

TATIANA BARBOSA ROSADO

MAPEAMENTO DE GENE LETAL, RESPONSÁVEL PELA DISTORÇÃO DE
SEGREGAÇÃO E DETECÇÃO DE QTL PARA RESISTÊNCIA À FERRUGEM
(*Puccinia psidii*) EM *Eucalyptus* spp.

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R788m
2007

Rosado, Tatiana Barbosa, 1979-
Mapeamento de gene letal, responsável pela distorção de
segregação e detecção de QTL para resistência à ferrugem
(*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus* spp. / Tatiana Barbosa
Rosado. – Viçosa, MG, 2007.
xiii, 123f. : il. ; 29cm.

Orientador: Cosme Damião Cruz.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Genética. 2. Locos de caracteres quantitativos.
3. Marcadores genéticos. 4. Mapeamento cromossômico.
5. Eucalipto - Genética. 6. Eucalipto - Melhoramento
Genético. 7. Ferrugem-do-eucalipto. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 573.5

TATIANA BARBOSA ROSADO

MAPEAMENTO DE GENE LETAL, RESPONSÁVEL PELA DISTORÇÃO DE
SEGREGAÇÃO E DETECÇÃO DE QTL PARA RESISTÊNCIA À FERRUGEM
(*Puccinia psidii*) EM *Eucalyptus* spp.

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exi-
gências do Programa de Pós-Graduação
em Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 8 de novembro de 2007.

Prof^a. Elza Fernandes de Araújo
(Co-Orientadora)

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Co-Orientador)

Dr^a. Elizabete Keiko Takahashi

Dr^a. Eveline Teixeira Caixeta

Prof. Cosme Damião Cruz
(Orientador)

Aos meus pais,
Antônio Dimas Silva Rosado
Raimunda Barbosa Rosado

Aos meus irmãos,
Antônio Marcos Rosado
Valmir Barbosa Rosado

Ao meu grande amor
Bruno Gálveas Laviola

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado e Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao professor Cosme Damião Cruz, pela orientação, pela amizade, pelos sábios ensinamentos responsáveis pelo meu crescimento acadêmico e pelo desenvolvimento desse trabalho e pela presença constante em todos os momentos decisivos.

À professora Elza Fernandes de Araújo, pelo exemplo de pessoa e de pesquisadora, pelos conselhos fundamentais no meu desenvolvimento profissional e humano e pela colaboração na condução desse trabalho.

Ao professor Acelino Couto Alfenas, pela amizade e pela importante contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

Às pesquisadoras Eveline Teixeiras Caixeta e Elizabete Keiko Takahashi pelas críticas e sugestões.

À empresa CENIBRA CELULOSE S/A pelo fornecimento de material biológico e apoio na elaboração desse trabalho.

Ao Rafael pela amizade, pelo auxílio nas análises dos dados e pelo agradável convívio.

Ao Douglas, Lúcio e Guilherme pelas avaliações fenotípicas e pelas importantes sugestões.

Aos amigos do Laboratório de Bioinformática, de Genética Molecular de Microrganismos e Fitopatologia Florestal, pela agradável convivência por me proporcionar um ótimo ambiente de trabalho e pelas contribuições durante o desenvolvimento desse trabalho.

À minhas grande amigas Milene Maria Augusta pela amizade desde a graduação e pelos obstáculos vencidos juntas.

Aos funcionários da secretária de genética e melhoramento especialmente à Rita pela atenção e amizade.

Aos funcionários Antônio, Danilo e Evandro pelo carinho e amizade.

Aos meus avós, tios e primos pelas orações, amizade e torcida

A meus pais, pelo incentivo, carinho, e por serem os responsáveis pela minha sólida formação meus eternos agradecimentos.

Aos meus irmãos Antônio Marcos e Valmir, meus melhores amigos, pelo amor incondicional, apoio e dedicação em todos os momentos.

A Lira e Rita, grandes amigas e companheiras.

Aos meus sobrinhos Lara e João Vitor tesouros da minha vida.

Ao Bruno, pela companhia, compreensão e, sobretudo pelo amor.

BIOGRAFIA

TATIANA BARBOSA ROSADO, filha de Antônio Dimas Silva Rosado e Raimunda Barbosa Rosado, nasceu em Viçosa – MG, no dia 22 de Janeiro de 1979.

Em 1998, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), graduando-se em maio de 2002.

Em abril de 2002, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade de Viçosa (UFV), concluindo-o em fevereiro de 2004.

Em março de 2004, iniciou o Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se à defesa de tese em novembro de 2007.

Em outubro de 2007, obteve aprovação do CNPq para uma bolsa de pós-doutorado júnior (PDJ) junto ao departamento de Biologia Geral – UFV, sob a supervisão do professor Cosme Damião Cruz, com início de trabalho para novembro de 2007.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. O gênero <i>Eucalyptus</i>	4
2.2. A ferrugem do eucalipto.....	5
2.3. Estudo de herança.....	7
2.4. Mapeamento genético.....	8
2.5. Distorção de Segregação.....	11
2.5.1. Distorção de segregação em <i>Eucalyptus</i>	13
2.6. Detecção de QTLs.....	14
2.7. Métodos de detecção de QTLs.....	16
2.7.1. Mapeamento por marca simples.....	16
2.7.2. Mapeamento por intervalo simples.....	18
2.7.3. Mapeamento de QTLs em <i>Eucalyptus</i>	19
2.8. Marcadores microsatélites.....	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
Capítulo I: Herança da resistência à ferrugem (<i>Puccinia psidii</i>) em progênies de <i>Eucalyptus</i> spp.....	34

1. RESUMO.....	35
2. INTRODUÇÃO.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Material vegetal	39
3.2. Inoculação.....	39
3.3. Avaliação da severidade e teste de segregação.....	40
3.4. Análises estatísticas.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
Capítulo II: Mapeamento de gene letal responsável pela distorção de segregação no grupo de ligação três, em cruzamento interespecífico de <i>Eucalyptus spp.</i>.....	50
1. RESUMO.....	51
2. INTRODUÇÃO.....	53
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.1. Material.....	56
3.2. Extração de DNA total.....	56
3.3. Amplificação e avaliação dos oligonucleotídeos microssatélites.....	57
3.3.1. Teste de segregação.....	58
3.3.2. Taxa de distorção de segregação	59
3.3.3. Distância entre pares de locos e mapeamento genético.....	60
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	61
4.1. Análise dos padrões de amplificação.....	61
4.2. Teste de segregação genotípico e gamético.....	64
4.3. Taxa de segregação distorcida	70

4.3.1.Desenvolvimento teórico.....	70
4.3.1.1. Distorção observada para um único genitor em cruzamentos entre genitores heterozigotos	72
4.3.1.2. Distorção observada em um único genitor em cruzamentos entre genitores homozigotos e heterozigotos.....	74
4.3.1.3. Distorção observada em ambos genitores.....	76
4.3.2. Desenvolvimento aplicado.....	77
4.4. Mapeamento do gene letal.....	79
4.4.1. Desenvolvimento teórico.....	79
4.4.2. Desenvolvimento aplicado.....	83
4.4.2.1. Frequência de recombinação entre pares de locos.....	83
4.4.2.2. Posicionamento dos locos microssatélites no grupo de ligação três.....	83
5. CONCLUSÕES	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
Capítulo III. Mapeamento de QTLs para resistência à ferrugem (<i>Puccinia psidii</i>) em cruzamento interespecífico de <i>Eucalyptus</i> spp	92
1. RESUMO.....	93
2. INTRODUÇÃO.....	94
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	96
3.1. Informação fenotípica.....	96
3.2. Informação genotípica.....	96
3.3. Método de detecção de QTL.....	97
3.3.1. Mapeamento por marca simples.....	97
3.3.2. Mapeamento por intervalo simples.....	105
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108
4.1 Mapeamento por marca simples.....	108

4.2. Mapeamento por intervalo simples	113
5. CONCLUSÕES.....	118
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	121

RESUMO

ROSADO, Tatiana Barbosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2007. **Mapeamento de gene letal, responsável pela distorção de segregação e detecção de QTL para resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus* spp.** Orientador: Cosme Damiano Cruz. Co-Orientadores: Elza Fernandes de Araújo e Acelino Couto Alfenas.

A ferrugem causada por *Puccinia psidii* é uma doença limitante para a cultura do eucalipto no Brasil. Dessa forma, estudos de herança da resistência à ferrugem, subsidiado por análise de mapeamento e detecção de QTL (s), torna-se de suma importância para auxiliar nos programas de melhoramento. No entanto, em *Eucalyptus*, principalmente em cruzamentos interespecíficos, observa-se alta frequência de locos com distorção de segregação (DS) que dificulta prever as segregações genotípicas e estimar as frequências de recombinações em análises genômicas. Mapas genéticos que negligenciam a distorção de segregação, proporcionam estimativas viesadas da distância entre marcas. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram selecionar um cruzamento interespecífico para identificar a causa da distorção de segregação, de locos microssatélites, no grupo de ligação três, desenvolver uma metodologia para mapear esses locos e detectar QTLs responsáveis pela resistência à ferrugem. Foram apresentadas funções para estimar a taxa de distorção dos locos do grupo de ligação três. Baseada nas taxas de distorção foi estabelecido um estimador para mapear esses locos. Foi pressuposto e comprovado que a distorção de segregação foi devida a um gene letal que atua na formação dos gametas. A partir das taxas de distorção e da frequência de recombinação estimadas, para cada loco, esses foram mapeados em relação ao loco letal. Para a detecção de QTLs foram utilizados os dados fenotípicos relacionados à ferrugem e as informações genotípicas de sete locos microssatélites do grupo de ligação três (EMBRA 227, EMBRA 189,

EMBRA 122, EMBRA 171, EMBRA 125, EMBRA 239, EMBRA 181). A detecção de QTLs, responsáveis pela resistência à ferrugem, foi feita por meio de metodologias de mapeamento baseada em marca simples e em intervalo simples. As metodologias de marcas simples evidenciaram associação significativa entre os marcadores EMBRA 181 e EMBRA 125 e o QTL, sendo a maior significância detectada para o marcador EMBRA 125. Pelo método de intervalo simples, o QTL foi mapeado a 0,002 cM do EMBRA 125. O QTL mapeado explicou 42% da variação fenotípica. Em função do QTL ter sido mapeado muito próximo ao loco marcador EMBRA 125 e por explicar grande proporção da variância fenotípica, é interessante o seu uso em seleção assistida e eventual clonagem posicional do gene de resistência à ferrugem

ABSTRACT

ROSADO, Tatiana Barbosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2007. **Lethal gene mapping responsible for the segregation distortion and QTL detection for rust (*Puccinia psidii*) in *Eucalyptus* spp.** Adviser: Cosme Damião Cruz. Co-Advisers: Elza Fernandes de Araújo and Acelino Couto Alfenas

The rust caused by *Puccinia psidii* is a limited factor to the *Eucalyptus* production. In this way, inheritance studies for rust, subsidized by mapping analysis and detection of QTL (s) becomes important to aid the breeding programs. However, in *Eucalyptus*, mainly in interspecific crossings, a high frequency of loci with segregation distortion (SD) is observed. The SD hinders to predict the genotypic segregation and to estimate the recombination frequencies in genomic analysis. Genetic maps that neglect the segregation distortion provide a bias estimation of the distance among markers. This way, this work aimed to select a interspecific cross to identify the cause of segregation distortion of microsatellite loci, in the linkage group three; to develop a methodology to map those loci and to detect QTLs responsible for the rust resistance. Functions were presented to estimate the amount of distortion of the loci of the linkage group three that exhibited segregation distortion. From the amount of distortion an estimator was established to map those loci. It was presupposed and confirmed that the segregation distortion was due to a lethal gene that acts in the gamete formation. Starting from the amount of distortion and from the estimated recombination frequency for each locus, they were mapped in relation to the lethal loci. Phenotypic data related to the rust and genotypic information of seven microsatellite of the linkage group three (EMBRA 227, EMBRA 189, EMBRA 122, EMBRA 171, EMBRA 125, EMBRA 239, EMBRA 181) were used for the QTLs detection. The QTL

detection, responsible for the rust resistance, was made through methodologies based in simple mark and simple interval mapping. The methodologies of simple marks evidenced statistical significance for the markers EMBRA 181 and EMBRA 125, and the last one showed the largest statistical significance. For the simple interval mapping method, QTL was mapped 0,002 cM from EMBRA 125. Mapped QTL explained 42% of the phenotypic variation. Once the QTL was mapped very close to the locus marker EMBRA 125 and it explains great proportion of the phenotypic variance, it is interesting to use in markers assisted selection and eventual positional cloning of the rust resistance gene.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente as espécies do gênero *Eucalyptus* são as mais utilizadas em plantações florestais no país, sendo que o Brasil ocupa lugar de destaque como um dos países de maior área plantada com eucalipto do mundo, cerca de 3,4 milhões de hectares, ultrapassado apenas pela Índia. Estima-se que cerca de 85% desta área estejam distribuídas pelas regiões Sul e Sudeste, cuja principal aplicação é a utilização da madeira para produção de celulose (Sociedade Brasileira de Silvicultura, Fatos e Números do Brasil Florestal, 2007).

Espécies do gênero *Eucalyptus* são bem adaptadas às condições edafo-climáticas brasileiras, apresentando rápido crescimento e boa qualidade de madeira, sendo intensivamente propagadas por meio de clones híbridos. No entanto, a expansão das áreas plantadas e os ciclos sucessivos numa mesma área de plantio favoreceu o surgimento de várias doenças. Dentre essas, a ferrugem causada por *Puccinia psidii* constitui, atualmente, uma das mais severas para a plantação de *Eucalyptus*. *Puccinia psidii* é um patógeno do *Eucalyptus* e de outros gêneros da família *Myrtaceae* que, em condições de ambiente favorável, infecta órgãos da parte aérea em mudas no viveiro e em plantas jovens com até 3 m de altura, causando redução de crescimento, perda de dominância apical, morte de brotações, após o corte raso, e morte de mudas para plantio (Alfenas et. al., 2004). O plantio de genótipos de *Eucalyptus* resistentes ao fungo *Puccinia psidii* Winter é a medida mais recomendável de controle. Dessa forma, torna-se imprescindível o estudo e o conhecimento dos genes responsáveis pela resistência à ferrugem.

Uma estratégia para buscar regiões genômicas que contenham genes ou seqüências regulatórias envolvidos no controle de caracteres é o mapeamento genético. Essas regiões são comumente denominadas de locos controladores de caracteres quantitativos (QTL). As marcas ligadas aos QTLs

podem ser utilizadas em seleção assistida por marcadores ou como guias visando a clonagem posicional dos genes.

Apesar de sua relevância, o mapeamento genético e a detecção de QTLs, em espécies perenes não é simples. O cálculo da frequência de recombinação entre pares de locos é mais complexo em *Eucalyptus* do que em espécies anuais para as quais é factível a obtenção de linhagens endogâmicas. Em populações exogâmicas até quatro alelos podem estar segregando para cada loco marcador e para o QTL, tornando complexas as análises de ligação por causa da existência de muitos tipos de razões de segregação entre pares de marcas. Nestes casos, é necessário empregar delineamentos genéticos de populações exogâmicas como famílias de meios-irmãos e famílias de irmãos completos. No entanto, em *Eucalyptus*, os primeiros mapas genéticos gerados utilizaram um tipo de delineamento alternativo denominado de pseudo-cruzamento teste no qual, os marcadores segregantes são analisados separadamente para cada genitor (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Porém, pela estratégia de pseudo-cruzamento teste são gerados dois mapas para os genitores e os marcadores que segregam na proporção 1:2:1 são excluídos da análise dificultando a integração dos mapas e prejudicando a precisão do mapeamento.

Além da dificuldade de mapeamento em populações de *Eucalyptus*, estudos de mapeamento nesse gênero, principalmente em cruzamentos híbridos, tem detectado grande número de locos com distorção de segregação (DS), ou seja, locos que não segregam como o esperado pelas leis mendelianas clássicas (Ky et al., 2000). A presença de marcadores com DS pode ser um inconveniente, devido a construção de mapas de ligação, ser realizada a partir de frequências de recombinação entre locos. Os trabalhos de mapeamento em *Eucalyptus*, também evidenciam que no grupo de ligação três, desse gênero, os locos marcadores apresentam alta taxa de distorção de segregação sendo, como consequência, o menos saturado (Brondani et al., 2006). No entanto, foi no grupo de ligação três de uma família de irmãos completos de *Eucalyptus grandis* que Bueno et al. (2004), posicionou o gene de resistência à ferrugem, denominado *Ppr-1* mapeado por Junghans et al., (2003).

O gene *Ppr-1* foi mapeado com base em marcadores RAPD. Contudo, em função das limitações inerentes a técnica de RAPD, o uso da informação de ligação marcador/característica tem ficado restrita ao pedigree utilizado no mapeamento, dificultando validação do *Ppr-1*, aspecto absolutamente fundamental para seleção assistida por marcadores (Grattapaglia, 2004). Neste contexto, marcadores microssatélites que são multialélicos, co-dominantes e altamente conservados entre as espécies de *Eucalyptus* são os mais adequados para o mapeamento e a detecção de QTLs para fins de seleção assistida (Brondani et al., 2002)

Com base no exposto, os objetivos desse trabalho foram verificar a existência de gene letal responsável pela distorção de segregação de locos microssatélites do grupo de ligação três, propor metodologia de mapeamento desses locos e detectar QTLs responsáveis pela resistência à ferrugem em *Eucalyptus* spp.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O gênero *Eucalyptus*

O eucalipto foi trazido para o Brasil no início do século passado para suprir a necessidade de dormentes para a Companhia Paulista de Estrada de Ferro – FEPASA (Ferreira, 1992). Sua grande distribuição pode ser justificada pela sua agressividade e rusticidade aliadas a seus diversos usos, como produção de madeira para celulose, carvão, serrarias e extração de óleos essenciais (Ramalho, 1995). O principal uso da madeira das plantações de *Eucalyptus* plantados no Brasil destina-se à produção de celulose fibra curta, amplamente utilizada no mundo, principalmente, para a produção de papel.

O gênero *Eucalyptus* contém cerca de 800 espécies arbóreas, incluindo variedades e híbridos naturais da Austrália e ilhas vizinhas como Nova Guiné e Indonésia, pertence à subtribo *Eucalyptinae*, tribo *Leptospermeae*, subfamília *Leptospermoideae*, família *Myrtaceae* (Araújo et al., 2002). Árvores de eucalipto são hermafroditas e protandricas, apresentando fecundação preferencialmente alógama, podendo sofrer autofecundação. O genoma de *Eucalyptus* contém entre 500 e 650 Mb (Grattapaglia & Sederoff 1994), distribuídos em 22 cromossomos ($2n=2x=22$).

Dentre as principais espécies plantadas para fins comerciais pode-se destacar *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. globulus*, *E. camaudulensis*, *E. saligna* e *E. terenticornis* que pertencem ao subgenero *Symphyomyrtus* (Eldridge et al., 1993).

As espécies *E. urophylla* e *E. grandis* e seus híbridos são de grande importância para a produção de celulose de fibra curta e carvão vegetal no Brasil. Estas espécies possuem ampla capacidade de adaptação às condições tropicais, aliada a resistência a *Crysoporthe cubensis*, causador do cancro do eucalipto (Ferreira, 1992). A obtenção de um híbrido entre estas duas espécies é uma das principais estratégias empregadas em programas de melhoramento visando a obtenção de indivíduos que apresentam características desejadas de ambas as espécies ou seja, resistência a doenças e alta adaptação do *E. urophylla*, associada ao rápido crescimento e alta qualidade da madeira do *E. grandis* (Câncio, 1998).

