produtividade e qualidade da madeira obtidas nestas florestas, visando aumentar de forma sustentável a competitividade da eucaliptocultura nacional frente ao mercado externo. Plantios do gênero *Eucalyptus* no Brasil possuem incremento médio anual – IMA - de aproximadamente $40,5 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$, um dos maiores do mundo (ABRAF, 2010).

Essas espécies, nativas da Austrália e ilhas próximas, apresentam excelente adaptação às condições edafoclimáticas brasileiras. Além disso, possuem boas características silviculturais, grande variabilidade inter e intra-específica, tornando-as úteis para diversas finalidades. Atualmente, o principal mercado para a madeira de eucalipto é a indústria de celulose e papel (RAYMOND, 2002). Em 2009, a produção brasileira de celulose apresentou crescimento de 6%, mantendo a tendência de crescimento anual de 6,8% entre 2000 e 2008, apesar da crise global que afetou o país no período (ABRAF, 2010). No mesmo ano, a produção alcançou 13,4 milhões de toneladas, mantendo o país como o quarto maior produtor de celulose mundial (ABRAF, 2010). Existe uma grande participação do setor na pauta de exportações. No período de janeiro a junho de 2010, o país exportou cerca de US\$ 3,3 bilhões, 44,9% a mais que no mesmo período de 2009. Este valor representa uma participação de aproximadamente 3,73 na balança comercial brasileira (ABTCP, 2010).

Para o setor de produção de polpa celulósica, o ganho não é significativo somente no que tange à produtividade, mas também à qualidade da matéria-prima, a qual contribui para o

aumento em rendimento industrial e uniformidade do produto final, gerando resultados econômicos significativos (NEALE, 2002).

Para a indústria de papel e celulose, os atributos da madeira mais relevantes são a densidade básica (RAYMOND, 2002; THAMARUS, 2004; SECA, 2006; MOKFIENSKI, 2008) e os teores de lignina total, de extrativos totais e de holocelulose (FONSECA, 1996). Estes constituintes afetam as características gerais do material madeira e impactam a produção de celulose e papel (UKRAINETZ, 2008). Desse modo, a possibilidade de melhoramento e seleção de indivíduos com características de qualidade superiores é fundamental do ponto de vista econômico.

Neste quadro, o uso de seleção assistida por marcadores moleculares (SMM) é uma das técnicas de melhoramento mais utilizadas recentemente, pois permite a seleção na fase juvenil de características que são expressas somente na fase adulta, de características de difícil mensuração ou que consomem muito tempo e recurso (POT, 2006). Estudos sobre xilogênese revelaram que atributos da madeira, como teor de celulose e lignina, apresentam padrão complexo de controle genético, onde vários genes agem simultaneamente na determinação de cada caráter, com grande interação ambiental (RENGEL, 2009). Assim, encontrar marcadores moleculares que possam estar relacionados à genes que controlam atributos da madeira, e associar estes marcadores à fenótipos de interesse, são etapas importantes que aumentam a eficiência dos programas de melhoramento.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar características da madeira de uma população de híbridos interespecíficos (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*) aos 4 anos de idade através de análises convencionais de química úmida para determinação dos teores de lignina klason, extrativos totais e holocelulose. Além da determinação da densidade básica através do método de máximo teor de umidade. Também foi objetivo deste trabalho genotipar os indivíduos utilizando marcadores TRAP e microssatélite, com intuito de associar polimorfismos às propriedades da madeira mencionadas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Propriedades da madeira

A densidade básica reflete a quantidade de matéria lenhosa por unidade de volume, ou do volume de espaços vazios existente em uma madeira. Assim, deve-se observar que a avaliação da qualidade da madeira com base na densidade básica é bastante útil do ponto de vista tecnológico, sendo um excelente indicador das propriedades da madeira. Esta característica física é complexa e resultante da combinação de diversos fatores. Sabe-se, por exemplo, que é dependente das características morfológicas, porém sua relação com a composição química da madeira não parece ser significativa (SECA; DOMINGUES, 2006). Contudo, estudo realizado por Vasconcelos e Silva Jr. (1985) apud Fonseca (1996) encontrou correlação direta entre o teor de lignina e valor de densidade básica para madeira de clones de *Eucalyptus grandis*.

Entretanto, esta propriedade é passível de melhoramento e é considerada altamente herdável. Por isso, é utilizada por muitos pesquisadores como principal critério de seleção em programas de melhoramento genético (RUY, 1998; RUY et al., 2001). Hannrup (1998) sugere que há alta correlação genética entre idade e densidade, provavelmente porque o controle genético é feito por poucos genes. Demuner e Bertolucci (1993), trabalhando com nove híbridos de *E. grandis* × *urophylla*, aos cinco anos de idade, em três locais da região de Aracruz-ES, concluíram que, apesar da densidade da madeira ser herdável, os híbridos não se comportam da mesma forma entre locais distintos.

Além disso, sabe-se que há variação da densidade básica até mesmo na mesma árvore nos sentidos radial e longitudinal. Com relação à variação longitudinal, existem padrões de variação que podem ser sintetizados como: a) a densidade decresce uniformemente no sentido base-topo; b) a densidade decresce até o meio do tronco e a partir deste ponto cresce até o topo; c) a densidade decresce da base para o topo, embora uniformemente (PANSHIN; DE ZEEUW, 1970).

Dentre os parâmetros empregados na avaliação da qualidade da madeira, a densidade básica tem merecido atenção especial como decorrência de sua íntima relação com algumas importantes características tecnológicas e econômicas. Entre estas, pode-se citar, a alteração dimensional, resistência mecânica das peças, produção e qualidade da polpa celulósica, produção e qualidade

do carvão vegetal, bem como os custos operacionais ligados ao transporte e armazenamento da madeira.

No tocante a produção de polpa celulósica, a densidade básica é a propriedade que exerce maior influência sobre a qualidade e o custo da madeira produzida (FONSECA, 1996). Nos processos industriais, a madeira com maior densidade exige manuseio de menor volume de toras e cavacos. Assim, a capacidade do digestor, limitada volumetricamente, é aumentada em massa com a elevação da densidade básica, levando a um incremento do potencial de produção da indústria. Porém, o aumento da densidade é acompanhado por uma maior dificuldade na picagem das toras, ocasionando maior proporção de cavacos de maiores dimensões, dificultando a impregnação do licor, o que implica em menor produção de polpa depurada e maior teor de rejeitos na polpação (FONSECA, 1996). Madeiras de eucalipto menos densas produzem maiores rendimentos de polpação, porém maior consumo específico de madeira como demonstrado em estudo feito por Mokfienski, (2008).

A importância da densidade reside no fato da mesma contribuir para o rendimento no digestor e resistência do papel (SANTOS, 2007). Segundo o autor, algumas propriedades importantes da polpa do eucalipto, como volume específico, resistência ao ar e absorção de água, mostraram ser mais dependentes da densidade da madeira do que da espécie.

Na fabricação de papéis para impressão e escrita, as exigências mais requisitadas visam obter menor consumo de energia de refino, maior volume específico e opacidade mais elevada em índice de tração pré-estabelecida. Esses atributos são, freqüentemente, alcançados com madeiras de menores densidades, as quais apresentam fibras com menores espessuras e geram polpas com menores massas por comprimento de fibras (“coarseness”). Na fabricação de papéis sanitários, são importantes a elevada capacidade de absorção de água e o aumento de maciez, atributos atingidos com madeiras de maiores densidades básicas, que apresentam fibras com maiores espessuras e produzem polpas com maior massa por comprimento de fibras (SANTOS, 2007).

Apesar da densidade básica ser considerada a característica mais importante para a qualidade da polpa celulósica, o rendimento da polpação, por sua vez, é mais influenciado pela composição química da madeira. Isto porque, para que haja a individualização das fibras no processo de polpação química, é necessário que a lignina seja degradada seletivamente usando químicos apropriados, permitindo a separação das fibras sem destruir a celulose ou a forma das mesmas.

A lignina foi originalmente descoberta por Anselme Payen em 1838 após tratamento da madeira com ácido sulfúrico concentrado. O nome lignina vem do latim “*lignum*” que significa madeira. É constituinte da parede celular, de natureza polimérica e tridimensional, extremamente complexa. A base estrutural da lignina é o fenil-propano, sendo ligado ao anel benzênico um número variável de grupos hidroxílicos e metoxílicos.

A ocorrência da lignina coincide com o aparecimento do sistema vascular nos vegetais e foi um fator decisivo para o sucesso da colonização terrestre pelas plantas. É o segundo composto orgânico mais abundante da terra depois da celulose. Depositada em certas células especializadas do xilema e do floema, ela causa grande variação nas propriedades da parede celular, proporcionando maior resistência e impermeabilidade. A deposição de lignina é importante para a árvore porque reforça a parede celular das plantas, conferindo rigidez, impermeabilidade (HARAKAVA, 2005), suporte estrutural e transporte de água em longas distâncias. Além disso, a lignina pode ser sintetizada em resposta a vários fatores ambientais como estresse mecânico ou ataque de patógenos (VANCE, 1980; COTTERILL, 1997; BOUDET, 2000; HARAKAVA, 2005). Em espécies florestais, o teor de lignina representa entre 15 e 36% do peso seco da madeira (GRIMA-PETTENATI, 1999) e em madeira de eucalipto varia entre 22 e 30%, determinada como Lignina Klason total (FOEKEL, 2009).

Estudos feitos por Hu (1999) indicam que a deposição de lignina e celulose nas árvores é regulada de modo compensatório não relatado em herbáceas (HU, 1999), i. e., a redução da lignina é compensada por um concomitante incremento de celulose (WIMMER, 2002).

Durante muito tempo, a lignina não teve a mesma atenção que outros polímeros tais como celulose e hemicelulose, por não apresentar importância nutricional ou industrial como outros polímeros, além de ser complexa e inexistirem técnicas analíticas convenientes (BOUDET, 2000). Adota-se o teor de lignina Klason como medida do teor de lignina existente na madeira. Trata-se de uma hidrólise ácida da madeira livre de extrativos cujo resíduo é quantificado em frações solúveis e insolúveis. Na produção de polpa celulósica, a lignina apresenta-se como fator de alta relevância. Sua remoção deriva de processos químicos onerosos, poluentes e que demandam alto consumo de energia (GRIMA-PETTENATI, 1999; BOUDET, 2000; HARAKAVA, 2005).

Segundo Fonseca et al. (1996), os teores de lignina e de extrativos influenciam diretamente o consumo de álcali, o rendimento da deslignificação e o potencial industrial. Maior teor de lignina

na madeira gera polpa com viscosidade e rendimento menores em consequência da necessidade de maiores cargas de álcali ativo (TRUGILHO, 2005) além de comprometerem o potencial de produção industrial (FONSECA, 1996).

Os extrativos compõem uma extraordinária diversidade de compostos. As proporções exibem ampla variação e alguns desses componentes são encontrados em quantidade significativas somente em algumas espécies ou gêneros. Assim, determinadas madeiras podem ser caracterizadas pela natureza e quantidade de seus extrativos. A pesquisa sobre os extrativos da madeira tem tido sua motivação na descoberta e na caracterização de novas estruturas químicas, classificação taxonômica de espécies, processos de crescimento da árvore, obtenção de novos produtos e sub produtos de valor comercial, e a determinação dos problemas para alguns usos da madeira.