Até a década de 70, o eucalipto era considerado uma cultura praticamente livre de doenças. Todavia, com a expansão das áreas plantadas e com a utilização repetitiva de mesmo clone em uma mesma área para plantio, houve condições favoráveis à ocorrência de doenças (Alfenas et al. 2004, Alfenas & Zauza, 2007). Dentre estas, merece destaque a ferrugem do eucalipto causada pelo fungo *Puccinia psidii* Winter

2.2. A ferrugem do eucalipto

A ferrugem do eucalipto causada pelo fungo *Puccinia psidii* foi relatada pela primeira vez no Brasil, em 1929 (Golçalves, 1929) e atualmente, constitui uma das mais importantes doenças do *Eucalyptus* no país (Alfenas et. al., 2004)

Puccinia psidii é nativo da América do sul e encontra-se amplamente distribuído nas Américas do Sul e Central e nas ilhas do Caribe (Laudon & Waterston, 1965; Di Stefano et al., 1998), havendo relatos da sua presença na Jamaica (Maclachlan, 1938) e na Flórida – EUA (Marlatt & Kimbrough, 1979; Rayachehetry et al., 1997). No Brasil, provavelmente, a ferrugem do eucalipto é causada por isolados do patógeno que infectavam as mirtáceas nativas, com capacidade de infectar também espécies de *Eucalyptus* (Castro et al., 1983).

A ferrugem incide em mudas no viveiro e em plantas jovens no campo, até os dois primeiros anos de plantio e em brotações após o corte raso, bem como em jardins e mini jardins clonais (Alfenas et al., 2004). O patógeno é parasita biotrófico que infecta órgãos juvenis, tais como folhas novas, terminais suculentos dos ramos ou da haste principal, podendo causar deformação ao órgão atacado, perda de dominância apical e redução de crescimento (Rayachehetry et al., 2001). O ataque da ferrugem em brotações é bastante severo, podendo levar a planta à morte e exigir a reforma do povoamento após o seu corte (Rocabado, 2003).

Inicialmente a doença se expressa na forma de pequenas hipertrofias verde-claras que se rompem com o progresso da infecção, constituindo as pústulas de urediniosporos de cor amarela (Alfenas et al., 2004). A presença de urediniosporos é a característica mais marcante no diagnóstico da doença. Cada pústula urediniospórica pode conter uma ou mais unidades produtoras de esporos, dependendo da suscetibilidade do hospedeiro e das condições ambientais. Segundo Ruiz et al. (1989), temperaturas na faixa de 18-25°C, períodos prolongados de molhamento foliar e a existência de órgãos juvenis são consideradas condições favoráveis à infecção do patógeno. Sob condições favoráveis, os urediniosporos germinam, produzem apressório e penetram diretamente na cutícula e epiderme. A colonização do fungo é intercelular, com a formação de haustórios intracelulares (Alfenas et al., 2004).

O controle da ferrugem pode ser feito por meio de aplicação de fungicidas, colheita de materiais suscetíveis em épocas desfavoráveis à doença (escape pela época) e plantio de materiais resistentes (Carvalho et al., 1998; Coutinho et al., 1998). Em materiais suscetíveis de alto valor comercial, pode-se aplicar triadimenol a 0,5 g aos 20 dias, nas brotações após o corte raso e em jardins clonais (Alfenas et al., 1993). O plantio de genótipos de *Eucalyptus* de rápido crescimento (escape pela precocidade) é também uma medida alternativa de controle (Ferreira, 1983). Todavia, a utilização da resistência genética é o método de controle mais indicado, por ser de menor custo, facilmente exequível e por reduzir o impacto de fungicidas no ambiente (Alfenas et al., 2004).

A alta variabilidade da resistência de *Eucalyptus* à ferrugem, permite a seleção de material resistente para plantio ou para ser empregado em

programas de melhoramento. Entretanto poucos estudos sobre resistência à ferrugem foram feitos no gênero *Eucalyptus* (Dianese et al., 1984; Passador, 1994; Carvalho et al., 1998). Em geral esses trabalhos buscaram identificar espécies, progênies e procedências resistentes.

Junghans et al. (2003), em um estudo de herança e mapeamento de genes responsáveis pela resistência à ferrugem em progênies de irmãos-completos de *Eucalyptus grandis*, identificaram que a resistência é controlada por um gene dominante de efeito principal, denominado *Ppr1* (gene de resistência 1 a *P. psidii*) sendo esse o primeiro gene de resistência à doença descrito em *Eucalyptus*.

2.3. Estudo de herança

Em geral, as características de relevância econômica do setor florestal como produtividade e qualidade da madeira apresentam a expressão governada por muitos genes de pequeno efeito (Zobel & Jett, 1995). Em contraste, a resistência de plantas a patógenos, tem revelado ter expressão governadas por um ou poucos genes de maior efeito (Yu et al., 2000; Junghans et al., 2003; Vijayalakshmi et al., 2005).

Dessa forma, a caracterização do padrão da herança é muito importante para a manipulação dos componentes hereditários e da fração herdável, uma vez que as estratégias para estudo genético de mapeamento são bastante contrastantes de acordo com a natureza da característica, se monogênica, oligogênica ou quantitativa (Cruz et al., 2004; Rocha, 2007).

O estudo de herança associado às técnicas de mapeamento genético permitem o conhecimento e o entendimento dos mecanismos hereditários com uma riqueza de detalhes nunca antes experimentada (Grattapaglia, 2004; Dekkers & Hospital, 2001).

Na genética clássica, o estudo de herança tem sido feito a partir de fenotipagem de grande número de indivíduos envolvendo gerações genitoras, F1, F2 e retrocruzamentos. Nestes estudos, identifica-se o número de genes que controlam o caráter e a relação de dominância entre alelos. Para contribuição da análise genômica em estudos de herança, é necessário que

indivíduos da população segregante (F2) sejam genotipados em relação a um grupo de marcadores selecionados ou aleatórios. A análise genômica confirmará a presença do gene em determinado grupo de ligação, avaliará a existência de fatores determinantes de distorção de segregação e posicionará o gene em relação aos marcadores moleculares.

2.4. Mapeamento genético

Na construção de mapas genéticos deve-se, preliminarmente, proceder a seleção de marcadores genéticos, determinando o número e o tipo de marcadores a serem utilizados. Subseqüentemente, genotipa-se a população com os marcadores selecionados e submete o conjunto de marcas segregantes à análise do padrão de segregação (Schuster & Cruz, 2004). Para cada marcador utilizado, espera-se padrão de segregação mendeliano, típico para cada população. A ausência do padrão de segregação mendeliano é chamada de distorção de segregação (Lu et al., 2002).

Na etapa efetiva de construção do mapa genético, o primeiro passo é a análise de ligação para pares de locos. Assim, inicialmente é necessário que todos os marcadores sejam analisados par a par, verificando se existe ligação entre eles. O método mais utilizado para a estimação da porcentagem de recombinação é o método da máxima verossimilhança (MV). Após a estimação da porcentagem de recombinação é necessário definir a frequência máxima de recombinação e o LOD mínimo para inferir se dois locos estão ligados. Subseqüentemente deve-se agrupar e ordenar os locos nos grupos de ligação (Schuster & Cruz, 2004).

Para facilitar o agrupamento e o ordenamento dos locos em um grupo de ligação, o critério de otimização a ser utilizado são as funções de mapeamento genético que estabelecem a relação entre distância de mapa e frequência de recombinação para uma dada taxa de interferência (Haldane, 1919; Kosambi, 1944).

O mapeamento genético em plantas, geralmente, é realizado por meio da análise de meioses geradas a partir de cruzamentos entre linhagens puras, ou seja, indivíduos homocigotos para seus alelos. Entretanto, as espécies florestais sofrem alta depressão em cruzamentos endogâmicos, dificultando,

ou até impossibilitando, a obtenção de linhagens homozigóticas e, portanto, o emprego de delineamentos clássicos de mapeamento, tais como populações F2, retrocruzamentos e linhagens recombinantes endogâmicas (RILs). As famílias de mapeamento em espécies arbóreas são derivadas do cruzamento entre parentais heterozigóticos, em que o número de alelos segregando por loco marcador poderá variar em até quatro, para uma espécie diplóide. Nestes casos, é necessário empregar delineamentos genéticos de populações exogâmicas como famílias de meios-irmãos e famílias de irmãos completos.

Quando se considera o cruzamento entre dois indivíduos de uma população, que produzirão uma família de irmãos completos, diferentes configurações de marcadores podem estar segregando. De acordo com Haseman & Elston (1972), para o caso geral de sistemas multialélicos com quatro alelos, haverá basicamente, três categorias e sete tipos distintos de acasalamentos ou diferentes tipos de pares de irmãos que caracterizam a herança de marcas individuais. Assim, considerando-se um loco A com alelos i, j, k e l, ter-se-ão os seguintes tipos de cruzamentos: cruzamento entre genitores homozigotos (I- $A_iA_i-A_iA_i$, II- $A_iA_i-A_jA_j$), cruzamento entre genitores homozigotos e heterozigotos (III- $A_iA_i-A_iA_j$, IV- $A_iA_i-A_jA_k$) e cruzamento entre genitores heterozigotos (V- $A_iA_j-A_iA_j$, VI- $A_iA_j-A_iA_k$; VII- $A_iA_j-A_kA_l$). O tipo I envolve apenas um alelo, os tipos II, III e V dois alelos, os tipos IV e VI três alelos, e o tipo VII quatro alelos.

Na análise de segregação, deve-se considerar que somente acasalamentos que envolvam pelo menos um dos genitores heterozigoto sejam informativos para fins de mapeamento. Dessa forma, apenas cruzamentos dos tipos III, IV e V, VI e VII são informativos.

Além da heterozigosidade observada entre genitores de um cruzamento exogâmico, deve ser verificada, adicionalmente, a existência de indivíduos informativos na progênie. Segundo Da & Lewin (1995), um marcador é considerado informativo quando a origem dos alelos dos indivíduos em uma progênie pode ser inequivocadamente determinada. Baseando-se nesse pressuposto, Lynch & Walsh (1998) propuseram de forma resumida três níveis de informatividade para cruzamentos exogâmicos, de acordo com os genitores envolvidos no cruzamento: Cruzamentos completamente informativos ($A_iA_j \times A_kA_l$); em que a segregação esperada é de 1:1:1:1; cruzamento com um loco

informativo ($A_iA_j \times A_kA_k$), a segregação esperada é 1:1 e cruzamentos parcialmente informativos ($A_iA_j \times A_iA_j$), no qual a segregação esperada é de 1:2:1.

Em eucaliptos os primeiros mapas genéticos gerados utilizaram um tipo de delineamento proposto por Grattapaglia & Sederoff (1994), denominado de pseudo-cruzamento teste. Este delineamento baseia-se no uso de uma família de irmãos completos derivadas de genitores heterozigotos, no qual a análise de mapeamento é realizada considerando apenas marcadores que segregaram como família de retrocruzamento (1:1) separadamente para cada genitor, resultando em dois mapas de ligação. Os mapas são indivíduo-específicos e não podem ser alinhados ou integrados.

Após a publicação de Grattapaglia & Sederoff (1994), vários outros mapas foram gerados utilizando a estratégia de pseudo-cruzamento teste (Verhaegen & Plomion, 1996; Marques et al., 1998; Gion et al., 2000; Moran et al., 2002; Brondani et al., 2002; Gan et al. 2003; Myburg et al., 2003; Brondani, et al., 2006). No entanto, algumas desvantagem da estratégia de pseudo-cruzamento teste, em relação às metodologias que consideram delineamentos genéticos de populações exogâmicas, são a necessidade de exclusão dos marcadores que segregam na proporção 1:2:1, problemas na obtenção de dois mapas para os genitores e a dificuldade de integração dos mesmos.

Atualmente existem programas capazes de realizar os cálculos de frequência de recombinação levando em consideração a informação simultânea das meioses dos dois parentais heterozigóticos para produzir um mapa integrado (Stam, 1993; Butcher et al., 2002; Cruz, 2007). No entanto somente Byrne et al. (1995), Thamarus et al., (2002) e Novaes (2006) construíram mapas integrados para ambos parentais.

O comprimento médio total destes mapas de *Eucalyptus* variou entre 1300 a 1400 centiMorgans (cM), com média de aproximadamente 120 cM por grupo de ligação. O total de marcadores microssatélites por grupo de ligação variou de 2 (grupo 3) a 8 (grupo 10) no mapa construído por Brondani et al. (2002), a partir de 50 marcas SSR e de 12 (grupo 3) a 25 (grupo 5 e 8) no mapa com 230 marcadores SSR, feito pela mesma autora (Brondani et al., 2006). Nesses mapas, pode-se perceber que, além do grupo de ligação três ser o

menos saturado foi o grupo que apresentou o maior número de marcas com distorção de segregação.

2.5. Distorção de segregação

Segundo Lu et al. (2002), a distorção de segregação (DS) pode ser definida como os desvios da proporção mendeliana esperada nos indivíduos, para cada classe genotípica que resulta na falha ou violação de pressupostos da teoria genética convencional e suas análises.

Em plantas, a distorção na razão de segregação de marcadores pode ser atribuída a uma série de causas genéticas e fisiológicas tais como: transmissão diferencial de alelos tanto de linhagens germinativas macho quanto de fêmea, incluindo competição de tubo polínico, pólenes letais, fertilização preferencial e eliminação seletiva de zigotos (Liang et al., 2006).

A DS foi primeiramente reportada em milho por Mangelsdorf & Jones (1926). Subseqüentemente, distorção em milho foi descrita por Burnham (1936); Rhoades (1942); Longley (1945); Helentjaris et al. (1986); Wendel et al. (1987); Gardiner et al. (1993); Lu et al. (2002) e Sibov et al. (2003).

Distorção de segregação tem sido também relatada em arroz (Matsushita et al., 2003), sorgo (Pereira et al., 1994), girassol (Quillet et al., 1995), tomate (Paterson et al., 1991), sugi (Ohba, 1979; Kawasaki & Ohba, 1984; Tsumura et al., 1989), soja (Yang et al., 2000) e café (Ky et al., 2000). A magnitude, porcentagem, origem e efeito genético da DS variam significativamente de acordo com a espécie, população de segregação, o tipo de cruzamento e o marcador molecular utilizado (Liang et al., 2006).

Considerando os diferentes tipos de marcadores moleculares, a proporção e extensão da DS variam significativamente. Segundo Lorieux et al. (1995), a estimação das frações de recombinação entre marcadores codominantes é menos afetada pela distorção de segregação do que em marcadores dominantes.

De acordo com Liang et al. (2006), a distribuição de marcas distorcidas ao longo dos grupos de ligação pode ser dividida em dois grupos principais: Em um deles, as distorções da proporção Mendeliana em locos individuais são

numerosas, distribuídas pelos cromossomos e direcionadas para ambas as classes parentais. No outro as marcas distorcidas ocorrem na mesma direção e são agrupadas em pequenas regiões cromossomais, chamadas de região de distorção de segregação. Este tipo de DS normalmente está relacionada à existência de um loco com distorção de segregação. Em regiões de DS, o efeito seletivo de um loco com distorção de segregação determina a direção das marcas distorcidas.

A DS pode ser causada por seleção zigótica (pré ou pós-zigótica) ou por duplicação de marcadores e a distinção entre ambas torna-se muito importante no contexto genômico. Quando a DS tem causa na duplicação de marcadores, geralmente ela se manifesta somente em um ou poucos locos específicos, de forma que locos vizinhos, pertencentes ao mesmo grupo de ligação, permanecem com o padrão de segregação mendeliano esperado. Em contraste, quando a DS ocorre em razão de seleção zigótica, a distorção não se manifesta apenas para o loco que é afetado por seleção, mas também para os que estão ligados a ele (Frisch et al., 2004). Assim, conseqüentemente, se a distorção de segregação é detectada somente em um loco, a chance é alta que seja devido à duplicação de marcadores. Entretanto, nos casos em que a DS é detectada em muitos locos ligados, isto poderá ser interpretado como uma indicação de seleção zigótica.

Quanto ao que deve ser feito em relação aos marcadores que apresentam DS é discutível. De acordo com Kao et al. (1999), é recomendado, preferencialmente, o descarte dos marcadores que apresentam distorções da segregação mendeliana, para não comprometer a qualidade do mapa. No entanto, há trabalhos de mapeamento genético em que se utilizou marcadores com distorção na razão de segregação, e outros apenas os indicou no grupo de ligação com o nível de probabilidade utilizado no teste de segregação individual, sem saber os efeitos da utilização de tais marcadores (CostaeSilva et al., 2004).

2.5.1. Distorção de segregação em *Eucalyptus*

A eucaliptocultura atual fundamenta-se na obtenção de combinações genotípicas superiores a fim de atender a demanda cada vez mais exigente de materiais melhorados. Para tanto, a obtenção de híbridos entre as espécies de *Eucalyptus* é de suma importância. Porém, segundo Ky et al. (2000), os híbridos apresentam freqüentemente distorção de segregação, sendo que a frequência da distorção é mais elevada entre híbridos interespecíficos em relação aos intraespecíficos. Uma explicação para este fato é que em cruzamentos intraespecíficos, muitos marcadores obedecem à lei de transmissão de fatores genéticos postulada por Mendel. Nos cruzamentos interespecíficos, a alta taxa de formação de heteroduplex e o pareamento errôneo do DNA são esperados durante o pareamento de cromossomos homólogos entre as espécies distintas durante a meiose do híbrido interespecífico (Missiaggia, 2005).

De fato, em todos os trabalhos de mapeamento genético, envolvendo diferentes espécies do gênero *Eucalyptus*, tem sido observado marcadores com distorção da razão de segregação em diferentes níveis, geralmente maior para cruzamentos interespecíficos entre indivíduos de espécies puras (Grattapaglia & Sederoff 1994; Marques et al., 1998; Myburg et al., 2003) em comparação com cruzamentos intraespecíficos (Byrne et al., 1995; Thamarus et al., 2002). Na grande maioria desses trabalhos marcadores que exibem distorção de segregação foram descartados da análise de mapeamento e detecção de QTLs (Byrne et al., 1995; Marques et al., 1998; Thamarus et al., 2002; Myburn et al., 2003; Novaes, 2006).

Dentre os trabalhos que consideram marcadores com distorção de segregação em *Eucalyptus* entre híbridos *E. grandis* x *E. urophylla* destacam-se o de Grattapaglia & Sederoff (1994), em que 4% dos marcadores apresentaram DS, o de Byrne et al. (1997) 6%, de Verhaegen and Plomion (1996) 7%, de Myburg et al. (2003), 30,6% e o de Campinhos (2005), em que 13,7% dos marcadores apresentaram DS. Em todos esses estudos foram utilizados marcadores dominantes AFLP ou RAPD e as marcas que apresentaram distorção de segregação foram destacadas com um asterisco no

mapa. Entretanto, em nenhum deles, foi apresentada uma explicação biológica para a distorção.

Missiaggia (2005), em um estudo de mapeamento e detecção de QTL, para qualidade da madeira e florescimento precoce, em híbridos interespecíficos de *Eucalyptus* usando marcadores microsatélites, observou distorção de segregação para 43,05% dos marcadores mapeados para o genitor 235 e 54,71% para o genitor 221. O autor explica que essa distorção deve-se a seleção pós-zigótica na F₁ devido ao encontro específico de alelos deletérios a genes ligados aos marcadores analisados.

Distorção de segregação como causa de genes letais já foi descrita em outras culturas, como em sugi (Ohba, 1979; Kawasaki & Ohba, 1984; Tsumura et al., 1989), em soja (Yang et al., 2000) e em café (Lashermes et al., 2001).

2.6. Detecção de QTLs

O termo QTL (“ Quantitative trait loci”) foi criado por Geldermanm (1975) e baseia-se no princípio de existência de locos de maior importância, relacionados à expressão de determinada característica quantitativa. A associação de técnicas de marcadores moleculares com métodos estatísticos permite determinar a posição do QTL ao longo do grupo de ligação bem como quantificar e caracterizar os seus efeitos.

Assim como no mapeamento, na análise de detecção de QTLs em espécies florestais deve-se usar delineamentos para cruzamentos exogâmicos como famílias de irmãos completos e famílias de meio-irmãos. Um certo número de indivíduos desta população segregante é avaliado para as características fenotípicas de interesse e genotipados para algumas dezenas ou centenas de marcadores moleculares distribuídos a intervalos regulares ao longo do genoma. Uma busca é então conduzida para as associações entre os marcadores segregantes e as características de interesse.

A análise e a detecção de QTLs em cruzamentos exogâmicos apresentam complicações adicionais quanto à estimação dos efeitos do QTL em comparação com populações derivadas de cruzamentos entre linhagens

endogâmicas. Em populações F_2 derivadas de linhagens endogâmicas, o desequilíbrio de ligação é máximo e em populações exogâmicas é menor. Ao contrário de uma geração F_1 , de linhagens endogâmicas, em populações exogâmicas não há uniformidade genética entre os indivíduos; conseqüentemente apenas uma fração dos indivíduos será informativa e a fase de ligação entre marcadores e QTLs não pode ser estabelecida diretamente, podendo variar entre indivíduos. Assim, a análise dos dados tem que considerar as descendências de cada genitor em separado, ao invés de agrupar como nos cruzamentos entre linhagens endogâmicas, reduzindo o poder e a precisão. Além disso, em populações exogâmicas podem estar segregando qualquer número de alelos do QTL e não apenas dois como em populações endogâmicas. Dessa forma, para que uma quantidade mínima de indivíduos seja informativa, é necessária a utilização de marcadores altamente polimórficos, marcadores multialélicos e co-dominantes, como os microssátelites, para permitir o rastreio, compreensão e manipulação adequada de toda a variabilidade alélica que segrega aos QTLs (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A validação da real existência de QTL em determinados segmentos genômicos depende em grande parte de experimentos de mapeamento comparativo entre diferentes *backgrounds* genéticos. Neste contexto, o mapeamento com base em marcadores microssátelites, altamente transferíveis entre espécies de *Eucalyptus*, são de suma importância (Grattapaglia, 2004).

2.7. Métodos de detecção de QTLs

2.7.1 Mapeamento por marca simples

ANOVA e contraste entre médias

O mapeamento por marca simples baseia-se na utilização de dados de famílias de meios-irmãos e irmãos completos para a detecção de QTLs pela comparação na descendência de indivíduos que apresentem alelos alternativos de marcadores de um mesmo genitor. Dessa forma, um modelo linear simples com apenas um fator pode ser utilizado para detectar QTLs por meio da análise de variância (ANOVA). Esse método permite estimar a associação entre um determinado marcador e o QTL, mas não é possível determinar a posição do QTL em relação ao marcador testado e nem a magnitude de seu efeito.

A análise de variância é feita para verificar se existe diferença significativa em relação às médias dos indivíduos na descendência, agrupados segundo as classes genótípicas do marcador. O modelo com um único fator é empregado para decompor a variação entre e dentro das classes genótípicas dos marcadores.

Para melhor entendimento das propriedades biométricas do método da ANOVA é importante definir os contrastes entre médias para avaliar a influência dos alelos de cada genitor sobre a característica de interesse.

No entanto, quando se utilizam os dados de famílias de irmãos completos para análise de variância, deve ser levado em consideração os diferentes tipos de cruzamentos informativos que podem ocorrer em relação aos marcadores. Assim, segundo Lynch & Walsh (1998), como já mencionado, para uma família completamente informativa ($A_i A_j \times A_k A_l$) todos os genótipos em sua descendência são informativos, de maneira que a ANOVA usa quatro classes genótípicas em sua análise, sendo possível testar dois contrastes de médias de tipo marcadores, um para cada pai ($\mu_{A_i} - \mu_{A_j}$ e $\mu_{A_k} - \mu_{A_l}$). Em uma família de retrocruzamento ($A_i A_j \times A_k A_k$) a ANOVA resultante leva em conta

apenas duas classes genóticas na descendência, correspondendo à segregação dos alelos do pai heterozigoto e apenas o contraste $\mu_{A_i} - \mu_{A_j}$ pode ser testado. Em uma família de intercruzamento ($A_i A_j \times A_i A_j$), a descendência heterozigota não é informativa para os marcadores e apenas é testado o contraste $\mu_{A_i} - \mu_{A_j}$ excluindo da análise gamética cerca de 50% dos dados, atribuídos aos genótipos $A_i A_j$.

Na formação dos contrastes entre médias deve-se considerar todos os tipos de classes genóticas e a informatividade de cada loco marcador. Dessa forma, a descendência de irmãos completos poderá apresentar diferentes genótipos associados à diferentes probabilidades condicionais $P(Q_j|M_i)$. As probabilidades condicionais representam a probabilidade de ocorrência de alelos alternativos do QTL em gametas carregando um dado marcador conhecido

Regressão de Haseman & Elston (1972)

A metodologia de Haseman & Elston (1972) foi originalmente proposta para a detecção de QTLs na espécie humana, para famílias de irmãos completos, situação na qual a progênie de cada família é pouco numerosa e nem sempre é possível obter informações completas de muitos casais. Essa metodologia envolve o uso de quadrados mínimos para ajustar uma regressão linear simples, na qual o modelo se baseia na relação entre o quadrado da diferença fenotípica entre pares de irmãos (variável dependente) e a proporção de alelos idênticos por descendência (IBD) do QTL compartilhado por eles.

A regressão de Haseman & Elston (1972) é um método robusto de regressão de pares de irmãos para detectar ligação e estimar a variância do QTL e é computacionalmente fácil. Apesar deste método de pares de irmãos ser adequado quanto a diversos tipos de distribuição dos dados e independe do modelo genético do QTL, em sua forma original é limitado devido ao confundimento entre o efeito genético do QTL e a taxa de recombinação entre QTL e o loco marcador. Isto significa que apenas a ligação entre o QTL e o

marcador é detectável, mas não é possível estimar se é devido a um QTL de grande efeito localizado longe do marcador, ou devido a um QTL de pequeno efeito, mas muito próximo ao loco marcador (Martinez & Vukasinovic, 2000).

2.7.2. Mapeamento por intervalo simples

Regressão de Fulker & Cardon (1994)

Fulker & Cardon (1994) apresentaram uma metodologia de detecção de QTL visando aumentar o poder de detecção dos mesmos. Esta metodologia baseia-se no princípio de análise por intervalo de pares de irmãos descrito por Haseman e Elston. O procedimento é análogo a outros procedimentos fundamentado em análise de intervalo simples usados em populações derivadas de cruzamentos controlados e produzem resultados bastantes similares em termos de localização e quantificação do efeito do QTL. O procedimento oferece vantagens em relação à metodologia de Haseman e Elston, em termos do poder dos testes e por prover informações úteis na detecção da posição do QTL.

Nessa metodologia, a proporção IBD de marcas adjacentes em um grupo de ligação é usada para estimar a proporção de alelos IBD de um possível QTL ao longo do intervalo entre as marcas. A posição que confere melhor ajuste da regressão é tomada como a posição estimada do QTL no grupo de ligação. Assim, é possível obter estimativas do efeito do QTL sobre a variância genética aditiva e de sua posição separadamente.

Neste caso, a metodologia de regressão de pares de irmãos utiliza dois marcadores simultaneamente para separar o efeito da localização do QTL de seu efeito propriamente dito e, também, para estimar a posição específica de um QTL em um cromossomo, resultando em alto poder estatístico.

Para maior precisão da estratégia de pares de irmãos é necessário a utilização de marcadores co-dominantes e multialélicos para obtenção de estimativas precisas do número de alelos IBD compartilhados pelos irmãos nos diferentes marcadores. Nesse caso, os microssatélites são os marcadores mais indicados.

2.7.3. Mapeamento de QTLs em *Eucalyptus*

Nas espécies de *Eucalyptus* vários trabalhos foram conduzidos na detecção de QTLs relacionados à características de interesse econômico. Grattapaglia et al. (1995) e Marques et al. (1999) mapearam QTLs para habilidade de propagação vegetativa. Byrne et al. (1997) mapearam QTLs para tolerância à geada. QTLs para caracteres silviculturais e de qualidade da madeira foram identificados por Grattapaglia et al. (1996), Verhaegen et al. (1997), Thamarus et al. (2004) e Novaes (2006). Kirst et al. (2004) identificaram QTLs que explicam parte da variabilidade nos níveis de transcrição de vários genes pertencentes à via de biossíntese de lignina e Missiaggia (2005) mapeou QTLs para florescimento precoce.

Entretanto, atualmente, além desses caracteres de importância, um grande desafio dos programas de melhoramento florestais é identificar genes responsáveis pelo controle da resistência à doenças para serem usados na seleção precoce. Dentre as doenças de importância econômica, destaca-se ferrugem causada por *Puccinia psidii*, uma vez que, esse patógeno infecta plantas jovens reduz o crescimento e pode provocar a morte das mudas para plantio. No entanto, o mapeamento de genes relacionados à ferrugem somente foi contemplado em dois trabalhos. No primeiro realizado por Junghans et al. (2003), via marcador RAPD, foi identificado um gene de resistência a ferrugem, denominado Ppr1, em uma família de *E. grandis* e no segundo realizado por Bueno et al. (2004), com marcadores microssatélites, o gene Ppr1 foi posicionado no grupo de ligação três do mapa de Brondani *et al.* (2002).

Desses trabalhos de mapeamento em *Eucalyptus* citados, a maioria utilizou metodologias de mapeamento de QTLs por intervalo (simples e/ou composto). Byrne et al. (1997), Junghans et al. (2003) e Thamarus et al. (2004) utilizaram análises de marca simples e somente Novaes (2006) detectou QTL pela metodologia de intervalo de Fulker e Cardon. Apesar do sucesso desses experimentos em encontrar regiões do genoma responsáveis pela variação na característica sob estudo, o número de QTLs, suas posições precisas e particularmente a magnitude dos seus efeitos ainda são

insuficientemente compreendidos. Isso se deve ao tamanho relativamente pequeno das progênies empregadas, a precisão limitada na avaliação do fenótipo e as limitações inerentes aos tipos de marcadores moleculares (Grattapaglia et al., 2004). A maioria desses trabalhos utilizou marcadores dominantes (RAPD e AFLP) que não são facilmente transferíveis para outros cruzamentos. Dessa forma, o uso da informação de ligação tem ficado restrito a população utilizada para o mapeamento, limitando o compartilhamento inter-experimental de dados e a possibilidade de utilização dos marcadores ligados à QTLs em outros cruzamentos, processo fundamental para viabilização da seleção assistida por marcadores (Grattapaglia, 2000).

O desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Eucalyptus* (Brondani et al., 1998; Brondani et al., 2002; Brondani, et al., 2006; Grattapaglia et al., 2005) representa um passo muito importante para um maior detalhamento nos estudos de mapeamento de QTLs e validação desses em diferentes *backgrounds* genéticos.

2.8. Marcadores microssatélites

Os microssatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*), são marcadores moleculares baseados na amplificação via PCR de seqüências repetitivas (1 a 6 pb), abundantemente encontradas no genoma de eucariotos. Os microssatélites possuem natureza multialélica, herança co-dominantes e apresentam ampla distribuição no genoma e possibilidade de detectar variações de seqüência por meio de um ensaio simples de PCR. Adicionalmente, marcadores SSR são altamente transferíveis entre espécies pertencentes ao mesmo gênero e até às vezes entre gêneros de uma mesma família (Lourenço et al., 2004). Essa possibilidade decorre do fato que, embora as regiões microssatélites estejam sujeitas a alta taxa de mutação, as regiões flangeadoras complementares aos iniciadores são freqüentemente conservadas em espécies ou gêneros próximos.

A similaridade morfológica e compatibilidade genética de cruzamentos sexuais entre espécies de *Eucalyptus*, particularmente no mesmo subgênero, sugere, a princípio, uma alta homologia do genoma que deveria traduzir-se em conservação das seqüências de DNA, que flanqueiam as regiões de

microssatélites. Esta conservação foi comprovada em alguns trabalhos (Byrne et al., 1996; Kirst et al., 1997). Entre 25% e 59% dos locos foram transferíveis entre espécies de subgêneros diferentes, sendo que a transferibilidade diminui a medida que foram analisadas espécies filogeneticamente mais distantes. Estes resultados indicam que a perspectivas de transferência de informação de mapeamento gerada com marcadores microssatélites entre espécies de *Eucalyptus* é eficiente, particularmente dentro de um subgênero, mas também em uma menor taxa entre subgêneros distantes. Além disso, marcadores microssatélites, pelo menos em *Eucalyptus*, possuem associação preferencial com regiões codificantes (Lourenço et al., 2004).

O desenvolvimento de marcadores microssatélites deve levar em consideração a maximização de sua utilização, ou seja, quanto maior a conservação de locos microssatélite menor será seu custo relativo. Em *Eucalyptus*, locos microssatélites conservados entre espécies, pelo menos entre as mais plantadas, são essenciais, já que programas de melhoramento normalmente lançam mão de várias espécies e híbridos (Byrne et al., 1996).

Marcadores microssatélites foram utilizados para a construção de um mapa genético referência, cobrindo mais de 95% do genoma de eucalipto (Brondani et al., 2006).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V. **Doenças na cultura do eucalipto**. SIF Viçosa, 2007. 164p.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Editora UFV, Viçosa, 2004. 442p.

ALFENAS, A.C.; MAFIA, L.A.; MACABEU, A..J.; SARTÓRIO, R.C. Eficiência de triadimenol, oxicarboxin e diniconazole para o controle da ferrugem (*Puccinia psidii*) em brotações de *Eucalyptus cloeziana*, em condições de campo. **Revista Árvore**, v. 17, p. 247-264, 1993.

APARECIDO, C.C. **Estudos ecológicos sobre *Puccinia psidii* winter-ferrugem das mirtáceas**. 66p., 2001. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ARAÚJO, E.S. N.; GIMENES, M.A.; LOPES C. R. Phylogenetic relation among genera *Eucalyptus* and *Corymbia* species based on rDNA internal transcribed spacers sequences. **Scientia Forestalis**, v.62, p. 75-85, 2002.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. Towards the construction of a genus wide reference linkage map for *Eucalyptus* based on microsatellite markers. **Molecular and General Genomics**, **267**, 338-347. 2002.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHHNI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in

Eucalyptus grandis and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, 97, 816-827. 1998.

BRONDANI, R.P.V.; WILLIAMS, E.R. BRONDANU, C.; GRATTAPAGLIA, D. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. **Plant Biology**, 6:20, 1-16, 2006.

BUENO, N.W , JUNGHANS D.T. , ALFENAS A.C., BROMMONSCHENKEL S.H.; GRATTAPAGLIA, D. Localized mapping of the Puccinia psidii resistance (ppr1) locus in *Eucalyptus* with microsatellite markers Resumos do 50º Congresso Brasileiro de Genética. Resumo GP217. 2004

BURNHAM, C.R. Differential fertilization in the *Bt-Pr* linkage group of maize. **J Am Soc Agron**, v. 28, p.968-975. 1936.

BUTCHER, A.; WILLIAMS, R.; WHITAKER, D.; LING, S.; SPEED, P.; MORAN, F. Improving linkage analysis in outcrossed forest trees - an example from *Acacia mangium*. **Theoretical and Applied Genetics**, 104, 1185 - 1191. 2002.

BYRNE M.; MURRELL J.C.; ALLEN, B.; MORAN, G.F. An integrated linkage genetic linkage map for *Eucalyptus* using RFLP, RAPD and isozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, 869 - 875. 1995.

BYRNE M.; MURRELL, J.C.; OWEN, J.V.; WILLIAMS, E.R.; MORAN, G.F. Mapping of quantitative trait loci influencing frost tolerance in *Eucalyptus nitens*. **Theoretical and Applied Genetics**, 95, 975-979. 1997.

BYRNE, M.; MARQUEZ-GARCIA, M. Conservation and genetic diversity in the genus *Eucalyptus*. **Australian Journal of Botany**, v. 44, p. 331-341, 1996.

CAMPINHOS, E.N. Localized mapping of RAPD markers in *Eucalyptus grandis*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, n.1, p.91-98, 2005.

CÂNCIO, O.N. **Diversidade genética de progênies de meios irmãos de *E. urophylla* por meio de metodologia quantitativa e marcadores moleculares RAPD.** 1998. 52 p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CARVALHO, A.O., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L. A., CARMO, M.G.F. Resistência de espécies, progênies e procedências de eucalyptus à ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter. **Pesq Agropec. Brás**, 33:139-147, 1998.

CASTRO, H.A. **Padronização e metodologia de inoculação e avaliação da resistência de *Eucalyptus* ssp. a ferrugem causada por *puccinia psidii* Winter.** 1983. 166p. tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

COSTAeSILVA, L.; CRUZ, C.D.; PESSONI, L.A.; FERREIRA, A.; SILVA, M.F.; BARROS, E.G. Mapeamento genético: utilização de locos com distorção na razão de segregação. In: **50° Congresso Brasileiro de CRC**, Boca Raton, Florida, p.611. 2004.

COUTINHO, B.T.A., WINGFIELD, M.J., ALFENAS, A.C., CROUS, P.W. Eucalyptus Rust: Disease with the potential for serious international implications. **Plant Dis.** V.82, p.819-925, 1998.

CRUZ C.D., REGAZZI A.J., CARNEIRO P.C.S., **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético.** Editora UFV, Viçosa, 2004.. 480p.

CRUZ, C.D. **GQMOL:** Programa para análise de genética quantitativa molecular. Versão 2007.2.1. Desenvolvido pelo setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: www.ufv.br/dbq/gqmol/gqmol.htm

DA, Y. & LEWIN, H. A. Linkage information content and efficiency of full-sib and half-sib designs for gene mapping. **Theoretical and Applied Genetics**, 90:699-706. 1995.

DEKKERS, J.C.M., HOSPITAL F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature reviews**, v.3, p.22-32, 2001.

DI STEFANO, J.F., FOUNIER, L.A., CARRANZA, J., MARIN,W., MORA, A. Invasive potential of *Syzygium jambos* (Myrtaceae) in forest fragments: the case of Ciudad Colon, Costa Rica. **Rev. Biolo. Trop.** 46:567-573, 1998.

DIANESE, J.C., MORAES, T.S.A, SILVA,A.R. Response of *Eucalyptus* to field infection by *Puccinia psidii*. **Plant Dis**, 68:314-316, 1984.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J. HARWOOD, C.; VAN WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Oxford Science Publications. 228p.1993.

FERREIRA, M. Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal: **IPEF**, v.45. p.22-30, 1992.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 1998. 220p.

FRISCH, M.; QUINT, M.; LÜBBERSTEDT, T.; MELCHINGER, A.E. Duplicate marker loci can result in incorrect locus orders on linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.305-316. 2004.

FULKER, D.W. & CARDON, L.R. A sib-pair approach to interval mapping of quantitative trait loci. **Am. J. Hum. Genet**, 54:1092-1103. 1994.

GAN, S.; SHI, J.; LI, M.; WU, K.; WU, J. & BAI, J. Moderate-density molecular maps of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake and *E. tereticornis* Smith genomes based on RAPD markers. **Genetica**, 118, 59-67. 2003.

GARDINER, J.M.; COE, E.H.; MELIA-HANCOCK, S.; HOISINGTON, D.A.; CHAO, S. Development of a core RFLP map in maize using an immortalized F2 population. **Genetics**. v.134, p.917-930. 1993.

GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by genes markers. **Theoretical and Applied Genetics**., v. 46:p.310-330, 1975.

GION, J.M.; RECH, P.; GRIMA-PETTENATI, J.; VERHAEGEN, D.; PLOMION, C. Mapping candidate genes in *Eucalyptus* with emphasis on lignification genes. **Mol Breed**, 6, 441-449. 2000.

GOLÇAVES, S. Lista preliminar das doenças das plantas do estado do Espírito santo. **Ministério da Agricultura**. p.1-12. 1929.

GRATTAPAGLIA, D. & SEDEROFF R.R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers, **Genetics** **137**, 1121-1137. 1994.

GRATTAPAGLIA, D. Integrating genomics into the *Eucalyptus* breeding. **Genetics and Molecular Research**. v. 3 (3), p. 369-379, 2004.

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

GRATTAPAGLIA, D. Molecular breeding of *Eucalyptus* - State of the art, operational applications and technical challenges. **Molecular Biology of Woody Plants**, v.1, p.451-474, 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; BERTOLUCCI, F.L. & SEDEROFF, R.R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling vegetative propagation in

Eucalyptus grandis and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 90, 933-947. 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; FALCÃO, C.L.; ALONSO, A.; PAPPAS, M.C.R.; LOURENÇO, R.T.; PÁDUA, J.G.; MAMANI, E.M.; PAPPAS JR, G.J. Development and mapping of EST-derived microsatellites in *Eucalyptus*. Proceedings of the IUFRO Tree Biotechnology Conference, 2005. Poster abstract 5.33.

HALDANE, J. B. S. The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. **J. Genet.** 8:299-309. 1919.

HASEMAN, J.K. & ELSTON, R.C.. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. **Behav Genetics**, v 2:3-19. 1972.

HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A.; NIENHUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**. v.72, p. 761-769. 1986.

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

KAO, C.H.; ZENG, Z.B.; TEASDALE, R. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**. v.152, p. 1023-1216. 1999.

KAWASAKI, H. & OHBA, K. Detection of embryonic lethal genes in Wogon-Yoresugi with selfing of S1 families. **Transactions of the 95 th Meeting of the Japanese Forestry Society**, p.336-337. 1984.

KIRST, M.; MYBURG, A. A.; DE LEON, J. P.; KIRST, M. E.; SCOTT, J. & SEDEROFF, R.. Coordinated genetic regulation of growth and lignin revealed

by quantitative trait locus analysis of cDNA microarray data in an interspecific backcross of *Eucalyptus*. **Plant Physiol**, v. 135, 2368-78. 2004.

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

KY, C.L.; BARRE, P.; LORIEUX, M.; TROUSLOT, P.; AKAFFOU, S.; LOUARN, J.; CHARRIER, A.; HAMON, S.; NOIROT, M. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.669-676. 2000.

LASHERMES, P., COMBES, M.C., PRAKASH, N.S., TROUSLOT, P., LORIEUX, M., CHARRIER, A. Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meioses. **Genome**, v.44, p.589-596. 2001.

LAUDON, G.F.; WATERSTON, J.M. *Puccinia psidii*. **CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria**, n.56, 1965

LIANG, X. S. ; ZHEN, X., S.; ZHEN, Z.T. Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology** v.3, p. 163-169, 2006.

LONGLEY, A.E. Abnormal segregation during megasporogenesis in maize. **Genetics**, v.30, p. 100-113. 1945.

LORIEUX, M.; PERRIER, X.; GOFFINET, B.; LANAUD, C.; GONZÁLEZ DE LEÓN, D. Maximum likelihood models for mapping genetic markers showing segregation distortion. 2. F2-populations **Theoretical and Applied Genetics**. v.90, p.81-89. 1995.

LOURENÇO, R.T. **Estrutura genômica de três megabases de DNA genômico e seqüenciamento por fragmentação randômica de DNA ("shotgun") de Eucalyptus: conteúdo nucleotídico, seqüências repetitivas e genes**. 2004. 164p. Tese (Mestrado) - Universidade de Campinas, Campinas.

LU, H.; ROMERO-SEVERSON, J.; BERNARDO, R. Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p.622-628. 2002.

LYNCH, M. & WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland, USA: Sinauer Associates, Inc. Ed., 1998.

MACLACHLAN, J.D. A rust of the pimento tree in Jamaica, B.W.I. **Phytopathology** 28:157-170, 1938.

MANGELSDORF, P.C.; JONES, D.F. The expression of Mendelian factors in the gametophyte of maize. **Genetics**, v.11, p.423-455. 1926.

MARLATT, R.B., KIMBROUGH, J.W. *Puccinia psidii* on *Pimenta dioica* in South Florida. **Plant Dis Rep**, 63:510-512, 1979.

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

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

MARTINEZ, M.L. & VUKASINOVIC, N. Algorithm to calculate proportion of genes identity by descent to map QTL in half-sibs families. **Rev. Bras. Zootec.** 29(2):443-451. 2000.

MATSUSHITA, S.; ISEKI, T.; FUKUTA, Y.; ARAKI, E.; KOBAYASHI, S.; OSAKI, M.; YAMAGISHI, M. Characterization of segregation distortion on chromosome 3 induced in wide hybridization between indica and japonica type rice varieties **Euphytica**, v.134, p.27-32. 2003.

MISSIAGGIA, A.A. **Mapeamento genético de QTL para qualidade da madeira e florescimento precoce e estudos de expressão gênica alelo específica em *Eucalyptus* spp.** 2005. 236p. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo, São Paulo.

MORAN, G.F.; THAMARUS, K. A.; RAYMOND, C.A. Genomics of *Eucalyptus* wood traits. **Annals of Forest Science** V. 59. p 645-650, 2002.

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, 1028-1042. 2003.

NOVAES E. **Mapeamento de QTLS para qualidade da madeira em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e ancoragem de clones BAC no mapa genético.** Viçosa, 2006. 171p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

OHBA, K. **Detection of embryonic lethal genes in sugi, *Cryptomeria japonica*** D. Don. Transactions of the 90th Meeting of the Japanese Forestry Society. p. 257-258. 1979.

PASSADOR, G.C. **Resistência à ferrugem e análise de isoenzimas em procedências de *Eucalyptus*.** 1994. 69p. Tese (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PATERSON, A.H.; DAMON, S.; HEWITT, J.D.; ZAMIR, D.; RABINOWITCH, H.D.; LINCOLN, S.E.; LANDER, E.S.; TANKSLEY, S.D. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. **Genetics**, v.127, p. 181-197. 1991.

PEREIRA, M.G.; LEE, M.; BRAMEL-COX, P.; WOODMAN, W.; DOEBLEY, J.; WHITKUS, R. Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. **Genome**, v.37, p.236-243. 1994.

QUILLET, M.C.; MADJIDAN, N.; GRIVEAU, Y.; SERIEYS, H.; TERSAC, M.; LORIEUX, M.; BERVILLÉ, A. Mapping genetic factors controlling pollen viability in an interspecific cross in *Helianthus* sect. *Helianthus*. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 91, p.1195-1202, 1995.

RAMALHO, R.S. **Dendrologia Tropical (terminologia)**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 1995. 52 p.

RAYACHETRY, M.B., ELLIOTT, M.T., VAN, T.K. Natural epiphytotic of the rust *Puccinia psidii* in *Melaleuca quinquenervia* in Florida. **Plant Dis**, 81:831, 1997.

RAYACHETRY, M.B., VAN, T.K., CENTER, T.D., ELLIOTT, M.L. Host range of *Puccinia psidii*, a potential biological control agent of *Melaleuca quinquenervia* in Florida. **Biological Control**, v. 22, p.38-45, 2001.

RHOADES, M. M. Preferential segregation in maize. **Genetics**. v.27, p.395-407, 1942.

ROCABADO, J.M.A. **Epidemiologia e patogênese da ferrugem da goiabeira, causada por *Puccinia psidii***. 2003.110p Tese (doutorado) Universidade Estadual Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.

ROCHA, R.B. Proposta de metodologia para mapeamento **de locos controladores de características oligogênicas**. 2007. 125p. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Viçosa., Viçosa.

SBS, SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. Disponível em <http://www.sbs.org.br>, acesso em outubro de 2007.

SCHUSTER I. & CRUZ C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa , MG. Editora UFV, 2004. 585p.

STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. **The Plant Journal**, v. 3, p. 739 -744,1993.

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, p.379-387, 2002.

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 and fibre properties in two full-sib populations of *Eucalyptus globulus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.856-864, 2004.

TSUMURA, Y.; UCHIDA, K.; OHBA, K. Genetic control of isozyme variation in needle tissues of *Cryptomeria japonica* **J. Hered**, v.80, p. 291-297,1989.

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

VERHAEGEN, D. & PLOMION, C. Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers. **Genome**, v. 39, p.1051-1061. 1996.

VIJAYALAKSHMI, S.; YADAV, K.; KUSHWAHA, C.; SARODE, S.B.; SRIVASTAVA, C.P.; CHAND, R.; SINGH, B.D. Identification of RAPD markers linked to the rust (*Uromyces fabae*) resistance gene in pea (*Pisum sativum*). **Euphytica**, v.144, p.265-274, 2005.

WENDEL, J.F.; EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W. Evidence for multilocus genetic control of preferential fertilization in maize. **Heredity**, v.58, p.297-302. 1987.

YANG, W.; WEAVER, D.B.; NIELSEN, B.L.; QIU, J. A preliminary genetic linkage map of soybean using an intraspecific cross of two cultivars: 'peking' and 'lee'. **Soybean Genetics Newsletter**, v.27. 2000.

YU, K.; PARK, S. J.; POYSA V. Marker assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. **Plant breeding**, v.199, p.411-415, 2000.

ZOBEL, B.& JETT J. B. **Genetics of wood production**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 337p.

Capítulo I

Herança da resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em progênies de *Eucalyptus* spp

1. RESUMO

O estudo de herança, bem como a mensuração adequada do fenótipo, são aspectos fundamentais para subsidiar o mapeamento genético visando a identificação de genes de resistência a doenças. O conhecimento desses genes pode acelerar a incorporação de resistência em genótipos comerciais, como também disponibilizar fontes alternativas de resistência via manipulação gênica. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram estudar o padrão de herança da resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em oito progênies de *Eucalyptus* spp e selecionar uma família para fins de mapeamento genético do (s) gene (s) de resistência à ferrugem. As progênies foram produzidas a partir do cruzamento ou de autofecundação controlada de clones cujo nível de resistência era previamente conhecido: Clone 57 (resistente), 1046 (suscetível), 1213 (suscetível), 7074 (resistente). Foram obtidas oito progênies, quatro provenientes de autofecundações dos clones e quatro provenientes de cruzamentos entre os clones resistentes e suscetíveis: 7074x1046, 7074x1213, 57x1046, 57x1213 contendo de 11 a 141 indivíduos, dependendo do cruzamento. Os indivíduos foram inoculados e avaliados quanto ao nível de resistência. Quase todos os indivíduos das progênies 1046x1046 e 1213x1213 foram suscetíveis à ferrugem. Supõe-se que os indivíduos resistentes destes cruzamentos sejam provenientes de contaminação. Segregação com diferentes proporções entre indivíduos resistentes e suscetíveis foram encontradas nos cruzamentos envolvendo os clones 7074 e 57. A partir das avaliações das autofecundações dos clones suscetíveis 1046 e 1213 pode-se concluir que são os genes dominantes os responsáveis pela resistência à ferrugem e a partir dessa conclusão foram formuladas e testadas duas hipóteses: herança monogênica dominante e herança oligogênica conferida por dois genes complementares de efeito principal. A primeira hipótese teve melhor ajuste no cruzamento entre os clones 7074 e 1213 e a segunda nos cruzamentos

envolvendo o clone 1046 (57x1046 e 7074x1046). O predomínio de indivíduos suscetíveis e a baixa significância estatística às hipóteses levantadas indicaram possíveis problemas de distorções de segregação nos cruzamentos. Dessa forma, o estudo genômico é fundamental para comprovar distorções de segregação nos cruzamentos híbridos e portanto, confirmar as hipóteses de herança apontadas.

2. INTRODUÇÃO

As plantações de *Eucalyptus* ocupam cerca de 1,5% da área agrícola do Brasil (Brun & Pearson, 2007), participando com participando com 4% do PIB e 3 % nas exportações de produtos florestais (Valverde et al., 2007).

Este cenário deve-se aos avanços, nos últimos 30 anos, em tecnologia e pesquisa nas áreas de silvicultura, clonagem e hibridação. Todavia, com a expansão da cultura para áreas, o emprego de materiais mais produtivos sem prévio conhecimento de sua resistência, a implementação de novas técnicas de manejo da eucaliptocultura e os ciclos sucessivos numa mesma área de plantio têm favorecido o surgimento de várias doenças (Alfenas & Zauza, 2007). Dentre elas, a ferrugem causada por *Puccinia psidii* Winter é considerada uma das mais severas em virtude do seu alto impacto nos plantios seminais e clonais.

A ferrugem do eucalipto incide em mudas na fase de viveiro, plantios novos de até dois anos de idade, brotações no campo após o corte raso e em jardim e mini-jardim clonal. A doença caracteriza-se pela presença de pústulas uredioniospóricas de coloração amarela intensa. Os sintomas são observados nos tecidos jovens de folhas e caules ainda em desenvolvimento. Em materiais altamente suscetíveis, as pústulas podem coalescer e recobrir a superfície das brotações causando deformações, perda da dominância apical, redução do crescimento e, eventualmente, ocasionar a morte da planta. A existência de genótipos resistentes, vários imunes à doença, torna a resistência genética a melhor alternativa de controle da ferrugem (Alfenas et al., 2004).

Neste contexto, o mapeamento genético é de suma importância na identificação de genes de resistência à ferrugem, visando à seleção precoce de genótipos resistentes e a clonagem desses para sua transferência para genótipos elite de *Eucalyptus*.

Um estudo de herança da resistência à ferrugem foi realizado por Junghans et al. (2003a), em progênies de irmãos-completos oriundas de cruzamentos entre genitores suscetíveis e resistentes. Neste estudo foi observado que o padrão de segregação da resistência indicava um controle baseado em um gene dominante de efeito principal denominado *Ppr1*. Variações no aspecto e tamanho da pústula de plantas com *Ppr1*, assim como diferentes padrões de segregação dependendo dos genitores envolvidos no cruzamento indicou que, além de *Ppr1*, outros genes determinam a eficiência da resposta de defesa.. Confirmar se a resistência presente em outras progênies é dependente também de *Ppr-1*, assim como, detectar outros genes é necessário para que o uso da resistência genética, como estratégia de controle da ferrugem, possa ser usado com eficiência.

O estudo de herança das características, geralmente, precedem os trabalhos de mapeamento e detecção de QTL's uma vez que o planejamento de cruzamentos, estabelecimento de populações experimentais e a escolha apropriada de métodos de análise dependem do conhecimento de herança da característica que deve ser conhecidos a priori (Cruz & Schuster, 2004). No entanto, para distinguir a herança de características de controle supostamente monogênica ou oligogênica são necessários delineamentos genéticos apropriados, envolvendo gerações de genitores, F1, F2 e retrocruzamento e grande número de indivíduos, para que os testes estatísticos sejam acurados. Contudo, em *Eucalyptus*, cultura perene, há grande dificuldade para se obter as várias gerações para a análise. O alto número de indivíduos a serem fenotipados também torna o trabalho, principalmente de avaliação de doenças com necessidade de inoculação, demorado e oneroso.

Quando não se tem disponível elevado número de indivíduos, o estudo de herança pela genética clássica deve ser subsidiado pelas informações de análise genômica para que as hipóteses de controle genético sejam elucidadas corretamente.

Assim, o objetivo deste capítulo foi realizar avaliação fenotípica da ferrugem e determinar o padrão de herança em oito populações exogâmicas de espécies de *Eucalyptus* visando a escolha de uma população segregante para fins de mapeamento genético de genes relacionados à resistência à ferrugem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

As progênies foram produzidas a partir do cruzamento ou de autofecundação controlada de clones cujo nível de resistência era previamente conhecido. Clones 57 e 7074 (*E. grandis*) resistentes à ferrugem e clones 1213 e 1046 (híbridos *E. urophylla* x *E. grandis*) suscetíveis à ferrugem. Oito progênies foram obtidas, quatro provenientes de autofecundações dos clones e quatro provenientes de cruzamentos entre os clones resistentes e suscetíveis: 7074x1046, 7074x1213, 57x1046, 57x1213 contendo de 11 a 141 indivíduos, dependendo do cruzamento (tabela 1).

Tabela 1. Número de indivíduos avaliados das progênies de eucalipto em cada cruzamento produzido.

Genitores	Número de plantas avaliadas na progênie	Total
*(S0)57x57(S0)	-	11
(S0)57x1213(S2)	70	100
(S0)57X1046(S3)	67	97
(S0)7074X1213(S2)	105	135
(S0)7074x1046(S3)	111	141
(S3)1046x1046(S3)	20	49
(S2)1213x1213(S2)	17	17
1213	-	3
57	-	3
7074	-	3
1213	-	2

* S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade do tipo “fleck” ou necrótico; S1 = pústulas < 0,8 mm de diâmetro; S2 = pústulas de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro; e S3 = pústulas > 1,6 mm de diâmetro (Junghans et al., 2003b).

3.2. Inoculação

As mudas foram inoculadas aproximadamente um mês após o transplântio. Empregou-se o isolado monopustular UFV-2 de *P. psidii* pertencente à raça 1, predominante nas diferentes regiões do Brasil. O isolado foi mantido em mudas de jambeiro [*Syzygium jambos* (L.) Alston], mediante reinoculações periódicas a cada 20 dias. A suspensão de inoculação foi ajustada para 2×10^4 urediniósporos/mL e atomizada homogeneamente nas superfícies abaxial e adaxial da folhas das mudas, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acoplado a um compressor elétrico ajustado para 0,6-0,8 Kgf/cm² de pressão. As mudas foram mantidas por 24 h em câmara de nevoeiro (Ruiz et al., 1989), e a seguir transferidas para câmara de crescimento a 22°C, fotoperíodo de 12 h e intensidade luminosa de 40 μm fótons/s/m². Como controle experimental foram utilizadas plantas de clones comprovadamente suscetíveis e resistentes a *P. psidii*.

3.3. Avaliação da severidade e teste de segregação

A avaliação da severidade da doença foi realizada aos 20 dias após a inoculação utilizando-se a escala de notas preconizada por Junghans et al. (2003b), com quatro graus de severidade, sendo as classes S0 e S1 consideradas resistentes e S2 e S3 suscetíveis. Após as avaliações, as plantas foram reconduzidas para emissão de novos brotos e estes foram reinoculados para confirmação dos resultados.

3.4. Análises estatísticas

Foram formuladas hipóteses sobre o controle gênico da característica e as razões de segregação esperada associada a cada hipótese, foram comparadas com as segregações observadas por meio do teste do qui-quadrado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado das avaliações das autofecundações dos clones suscetíveis 1046 e 1213 (Tabela 2) evidenciou que a resistência à ferrugem é controlada por genes dominantes, pois foi observado predomínio de indivíduos suscetíveis em suas progênes. Apenas quatro indivíduos, em 74 analisadas, para o cruzamento 1213x1213 e dois em 48, para o cruzamento 1046x1046 foram resistentes. Uma vez que, o número de indivíduos resistente foi muito baixo e todas as plantas foram reinoculadas é provável que os indivíduos resistentes sejam provenientes de contaminação (mistura de pólen, de sementes e, ou, de mudas). Pode-se evidenciar também, por meio do resultado das avaliações das autofecundações dos clones 7074 e 57 (ambos resistentes), que os genes responsáveis pela resistência, presente nestes clones, são dominantes e estão em heterozigose, uma vez que indivíduos suscetíveis foram encontrados em suas progênes (Tabela 2).