Os extrativos são freqüentemente responsáveis por determinadas características da madeira, como: cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, gosto e propriedades abrasivas. Sua composição e quantidade relativa dependem de diversos fatores, como espécie, idade e região de procedência. Aproximadamente 3 à 10% da madeira seca é constituída por extrativos, enquanto em folhosas de regiões temperadas este valor é entre 2 e 4%, podendo chegar a valores superiores a 10% na madeira de espécies de regiões tropicais.

Um exemplo da influência negativa do teor de extrativos na constituição química da madeira é na produção de celulose. Neste processo, estes componentes ocasionam maior requerimento de álcali para polpação, além de perda de rendimento, inibição de reações, incrustação de materiais na polpa e nos equipamentos, corrosão (QUEIROZ, 2003) e dificuldades no branqueamento (QUEIROZ, 2003; JOZSA; MIDDLETON, 1994; SANTOS, 2007). Outro efeito marcante dos extrativos sobre as propriedades da polpa é observado em sua capacidade de absorção. Esses compostos podem formar um rearranjo estrutural na superfície da fibra à medida que o tempo de estocagem aumenta, podendo assim influenciar a taxa de absorção de água de papéis sanitários (JORDÃO; MANGOLINI, 1998). Deste modo, o teor de extrativos pode ser considerado como um parâmetro importante na seleção de árvores matrizes para o melhoramento florestal visando a produção de matéria-prima destinada à produção de polpas Kraft (ALMEIDA; SILVA, 1997; MOKFIENSKI, 2008).

Outro componente da madeira que influencia os resultados do processo de polpação é o teor de holocelulose. Holocelulose é o conteúdo total de polissacarídeos da madeira, ou seja, celulose

e hemicelulose (PETTERSEN, 1984). No processo de polpação química (alcalino ou ácido), a lignina é dissolvida para liberar as fibras constituídas basicamente de holocelulose (ALMEIDA; SILVA, 1997). Este componente geralmente correlaciona-se fraca e positivamente com o rendimento em polpa (SANTOS, 2007). Entretanto, madeiras de baixa densidade, mas com alto teor de holocelulose, podem proporcionar altos rendimentos de polpa (MOKFIENSKI, 2008).

2.2 Marcadores moleculares

Os marcadores genéticos podem ser morfológicos, bioquímicos ou moleculares. Atualmente, os marcadores moleculares são os mais utilizados. São neutros e abundantes no genoma, permitindo maior precisão e detalhamento nos estudos genéticos (LEFEBVRE; CHÈVRE, 1995). Marcadores moleculares são, basicamente, um conjunto de métodos de detecção de variações nas seqüências de DNA (CAIXETA et al., 2006). A forma de detecção deste polimorfismo é o que os diferencia. Estes podem ser classificados em duas categorias, dependendo de como o polimorfismo é revelado: por hibridização ou por PCR.

Após o advento da tecnologia de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - MULLIS; FALOONA, 1987) no início da década de 1990, a capacidade de visualização de locos genômicos, sem a necessidade de marcação e hibridização, possibilitou o desenvolvimento de uma série de marcadores moleculares, sendo os mais importantes o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* - WILLIAMS et al., 1990), os microssatélites e o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - VOS et al., 1995).

Os marcadores microssatélites (LITT; LUTY, 1989), também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats* - JACOB et al., 1991) ou STR (*Short Tandem Repeats* - EDWARDS et al., 1991), são seqüências de um a seis pares de bases, chamadas de motivos, repetidas em *tandem*. A variação no número de repetições do motivo é a base do seu polimorfismo. Por outro lado, as seqüências que flanqueiam o microssatélite são conservadas, sendo utilizadas para o ancoramento dos iniciadores e a amplificação do loco. Os produtos da PCR possuem mobilidade eletroforética que difere de acordo com o número de unidades repetidas no alelo. Estes marcadores possuem natureza codominante.

Avanços na área de genômica resultaram no desenvolvimento de novas classes de marcadores moleculares, principalmente com base em informações de seqüências expressas do

genoma (*Expressed Sequence Tags* – ESTs). Este conhecimento permitiu desenvolver marcadores que identificam alelos específicos e/ou formas alternativas de genes, ao invés de regiões genômicas aleatórias (PFLIEGER et al., 2001). Esta abordagem abriu a perspectiva de usar polimorfismos em genes candidatos, i.e., genes participantes de vias metabólicas que controlam características fenotípicas importantes, o que traz a vantagem de tornar o próprio gene de interesse uma marca genética.

Neste contexto, uma nova classe de marcadores, denominada TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) foi desenvolvida com base em PCR, com o objetivo de direcionar o desenvolvimento de marcadores voltados para locos específicos ou famílias gênicas. Esta técnica, foi proposta por Li e Quiros (2001) e modificada por Hu e Vick (2003). São gerados com base em um par de iniciadores, sendo um arbitrário e outro fixo. As seqüências dos iniciadores fixos são concebidas com base em seqüências conhecidas de regiões de interesse e comumente desenhados com base em ESTs.

O mapeamento e a análise detalhada de variabilidade de genes se baseiam na premissa que um gene, com função conhecida ou inferida, pode afetar o controle de uma característica quantitativa. Esse gene é considerado um candidato para aquela característica. Entretanto, informações funcionais de genes, derivadas da genômica, demandam experimentos de validação para estabelecer de uma forma definitiva seu modo de funcionamento e interação com o resto de genoma. A possibilidade de expressar construções de genes em árvores e verificar os efeitos sobre os fenótipos é uma importante ferramenta para este fim. Um exemplo são as tentativas de desenvolvimento de árvores geneticamente modificadas com ênfase na manipulação da rota biossintética de lignina.

Estudo desenvolvido por Pilate (2002) demonstra a viabilidade de produzir, através de engenharia genética, uma madeira mais facilmente processada por polpação kraft, reduzindo o consumo de energia e a geração de poluentes, além da produção de celulose com propriedades melhoradas. Isto foi possível através da supressão das enzimas CAD e COMT da rota de biossíntese dos monolignóis. Este estudo sugeriu que o crescimento pode ser afetado se houver uma supressão severa da enzima CAD.

Em teoria, o uso de genes como marcadores para seleção de árvores é a melhor escolha, pois permite o estabelecimento de relações entre a variabilidade de seqüência destes genes e a variabilidade fenotípica observada. Além disso, esta abordagem permite a análise direta de

bancos de germoplasma e coleções de clones elite detalhadamente caracterizados, dispensando o tempo necessário para a geração, plantio e mensuração de populações segregantes. Na prática, no entanto, existem duas dificuldades que precisam ser consideradas: a) a definição de quais genes candidatos devem ser analisados; e b) a detecção de polimorfismos de seqüência nos genes candidatos. Selecionados os genes candidatos resta detectar polimorfismos de seqüência que permitam distinguir diferentes alelos a estes genes. Iniciadores da *polymerase chain reaction* – PCR (reação de polimerase em cadeia), desenhados a partir de seqüências parciais de cDNA são utilizados para gerar amplicons a partir do DNA genômico.

Em eucalipto, a seleção assistida por marcadores – SAM, ainda não está sendo empregada na rotina dos programas de melhoramento, mas existem muitos mapas genéticos e marcadores moleculares ligados a genes para diferentes características, como qualidade da madeira (GRATTAPAGLIA et al., 1996, VERHAEGEN et al., 1997; THAMARUS al., 2004). Todavia, são amostradas regiões anônimas do genoma, compreendendo regiões que não codificam proteínas (GRATTAPAGLIA et al., 1996, VERHAEGEN et al., 1997; MARQUES et al., 1999; MYBURG et al., 2003; MISSIAGIA et al., 2005), o que poderia estar contribuindo para a dificuldade do emprego da SAMM em eucalipto.

O sucesso da SAMM dependerá do grau de associação entre marcador e característica de interesse. O grau de associação mostra a possibilidade de ocorrência de recombinação entre o marcador e o gene que controla a característica. Assim, quanto maior a associação maior será a eficiência da seleção. Embora o marcador possa ser o próprio gene que codifica a característica, na maioria das vezes, está apenas associado à característica.

2.3 Estudos de associação

Estes estudos admitem que um gene possa estar envolvido na determinação do fenótipo e em seguida verifica-se se a freqüência da variante gênica é significativamente diferente entre grupos de fenótipos. Estatisticamente, significa que há covariância entre o marcador polimórfico e a característica de interesse. Esse tipo de estratégia apresenta a vantagem de possibilitar a detecção de genes que apresentam efeitos discretos ou moderados sobre uma característica.

A identificação de uma associação sugere que a variação genética neste gene poderia influenciar a característica de interesse. No entanto, a ausência de associação não implica

necessariamente na exclusão da contribuição de um gene em particular para o desenvolvimento daquela condição.

2.4 Material e métodos

2.4.1 Material vegetal

Para a realização deste trabalho foram amostrados 85 indivíduos de uma população de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urograndis* aos 4 anos de idade em um experimento localizado na região de Itapetininga-SP.

2.4.2 Avaliação das características da madeira

As árvores foram abatidas e seccionadas em toretes de 50cm de comprimento. As alturas de amostragem foram DAP e 25, 50, 75 e 100% da altura comercial (altura onde o diâmetro do tronco é igual à 6cm). Os toretes coletados foram transformados em cavaco por meio de um picador de disco móvel acoplável à tomada de força de um trator.

Na base dos toretes foram retirados discos de espessura aproximada de uma polegada (\approx 2,6cm). Foram retirados seis discos sendo o primeiro retirado na base da árvore e os demais na base de cada torete e o último na altura comercial.

Os toretes e os discos foram descascados no campo, com a madeira ainda úmida condição em que a remoção da casca é facilitada.

2.4.2.2 Métodos

2.4.2.2.1 Densidade básica

Para a determinação da densidade básica os discos foram divididos em quatro partes sendo a medula o centro da divisão. Duas partes opostas de cada disco foram utilizadas como repetição. A determinação desta característica foi feita pelo método do máximo teor de umidade (FOEKEL; BRASIL; BARRICHELO, 1972).

2.4.2.2.2 Teor de extrativos totais

O teor de extrativos totais foi determinado de acordo com a norma TAPPI T204.

2.4.2.2.3 Teor de lignina

O teor de lignina foi determinado de acordo com a norma TAPPI T222.

2.4.2.2.4 Teor de holocelulose

O teor de holocelulose foi obtido por diferença através da equação:

$$\text{Holocelulose (\%)} = 100 - (\text{extrativos (\%)} + \text{lignina (\%)}) \quad (1)$$

2.4.3 Genotipagem da população

2.4.3.1 Coleta de material vegetal para genotipagem

Dada a altura das árvores, foi inviável a coleta de folhas para extração de DNA genômico total. Assim, optou-se pela coleta de tecido cambial e floemático. Para a coleta foi utilizado um descascador de legumes comercial. O material coletado foi imediatamente armazenado em tubos cônicos de polipropileno estéreis de 25 ml (tubos tipo Falcon) contendo uma solução de CTAB 2% em água de osmose reversa.

2.4.3.2 Extração de DNA

Testes realizados *a priori* mostraram que a maceração diretamente em CTAB 2% apresentou baixo rendimento em atividade e em quantidade de DNA extraído. Verificou-se também que as amostras não podiam ser armazenadas por mais de 7 dias devido à oxidação. Deste modo, no laboratório, as amostras foram maceradas imediatamente à coleta, utilizando um aparelho de moer grãos de café (Mr. Coffee® - Fabricado por: Sunbeam Products, Inc.; Coffee Grinder; IDS 55) e, posteriormente, nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida, as amostras maceradas foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C).

O protocolo de extração de DNA de tecidos vegetais foi otimizado para obtenção de um produto de qualidade adequada para as etapas subsequentes, a partir dos tecidos vegetais do

câmbio e do floema. As principais modificações no processo foram na composição e concentração dos reagentes que compõem o tampão de extração.

O tampão de extração (2% CTAB; Tris 1M pH 8,0; EDTA 0,5M pH 8,0; NaCl 0,7M; 2% polivinil pyrrolidone (PVP)) foi aquecido à aproximadamente 65°C em banho-maria. No momento da aplicação nas amostras, adicionou-se ao tampão de extração 0,01% de proteinase-K. Parte do tecido vegetal macerado foi transferido para tubos de polipropileno de 1,5 mL, e, a seguir, adicionou-se 700 µl de tampão de extração. A cada amostra foi aplicado 1,4 µl de β-mercaptoetanol. As amostras foram incubadas a 65°C em banho-maria por 60 minutos, sob agitação periódica a cada 10 minutos para homogeneização.

Após este período, foi adicionado ao extrato 600µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). As amostras foram homogeneizadas por leves inversões durante 3 min e, em seguida, centrifugadas por 8 min a 12000 rpm. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo e homogeneizado novamente com 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) durante 3 min e, em seguida, uma nova centrifugação por 8 min a 12000 rpm. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 400 µL de isopropanol gelado, permanecendo 60 min em freezer a -20 °C em repouso. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 12.000 rpm, sendo o sobrenadante descartado. O sedimento formado ("*pellet*") foi lavado com 400 µl de etanol 70% e centrifugado por 1 min a 12000 rpm, descartando-se o etanol. Esta operação foi repetida duas vezes. A seguir, o "*pellet*" foi lavado com etanol 100% e este descartado. O *pellet* permaneceu em estufa por aproximadamente 30 minutos a 37 °C para secar e, a seguir, foi submetido a um processo para remoção das impurezas.

Nesta etapa, denominada de limpeza, foi adicionado a cada *pellet* 500 µl de NaCl 1M. O *pellet* foi dissolvido utilizando-se de leves inversões e aquecimento em banho-maria a 65 °C por 10 min. As amostras foram incubadas a 4 °C por 30 min e a seguir centrifugadas por 10 min à 4 °C à 1200 rpm. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro tubo e o precipitado foi descartado. Ao sobrenadante adicionou-se 350 µl de isopropanol à temperatura de aproximadamente -20 °C e esta solução foi centrifugada por 5 min à 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* novamente lavados com 400 µl de etanol 70%, em seguida o etanol foi descartado e o procedimento repetido por mais uma vez. A seguir o *pellet* foi lavado com etanol 100% e centrifugado por 2 min à 12000 rpm e o etanol descartado. O *pellet* permaneceu em estufa por aproximadamente 30 minutos a 37 °C para secagem.

Após a secagem o *pellet* foi ressuspenso em 30 µl de TE com RNase (10µg/ml) e incubado em estufa à 37 °C por 60 min para a eliminação completa de possíveis contaminações por RNA.

2.4.3.3 Quantificação do DNA

O DNA extraído foi quantificado em aparelho Nanodrop (Thermo Scientific) e a verificação da integridade do DNA foi realizada em gel de agarose 1% (Invitrogen) adicionado de 0,5% Sybr Safe (Invitrogen), após eletroforese nas condições de 3V/cm por 60 min a temperatura ambiente em tampão TBE 0,5× (2,7g tris base, 1,375g ácido bórico e 0,232g EDTA q.s.p. 1 litro). Para inferir sobre a integridade das amostras foi feita uma comparação visual das bandas com padrões de DNA fago λ de concentrações conhecidas sob luz ultravioleta.

2.4.3.4 Identificação de ESTs

Os genes candidatos foram selecionados com base em evidências de correlação com o fenótipo-alvo. Tais evidências foram detectadas em levantamento bibliográfico baseado em informações disponíveis no banco de dados Kegg Pathway.

2.4.3.5 Marcadores TRAP

As combinações de iniciadores fixos e aleatórios (14) foram avaliadas nas reações de amplificação de fragmentos de DNA (14 fixos: MYB1, MYB2, WRKY, CCoAOMT, COMT, BGluc, 4Cl, C3H, C4H, CAD, CCR, F5H, HCT, PAL e 1 aleatório: Trap2). O iniciador fixo (gene alvo) foi desenhado a partir de um banco de dados de seqüência EST, enquanto o segundo iniciador, o arbitrário (18 a 20 pb), possui em sua extremidade 3', 3 a 4 nucleotídeos seletivos, 4 a 6 nucleotídeos no centro da seqüência (rica ou em AT ou GC), amplificando as demais regiões prováveis do gene candidato e seqüências de preenchimento na extremidade 5' relacionadas com o desempenho do iniciador. Os iniciadores fixos foram desenhados a partir de seqüências depositadas em banco de seqüências (L.E. A. Camargo, dados não publicados). As seqüências dos iniciadores estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores arbitrário e fixos utilizados para os marcadores TRAP

Iniciadores	Nome completo	Tipo	Sequência (5' --> 3')
TRAP 2		Arbitrário	GACTGCGTACGAATTTCG
MYB1	MYB1 transcription factor family member	Fixo	ACGACAAGCTCATTGCCTAC
MYB2	MYB2 transcription factor family member	Fixo	CAACAATGAGGAAGCCAAGT
WRKY	transcription factor	Fixo	ATGGAAGCAAGAGGTCGAG
CCoAOMT	Caffeoyl CoA <i>O</i> -methyltransferase	Fixo	CATCGTTGCTTGATTTTGAG
COMT	Caffeic acid <i>O</i> -methyltransferase	Fixo	GCATGACCATATCGGAAAGTG
BGluc	beta glucosidase	Fixo	GGTCCTCATCGCTGTCTGAT
4Cl	4-Hydroxycinnamoyl CoA ligase	Fixo	ATACTGGGTGTGCAATCAG
C3H	p-Coumarate 3-hydroxylase	Fixo	TAAGGGAGGTTTCGAGAAGTC
C4H	Cinnamate 4-hydroxylase	Fixo	AGCCTCAGTGTTCCTTCAC
CAD	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	Fixo	GGTTGGTTCATCTTGTGACG
CCR	Cinnamoyl CoA reductase	Fixo	CACCTCATCAGAGCACTTGG
F5H	Ferulate 5-hydroxylase	Fixo	ACAGCCTCAAGGGTAAGATG
HCT	Hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase	Fixo	TGAAGGCCAGAAAATCCATC
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase	Fixo	GTGAATGGGACGGGAGTTG

Na tabela 2, é apresentada uma relação dos iniciadores ligados a genes de interesse que foram utilizados neste estudo, considerações sobre sua ligação com a produção de lignina relatados em diferentes estudos.

Tabela 2 – Descrição resumida da função dos ESTs utilizados e respectiva fonte de informação

Gene	Função	Referência
MYB	regulação da transcrição durante a xilogênese	PLOMION, et al. (2001)
	redução da quantidade de lignina	BOUDET, et al. (2000)
	rota biossintética de flavonóides	TAMAGNONE, et al. (1998)
CCR	envolvido na síntese de lignina	GRIMA-PETTENATI, et al. (1999); GION, et al. (2000); HERTZBERG, et al. (2001); HARAKAVA (2005)
	alteração qualitativa/quantitativa da síntese de lignina	GION, et al. (2000)
PAL	envolvido na síntese de lignina	GION, et al. (2000); HERTZBERG, et al. (2001); HARAKAVA (2005)
	redução da expressão: redução do desenvolvimento, redução da quantidade de lignina e aumento da relação S/G	GRIMA-PETTENATI, et al. (1999)
	alteração qualitativa/quantitativa da síntese de lignina	GION, et al. (2000)
C4H	envolvido na síntese de lignina	HERTZBERG, et al. (2001); HARAKAVA (2005)
	redução da expressão: redução da quantidade de lignina; redução da relação S/G	GRIMA-PETTENATI, et al. (1999)
COMT	envolvido na síntese de lignina	GION, et al. (2000); HERTZBERG, et al. (2001); HARAKAVA (2005)
	redução da expressão: redução da relação S/G	BOUDET, et al. (2000)
	alteração qualitativa/quantitativa da síntese de lignina	GION, et al. (2000)
C3H	pouco conhecimento sobre este gene envolvido na síntese de lignina	GRIMA-PETTENATI, et al. (1999) HARAKAVA (2005)
HCT	repressão: inibição da produção de lignina; redução da relação S/G e do crescimento das plantas	HOFFMANN, et al. (2004)
	envolvido na síntese de lignina	HARAKAVA (2005); RENGEL, et al. (2009)

2.4.3.6 Reações de amplificação

As reações de amplificação foram realizadas a um volume final de 15 μL com os seguintes componentes: 3 μL da amostra de DNA (10 ng/ μL), 7,5 μL de PCR Master Mix (Promega), 0,5 μM dos iniciadores arbitrários e 0,8 μM dos iniciadores fixos. A PCR foi realizada com temperatura de desnaturação do DNA a 94°C por 3 min. A seguir, 5 ciclos a 94°C

por 50 s, 35°C por 50 s, e 72°C por 1 min, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 50 s, 50°C por 50 s, e 72°C por 1 min e um passo de extensão a 72°C por 7 min.

2.4.3.7 Eletroforese dos produtos amplificados

Após a reação de amplificação, 6 µL de tampão da amostra 6× [formamida 10 mL EDTA 0,5 M pH 8,0 azul de bromofenol e xylele cyanol] foram adicionados às reações. As amostras foram desnaturadas por 5 min a 94 °C e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% de 0,5mm de espessura, com o sistema “Sequi-gen GT” (BioRad) de 38 x 50 cm. Foi realizada pré-corrída com potência de 80 W por 1 hora, seguida de corrida por 5 horas a 80 W. Para revelação dos géis foi utilizado o método de coloração com nitrato de prata seguindo 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 (Promega).

2.4.3.8 Análise dos géis

Os géis foram escaneados e impressos e a análise foi feita sobre a impressão em cores do mesmo. Tal procedimento foi adotado para que, em caso de dúvidas, o material analisado ainda estivesse disponível e idêntico ao utilizado no momento da análise.