Desta forma, supondo que a resistência seja um caráter dominante e condicionada por gene (s) em heterozigose, dois modelos foram hipotetizados. O primeiro considerou herança mendeliana simples em que a resistência à ferrugem é controlada por um gene dominante de efeito principal e que ambos, 57 e 7074, são heterozigotos (Rr) para esse gene (Tabela 2). Este modelo possui respaldo nos trabalhos de herança realizados por Junghans et al. (2003a). No segundo modelo foi assumido que a resistência à ferrugem tem herança oligogênica e neste caso, os genitores 57 e 7074 foram considerados heterozigotos para dois genes de efeito maior (PpRr), complementares à resistência, e os genitores suscetíveis 1046 e 1213 homozigotos ou heterozigotos para um dos locos envolvidos na resistência (pprr ou Pppr)

As evidências que levaram ao primeiro modelo provém primeiramente do fato de que em todas as famílias envolvendo genitores resistentes (57 e 7074)

foram encontrados indivíduos suscetíveis, indicando portanto, que os genes envolvidos na resistência estão em heterozigose nestes clones. A segunda evidência vem da análise da progênie da autofecundação do clone 57, em que a proporção 3:1 esperada não foi rejeitada ($P=86,2\%$ pelo teste de χ^2). No entanto, o baixo número de indivíduos resistentes em famílias dos cruzamentos desses dois clones (57 e 7074) com os genitores suscetíveis, 1046 e principalmente 1213, onde se esperava uma segregação 1:1 (R:S), indicou que este gene teria baixa penetrância e/ou que outro gene (ou genes) fundamentais a resistência também estaria segregando.

Na autofecundação do clone resistente 7074 (Rr) o número de indivíduos suscetíveis foi maior do que o esperado, e portanto a proporção 3:1 foi rejeitada (Tabela 2). Quando o clone 7074 foi cruzado com o clone suscetível 1213 (rr), a proporção 1:1, esperada não foi rejeitada, mas quando cruzamento com 1046 houve novamente predomínio de indivíduos suscetíveis e a proporção 1:1, esperada, foi rejeitada (Tabela 2).

No segundo modelo a resistência à ferrugem foi hipotetizada como oligogênica conferida por dois genes. O predomínio de indivíduos suscetíveis nos cruzamentos permite o ajuste de proporções oriundas da segregação de mais de um gene (Tabela 3). Neste caso, os genitores 57 e 7074 poderiam ser heterozigotos para dois genes de efeito maior (PpRr), complementares à resistência, e os genitores suscetíveis 1046 e 1213 homozigotos (pprr) ou heterozigotos (Pprr) para um dos locos envolvidos na resistência (Tabela 3).

Quando os genitores 1046 e 1213 foram considerados homozigotos (pprr), a segregação esperada (1:3) foi rejeitada para todos os casos (Tabela 3) e quando considerados heterozigotos (Pprr) para um dos locos, a segregação esperada de 3:5 ajustou-se melhor aos cruzamentos envolvendo o genitor 1046 (Tabela 3)

É importante ressaltar que embora os clones 57 e 7074 apresentem o mesmo nível de resistência (ambos S0), nos cruzamentos com os mesmos clones suscetíveis (1046 e 1213), para o clone 7074 o número de indivíduos resistentes foi maior na progênie (Tabela 2). As diferenças nas frequências de indivíduos resistentes dependendo do genitor resistente e suscetível empregados mostram a importância do “background genético” na expressão da resistência à ferrugem.

À exceção da autofecundação dos clones 57 e 7074 em que houve um predomínio de indivíduos resistentes (S0 e S1), em todos os demais cruzamentos houve predomínio de indivíduos suscetíveis. A maior frequência de indivíduos suscetíveis ocorreu principalmente nos cruzamentos envolvendo o clone 1213.

Tabela 2. Segregação da resistência em progênie de *Eucalyptus* inoculadas com *Puccinia psidii*, avaliadas aos 20 dias após a inoculação, assumindo a resistência dos clones 57 e 7074, como monogênica dominante.

Progênie	Fenótipo				Total	R:S obs	R:S esp	Modelo	χ^2	P(%)
	S0	S1	S2	S3						
1046x1046	1	1	3	43	48	2:46	0:48	0:1	-	-
1213x1213	1	3	7	63	74	4:70	0:74	0:1	-	-
57x57	6	2	3	-	11	8:3	8,25:2,75	3:1	0,03	86,2
7074x7074	9	19	8	15	51	28:23	38,25:12,75	3:1	10,9	0,10
7074x1046	21	37	31	52	141	58:83	70,5:70,5	1:1	4,4	3,5
7074x1213	36	26	26	47	135	62:73	67,5:67,5	1:1	0,9	34,3
57x1046	38	3	17	39	97	41:56	48,5:48,5	1:1	2,3	12,8
57x1213	6	12	27	55	100	18:82	50:50	1:1	40,9	0,0

Genitores	Genótipo	Fenótipo	Herança
1046	rr	Suscetível	R- = resistente
1213	rr	Suscetível	
57	Rr	Resistente	rr = suscetível
7074	Rr	Resistente	

Tabela 3 – Segregação da resistência em progênies de eucalipto inoculadas com *Puccinia psidii*, avaliadas aos 20 dias após a inoculação, assumindo que a resistência, dos clones 57 e 7074, como oligogênica conferida por dois genes dominantes e complementares.

Progênie	Fenótipo				Total	R:S obs	R:S esp	Modelo	χ^2	P(%)
	S0	S1	S2	S3						
57x57	6	2	3	-	11	8:3	6,2:4,8	9:7	1,21	27,1
7074x7074	9	19	8	15	51	28:23	28,7:22,3	9:7	0,004	84,6
7074x1046	21	37	31	52	141	58:83	35,25:105,75	1:3	14,58	0,0
7074x1213	36	26	26	47	135	62:73	33,75:101,25	1:3	31,5	0,0
57x1046	38	3	17	39	97	41:56	24,25:72,75	1:3	15,43	0,00
57x1213	6	12	27	55	100	18:82	25:75	1:3	2,61	10,59
7074x1046	21	37	31	52	141	58:83	52,9:88,1	3:5	0,8	37,2
7074x1213	36	26	26	47	135	62:73	50,6:84,4	3:5	4,1	4,3
57x1046	38	3	17	39	97	41:56	36,4:60,6	3:5	0,9	33,2
57x1213	6	12	27	55	100	18:82	37,5:62,5	3:5	16,2	0,0
Genitores	Genótipo				Fenótipo		Herança			
1046	pprr ou Ppr				suscetível		P.R. = resistente			
1213	pprr ou Ppr				suscetível		P.rr = suscetível			
57	PpRr				resistente		ppR.= suscetível			
7074	PpRr				resistente		pprr= suscetível			

Os padrões complexos e a necessidade de recorrer à hipótese de baixa penetrância do gene para explicar os resultados encontrados, diferentemente dos encontrados por Junghans et al. (2003a) em cruzamento de *E. grandis*, pode ter relação com fato de os cruzamentos utilizados, no presente trabalho, incluírem clones híbridos de *E. urophylla* x *E. grandis*. Híbridos interespecíficos geralmente apresentam problemas de segregação com distorção devido ao

pareamento errôneo de cromossomos homólogos durante a meiose (Missiaggia, 2005).

Douglas Lau, (comunicação pessoal, 2007), avaliando a resistência em 30 progênies de *E. grandis* X *E. urophylla* também encontraram forte predomínio de indivíduos suscetíveis. Das 30 progênies analisadas, apenas 11 apresentaram segregação para resistência, sendo que em oito progênies segregantes, considerando o ponto de corte proposto por Junghans et al. (2003b), houve um predomínio de indivíduos suscetíveis (proporção 1 resistente : 3 suscetíveis).

Para elucidar estas questões, estudos genômicos de mapeamento e detecção de QTLs, dos cruzamentos, envolvendo os clones 7074 e 57 são de suma importância, para a confirmação da paternidade, eliminando-se assim indivíduos que não fazem parte do cruzamento, e para verificar possíveis problemas de distorções de segregação em cruzamentos híbridos interespecíficos. Além disso, as informações geradas pelos estudos genômicos serão úteis para averiguar a veracidade das hipóteses levantadas neste capítulo.

Para o estudo de mapeamento, descrito no capítulo 2, foi escolhido o cruzamento envolvendo o parental resistente 7074 (7074 x 1213), devido ao maior número de indivíduos encontrados na progênie em relação ao cruzamento envolvendo o clone 57.

5. CONCLUSÕES

- Os clones 7074 e 57 (ambos S0) são heterozigotos para a resistência uma vez que suas progênies de autofecundação foram segregantes. É possível que o gene de resistência presente nestes genitores dependa de outros genes que também estão segregando nos cruzamentos com parentais suscetíveis.
- A autofecundação do clone 57 sugere a segregação de um gene com dominância completa. No entanto, a população de autofecundação do clone 57 necessita ser aumentada para confirmar a proporção R:S encontrada.
- A hipótese de segregação oligogênica foi rejeitada para todos os casos em que os genitores 1046 e 1213 foram considerados homozigotos e teve melhor ajuste para os cruzamentos envolvendo o genitor 1046, considerado heterozigoto para um dos locos,
- O estudo genômico é fundamental para comprovar possíveis distorções nos cruzamentos híbridos e portanto, averiguar as hipóteses de herança apontadas neste capítulo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. & ZAUZA, E. A. V. **Doenças na cultura do eucalipto**. SIF – Viçosa, 2007. 164p.

ALFENAS, A.C, ZAUZA, E. A. V, MAFIA, R. G, ASSIS, T. F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Editora UFV, Viçosa, 2004. 442p.

BRUN, L.R., & PEARSON, L. Aspectos legais: biossegurança e propriedade intelectual. In: Borém, A. **Biotecnologia Florestal**, Viçosa. 347-362. 2007.

CRUZ, C.D. & SCHUSTER, I. Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. Editora UFV, Viçosa, 2004. 568p.

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

JUNGHANS, D. T., ALFENAS, A. C., MAFFIA, L. A. Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira** v.28, p184-188, 2003b.

MISSIAGGIA, A.A. **Mapeamento genético de QTL para qualidade da madeira e florescimento precoce e estudos de expressão gênica alelo específica em *Eucalyptus* spp.** 2005. 236p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo.

RUIZ, R.A.R., ALFENAS, A.C. & FERREIRA, F.A. Influência da temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, p.55-61, 1989.

VALVERDE, S.R., NEIVA, S.A., SOARES, N.S. Biotecnologia e competitividade das plantações florestais. In: Borém, A. **Biotecnologia Florestal**, Viçosa. 363-374. 2007.

Capítulo II

Mapeamento de gene letal responsável pela distorção de segregação no grupo de ligação três, em cruzamento interespecífico de *Eucalyptus spp*

1. RESUMO

Estudos de mapeamento genético em espécies de *Eucalyptus*, baseados em marcadores moleculares, permitem a identificação de genes envolvidos no controle de caracteres de interesse. No entanto, o mapeamento genético em espécies florestais é mais complexo em relação a espécies para as quais é factível a obtenção de linhagens endogâmicas. Além disso, em *Eucalyptus* principalmente em cruzamentos interespecíficos observa-se alta frequência de locos marcadores com distorção de segregação (DS). A presença de locos distorcidos prejudica prever as relações genotípicas e estimar as frequências de recombinações. Geralmente, marcadores que exibem distorção de segregação são descartados da análise de mapeamento. Contudo, negligenciar a ocorrência de DS não é prática recomendável, visto que informações precisas e completas são necessárias em estudos de mapeamento. Neste trabalho foi proposta a hipótese da existência de um gene letal responsável pela distorção de segregação em locos microssatélites do grupo de ligação três em *Eucalyptus*, e desenvolvida uma metodologia de mapeamento desses locos. Para tanto, foram genotipados dezenove locos microssatélites, do grupo de ligação três, em uma progênie de 135 irmãos-completos derivadas de um cruzamento interespecífico. Para verificar a razão de segregação esperada conforme o grau de informatividade de cada loco, foram realizados testes de segregação genotípico e gamético, utilizando a estatística do qui-quadrado. Para os locos em que foi detectada distorção de segregação, foram formuladas funções para estimar a taxa de distorção. A partir das taxas de distorção foi estabelecido um estimador de distância para mapear os locos distorcidos. Foi verificado que dos dezenove locos

microssatélites nove foram polimórficos na progênie e desses, sete apresentaram distorção gamética para o genitor masculino. Dessa forma, foi pressuposto que a distorção observada para os locos do grupo de ligação três é devida a um gene letal. A partir das taxas de distorção e da frequência de recombinação estimadas, para cada loco, o gene letal foi mapeado em relação aos demais locos do grupo de ligação três. A ordem dos locos microssatélites foi consistente com os mapas disponíveis na literatura, demonstrando adequabilidade do mapeamento proposto com base nas taxas de distorção.

2. INTRODUÇÃO

Para aumentar a competitividade da eucaliptocultura nacional são necessárias ações contínuas que visem melhorar as características de interesse das espécies de *Eucalyptus*. Neste contexto, mapas genéticos baseados em marcadores moleculares têm se revelado como um recurso de valor inestimável. Por meio deles, torna-se possível identificar regiões genômicas que contenham genes ou seqüências regulatórias envolvidos no controle genético dessas características. No entanto, apesar da grande importância, a grande maioria dos mapas genéticos construídos até hoje, apresenta limitações técnicas que dificultam a transferência das informações geradas para o contexto de melhoramento florestal. Isso ocorre, principalmente, devido ao número limitado de descendentes analisados, a precisão na coleta dos dados fenotípicos, a herança dominante e a baixa transferibilidade dos marcadores utilizados, tipicamente marcadores RAPD e AFLP (Brondani et al., 1998). Com isso, a informação de ligação entre marcadores, desses mapas, tende a permanecer restrita à população segregante, utilizada para o mapeamento, limitando o mapeamento comparativo entre indivíduos e espécies, bem como a validação do posicionamento de QTLs (Grattapaglia, 2004).

Marcadores microssatélites, são atualmente, os mais indicados para a construção de mapas genéticos de alta resolução e cobertura em espécies florestais. Os microssatélites caracterizam-se pela natureza multialélica, herança co-dominante, abundância e transferibilidade entre espécies geneticamente relacionadas. A conservação de locos microssatélites entre as espécies do gênero *Eucalyptus* torna possível a geração de mapas “consenso”, permitindo a comparação e integração de informação de mapeamento genético de marcadores, genes e QTLs entre experimentos independentes.

Contudo, o mapeamento genético em espécies perenes não é trivial. O cálculo da frequência de recombinação entre pares de locos é mais complexo em *Eucalyptus* do que em espécies anuais, para as quais é factível a obtenção de linhagens endogâmicas. Além disso, nas espécies do gênero *Eucalyptus* a elevada carga genética resulta na maioria das vezes em distorção de segregação DS, ou seja ausência do padrão de segregação mendeliano clássico dos marcadores analisados, dificultando prever as relações genotípicas e estimar recombinações a partir dos pressupostos dos modelos probabilísticos. A presença de marcadores com DS em pelo menos um loco faz com que as estimativas de recombinação entre os pares de locos fiquem viesadas formando mapas pouco acurados e de baixa resolução.

Nos trabalhos de mapeamento genético, envolvendo diferentes espécies do gênero *Eucalyptus*, tem sido observado marcadores com distorção da razão de segregação em diferentes níveis, geralmente maior para cruzamentos interespecíficos entre indivíduos de espécies puras (Grattapaglia & Sederoff, 1994; Marques et al., 1998; Myburg et al., 2003) em comparação com cruzamentos intraespecíficos (Byrne et al., 1995; Thamarus et al., 2002). Na grande maioria desses trabalhos marcadores que exibem DS foram descartados da análise de mapeamento (Byrne et al., 1995; Marques et al., 1998; Thamarus et al., 2002; Myburn et al., 2003 e Novaes, 2005).

Nos trabalhos que foram considerados marcadores com DS em *Eucalyptus*, as marcas que apresentaram DS foram destacadas com um asterisco no mapa (Grattapaglia & Sederoff, 1994; Brondani et al., 2002, Myburg et al., 2003; Brondani et al., 2006). Nestes trabalhos ficou evidenciado que o grupo de ligação três foi o que exibiu o maior número de marcadores com distorção de segregação.

Neste contexto, métodos que consideram a DS são importantes na análise e no entendimento dos estudos genômicos relativos à construção de mapas genéticos acurados e ao mapeamento de QTLs, à seleção assistida e à clonagem de genes para espécies do gênero *Eucalyptus*. Negligenciar a ocorrência de DS não é prática recomendável, tendo em vista a grande necessidade de se obter informações confiáveis para tomada de decisão em estudos genéticos teóricos e aplicados ao melhoramento.

Com base no exposto, o objetivo desse trabalho foi, primeiramente, propor e validar a hipótese da existência de um gene letal responsável pela distorção de segregação de locos microssatélites do grupo de ligação três, em cruzamento interespecíficos de *Eucalyptus* e, posteriormente, mapear esses locos em relação ao gene letal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Para este estudo foi utilizada uma família de irmãos completos constituída por 135 indivíduos derivados do cruzamento entre o genitor feminino 7074 (*E. grandis*) e o genitor masculino 1213 (híbrido *E. urophylla* x *E. grandis*). A progênie foi genotipada com dezenove oligonucleotídeos microssatélites, pertencentes ao grupo de ligação três, selecionados com base nos mapas de genéticos descritos na literatura.

3.2. Extração de DNA total

As folhas jovens e sadias dos genitores e da progênie foram coletas em casa de vegetação, armazenadas em gelo e encaminhadas ao Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, onde foram armazenadas a -20 °C. O DNA total foi extraído de acordo com o método descrito por Doyle & Doyle (1990), com modificações: Cerca de 150 mg de folhas foram maceradas com nitrogênio líquido, até o tecido virar um pó bem fino e transferido para um tubo Eppendorf, adicionando-se 650 µL de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4M; EDTA 20 mM pH 8,0; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; PVP 1% e β-mercaptoetanol 1%) previamente aquecido a 65°C; a seguir foi feita a incubação a 65°C por 30 minutos; após choque térmico em gelo, adicionou-se um volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), agitando levemente por 10 minutos e centrifugou por 6.000 g por 10 min. Após esta etapa, recolheu-se a fase aquosa fazendo nova extração com clorofórmio-álcool isoamílico, e incubando os tubos a -20°C durante a noite em isopropanol. O material foi centrifugado a 6.000 g por 30 minutos e o sedimento lavado com etanol 70%,

secado e ressuspendido em 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0) e incubados a 37 °C por 30 minutos.

A quantidade de DNA foi determinada em espectrofotômetro PHARMARCIA BIOTECH modelo ULTROSPEC 3000, sendo também verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% e evidenciado com brometo de etídeo na concentração de 0,2 µg/mL. O gel foi analisado sob luz ultravioleta e sua imagem digitalizada utilizando sistema de vídeo Eagleye (Stratagene®).

3.3. Amplificação e avaliação dos oligonucleotídeos microssatélites

Inicialmente os dezenove oligonucleotídeos microssatélites foram usados nas reações de amplificação para os dois genitores e vinte indivíduos tomados aleatoriamente na progênie.

Os microssatélites desenvolvidos por Brondani et al. (2002) e no âmbito do projeto Genolyptus (Grattapaglia et al., 2005) foram identificados pelo acrônimo EMBRA, (EMBRA 115, EMBRA 34, EMBRA 350, EMBRA 286, EMBRA 77, EMBRA 144, EMBRA 49, EMBRA 231, EMBRA 321, EMBRA 114, EMBRA 189, EMBRA 227, EMBRA 171, EMBRA 122, EMBRA 125, EMBRA 181, EMBRA 239) e os desenvolvidos pelo CSIRO identificados pelo acrônimo EG (Eg 98 e Eg 94).