Para avaliar a porcentagem de polimorfismos gerada foram selecionados, ao acaso, 22 indivíduos (aproximadamente 25 % da população) e todos os fragmentos foram contados. Foram considerados como fragmentos aqueles com tamanho entre 100 e 350 pb e sobre os quais não houve dúvida sobre a presença. A seguir foi feita a codificação dos fragmentos moleculares em dados binários.

Os polimorfismos foram identificados pela abreviação de cada um dos iniciadores seguidos pelo peso molecular do fragmento polimórfico em pares de bases (pb).

2.4.3.9 Marcadores microsatélites

As reações de amplificação foram realizadas utilizando 2,5 µl de solução PCR Master Mix (Qiagen), 0,5 µl Q solution (Qiagen), 0,02 µM de cada iniciador e 2,0 ng DNA para um volume final de 5 µl. As reações de amplificação foram iniciadas por um ciclo de 95 °C por 15 min, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min e 30 s a 57 °C e 1 min a 72°C, terminando com 60 °C por 30 min. A amplificação foi feita em sistema multiplex com 3 locos de marcadores microsatélites.

Após a amplificação, 1 µl do produto de PCR foi misturado com 10 µl de formamida Hi Di (Applied Biosystems) e 1 µl de marcador de peso molecular ROX size standard desenvolvido por Brondani e Gratapaglia (2001) e analisado em seqüenciador automático ABI 3100 DNA analyser (Applied Biosystems). Os dados foram coletados automaticamente pela detecção das diferentes fluorescências 6-FAM, HEX e NED (Applied Biosystems) com filtro virtual D (Applied Biosystems), e analisados com o auxílio dos softwares GeneScan/Genotyper (Applied Biosystems), que permitem a genotipagem automatizada dos alelos comparando-os com os valores de um marcador interno. A denominação dos marcadores foi feita com base no iniciador utilizado na amplificação e, em seguida, foi feita a codificação dos dados de coincidência alélica.

Estes marcadores foram utilizados com o intuito de maximizar a possibilidade de detecção de uma associação genótipo-fenótipo.

2.5 Análise estatística e bioinformática

Os parâmetros de caracterização dos materiais utilizados neste trabalho foram analisados estatisticamente através das análises de correlação de Spearman e Pearson. Com o intuito de melhor explorar os dados também foi feita uma análise de componentes principais – PCA.

Para a avaliação da associação realizou-se análise de regressão linear múltipla (*stepwise*) aos dados observados, de modo que

Para avaliação do grau de associação entre os polimorfismos detectados e as características avaliadas, realizou-se análise de regressão múltipla (*stepwise*) aos dados observados. A explicação para a associação foi dada pelo coeficiente de determinação (R^2). Este coeficiente é uma medida da proporção da variabilidade em uma variável que é explicada pela variabilidade da

outra. É pouco comum uma correlação perfeita ($R^2=1$) na prática, porque existem muitos fatores que determinam as relações entre variáveis na natureza. Por exemplo, um coeficiente de determinação de 0,8 indica que, em apenas 20% dos casos, a variação observada no item medido não pode ser descrita ou explicada pela variável testada.

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software estatístico SAS versão 9.2.

2.6 Resultados e discussão

2.6.1 Otimização da extração de DNA

O DNA extraído de folhas de eucalipto em geral é feito de acordo com o método CTAB (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1996). O mesmo procedimento foi adotado na tentativa de extrair DNA de tecido cambial e xilemático. Após a extração, o DNA foi quantificado em gel de agarose e o resultado foi considerado satisfatório. Entretanto, a quantificação em Nanodrop detectou a presença de impurezas, apesar da alta concentração de DNA.

A principal limitação da presença destes compostos está relacionada à sensibilidade da PCR. Muitos compostos podem interferir ou mesmo bloquear a ação da enzima Taq polimerase. Neste sentido, foram realizadas diversas tentativas de amplificação das amostras de DNA a partir do protocolo usual. Observou-se que as amplificações ocorriam ao acaso, ou seja, algumas vezes amplificavam outras não, sem um padrão que explicasse o evento. A diluição das amostras com o intuito de diluir também os compostos contaminantes também não foi satisfatória.

Os compostos foram identificados como compostos fenólicos e proteínas devido ao comprimento de onda em que apareciam: 320-330 nM para os fenóis e 260 nM para as proteínas. Para a detecção do problema foi feita uma comparação com o DNA extraído de folhas utilizando amostras disponíveis no Laboratório de Genética Molecular – LGM do depto de Nematologia e Fitopatologia da ESALQ/USP. Assim, foi possível estabelecer um padrão de valores a serem alcançados para a otimização do protocolo de extração para o tecido disponível no estudo em questão.

A solução encontrada foi alterar a composição do tampão de extração aumentando a concentração de reagentes capazes de inativar os compostos contaminantes. Além disso, foram incluídas novas etapas de limpeza para remoção destes compostos. O tempo de precipitação e centrifugação das amostras também foi reduzido, pois favorece a precipitação dos componentes indesejáveis. Estas medidas causaram, por consequência, uma redução na concentração das amostras de DNA, porém a qualidade obtida foi satisfatória e permitiu a amplificação das moléculas.

2.6.2 Caracterização do material

2.6.1 Densidade básica

Na figura 1 temos um panorama sobre a variação da densidade básica entre os indivíduos da população. Este parâmetro variou entre 0,3497 e 0,5317 g/cm³, variação que pode ser explicada por tendências hereditárias, influências fisiológicas e mecânicas, além dos fatores ambientais. Como os indivíduos estavam localizados na mesma área, as variações existentes são provavelmente devido a fatores genéticos, não excluindo a possibilidade de influências microclimáticas e/ou interferência de outras características da madeira.

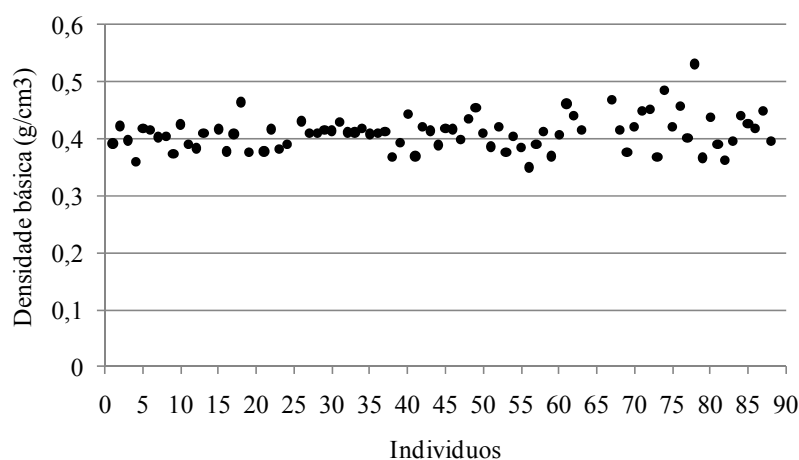


Figura 1 – Representação da variação da densidade básica entre os indivíduos da população

2.6.1 Teor de extrativos totais

A amplitude de variação do teor de extrativos totais foi de 5,33 pontos percentuais, sendo os valores máximo e mínimo, respectivamente, 8,21 e 2,88%. Estes valores estão dentro do proposto na literatura para *Eucalyptus spp.* (3 à 10%) e é ilustrada na figura 2.

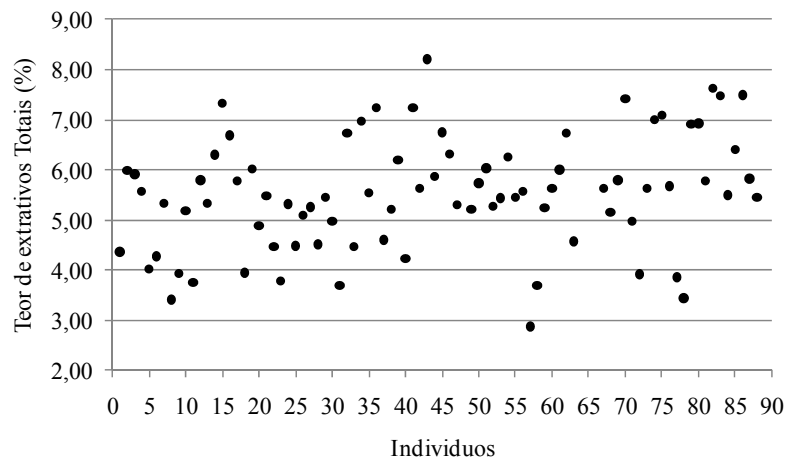


Figura 2 – Representação da variação do teor de extrativos total entre os indivíduos da população

2.6.2 Teor de lignina Klason

O teor de lignina Klason, um dos mais preocupantes para a indústria de celulose, apresentou valores dentro do esperado para espécies do gênero, ou seja, entre 22 e 30%. Os valores máximo e mínimo foram, respectivamente, 29,41 e 24,48%. A amplitude de variação de aproximadamente 5% pode ser considerada como um fator relevante em um programa de melhoramento genético. Um panorama desta variação é apresentado na figura 3.

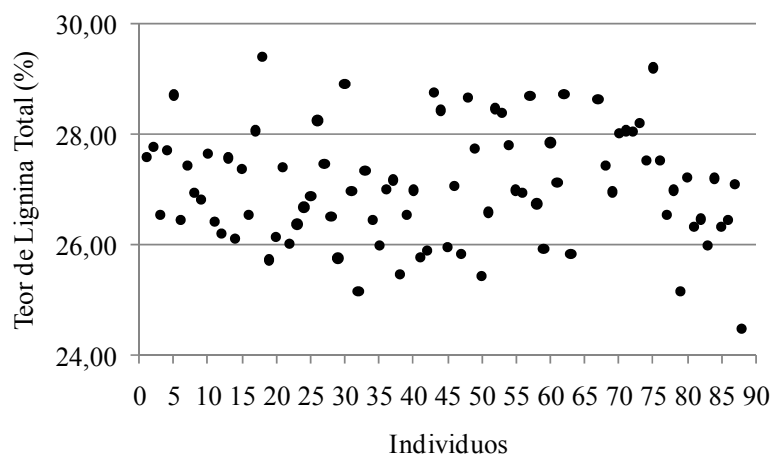


Figura 3 – Representação da variação do teor de lignina Klason entre os indivíduos da população

Este composto químico é um dos que mais afeta o consumo de reagentes durante a polpação, fato relevante por afetar diretamente os custos da produção e, ainda, a qualidade da polpa, visto que altos teores de álcali causam danos às fibras. Assim, seria interessante verificar se há correlação significativa entre esta variação e o consumo de álcali ativo no processo de polpação. Além disso, sabe-se que o tipo de lignina (siringil/guaiacil) também influencia o padrão de consumo, bem como a relação entre elas.

Porém, esta característica não pode ser considerada isoladamente para a escolha dos melhores indivíduos. Deve-se considerar a correlação genética, i.e., o que acontece com uma característica quando a seleção é feita baseada em outra, a exemplo dos resultados obtidos no estudo desenvolvido por Pilate (2002).

2.6.3 Teor de holocelulose

O teor de holocelulose, material componente da polpa celulósica, apresentou variação em teor de 63 a 70%, ou seja, dentro do esperado para espécies do gênero *Eucalyptus*.

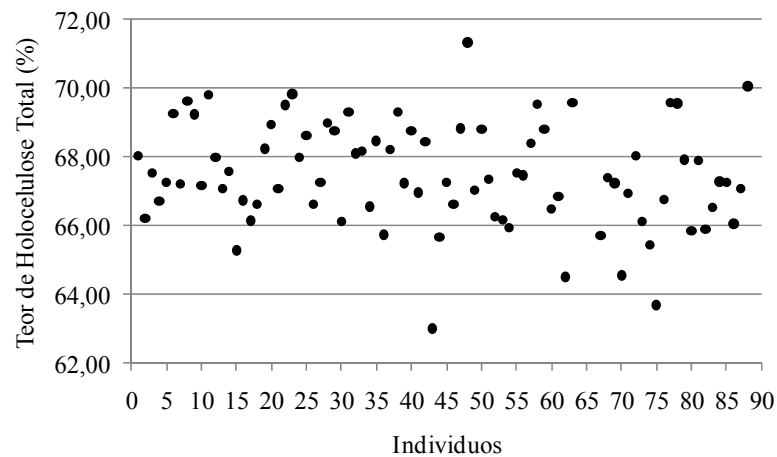


Figura 4 – Representação da variação do teor de holocelulose entre os indivíduos da população

2.7 Estudo das interações entre as características e os indivíduos

A análise de componentes principais (PCA) representada na figura 5 apresenta uma visão geral sobre a população em estudo. A partir dela, podemos inferir sobre a interação entre os indivíduos de acordo com as características avaliadas, além da interação entre as próprias características.

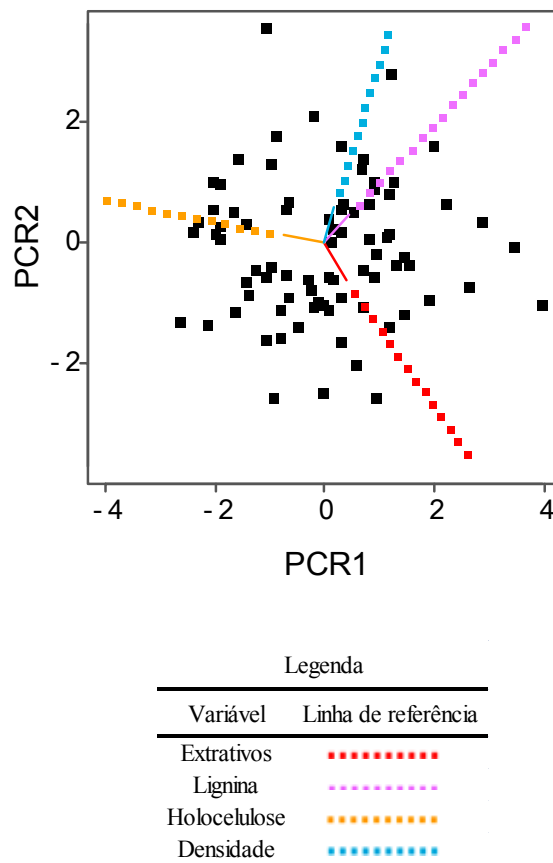


Figura 5 – Representação gráfica da análise de componentes principais (PCA) evidenciando a interação entre os indivíduos da população e as parâmetros de qualidade da madeira avaliados

A partir da figura 5 podemos inferir que a população tende a ser homogênea, isto porque a formação de sub-grupos em torno de determinada característica não é evidente, apesar de existirem indivíduos que se destacam e apresentam valores extremos para determinada(s) característica(s). As observações encontram-se agrupadas no centro dos eixos, o que significa que, além de homogêneos os valores das características avaliadas para esta população são baixos.

Algumas características estão fortemente relacionadas, como é o caso do teor de extrativos totais e holocelulose, bem como o teor de lignina e o de holocelulose. Tratam-se de fortes correlações significativas e negativas, ou seja, quando há o aumento do teor de holocelulose, os teores de lignina Klason e extrativos totais diminuem. Os dados encontrados corroboram para a teoria de Hu (1999) e Wimmer (2002) sobre a regulação compensatória do teor de lignina e celulose. Esta correlação foi detectada não somente através da PCA, mas também pela análise de correlação de Pearson que detectou para a primeira e segunda interações um valor aproximado de, respectivamente, 71 e 55%. Estas correlações estão ilustradas nas figuras 6a e 6b.

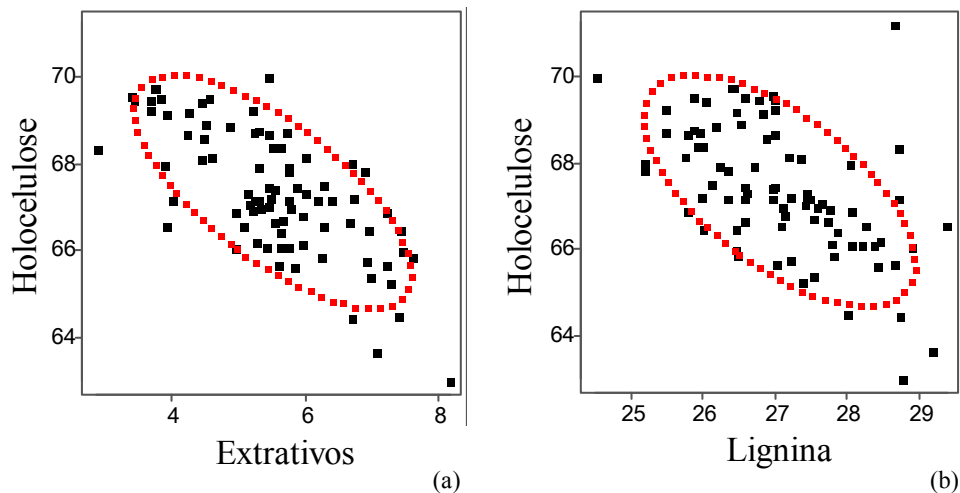


Figura 6 – Representação gráfica da análise de correlação entre indivíduos em função da interação entre as características químicas: (a) correlação entre o teor de holocelulose e o teor de extrativos totais; (b) correlação entre o teor de holocelulose e o teor de lignina Klason

Outra evidência de correlação foi detectada entre o teor de lignina e a densidade básica como pode ser observado na figura 5 e na figura 7. Neste caso, a correlação é positiva e de 19%, de acordo com a PCA e a análise de correlação de Pearson. Porém, no teste de correlação de Spearman, este valor chega a 34%. Este resultado é incoerente com a maior parte dos trabalhos publicados sobre o assunto que, em geral, não detectam correlação entre a densidade básica e características químicas. Todavia, estudo realizado por Vasconcelos e Silva Jr. (1985) também detectou correlação entre essas duas características da madeira.

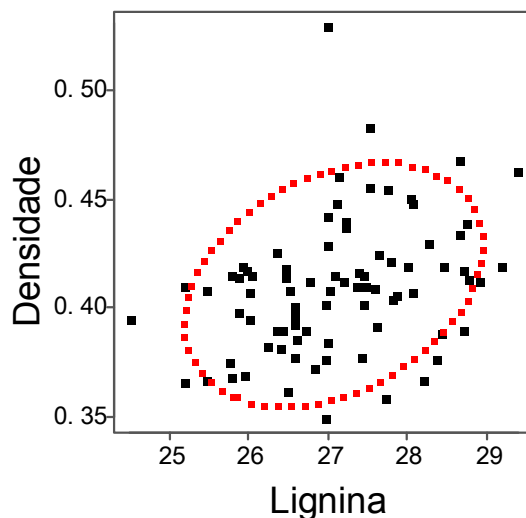


Figura 7 – Representação gráfica da análise de correlação entre indivíduos em função da interação entre o teor de lignina Klason e densidade básica

A correlação detectada entre as demais características foi menor que 10% e sempre negativa, nos testes de correlação de Pearson, de Spearman e também na PCA.

2.8 Genotipagem utilizando marcadores TRAP

A genotipagem da população utilizando marcadores TRAP foi feita inicialmente com 14 combinações entre iniciadores fixos e arbitrário. Entretanto, somente 9 dessas combinações foram consideradas, visto que as demais não geraram um perfil de fragmentos que possibilitasse uma análise clara.

Nas 9 combinações analisadas, o número de fragmentos gerado foi em média 16. Devido a quantidade de indivíduos genotipados (85 indivíduos) e a capacidade do equipamento utilizado (41 amostras) foi necessário mais de um gel de eletroforese por combinação, além da necessidade de repetição de algumas amostras. Desse modo, foi possível comparar a qualidade dos géis produzidos e também observar o padrão de fragmentos gerado entre um e outro gel para a mesma combinação entre iniciadores fixos e arbitrário.

A etapa mais crítica para a qualidade do padrão de fragmentos parece ser a coloração do gel, que varia sensivelmente de acordo com os reagentes utilizados. Esta variação faz com que, em alguns casos, alguns fragmentos sejam revelados e em outros não. A principal interferência detectada foi na revelação de fragmentos que são possivelmente gerados pela inespecificidade da

amplificação. Tais fragmentos apresentam, em geral, tamanho superior a 350 pb ou inferior a 100 pb.

Frente à esta variação, os géis foram submetidos à uma pré-análise a fim de determinar quais fragmentos seriam considerados. Um dos critérios foi o tamanho dos fragmentos sempre entre 100 e 350 pb. Uma vez definidos, todos os fragmentos foram contabilizados e em seguida somente os fragmentos polimórficos foram anotados em uma planilha, gerando uma matriz de dados binários sendo 1 a presença do fragmento e 0 a ausência. Um resumo das análises é apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Resumo da análise dos géis para todas as combinações entre iniciadores fixos e arbitrário testadas

Combinação	Nº médio de fragmentos	Nº de fragmentos polimórficos	Percentual de polimorfismo
Trap2 × MYB1	19	1	5
Trap2 × MYB2	11	4	36
Trap2 × COMT	21	3	14
Trap2 × BGluc	15	2	13
Trap2 × C3H	14	1	7
Trap2 × C4H	18	3	17
Trap2 × CCR	18	3	17
Trap2 × HCT	16	2	13
Trap2 × PAL	17	3	18

O princípio da utilização dos marcadores moleculares é baseado no dogma central da biologia molecular e na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam, na maioria das vezes, diferenças nas proteínas codificadas, as quais em conjunto levam a diferenças no fenótipo. Assim, a detecção de correlações entre as variáveis alélicas e as observações fenotípicas parece óbvia, porém ela é dependente de influências ambientais além das genéticas o que torna essa associação mais complexa. Entre os 22 fragmentos polimórficos detectados nas 9 combinações entre iniciadores analisados, apenas 4 (18%) apresentaram alguma associação com as características fenotípicas analisadas.

Porém, essas diferenças alélicas nem sempre tem consequência direta sobre o fenótipo, ou seja, sua correlação com a característica não é detectada. Isso pode também ser devido, por exemplo, ao grau de sensibilidade da técnica adotada. Os iniciadores utilizados são tidos como

fortemente correlacionados às características estudadas, sobretudo o teor de lignina. Assim, o fato de não ter sido detectada uma correlação significativa entre a maior parte dos genes, não significa que não tenham contribuído para a composição do fenótipo observado.