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µL, contendo Tris-HCl 10 mM pH 8,0; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,5 mM; 0,1 mM de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,3 µM de cada oligonucleotídeos iniciadores; 12,0 ng de DNA e 1 unidade de Taq polimerase. As reações foram submetidas à ciclos de PCR variando a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos a fim de determinar uma temperatura ótima de anelamento dos mesmos

Os ciclos de PCR foram conduzidos em termociclador PTC-100 MJ Research, Inc. e incluíram uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida de 36 ciclos com os seguintes passos: 1 minuto a 94 °C para desnaturação das moléculas de DNA, 1 minuto (temperatura estabelecida para

cada oligonucleotídeo), para anelamento do oligonucleotídeo e 1 minuto a 72 °C para extensão das novas cadeias de DNA. Após um passo final de 7 minutos a 72 °C, a temperatura foi reduzida a 4 °C mantendo-se nesta até que as amostras fossem retiradas.

Posteriormente as reações de amplificação de cada loco microssatélite, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida nativo 10 % para avaliação do nível de polimorfismo de DNA. A corrida eletroforética ocorreu em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04M e EDTA 0,001M), por 6 horas a 80 V. Após a corrida , os géis foram colocados em solução de brometo de etídeo (1µg/L) por 30 minutos. A seguir, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta e sua imagem digitalizada utilizando sistema de vídeo Eagleye (Stratagene®).

A presença de indivíduos contaminantes, ou seja, que não pertencem ao cruzamento entre o parental 7074 e 1213 foi verificada. Foram considerados contaminantes indivíduos com alelos diferentes de um ou ambos os parentais para mais de dois locos microssatélites analisados. Os contaminantes foram retirados das análise.

Os locos que exibiram polimorfismo, nos genitores e nos vinte indivíduos, foram usados na genotipagem completa dos 135 indivíduos da progênie segregante.

3.3.1. Testes de segregação

Para a verificação da razão de segregação esperada de acordo com o grau de informatividade de cada tipo de cruzamento em relação a famílias de irmãos completos (Tabela 1), foi feito, primeiramente um teste de segregação genotípico. Neste teste a significância dos desvios entre o número de indivíduos observados e esperados em cada classe genotípica do marcador foi avaliada por meio do teste de qui-quadrado (X^2) com um nível de significância de 5%. Posteriormente, para os locos que apresentaram distorção pelo teste de segregação genotípico, foi feito um teste de segregação gamético, para verificar a hipótese de distorção pré-zigótica e, neste caso, qual dos genitores produziu gametas com frequências distorcidas. Para tanto,

também foi utilizado o teste do qui-quadrado (X^2) com 5% de significância. Esses testes foram realizados pelo programa GQMOL (Cruz, 2007)

A estatística qui-quadrado é dada por:

$$X^2 = \sum_{i=1}^n \left[\frac{(Obs_i - Esp_i)^2}{Esp_i} \right]$$

em que,

X^2 é o valor de qui-quadrado calculado;

Obs_i e Esp_i são os valores observado e esperado, para a i -ésima classe fenotípica ($i= 1, 2, \dots, n$), respectivamente.

Tabela 1. Tipos de cruzamentos quanto ao grau de informação

Cruzamento	Configuração	Característica	Segregação
Completamente Informativo	$A_i A_j \times A_k A_l$	Os alelos de cada genitor são distinguíveis	1:1:1:1
Um loco informativo	$A_i A_j \times A_k A_k$	Apenas os alelos do genitor heterozigoto são distinguíveis	1:1
Parcialmente informativo	$A_i A_j \times A_i A_j$	Apenas os descendentes homozigotos são informativos	1:2:1

Fonte: Lynch & Walsh (1998)

3.3.2. Taxa de distorção de segregação

Para os locos em que foi detectada distorção de segregação, em razão de valores seletivos de gametas (s) ou de genótipos (g), foram formuladas expressões para estimar a taxa de distorção em populações exogâmicas. Essas expressões foram estabelecidas a partir do conhecimento do estimador

da taxa de distorção, desenvolvido por Ferreira (2006), para populações de retrocruzamento.

Segundo Ferreira (2006), a taxa de distorção genotípica (g) e gamética (s), em retrocruzamento (cruzamento do tipo $Aa \times aa$), para cada loco pode ser estimada a partir dos próprios dados experimentais pelo estimador:

$$s = g = \frac{1}{2} - \frac{O_2}{O_1 + O_2}, \text{ em que}$$

s = taxa de distorção gamética observada

O_1 = número observado de indivíduos Aa

O_2 = número observado de indivíduos aa

3.3.3.. Distância entre pares de locos e mapeamento genético

Para estimar a porcentagem de recombinação entre dois genes (ou marcas moleculares) em que pelo menos uma delas apresenta distorção de segregação foram estabelecidos procedimentos específicos que levam em consideração a taxa de distorção estimada para cada loco marcador em populações exogâmicas. O estabelecimento de um mapa genético, a partir das taxas de distorção estimadas, foi proposto.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise dos padrões de amplificação

A segregação dos dezenove locos microssatélites para os dois genitores 7074 (genitor feminino) e 1213 (genitor masculino) e os vinte indivíduos tomados aleatoriamente na progênie foram avaliadas nos padrões de amplificação. Dez locos microssatélites (EMBRA 286, EMBRA 34, EMBRA 77, EMBRA 144, EMBRA 49, EMBRA 231, EMBRA 321, EMBRA 114, Eg 98 e Eg 94) foram homocigotos para ambos os genitores e conseqüentemente não segregaram na progênie avaliada. Esses dez locos, segundo a classificação de Haseman & Elston, (1972), são do tipo de cruzamento I ($A_iA_i \times A_iA_i$) para os marcadores EMBRA 34, EMBRA 77, EMBRA 144, EMBRA 49, EMBRA 231, e do tipo II ($A_iA_i \times A_jA_j$) para os marcadores EMBRA 321, EMBRA 114, Eg 98 e Eg 94.

Segundo Lynch & Walsh (1998), na análise de segregação dos locos, deve-se considerar que somente locos que são heterocigotos para pelo menos um dos genitores são informativos para fins de mapeamento, pois locos homocigotos produzem progênie não informativa, na qual não é possível associar os alelos a cada genitor que lhe originou. Dessa forma, esses dez marcadores microssatélites não foram usados na genotipagem dos demais indivíduos componentes da população segregante e foram excluídos da análise de mapeamento.

Em contraste, nove marcadores microssatélites apresentaram-se polimórficos nos vinte indivíduos avaliados, e foram usados na genotipagem completa dos 135 indivíduos componentes da progênie.

Os nove locos microssatélites genotipados na população (EMBRA 227, EMBRA 189, EMBRA 122, EMBRA 171, EMBRA 125, EMBRA 239, EMBRA 181, EMBRA 115 e EMBRA 350) revelaram diferentes tipos de cruzamento. Para os marcadores EMBRA 227, EMBRA 189, EMBRA 122 e EMBRA 239 o genitor feminino (7074) foi do tipo A1A2 e o genitor masculino (1213) A3A4, ou seja, apresentaram cruzamento do tipo VII (AiAj x AkAl) de acordo com a classificação de Haseman & Elston (1972). Neste caso, ambos os genitores são heterozigotos com quatro alelos segregando. Segundo Lynch & Walsh (1998), este tipo de cruzamento é considerado totalmente informativo, pois é possível identificar, na progênie, a origem de todos os alelos em relação aos genitores.

O padrão de amplificação do loco microssatélite EMBRA 189 exemplifica o tipo de cruzamento VII (Figura 1). Pode-se observar que cada alelo da progênie, em relação aos genitores, são inequivocadamente distinguidos.

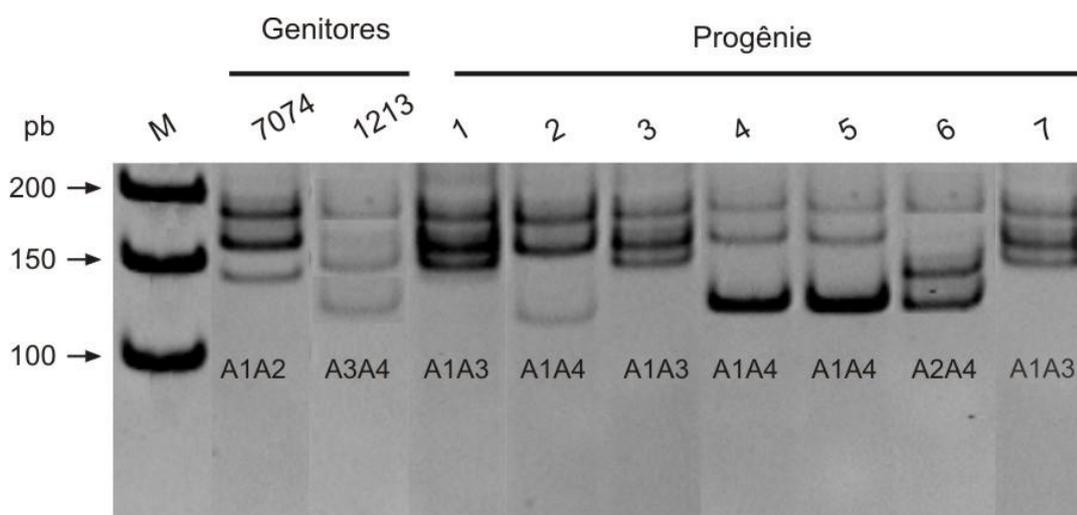


Figura 1 - Padrão de amplificação do loco microssatélite EMBRA 189 em que, o genitor feminino 7074 é do tipo A1A2 e genitor masculino 1213 é do tipo A3A4

Para os marcadores EMBRA 125, EMBRA 181 e EMBRA 350 foi verificado que o genitor masculino 1213 é heterozigoto do tipo A1A2 e o genitor feminino é heterozigoto do tipo A1A3. Essa configuração é classificada como cruzamento do tipo VI ($A_iA_j \times A_iA_k$), no qual se verifica que, apesar de ambos os genitores serem heterozigotos, a progênie deste tipo de cruzamento não é totalmente informativa como observada para os marcadores do tipo de cruzamento VII, descritos anteriormente. Neste caso, segundo Lynch & Walsh (1998), a progênie segrega para três alelos e não é possível identificar a origem de todos eles, como pode ser observado nas figuras 2, para o loco microssatélite EMBRA125.

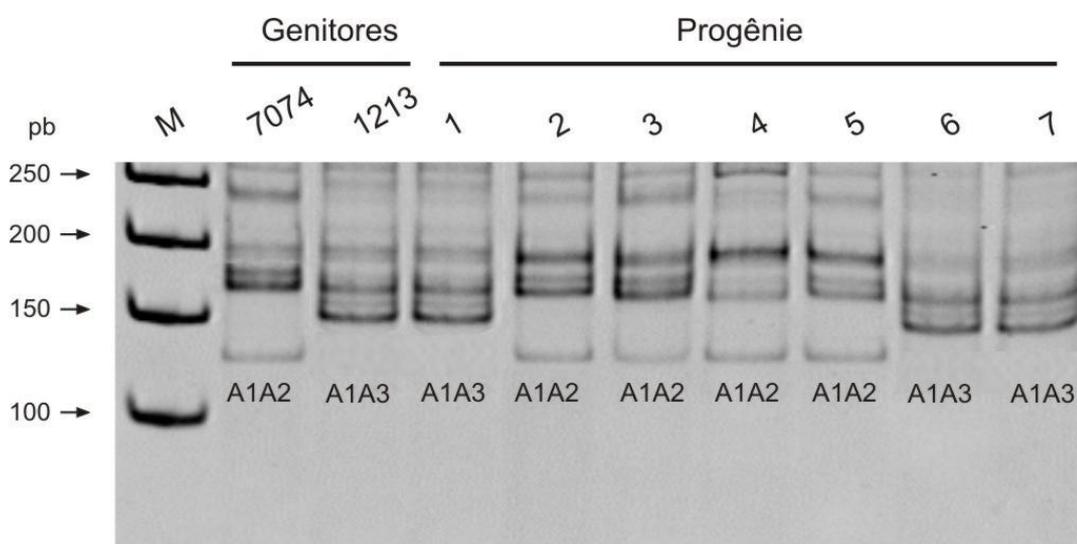


Figura 2 - Padrão de amplificação do loco microssatélite EMBRA 125 em que, o genitor feminino 7074 é do tipo A1A2 e o genitor masculino 7074 é do tipo A1A3

O marcador EMBRA 115 foi do tipo de cruzamento IV ($A_iA_j \times A_kA_k$), em que genitor feminino 7074 é heterozigoto (A1A2) e o genitor masculino 1213 homozigoto (A3A3). Neste caso, a população segregou para três formas alélicas. Para o marcador EMBRA 171 o genitor feminino 7074 foi homozigoto A1A1 e o genitor masculino 1213 foi heterozigoto A1A2, sendo classificado como cruzamento do tipo III ($A_iA_i \times A_iA_j$). Portanto, a população segregou para duas formas alélicas, sendo que apenas os

alelos do genitor heterozigoto (1213) puderam ser distinguidos na progênie (figura 3).

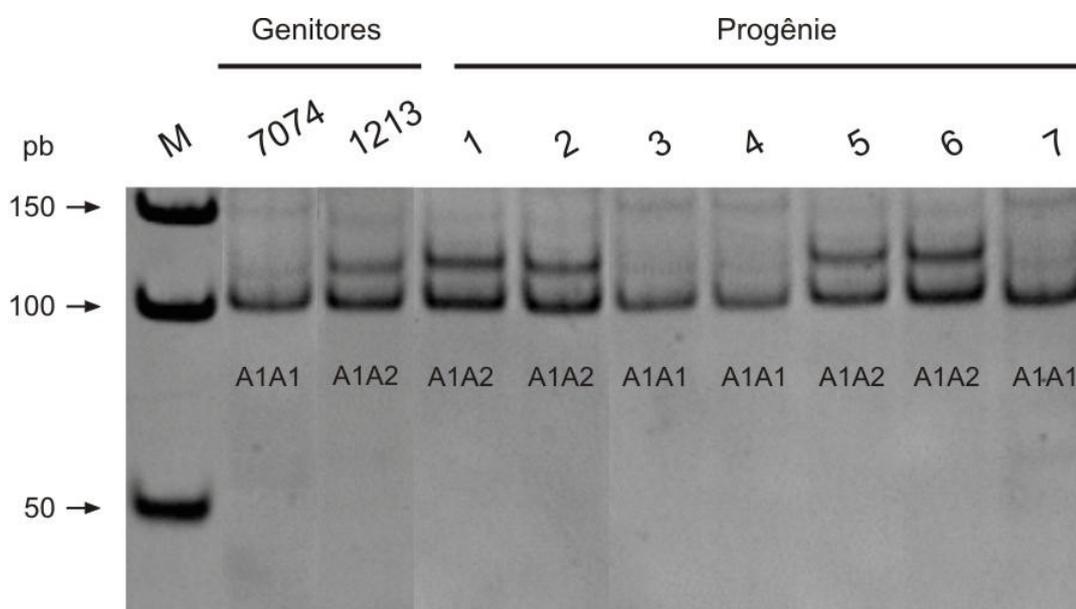


Figura 3 - Padrão de amplificação do loco microssatélite EMBRA 171. O genitor feminino 7074 é do tipo A1A1 e o genitor masculino 1213 é do tipo A1A2

Na etapa de genotipagem, dos 135 indivíduos componentes da progênie segregante foram detectados quatro indivíduos contaminantes, ou seja indivíduos que não apresentaram alelos comuns a um ou a ambos genitores, para mais de dois locos microssatélites analisados. Dessa forma, o número de indivíduos, da progênie, utilizado para o estudo de mapeamento, foi reduzido para 131. Esses contaminantes podem ser oriundos de autofecundação do parental feminino, mistura de pólen, de sementes e, ou, de mudas durante os processos de hibridação, beneficiamento de sementes e produção de mudas.

4.2. Teste de segregação genotípico e gamético

A análise de segregação, pelo teste do qui-quadrado, evidenciou que dos nove locos microssatélites polimórficos na progênie, oito apresentaram

distorção das proporções genótípicas esperadas de acordo com a Primeira Lei de Mendel (EMBRA 227, EMBRA 189, EMBRA 122, EMBRA 171, EMBRA 239, EMBRA 125, EMBRA 181 e EMBRA 350) e apenas o EMBRA 115 segregou como esperado (Tabela 2). No teste de segregação genotípico pode-se perceber também que para todos os marcadores uma classe genotípica apresentou-se muito reduzida, sendo que em alguns casos foi totalmente ausente (Tabela 2).

Tabela 2 – Teste de segregação genotípico dos nove locos microssatélites (EMBRA), genotipados na progênie derivada do cruzamento entre o genitor feminino 7074 e o genitor masculino 1213.

Loco	Pais	Classes							Hipótese	X ²	P(%)
		11	12	13	14	22	23	24			
EMBRA 227	12 x 34			0	52		16	36	1: 1: 1: 1	59,69	0,0*
EMBRA 189	12 x 34			43	2		35	7	1: 1: 1: 1	56,77	0,0*
EMBRA 122	12 x 34			0	49		13	43	1: 1: 1: 1	63,34	0,0*
EMBRA239	12 x 34			15	27		19	29	1:1:1:1	12,05	0,0*
EMBRA 125	12 x13	22	36	26			6		1:1:1:1	20,75	0,0*
EMBRA 181	12 x13	10	63	48			1		1:1:1:1	86,98	0,0*
EMBRA 350	12 x 13	2	42	46			2		1:1:1:1	82,622	0,0*
EMBRA 115	11 x 23		49	46					1:1	0,09	75,82ns
EMBRA 171	11 x 12	32	67						1:1	12,37	0,0*

* : Valor abaixo do nível crítico especificado (5%)
 ns: Valor acima do nível crítico especificado (5%)

Em populações exogâmicas com marcadores co-dominantes multialélicos, além do teste de segregação genotípico é possível realizar o teste de segregação gamético. Dessa forma para os locos que o teste genotípico foi significativo realizou-se o teste gamético, para identificar, para cada marcador, qual genitor produz gametas com distorção de segregação. O teste de segregação gamético está apresentado na Tabela 3, no qual é possível verificar que apenas para o marcador EMBRA 350 o teste foi não significativo para ambos os genitores ou seja os gametas produzidos por esses genitores não apresentam distorção de segregação. Para os demais marcadores a distorção da razão de segregação foi observada no genitor masculino 1213.

Tabela 3 – Teste de segregação gamético dos oito locos microssatélites (EMBRA), genotipados na progênie derivada do cruzamento entre o genitor feminino 7074 (♀) e o genitor masculino 1213 (♂)

Marcador	Genitor	Gameta T1	Gameta T2	χ^2	P (%)
EMBRA227	♀ 12	52	52	0,0	100 ns
	♂ 34	16	88	49,84	0,00*
EMBRA189	♀ 12	45	42	0,10	74,77 ns
	♂ 34	78	9	54,72	0,00*
EMBRA122	♀ 12	49	56	0,46	50,00 ns
	♂ 34	13	92	59,43	0,00*
EMBRA239	♀ 12	42	48	0,4	52,70 ns
	♂ 34	56	34	5,37	2,03*
EMBRA125	♀ 12	48	42	0,4	52,70 ns
	♂ 13	58	32	7,51	0,61*
EMBRA181	♀ 12	58	64	0,29	58,69 ns
	♂ 13	73	49	4,72	2,97*
EMBRA350	♀ 12	46	44	0,04	83,30 ns
	♂ 13	42	48	0,4	52,70 ns
EMBRA171	♀ 11	99	-	-	-
	♂ 12	67	32	12,37	0,04*

* : Valor abaixo do nível crítico especificado (5%)

ns: Valor acima do nível crítico especificado (5%)

O grande número de locos distorcidos pode ser justificado primeiramente, porque o cruzamento utilizado foi interespecífico. Segundo Ky et al. (2000), os híbridos interespecíficos possuem taxa de distorção de segregação mais elevada em comparação aos intraespecíficos, devido a possíveis problemas de pareamento dos cromossomos homólogos de espécies distintas durante a meiose no híbrido. De fato, o número de marcadores com distorção de segregação, observados em trabalhos de construção de mapas genéticos para espécies de *Eucalyptus*, são mais elevados para cruzamentos interespecíficos entre indivíduos de espécies puras (Grattapaglia et al., 1994; Marques et al., 1998; Myburg et al., 2003) em relação aos cruzamentos intraespecíficos (Byrne et al., 1995; Thamarus et al., 2002).