Na tabela 4, são apresentadas as combinações que geraram fragmentos polimórficos cuja associação significativa com características de interesse foi detectada, bem como o tamanho dos fragmentos, a característica à qual está associado e o grau de associação. Ressalta-se que as associações são significativas a um nível de probabilidade de 5%.

Tabela 4 – Resultado da análise de associação entre marcadores TRAP e características da madeira

Combinação	Tamanho do fragmento (pb)	Característica	R ²
Trap2 × COMT	210	Densidade básica	0,26
Trap2 × CCR	140	Extrativos	0,19
Trap2 × HCT	190	Lignina	0,32
Trap2 × HCT	205	Densidade básica	0,17

Na figura 8, é apresentada a imagem de um gel onde os polimorfismos gerados pela combinação entre os iniciadores TRAP2/HCT foram detectados.

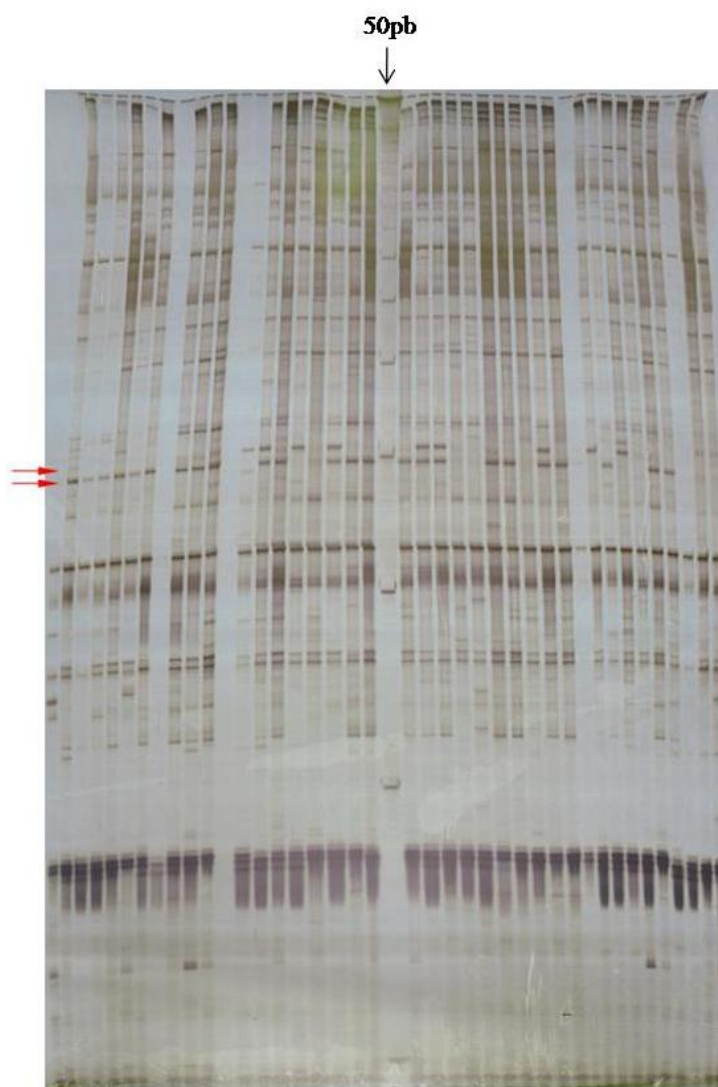


Figura 8 – Imagem de um gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata de acordo com metodologia proposta por Creste et al. (2001) evidenciando dois locos polimórficos gerados pela combinação entre os iniciadores TRAP2 e HCT

Os iniciadores utilizados para a genotipagem desta população foram baseados em ESTs relacionados à produção de lignina e os estudos já publicados sobre este composto são abundantes. Nestes estudos são apresentadas possíveis rotas metabólicas e genes envolvidos no controle da expressão deste composto fenólico. Todavia, parecem existir poucas certezas sobre a real função dos mesmos. Provavelmente, esta dificuldade esteja relacionada à dificuldade de isolamento desta molécula e assim da compreensão da regulação gênica e do metabolismo da mesma. Ainda não existe um método que permita o isolamento químico e estrutural da

protolignina, i.e., a lignina tal qual ela se encontra no vegetal (PILÓ- VELOSO, 1993). Esse fato pode contribuir para o resultado da associação com o gene candidato.

O teor de lignina teve sua variação 32% explicada pela variação alélica detectada pela amplificação de locos de interesse no genoma, utilizando os iniciadores TRAP2/HCT (190 pb). Dentre as características da madeira estudadas, esta foi a que apresentou a maior associação com marcador e a figura 9c ilustra esse resultado. Entretanto, o resultado obtido difere do que é proposto por outros estudos uma vez que, neste estudo, a presença do gene está negativamente correlacionada à produção de lignina, i.e., os indivíduos que apresentam a marca possuem menores valores para o teor de lignina Klason sendo 26, 77% contra 27,60% para os indivíduos que não possuem a marca.

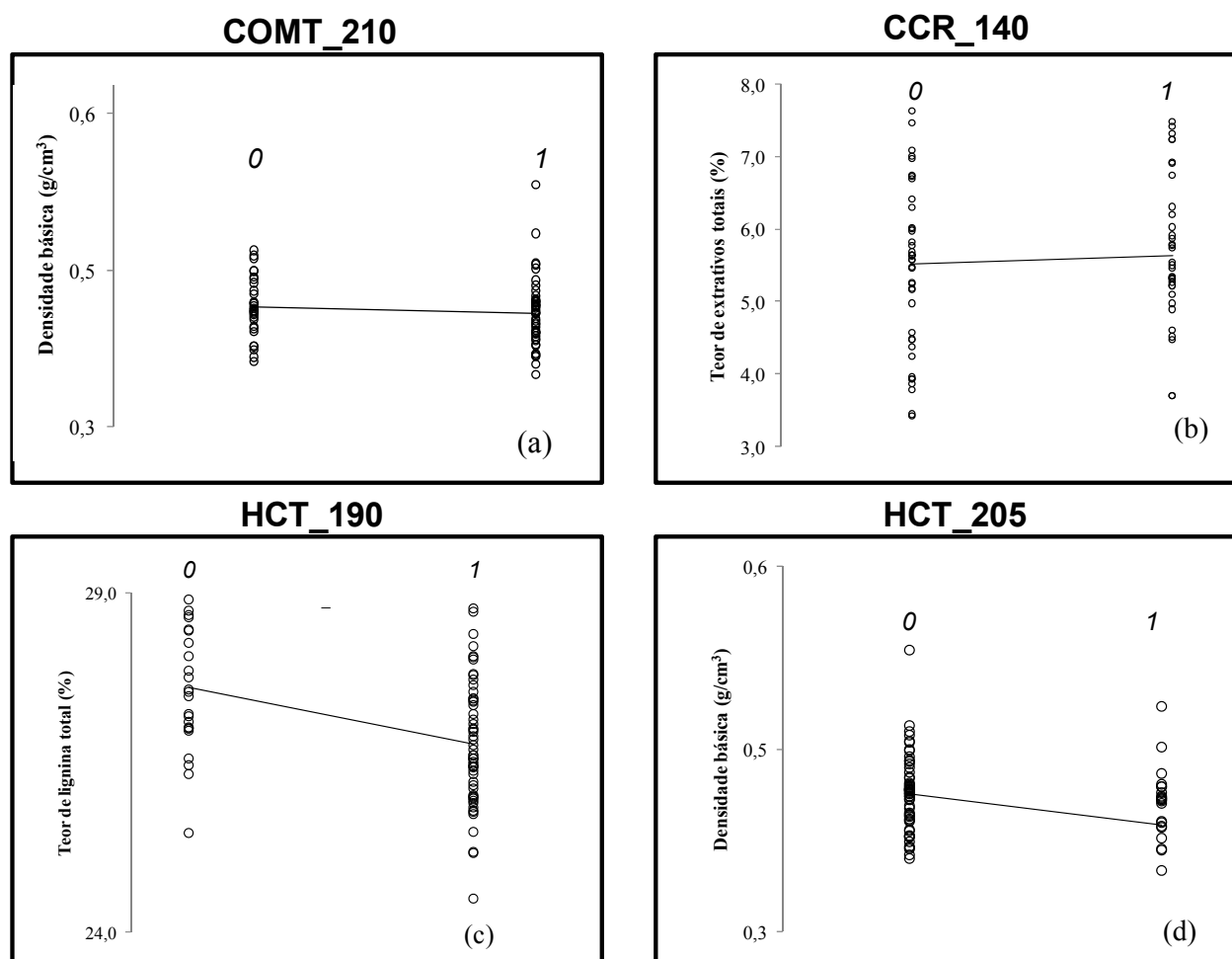


Figura 9 – Representação gráfica da correlação entre características da madeira e marcadores moleculares TRAP: (a) correlação entre a densidade básica e o marcador COMT_210; (b) correlação entre o teor de extrativos totais e o iniciador CCR_140; (c) correlação entre o teor de lignina Klason e o iniciador HCT_190; (d) correlação entre a densidade básica e o iniciador HCT_205

A densidade básica, é considerada como uma característica importante e complexa além de ser fortemente influenciada pelo ambiente. Contudo, neste estudo foram detectadas duas associações entre o genótipo e esta característica utilizando marcadores TRAP. Os iniciadores TRAP2/COMT mostraram uma associação de aproximadamente 26% com a densidade. Isto significa que 26% desta característica é explicada pela variação alélica existente neste loco. A segunda associação é com os iniciadores TRAP2/HCT a qual explica aproximadamente 17% desta característica. As figuras 9a e 9d mostram a natureza desta associação e pode-se inferir que a presença da marca COMT_210 e HCT_205 está associada à madeira de menor densidade, portanto uma correlação negativa.

O teor de extrativos totais também foi associado à polimorfismos. Esta propriedade da madeira que também está elencada entre as de maior importância para a produção de polpa celulósica, tem 19% de sua variação atrelada ao loco amplificado pelos iniciadores TRAP2/CCR (140pb). Porém, para o teor de extrativos totais a presença da marca CCR_140 está associada a teores mais elevados (figura 9b), ou seja, uma correlação positiva. Considerando que o teor de extrativos totais está fortemente relacionado ao teor de holocelulose, poderíamos supor que trata-se de uma associação indireta para esta última característica.

Para o teor de holocelulose não foi detectada nenhuma associação com o genótipo. Cabe portanto ressaltar a complexidade deste tipo de interação. Primeiramente porque o fenótipo depende do potencial genético, donde entende-se a participação de um ou inúmeros genes cuja expressão é influenciada em diferentes níveis pelo meio ambiente além de interações gênicas. Além disso, o teor de holocelulose é uma medida indireta do teor de duas outras substâncias a celulose e a hemicelulose as quais provavelmente estão sob controle exercido por diferentes genes e sofrem interferências de modo distinto pelo meio. Parece coerente considerar ainda que também em virtude das técnicas empregadas e dos genes candidatos escolhidos, esta associação não tenha sido detectada.

2.9 Genotipagem utilizando marcadores microssatélites

A genotipagem utilizando marcadores microssatélites foi feita inicialmente utilizando 36 iniciadores. Todavia, na maioria dos casos (19/36) os locos apresentaram padrão alélico de difícil

diferenciação. Apenas 17 locos foram considerados no estudo de associação e dentre eles 4 apresentaram associação significativa com alguma das características analisadas (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultado da análise de associação entre marcadores microssatélites e características da madeira

Marcador	Característica	R ²
E1339	Lignina	0,16
E1661	Densidade básica	0,18
E2010	Densidade básica	0,24
E1320	Extrativos	0,17

A genotipagem de um loco microssatélite (E2010) é exemplificada na figura 10, após edição e análise através do software Genotyper. Nesta figura podemos verificar a qualidade da genotipagem e o tamanho dos alelos.

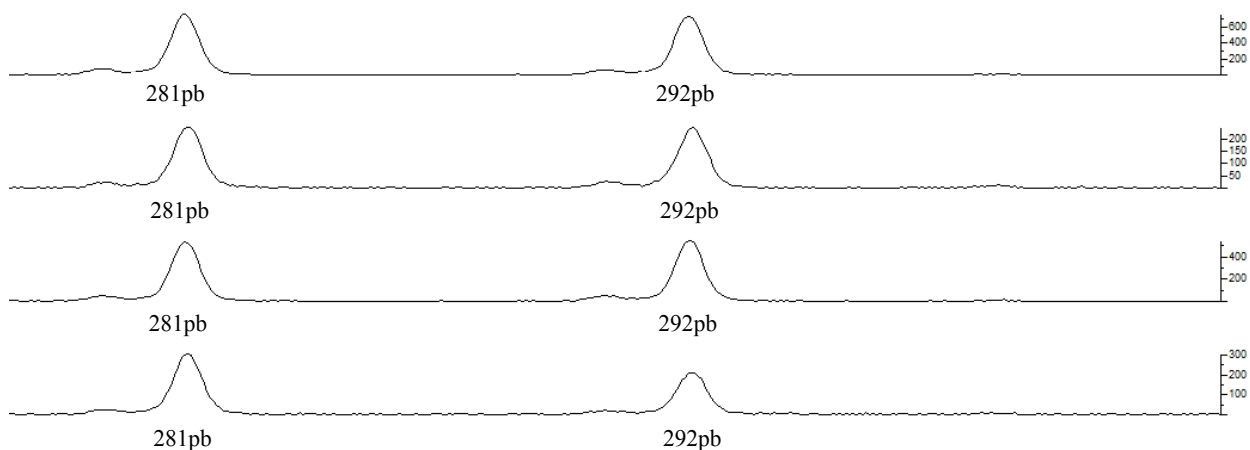


Figura 10 – Exemplo de resultado gerado pela genotipagem com marcadores microssatélites utilizando seqüenciador automático

A densidade básica apresentou 24% de sua variação associada às variações alélicas do loco E2010 e 18% ao loco E1661. No caso do loco E2010 (Figura 11c) a presença do alelo *a* é comum a todos os indivíduos donde pode-se inferir que os ganhos em densidade devem-se à variação do segundo alelo sendo que cada um contribui de forma diferente. Neste caso o alelo *d*

contribui para maior densidade básica seguido pelo *b* e finalmente pelo alelo *c*. Quanto ao loco E1661 (figura 11b) a presença do alelo *b* é comum e é este o alelo que determina o ganho em densidade.

O teor de lignina e de extrativos por sua vez tem parte de sua variação influenciada pelos locos considerados: o teor de lignina Klason possui 16% de associação com o loco E1339 (Figura 11a) e variação explicada pela variação alélica dentro dele. Neste loco a presença do alelo *a* é constante em todos os indivíduos e o aumento do teor é condicionado de modo crescente pela presença dos alelos *e*, *d*, *a* e *c*. O teor de extrativos totais está associado ao loco E1320 (Figura 11d) e tem 17% de sua variação explicada pela variação alélica neste loco. Neste caso os indivíduos heterozigotos para este caracter são os que apresentam maiores teores.

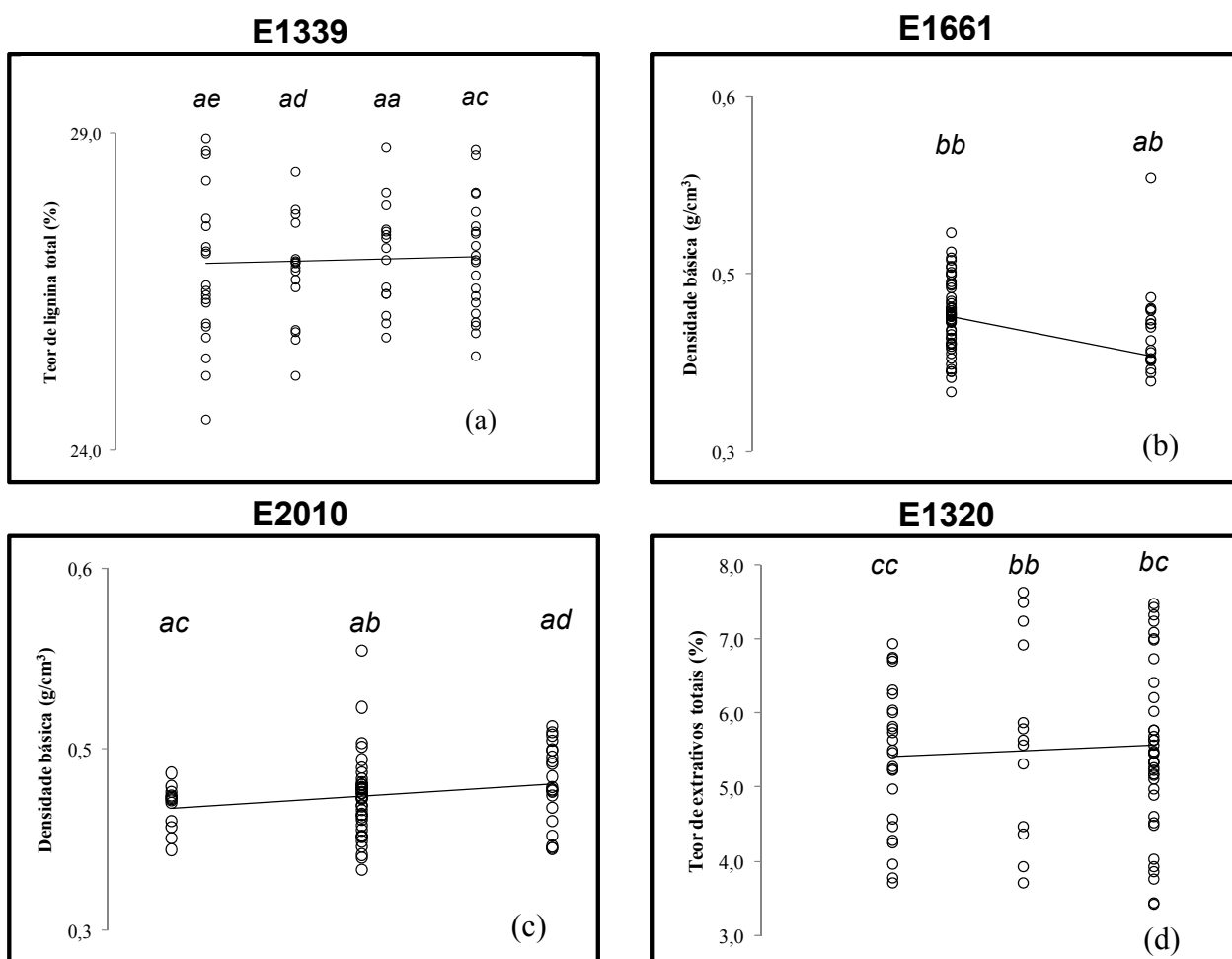


Figura 11 – Representação gráfica da correlação entre características da madeira e marcadores moleculares microsatélites: (a) correlação entre o teor de lignina Klason e o loco E1339; (b) correlação entre a densidade básica e o loco E1661; (c) correlação entre a densidade básica e o loco E2010; (d) correlação entre o teor de extrativos totais e o loco E1320

Ao contrário dos marcadores TRAP, os microssatélites são regiões anônimas e repetitivas do genoma. Assim, a associação encontrada entre locos microssatélites é uma evidência de que estes marcadores podem estar ligados aos genes codificadores das características de interesse.

A genotipagem utilizando marcadores moleculares evidencia um dos fatos anteriormente propostos: a influência de um ou mais genes sobre a determinação de um fenótipo. Percebemos que as propriedades da madeira apresentaram associação com mais de um marcador. A densidade básica, por exemplo, tida como uma das mais complexas apresentou associação significativa com 4 marcadores, sendo 2 marcadores TRAP e 2 microssatélites. Do mesmo modo, as características químicas, especificamente o teor de extrativos e de lignina também estão associados a mais de um marcador.

Pode-se supor portanto, que o fato do controle genético ser feito por diversos genes, faz com que cada um deles tenha um grau de associação significativo, porém em níveis diferentes. Outro fato, que deve ser ressaltado é o de que as características da madeira estão correlacionadas. Se isso ocorre, pode-se supor ainda que um mesmo gene possa estar associado à mais de uma característica. Essa hipótese pode ser reforçada pelo exemplo apresentado na tabela 6, a qual mostra a detecção de uma associação entre um marcador e duas características da madeira, uma física e outra química.

Tabela 6 - Resultado da análise de correlação linear múltipla entre marcadores microssatélites e características da madeira

Marcador	Características	R ²
E1661	Densidade e extrativos	0,32
E1111	Densidade e lignina	0,30

A partir dos dados apresentados na tabela 6 podemos inferir que os marcadores E1661 e E1111 estão associados a duas características cada um. A associação é significativa ao nível de 5% de probabilidade e explica aproximadamente 30% das características simultaneamente, resultado que reforça as hipóteses anteriores.

3 CONCLUSÕES

A caracterização da população via química úmida para características como teor de extrativos totais, lignina Klason e holocelulose apresentou resultado coerente com o proposto por outros estudos feitos para espécies do gênero *Eucalyptus*. Além disso, os resultados obtidos mostraram que algumas características estão significativamente correlacionadas. O método adotado para aferição da densidade básica também gerou resultados coerentes e permitiu constatar que esta característica física apresenta correlação com o teor de polissacarídeos totais presente na madeira.

A genotipagem utilizando marcadores TRAP gerou um perfil de fragmentos em gel de poliacrilamida de fácil visualização e permitiu a detecção de polimorfismos de genes de interesse associadas às características fenotípicas relevantes para a indústria de celulose e papel. A utilização da genotipagem utilizando marcadores microssatélites também permitiu a associação entre determinadas variações alélicas e características da madeira.

REFERÊNCIAS

ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2009. Brasília: ABRAF, 2010. 140p.