Uma segunda explicação para o número elevado de marcas distorcidas está no tipo de marcador utilizado, o qual pode influenciar na estimativa da proporção final de marcadores distorcidos. Na grande maioria dos mapas genéticos construídos foram utilizados marcadores dominantes RAPD ou AFLP, em uma configuração de pseudo-cruzamento teste. Nestes casos dos inúmeros marcadores polimórficos gerados e que segregam na população de mapeamento, existe a tendenciosidade de favorecer a interpretação somente daqueles marcadores que mais se aproximam da segregação esperada de 1:1, fazendo com que marcadores que estejam com segregação distorcida sejam descartados antes mesmo de serem considerados. No caso de se utilizar marcadores microssatélites, todos os marcadores que apresentam robustez na amplificação e segregação são interpretados sem qualquer tendenciosidade de seleção e assim a taxa de distorção detectada é mais elevada. Isto pode ser constatado pela comparação de dois estudos que envolveram a construção de mapas genéticos entre híbridos interespecíficos de *Eucalyptus*. No primeiro, realizado por Myburg et al. (2003), com marcadores RAPD, foi verificada uma distorção de segregação em 28,5% dos marcadores e no segundo, desenvolvido por Missiaggia (2005), com marcadores microssatélites, o autor encontrou 40 a 50% de distorção.

Desta forma, as proporções de marcadores com distorção de segregação estimada neste trabalho, com marcadores microssatélites, aproximam-se com maior precisão das proporções reais a serem observadas

em cruzamentos de *Eucalyptus* envolvendo híbridos interespecíficos como genitores dos cruzamentos.

Além de tudo isso, pelo fato deste estudo ter considerado apenas marcadores do grupo de ligação três, reforça ainda mais o número elevado de marcas distorcidas. O grupo de ligação três apresenta-se sempre menos saturado em relação aos demais, como pode ser verificado no mapa construído por Brondani et al. (2002), a partir de 50 marcas SSR, em que o número de marcas por grupo de ligação variou de 2 (grupo 3) a 8 (grupo 10). Em outro mapa construído pelos mesmos autores (Brondani et al., 2006), mas com 230 marcadores SSR, o número de marcas no mapa variou de 12 (grupo 3) a 25 (grupo 5 e 8). Além da baixa saturação, o grupo de ligação três mostra ainda, um grande *gap* em uma mesma posição para os mapas descritos na literatura. No entanto, apesar desse problema evidente no grupo de ligação três, nenhum trabalho apresentou uma explicação comprovada para o fato.

Missiaggia (2005), em um estudo de mapeamento e detecção de QTLs em híbridos interespecíficos de *Eucalyptus* utilizando delineamento pseudo-cruzamento teste com base em marcadores microssatélites, atribuiu a distorção de segregação observada (43,05% para marcadores mapeados no genitor 235 e 54,71% para o genitor 221) à seleção pós-zigótica na F_1 devida ao encontro específico de alelos deletérios a genes ligados aos marcadores analisados. No entanto, o autor apenas aponta esta hipótese mais não a valida.

Neste trabalho foi pressuposto que a distorção de segregação observada para os locos do grupo de ligação três é causada por um gene letal localizado neste grupo, que afeta a formação dos gametas (seleção pré-zigótica). Essa hipótese foi comprovada com base no resultado do teste genotípico e gamético que evidenciou que a distorção ocorreu na formação do gameta masculino e foi verificada para todos os locos. Segundo Liang et al. (2006), quando um marcador esta sob seleção, marcadores ligados a ele exibirão distorção de segregação esperada não pelo fator seletivo que atua diretamente sobre este loco, mas única e exclusivamente pela ação indireta da existência da ligação fatorial com o loco sob distorção. Contrariamente, quando a distorção é causada por erros de genotipagem (Vogl & Xu, 2000) ou de duplicação da informação genética (Frisch et al., 2004), ela se

manifesta apenas em um loco específico de forma que locos vizinhos, pertencentes ao mesmo grupo de ligação, permanecem com o padrão de segregação mendeliano esperado.

Distorção de segregação causada por genes letais já foi descrita em outras culturas, como em sugi (Ohba, 1979; Kawasaki & Ohba, 1984; Tsumura et al., 1989), em soja (Yang et al., 2000) e em Café (Lashermes et al., 2001).

Em *Eucalyptus*, Young et al., (2000) e Missiaggia, (2005) atribuíram a elevada carga de distorção de segregação dos locos microssatélites ao encontro específico de alelos deletérios a genes ligados aos marcadores analisados. No entanto, nesses trabalhos não houve a preocupação de localizar os genes letais. Os locos de todos os grupos de ligação que apresentaram distorção foram apenas marcados com um asterisco no mapa, negligenciando a sua ligação com um possível gene sob efeito de letalidade.

Segundo Ferreira (2006), em um gene que está sob seleção (tem efeito letal) ocorre um gradiente da taxa distorção, ou seja, as marcas mais próximas da marca sob seleção, apresentam altas taxas de DS e à medida que as marcas se distanciam, diminuem os valores das taxas de DS. Dessa forma, foi proposto neste trabalho utilizar as taxas de distorção para verificar a ocorrência de gradiente de distorção, dentro do grupo de ligação três, que permitisse o mapeamento do gene letal putativo.

4.3. Taxa de segregação distorcida

4.3.1. Desenvolvimento teórico

A taxa de segregação distorcida pode ser estimada em diferentes populações como descrito por Ferreira (2006), em cruzamentos controlados: F₂, Retrocruzamento e RILS. Para populações exogâmicas, a taxa de distorção foi estimada pela primeira vez neste trabalho. Para o entendimento do processo de estimação é necessário primeiramente conhecer o processo de Ferreira (2006) para populações controladas, tomando como exemplo uma população de retrocruzamento.

Segundo Ferreira (2006), no estabelecimento da taxa de distorção gamética de um retrocruzamento espera-se que os valores de probabilidade de ocorrência de gametas A e a do pai heterozigoto seja diferencial. e admitindo que o valor da taxa possa ser representado por s e que o pai heterozigoto Aa produz os seguintes gametas tem-se:

$$f(A) = \frac{1}{2} + s$$

$$f(a) = \frac{1}{2} - s$$

Os indivíduos da população F₁ quando retrocruzado com o genitor recessivo aa proporcionará as seguintes classes genotípicas na descendência:

Gametas	a (1)
A ($\frac{1}{2} + s$)	Aa ($\frac{1}{2} + s$) (1) = ($\frac{1}{2} + s$)
a ($\frac{1}{2} - s$)	aa ($\frac{1}{2} - s$) (1) = ($\frac{1}{2} - s$)

Dessa forma, a população de retrocruzamento, com e sem distorção de segregação, é constituída pelos genótipos e as freqüências genotípicas especificadas a seguir:

Classes observadas (O)	Esperado (s=0)	Esperado (s≠0)
Aa (O ₁)	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2} + s$
aa (O ₂)	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2} - s$

Neste tipo de população, as freqüências genotípicas são dadas exatamente pelas freqüências gaméticas. Assim pode-se estabelecer a igualdade:

$$f(Aa) = \frac{1}{2} + s = \frac{O_1}{O_1 + O_2}$$

e

$$f(aa) = \frac{1}{2} - s = \frac{O_2}{O_1 + O_2}$$

Dessa forma, o valor da taxa de distorção gamética pode ser estimado por meio do estimador:

$$s = \frac{1}{2} - \frac{O_2}{O_1 + O_2} \quad \text{ou} \quad s = \frac{O_1}{O_1 + O_2} - \frac{1}{2}$$

Em que:

s = taxa de distorção gamética observada

O_1 = número de indivíduos Aa

O_2 = número de indivíduos aa

Como neste estudo a população é exogâmica e diferentes configurações de marcadores estão segregando, foi feita extrapolação dessa metodologia. Foram derivados estimadores para as diferentes configurações de marcadores, levando em consideração, se a distorção ocorre em um ou em ambos os parentais.

4.3.1.1. Distorção observada para um único genitor em cruzamentos entre genitores heterozigotos

Neste caso, independente do tipo de configuração entre genitores heterozigotos (V- $A_iA_j-A_iA_j$, VI- $A_iA_j-A_iA_k$; VII- $A_iA_j-A_kA_l$), a expressão é equivalente. Assim, supondo um cruzamento do tipo $A_iA_j \times A_kA_l$ em que a distorção ocorreu no genitor A_iA_j e admitindo que o valor da distorção possa ser representado por s , tem-se as seguintes frequências gaméticas para cada genitor:

- **Genitor (AiAj) :**

$$f(Ai) = \frac{1}{2} + s$$

$$f(Aj) = \frac{1}{2} - s$$

- **Genitor (AkAl)**

$$f(Ak) = \frac{1}{2}$$

$$f(Al) = \frac{1}{2}$$

Assim, as seguintes classes genotípicas serão observadas na descendência:

Gametas	Ak $\frac{1}{2}$	Al $\frac{1}{2}$	Total
Ai ($\frac{1}{2} + s$)	AiAk = ($\frac{1}{2} + s$) ($\frac{1}{2}$)	AiAl = ($\frac{1}{2} + s$) ($\frac{1}{2}$)	= O1
Aj ($\frac{1}{2} - s$)	AjAk = ($\frac{1}{2} - s$) ($\frac{1}{2}$)	AjAl = ($\frac{1}{2} - s$) ($\frac{1}{2}$)	= O2

Assim pode-se estabelecer que:

$$f(Ai_{-}) = (\frac{1}{2} + s) (\frac{1}{2}) + (\frac{1}{2} + s) (\frac{1}{2}) = \frac{O_1}{O_1 + O_2}$$

$$f(Ai_{-}) = \frac{1}{2} + s = \frac{O_1}{O_1 + O_2}$$

e

$$f(Aj_{-}) = (\frac{1}{2} - s) (\frac{1}{2}) + (\frac{1}{2} - s) (\frac{1}{2}) = \frac{O_2}{O_1 + O_2}$$

$$f(Aj_{-}) = \frac{1}{2} - s = \frac{O_2}{O_1 + O_2}$$

Dessa forma, o valor da taxa de distorção gamética pode ser estimada por meio do estimador:

$$s = \frac{O_1}{O_1 + O_2} - \frac{1}{2} \quad \text{ou} \quad s = \frac{1}{2} + \frac{O_2}{O_1 + O_2}$$

Em que:

s = taxa de distorção gamética observada

O_1 = número de indivíduos que portam o alelo A_i .

O_2 = número de indivíduos que portam o alelo A_j .

4.3.1.2. Distorção observada em um único genitor em cruzamentos entre genitores homozigotos e heterozigotos

Neste caso, independente do tipo de configuração entre genitores homozigotos e heterozigotos (III- $A_iA_i-A_iA_j$, IV- $A_iA_i-A_jA_k$), a expressão é equivalente. Assim supondo um cruzamento do tipo $A_iA_i \times A_jA_k$, em que a distorção ocorreu no genitor A_jA_k e admitindo que o valor da distorção possa ser representado por s , tem-se as seguintes frequências gaméticas para cada genitor:

- Genitor (A_iA_i) :

$$f(A_i) = 1$$

- Genitor (A_jA_k)

$$f(A_j) = \frac{1}{2} + s$$

$$f(A_k) = \frac{1}{2} - s$$

Assim, as seguintes classes genóticas serão observadas na descendência:

Gametas	Ai (1)
Aj ($\frac{1}{2} + s$)	AiAj ($\frac{1}{2} + s$) (1) = ($\frac{1}{2} + s$) = O_1
Ak ($\frac{1}{2} - s$)	AiAk ($\frac{1}{2} - s$) (1) = ($\frac{1}{2} - s$) = O_2

Assim, pode-se estabelecer que:

$$f(Aj_-) = (\frac{1}{2} + s) (1) = \frac{O_1}{O_1 + O_2}$$

$$f(Aj_-) = \frac{1}{2} + s = \frac{O_1}{O_1 + O_2}$$

e

$$f(Ak_-) = (\frac{1}{2} - s) (1) = \frac{O_2}{O_1 + O_2}$$

$$f(Ak_-) = \frac{1}{2} - s = \frac{O_2}{O_1 + O_2}$$

Dessa forma, o valor da taxa de distorção gamética pode ser estimada por meio do estimador:

$$s = \frac{O_1}{O_1 + O_2} - \frac{1}{2} \quad \text{ou} \quad s = \frac{1}{2} - \frac{O_2}{O_1 + O_2}$$

Em que:

s = taxa de distorção gamética observada

O_1 = número de indivíduos que portam o alelo Aj-

O_2 = número de indivíduos que portam o alelo A_k .

4.3.1.2. Distorção observada em ambos genitores

Neste caso, independente do tipo de cruzamento entre genitores heterozigotos (V- A_iA_j - A_iA_j , VI- A_iA_j - A_iA_k ; VII- A_iA_j - A_kA_l) ou genitores homozigotos e heterozigotos (III- A_iA_i - A_iA_j , IV- A_iA_i - A_jA_k), a expressão é equivalente. Supondo um cruzamento do tipo $A_iA_j \times A_kA_l$ e que a distorção ocorreu nos dois genitores e admitindo que o valor da distorção possa ser representado por s , tem-se as seguintes frequências gaméticas para cada genitor:

- Genitor (A_iA_j) :

$$f(A_i) = \frac{1}{2} + s$$

$$f(A_j) = \frac{1}{2} - s$$

- Genitor (A_kA_l)

$$f(A_k) = \frac{1}{2} + s$$

$$f(A_l) = \frac{1}{2} - s$$

Assim, as seguintes classes genótípicas serão observadas na descendência:

Gametas	$A_k (\frac{1}{2} + s)$	$A_l (\frac{1}{2} - s)$	Total
$A_i (\frac{1}{2} + s)$	$A_iA_k - (\frac{1}{2} + s)^2$	$A_iA_l - (\frac{1}{2} + s) (\frac{1}{2} - s)$	= O_1
$A_j (\frac{1}{2} - s)$	$A_jA_k - (\frac{1}{2} - s) (\frac{1}{2} - s)$	$A_jA_l - (\frac{1}{2} - s)^2$	= O_2

Pode-se estabelecer que:

$$f(Ai_-) = (\frac{1}{2} + s)^2 + (\frac{1}{2} + s) \cdot (\frac{1}{2} - s) = \left[\frac{O_1}{O_1 + O_2} \right]$$

$$f(Ai_-) = \frac{1}{2} + s = \frac{O_1}{O_1 + O_2}$$

e

$$f(Aj_-) = (\frac{1}{2} - s)^2 + (\frac{1}{2} - s) \cdot (\frac{1}{2} + s) = \frac{O_2}{O_1 + O_2}$$

$$f(Aj_-) = \frac{1}{2} - s = \frac{O_2}{O_1 + O_2}$$

Dessa forma, o valor da taxa de distorção gamética pode ser estimado por meio do estimador:

$$s = \frac{O_1}{O_1 + O_2} - \frac{1}{2} \quad \text{ou} \quad s = \frac{1}{2} - \frac{O_2}{O_1 + O_2}$$

Em que:

s = taxa de distorção gamética observada

O_1 = número de indivíduos que portam o alelo tipo 1 (A_i ou A_k)

O_2 = número de indivíduos que portam o alelo tipo 2 (A_j ou A_l)

4.3.2. Desenvolvimento aplicado

Pelos estimadores descritos, foi estimada a taxa de distorção a partir dos dados experimentais. Visto que, a distorção foi observada apenas em um parental (parental masculino), para todos os locos (incluindo locos

heterozigotos para ambos genitores e locos homozigotos para um genitor e heterozigoto para o outro) e os estimadores para estes casos são equivalentes, o seguinte estimador foi empregado para os diferentes locos.:

$$s = \frac{O_1}{O_1 + O_2} - \frac{1}{2}$$

Em que:

s = taxa de distorção gamética observada

O_1 = número de indivíduos que portam o alelo tipo 1

O_2 = número de indivíduos que portam o alelo tipo 2

As taxas de distorção são apresentadas na Tabela 4

Tabela 4 – Taxas de distorção (s) estimadas para cada loco marcador (EMBRA) considerando o número de indivíduos observados com o alelo tipo 1 (O_1) e do tipo 2 (O_2), em população exogâmica de irmãos completos derivadas do cruzamento interespecífico

Marcador	Observado (O1)	Observado (O2)	Taxa de distorção
EMBRA 189	78	9	0,39
EMBRA 227	88	16	0,34
EMBRA 122	13	92	0,37
EMBRA 171	67	32	0,17
EMBRA 125	58	32	0,14
EMBRA 239	56	34	0,12
EMBRA 181	73	49	0,09

Pode-se observar, com base nas taxas de distorção estimada para cada loco microssatélite, que ocorreu um gradiente de distorção. Pereira et al. (1994) observaram, em trabalho com sorgo, gradiente de distorção em que marcas mais próximas da marca sob seleção, apresentam altas taxas de DS e à medida que as marcas se distanciam, diminuem os valores das taxas de DS. Xu et al. (1997), também, verificaram que marcadores apresentavam progressiva redução de DS à medida que se distanciavam dos marcadores com razão de segregação mais severa. Assim mais uma vez é demonstrado e evidenciado a adequabilidade da hipótese, de um gene letal, proposta neste estudo, pois diferentes taxas de distorção foram encontradas.

Desta forma ao confirmar a existência de um gene letal, no grupo de ligação três, a partir das taxas de distorção, o passo seguinte foi o mapeamento desse gene putativo, ou seja, a estimação da porcentagem de recombinação entre cada marca distorcida e o gene letal.

4.4. Mapeamento do gene letal

4.4.1 Desenvolvimento teórico

Segundo Ferreira (2006), considerando uma população com dois locos (L/l e B/b), em que o loco L/l é letal e apresenta segregação distorcida, e a marca B/b segrega na proporção 1:1 e admitindo que a distorção é explicada por variação na probabilidade gamética do loco L/l, pode-se admitir os seguintes valores de probabilidade conjunta:

$$P(LB) = P(L) \cdot P(B/L) = \left(\frac{1}{2} + s\right) \cdot (1-r) = \frac{(1+2s)(1-r)}{2}$$

$$P(Lb) = P(L) \cdot P(b/L) = \left(\frac{1}{2} + s\right) r = \left(\frac{1+2s}{2}\right) r$$

$$P(IB) = P(l) \cdot P(B/l) = \left(\frac{1}{2} - s\right)r = \left(\frac{1-2s}{2}\right)r$$

$$P(lb) = P(l) \cdot P(b/l) = \left(\frac{1}{2} - s\right)(1-r) = \frac{(1-2s)(1-r)}{2}$$

Na Tabela 5 estão descritos os valores comparativos de freqüências gaméticas esperadas com e sem distorção.