ABTCP. Associação Brasileira Técnica de Celulose e Papel. Disponível em: http://www.revistaopapel.org.br/noticia-anexos/1280421018_284b510451fdf04432dadd6d77b7618_1369078192.pdf. Acesso em: 20 set. 2010.

ALMEIDA, J.M.; SILVA, D.J. Inclusão de um novo e importante parâmetro potencial de seleção de eucalipto para produção de polpa Kraft. **IUFRO**, Washington, v. 3, p. 69, 1997.

ALZATE, S.B.A., TOMAZELLO FILHO, M., PIEDADE, S.M.S. Variação longitudinal da densidade básica da madeira de clones de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, *E. saligna* Sm. *E. grandis* × *urophylla*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 68, p.87-95, 2005.

ANTONSSON, S.;HENRIKSSON, G.;LINDSTRÖN, M.E. The influence of lignin and xylan on some kraftliner pulp properties. **Nordic Pulp and Paper Research Journal**, Stockholm, v. 24, p.403-408, 2009.

BASSA, A.G.M.C. **Mistura de madeiras de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus globulus* e *Pinus taeda* para produção de celulose Kraft através do processo Lo-Solids®**. 2006.170 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais com opção em Tecnologia de Produtos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

BOUDET, A.M., Lignins and lignification: select issues. **Plant Physiology Biochemistry**, Palo Alto, v. 38, p.81-96, 2000.

BRONDANI, R.P.V.; GRATTPAGLIA, D.A. Simple and cost effective method to synthesize a fluorescent labeled internal DNA standard for fragment sizing in an automatic sequencer. **BioTechniques**, Natick, v. 31, p. 793-800, 2001.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. cap. 1, p. 9-78.

COTTERILL, P.; SHARMANE, M. improving eucalyptus pulp and paper quality using genetic selection and good organization. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 80, p. 82-89, 1997.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorfisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels y silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, p.299-306, 2001.

DEMUNER, B.J.; BERTOLUCCI, F.L.G. Seleção florestal: uma nova abordagem a partir de estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos para características da madeira e de polpa de eucalipto. In: CONGRESSO NACIONAL ANUAL DE CELULOSE E PAPEL, 26, 1993. São Paulo, . **Anais...** São Paulo: ABTCP, 1993. p. 411-423.

EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H.A.; CASKEY, C.T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 49, p. 746-756, 1991.

FAO. **State of the World's Forests 2007**, Roma, 2007. 144p.

FOEKEL, C.; BRASIL, M.A.M.; BARRICHELO, L.E.G. Métodos para determinação da densidade básica para folhosas e coníferas. **O Papel**, São Paulo, v. 33, p. 57-61, 1972.

FOEKEL, C. Individualização das fibras da madeira do eucalipto para produção de celulose kraft. In: FOEKEL, C. **Eucalyptus on-line Book**, 2009. cap. 16. Disponível em: <http://www.eucalyptus.com.br/eucaliptos/PT16_IndividualizacaoFibras.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2010.

FONSECA, S.M., OLIVEIRA, R.C., SILVEIRA, P.N. Seleção da árvores industrial (Procedimentos, riscos, custos e benefícios). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 20, p.69-85, 1996.

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

GRIMA-PETTENATI, J., GOFFNER, D. Lignin genetic engineering revisited. **Plant Science**, Ireland, v.145, p.51-65, 1999.

JORDÃO, M.C.S.; MANGOLINI, N.J. Avaliação de pastas ligno-celulósicas para fins absorventes com ênfase em pasta fofa (fluff pulp). In: CONGRESSO ANUAL DE CELULOSE E PAPEL DA ABTCP, 21., 1988. São Paulo. **Anais...** São Paulo: ABTCP, 1988. p. 295-309.

HANNRUP, B.; EKBERG, I. Age-age correlations for tracheid length and wood density in *Pinus sylvestris*. **Canadian Journal of Forest Research**, Canada, v.28, p.1373-1379, 1998.

HARACAVA, R., Genes encoding enzymes of the lignin biosynthesis pathway in *Eucalyptus*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto v.28, suppl. 3, p.601-607, 2005.

HERTZBERG, M., ASPEBORG, H., SCHRADER, J., ANDERSSON, A., ERLANDSSON, R., BLOMQVIST, K., BHALERAO, R., UHLÉN, M., TEERI, T.T., LUNDEBERG, J., SUMDBERG, B., NILSSON, P., SANDBERG, G. A transcriptional roadmap to wood formation. **PNAS**, Boston, v.98, p.14732-14737, 2001.

HU, W.J., HARDING, S.A., LUNG, J., POPKO, J.L., RALPH, J., STOKKE, D.D., TSAI, C.J., CHIANG, V.L. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. **Nature Biotechnology**, New York, v.17, p.808-812, 1999.

HU, J.; VICK, B.A. Target region amplification polymorphism: a novel technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v.21, p.289-294, 2003.

JACOB, H.J.; LINDPAINNER, K.; LINCOLN, S.E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R.K.; MAO, Y.-P.; GANTEN, D.; DZAU, V.J.; LANDER, E.S. Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. **Cell**, Cambridge, v. 67, p. 213-224, 1991.

JOZSA, L.A.; MIDDLETON, G.R. **A discussion of wood quality attributes and their practical implications**. Vancouver:Forintek;Canada;Corpditora, 1994. 51 p.

LEFEBVRE, V.; CHÈVRE, A.M. Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review. **Agronomie**, Paris, v. 15, p. 3-19, 1995.

LI, G.; QUIROS, C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 103, p. 455-461, 2001.

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**, Chicago, v. 44, p. 397-401, 1989.

MARQUES, C.M.; VASQUEZ-KOOL, J.; CAROCHA, V.J.; FERREIRA, J.G.; O'MALEY, D.M.; LIU, B.H.; SEDEROFF, R. Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.99, p.936-946, 1999.

MISSIAGGIA, A.; PIACEZZI, A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic mapping of *Eefl*, a major effect QTL for early flowering in *Eucalyptus grandis*. **Tree Genetics e Genomes**, Heidelberg, v.1, p.79-84, 2005.

MOKFIENSKI, A.; COLODETTE, J.L.; GOMIDE, J.L., CARVALHO, A.M.L. A importância relativa da densidade da madeira e do teor de carboidratos da madeira e do teor de carboidratos no rendimento de polpa e na qualidade do produto. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.18, p.401-413, 2008.

MORAN, G.F., THAMARUS, K.A., RAYMOND, C.A., QIU, D., UREN, T., SOUTHERTON, S.G. Genomics of *Eucalyptus* wood traits. **Annals of Forest Science**, Nancy, v.59, p.645-650, 2002.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA invitro via a polymerase- catalyzed chain-reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.

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 pseud-backcross mapping approach. **Theoretical and Applied Genetic**, New York, v.107, p.1028-1042, 2003.

NEALE, D.B., SEWELL, M.M., BROWN, G.R. Molecular dissection of the quantitative inheritance of wood property traits in loblolly pine. **Annals of Forest Science**, Nancy, v. 59, p.595-605, 2002.

PANSHIN, A.J.; DE ZEEUW, C. **Textbook of wood technology**. New York: McGraw-Hill, 1980. 404p.

PETTERSEN, R.C. The chemical wood composition. In: ROWELL, R. **The chemistry of solid wood**. Madison, 1984. cap. 2, p. 57-126.

PFIEGER, S.; LEFEBVRE, V.; CAUSSE, M. The candidate gene approach in plant genetics: a review. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.7, p.275-291, 2001.

PILATE, G.; GUINEY, E.; HOLT, K.; PETIT-CONIL, M.; LAPIERRE, C.; LEPLÉ, J.C.; POLLET, B.; MILA, I.; WEBSTER, E.A.; MARSTORP, H.G.; HOPKINS, D.W.; JOUANIN, L.; BOERJAN, W.; SCHUCH, W.; CORNU, D.; HALPIN, C. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, p. 607-612, 2002.

PILO-VELOSO, D. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, São Paulo, v.16, p. 435-488, 1993.

POT, D., RODRIGUES, J.C., ROZENBERG, P., CHANTRE, G., TIBBITS, J., CAHALAN, C., PICHAVANT, F., PLOMION, C. QTLs and candidate genes for wood properties in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). **Tree Genetics & Genomics**, Heidelberg, v.2, p.10-24, 2006.

QUEIROZ, S.C.S.; GOMIDE, J.L. Efeito das características anatômicas e químicas na densidade básica da madeira de clones de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, p.10-16, 2003.

RAYMOND, C.A. Genetics of Eucalyptus wood properties. **Annals of Forest Science**, Nancy, v. 59, p.525-531, 2002.

RENGEL, D., CLEMENTE, H.S., SERVANT, F., LADOUCE, N., PAUX, E., WINCKER, P., COULOUX, A., SIVADON, P., GRIMA-PETTENATI, J. A new genomic resource dedicated to wood formation in *Eucalyptus*. **BMC Plant Biology**, London, v.9, p. 36-49, 2009.

RUY, O.F. **Variação da qualidade da madeira em clones de Eucalyptus urophylla S.T. Blake da Ilha de Flores, Indonésia**. 1998. 69 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais com opção em Tecnologia de Produtos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

RUY, O.F.; TOMAZELLO FILHO, M.; FERREIRA, M. Qualidade da madeira de grupos fenotípicos de clones de *Eucalyptus urophylla*. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, p.21-27, 2001.

SANTOS, S.R.; SANSÍGOLO, C.A., Influência da densidade básica da madeira de clones de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* na qualidade da polpa branqueada. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.17, p.53-63, 2007.

SECA, A.M.L., DOMINGUES, F.M.J. Basic density and pulp yield relationship with some chemical parameters in *Eucalyptus* trees. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p.1687-1691, 2006.

THAMARUS, K.; GROOM, K.; BRADLEY, A.; RAYMOND, C.A.; SCHIMLECK L.R.; WILLIAMS, E.R.; MORAN, G.F. Identification of quantitative trait loci for wood fibre properties in two full-sib pedigrees of *Eucalyptus globulus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.109, p.856-864, 2004.

TRUGILHO, P.F.; BIANCHI, M.L.; GOMIDE, J.L.; LIMA, J.T.; MENDES, L.M.; MORI, F.; GOMES, D.F.F. Clones de *Eucalyptus* versus a produção de polpa celulósica. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.15, p. 145-155, 2005.

UKRAINETZ, N.K.; RITLAND, K.; MANSFIELD, S.D. Identification of quantitative trait loci for wood quality and growth across eight full-sib coastal Douglas-fir families. **Tree Genetics & Genomics**, Heidelberg, v.4, p.159-170, 2008.

VANCE, C.P.; KIRK, T.K.; SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance, **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.18, p.259–288, 1980.

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

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprint. **Nucleic Acids Research**, London, v.23, p.4407-4414, 1995.

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**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WIMMER, R.; DOWNES, G.M.; EVANS, R.; RASMUSSEN, G.; FRENCH, J. Direct effects of wood characteristics on pulp and paper handsheet properties of *Eucalyptus globulus*. **Holzforschung**, Berlin, v.56, p. 244-252, 2002.