Tabela 5 - Dados comparativos das freqüências gaméticas esperadas, sem e com distorção de segregação gamética

Gameta	Tipo	Freqüência (s=0)	Frequência (s≠0)
LB	Paternal	$\frac{1-r}{2}$	$p(1-r)$
Lb	Recombinante	$\frac{r}{2}$	pr
IB	Recombinante	$\frac{r}{2}$	qr
lb	Paternal	$\frac{1-r}{2}$	$q(1-r)$

em que: $p = (1 + 2s) / 2$ e $q = (1 - 2s) / 2$, sendo $p+q = 1$

Assim a distorção gamética, direta e indireta, pode ser observada por meio das seguintes considerações:

A segregação esperada para o Loco L/l (letal) é dada por:

$$f(L) = p(1-r) + pr = p$$

$$f(l) = qr + q(1-r) = q$$

A segregação esperada para o loco B/b também será distorcida, não pelo fator seletivo que atua diretamente sobre este loco, mas única e exclusivamente pela ação indireta, em razão da existência da ligação fatorial com o loco L/l sob distorção. Assim, tem-se:

$$f(B) = p(1-r) + qr = \frac{1}{2} + s - 2rs$$

$$f(b) = pr + q(1-r) = \frac{1}{2} - s - 2rs$$

Se o loco B/b está completamente ligado ao loco L/l, então $r = 0$ e se verifica:

$$f(B) = f(L) = \frac{1}{2} + s$$

$$f(b) = f(l) = \frac{1}{2} - s$$

Se o loco B/b tem distribuição independente de L/l, então $r = 1/2$ e se verifica:

$$f(B) = \frac{1}{2}$$

$$f(b) = \frac{1}{2}$$

Então, considerando a taxa de distorção gamética observada para um único parental em populações exogâmicas, como:

$$s = \frac{O_1}{O_1 + O_2} - \frac{1}{2}$$

e substituindo s por θ tem-se,

$$\theta = \frac{O_1}{O_1 + O_2} - \frac{1}{2}$$

Em que:

θ = taxa de distorção gamética observada

O_1 = número observado de indivíduos portadores do alelo do tipo 1

O_2 = número observado de indivíduos portadores do alelo tipo 2.

Portanto, se θ é a taxa de distorção então seu valor pode ser acrescentado na frequência do alelo B e diminuído do alelo b, como se segue:

$$f(B) = \frac{1}{2} + \theta$$

$$f(b) = \frac{1}{2} - \theta$$

Desta forma, pode-se concluir que θ esta em função de s e r e como a frequência do alelo B ligado ao letal é:

$$f(B) = \frac{1}{2} + s - 2rs$$

$$f(b) = \frac{1}{2} - s + 2rs$$

A seguinte expressão pode ser estabelecida:

$$\theta = s - 2rs$$

Considerando também o gene letal "L" em que o alelo l é letal e o alelo L é normal e sabendo que indivíduos portadores do alelo letal não se desenvolvem, teremos na população apenas indivíduos portadores do alelo L. Desta forma, a frequência do alelo l (letal) é igual a zero e, portanto, o valor de s equivale a $\frac{1}{2}$ como se segue:

$f(l) = \frac{1}{2} - s$ então para $f(l) = 0$, tem-se:

$$f(l) = \frac{1}{2} - \frac{1}{2} = 0$$

Assim, a partir de θ e sabendo que $s = \frac{1}{2}$ para o alelo letal, pode-se obter o valor da frequência de recombinação (r) dos demais locos em relação ao loco letal pela seguinte expressão:

$$s - 2rs = \theta$$

4.4.2. Desenvolvimento aplicado

4.4.2.1. Freqüência de recombinação entre pares de locos

A partir das estimativas desenvolvidas anteriormente foi calculado a freqüência de recombinação (r) para cada marcador microssatélite analisado conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – Freqüências de recombinação (r) estimadas para cada loco marcador (EMBRA) a partir das taxas de distorção (θ), na progênie derivada do cruzamento entre o genitor feminino 7074 e o genitor masculino 1213.

Marcador	Taxa de distorção (θ)	Freqüência de recombinação (r)
EMBRA 189	0,39	0,10
EMBRA 227	0,34	0,15
EMBRA 122	0,37	0,12
EMBRA 171	0,17	0,32
EMBRA 125	0,14	0,35
EMBRA 239	0,12	0,37
EMBRA 181	0,09	0,40

4.4.2.2. Posicionamento dos locos microssatélites no grupo de ligação três

Uma vez estimada a freqüência de recombinação de cada marcador, do grupo de ligação três, conhecendo a ordem dos marcadores com base no mapa genético referência para *Eucalyptus* (Brondani et al., 2006) e, ainda, sabendo da existência de um gradiente de distorção, foi possível ordenar os marcadores em relação ao gene letal (Figura 5).

O comprimento total do grupo de ligação três foi de 55,5 cM. A maior distância entre dois marcadores foi de 22,8 cM e ocorreu entre o EMBRA122

e o EMBRA 189 . O gene letal foi mapeado a 10,34 cM do marcador EMBRA 189 e a 12,38 cM do loco marcador EMBRA 122. Em relação ao mapa referência de *Eucalyptus* (Brondani et al., 2006); representado na figura 6, o mapa construído neste estudo, para o grupo de ligação três, foi consistente, apenas alguns locos vizinhos trocaram de posição.

A consistência do mapa demonstra a adequabilidade do mapeamento com base em taxas de distorção.

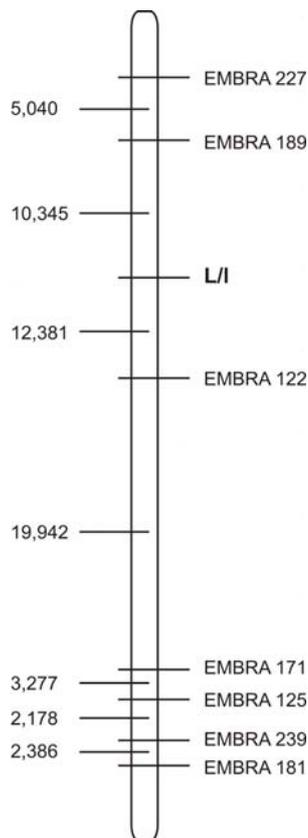


Figura 5 – Grupo de ligação três, mapeado com base nas taxas de distorção dos marcadores microssatélites. L/I = loco letal

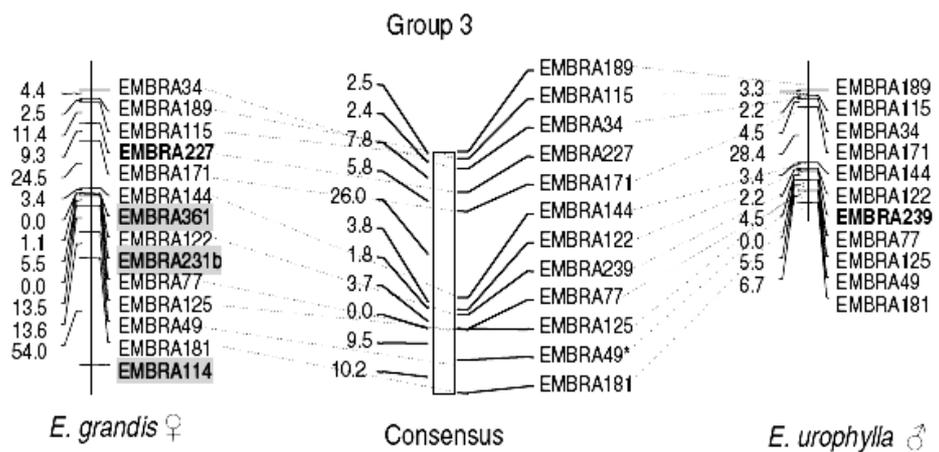


Figura 6 – Grupo de ligação 3, extraído do mapa de referência de Brondani et al. (2006).

5. CONCLUSÕES

- a distorção de segregação gamética detectada para sete dos nove oligonucleotídeos microssatélites e o gradiente de distorção observado para os locos marcadores do grupo de ligação três comprovou a hipótese de existência de um gene letal localizado neste grupo.
- os estimadores desenvolvidos para calcular as taxas de distorção de segregação e a porcentagem de recombinação entre locos distorcidos em populações de irmãos-completos foram adequados para mapear os locos microssatélites do grupo de ligação três em relação ao gene letal.
- o comprimento total do grupo de ligação três foi de 55,5 cM., sendo que o gene letal foi mapeado a 10,34 cM do loco marcador EMBRA 189 e a 12,38 cM do loco marcador EMBRA 122.
- o mapa construído com base nas taxas de distorção dos locos microssatélites do grupo de ligação três foi consistente com o mapa desenvolvido por Brondani, et al. (2006), em relação a ordem e a distância dos marcadores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C. & GRATTAPAGLIA, D. Towards the construction of a genus wide reference linkage map for *Eucalyptus* based on microsatellite markers. **Molecular and General Genomics**, v. 267, 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. **Plant Biology**, 6:20, 1-16, 2006.

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 Genetic**, v. 97, 816-827. 1998.

BUENO, N.W , JUNGHANS D.T. , ALFENAS A.C., BROMMONSCHENKEL S.H.; GRATTAPAGLIA, D. Localized mapping of the Puccinia psidii resistance (ppr1) locus in *Eucalyptus* with microsatellite markers Resumos do 50º Congresso Brasileiro de Genética. Resumo GP217. 2004

BYRNE M.; MURRELL J.C.; ALLEN, B. & MORAN, G.F. An integrated linkage genetic linkage map for *Eucalyptus* using RFLP, RAPD and isozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, 869 - 875. 1995.

CRUZ, C.D. **GQMOL**: Programa para análise de genética quantitativa molecular. Versão 2007.2.1. Desenvolvido pelo setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm

DOYLE, J.J & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.27, p. 13-15, 1990.

FERREIRA, A. **Mapeamento genético utilizando marcadores moleculares com distorção de segregação gamética e genotípica**. 2006. 132p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FRISCH, M.; QUINT, M.; LÜBBERSTEDT, T.; MELCHINGER, A.E. Duplicate marker loci can result in incorrect locus orders on linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.305-316. 2004.

GRATTAPAGLIA, D. & SEDEROFF R.R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers, **Genetics**, v. 137, 1121-1137, 1994.

GRATTAPAGLIA, D. Genômica Florestal. In: Luiz Mir. (Org.). Genômica. 1 ed. São Paulo, v. 1, p. 917-934, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; FALCÃO, C.L.; ALONSO, A.; PAPPAS, M.C.R.; LOURENÇO, R.T.; PÁDUA, J.G.; MAMANI, E.M.; PAPPAS JR, G.J. Development and mapping of EST-derived microsatellites in *Eucalyptus*. Proceedings of the IUFRO Tree Biotechnology Conference, 2005. Poster abstract 5.33.

HASEMAN, J.K. & ELSTON, R.C.. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. **Behav Genetics**, v 2:3-19. 1972.

KAWASAKI, H. & OHBA, K. Detection of embryonic lethal genes in Wogon-Yoresugi with selfing of S1 families. **Transactions of the 95 th Meeting of the Japanese Forestry Society**, p.336-337. 1984.

KY, C-L., BARRE, P., LORIEUX, M., THOUSLOT, P., AKAFFOU, S., LOUARN, J., CHARRIER, A., HAMON, S., NOIROT, M. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). **Theoretical and Applied Genetic**, v.101, p.669-676, 2000.

LASHERMES, P., COMBES, M.C., PRAKASH, N.S., TROUSLOT, P., LORIEUX, M., CHARRIER, A. Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meioses. **Genome**, v.44, p.589-596. 2001.

LIANG, X. S. ; ZHEN, X., S.; ZHEN, Z.T. Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology** v.3, p. 163-169, 2006.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland, USA: Sinauer Associates, Inc. Ed., 1998.

MARQUES, C. M., J. A. ARAÚJO, J. G. FERREIRA, R. WHETTEN, and D. M. O'MALLEY. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.727-737. 1998.

MISSIAGGIA, A.A. **Mapeamento genético de QTL para qualidade da madeira e florescimento precoce e estudos de expressão gênica alelo específica em *Eucalyptus* spp.** 2005. 236p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

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, 1028-1042. 2003.

NOVAES E. **Mapeamento de QTLs para qualidade da madeira em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e ancoragem de clones BAC no mapa genético.** 2006. 171p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

OHBA, K. **Detection of embryonic lethal genes in sugi, *Cryptomeria japonica*** D. Don. Transactions of the 90th Meeting of the Japanese Forestry Society. p. 257-258. 1979.

PEREIRA, M.G.; LEE, M.; BRAMEL-COX, P.; WOODMAN, W.; DOEBLEY, J.; WHITKUS, R. Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. **Genome**. v.37, p.236-243. 1994.

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, 379-387. 2002.

TSUMURA, Y.; UCHIDA, K.; OHBA, K. Genetic control of isozyme variation in needle tissues of *Cryptomeria japonica* **J. Hered**, v.80, p. 291-297. 1989.

VOGL, C. & XU, S. Multipoint mapping of viability and segregation distorting loci using molecular markers. **Genetics**, v.155, p. 1439-1447. 2000.

XU, Y.; ZHU, L.; XIAO, J.; HUANG, N.; MCCOUCH, S.R. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, double haploids, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). **Mol Gen Genet**, v.253, p.535-545. 1997.

YANG, W.; WEAVER, D.B.; NIELSEN, B.L.; QIU, J. A preliminary genetic linkage map of soybean using an intraspecific cross of two cultivars: 'peking' and 'lee'. **Soybean Genetics Newsletter**, v.27, 2000.

YOUNG, A.; BOYLE, T. J. B.; BOSCHER, D. **Forest conservation genetics: Principles and practice**. Australia: CSIRO, 2000. 352p.

CAPÍTULO III

Mapeamento de QTLs para resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em cruzamento interespecífico de *Eucalyptus* spp

1. RESUMO

A ocorrência da ferrugem causada pelo fungo *Puccinia Psidii* é limitante para as plantações de *Eucalyptus*. O plantio de genótipos de *Eucalyptus* resistentes a esse fungo é a medida mais recomendável de controle dessa doença. Dessa forma, torna-se imprescindível a detecção de genes responsáveis pela resistência à ferrugem, visando a seleção precoce de genótipos resistentes e a clonagem desses para sua transferência para genótipos suscetíveis de *Eucalyptus*. Assim, o objetivo desse trabalho foi o mapeamento de QTLs responsáveis pela resistência à ferrugem em um cruzamento interespecífico de *Eucalyptus* utilizando marcadores moleculares microssatélites. Para tanto, foram utilizadas informações fenotípicas, provenientes da avaliação da resistência para ferrugem, na família composta de 133 indivíduos e informações genotípicas de sete locos microssatélites (EMBRA 227, EMBRA 189, EMBRA 122, EMBRA 171, EMBRA 125, EMBRA 239, EMBRA 181) do grupo de ligação três. A detecção de QTL foi feita por meio das metodologias baseada em marca simples (ANOVA, contraste entre médias e regressão de Haseman e Elston) e pela metodologia baseada em intervalo simples (regressão de Fulker e Cardon). As metodologias de marcas simples evidenciaram associação significativa para os marcadores EMBRA 181 e EMBRA 125 com o QTL de resistência à ferrugem, sendo que associação mais significativa foi detectada para o marcador EMBRA 125. No entanto pelos três métodos, baseados em marca simples, não foi possível localizar a posição do QTL. O método de intervalo simples além de detectar maior significância para o marcador EMBRA 125 ($F=67,31$) localizou o QTL. O QTL foi mapeado a 0,002 cM do EMBRA 125 e explicou 42% da variação fenotípica. Em função da proximidade física entre o marcador EMBRA 125 e o QTL para resistência e por explicar grande proporção da variância fenotípica, abre-se a possibilidade do uso desse marcador em seleção assistida e eventual clonagem posicional do gene de resistência.

2. INTRODUÇÃO

Com o aumento das áreas plantadas com *Eucalyptus*, o uso de espécies suscetíveis e a reutilização da mesma área para plantio foram criadas condições favoráveis à ocorrência de doenças. Uma das doenças de maior importância nessa cultura é a ferrugem causada pelo fungo *Puccinia psidii* em virtude do seu alto impacto nos plantios seminais e clonais que reduz o crescimento e provoca a morte das mudas para plantio (Alfenas & Zauza, 2007).

O uso de genótipos resistentes é a medida mais recomendável de controle da ferrugem (Alfenas et al., 2004). Neste contexto, o mapeamento de QTLs relacionados à ferrugem torna-se de suma importância para programas de melhoramento baseado em seleção assistida por marcadores. Uma vez detectado marcas ligadas aos QTLs, responsável pelo controle da ferrugem, estas podem ser usadas para seleção precoce de genótipos resistentes, assim como guias para clonagem de genes de resistência visando a incorporação desses em genótipos suscetíveis.

Contudo, a detecção de QTLs em populações exogâmicas, assim como o mapeamento, é mais complexo em relação a populações endogâmicas. Em cruzamentos exogâmicos, podem estar segregando até quatro alelos do QTL e não apenas dois como em populações endogâmicas. Dessa forma, para que uma quantidade mínima de indivíduos seja informativa, é necessária a utilização de marcadores altamente polimórficos, multialélicos e co-dominantes, como os microssatélites para o rastreamento, compreensão e manipulação adequada de toda a variabilidade alélica que segrega para os QTLs.

Além do tipo de marcador empregado, a capacidade de detecção e caracterização dos QTL's dependem da magnitude do seu efeito sobre a

característica, bem como da herdabilidade da característica (Lynch & Walsh, 1998).

Em *Eucalyptus*, o gene para resistência a ferrugem (*Puccinia psidii*) foi identificado por Junghans et al. (2003a) em uma família de irmãos completos de *Eucalyptus grandis*. O gene, denominado *Ppr-1* é dominante e foi mapeado com base em marcadores RAPD. Entretanto, em função das limitações inerentes a técnica de RAPD, o uso do gene *Ppr-1* tem ficado restrita ao pedigree utilizado no seu mapeamento, limitando o compartilhamento de dados e a possibilidade de sua validação, aspecto absolutamente fundamental para seleção assistida por marcadores.

As metodologias estatísticas de mapeamento de QTLs em populações exogâmicas se baseiam na análise de marca simples (ANOVA, contraste entre médias e regressão de Haseman & Elston, 1972) e de intervalo simples (regressão de Fulker & Cardon, 1994) . As metodologias de mapeamento baseadas em marca simples permitem estimar a associação entre um determinado marcador e o QTL, mas não é possível determinar a posição do QTL em relação ao marcador testado e nem o seu efeito. Isto significa que não é possível determinar se a ligação detectada entre o QTL e o marcador deve-se a um QTL de grande efeito localizado longe do marcador, ou devido a um QTL de pequeno efeito, mas muito próximo ao loco marcador (Martinez & Vukasinovic, 2000).

A metodologia baseada em intervalo simples é considerada vantajosa em relação a marca simples por permitir a detecção precisa da localização dos QTLs nos grupos de ligação, assim, como estimativas dos seus efeitos (Lynch & Walsh, 1998)

Assim, o objetivo desse trabalho foi o mapeamento de QTLs, por diferentes metodologias estatísticas, para resistência à ferrugem utilizando marcadores microssatélites em uma família interespecífica de irmãos completos de *Eucalyptus ssp.*

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Informação fenotípica

Na análise de detecção de QTLs responsáveis pela resistência à ferrugem foi utilizada a informação fenotípica referente ao genitor feminino *E. grandis* (7074), ao genitor masculino híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* (1213) e a progênie composta de 131 indivíduos. A informação fenotípica foi obtida pela avaliação, quanto à resistência à ferrugem, realizada aos 12 e 20 dias após a inoculação do patógeno, utilizando-se a escala de notas preconizada por Junghans et al. (2003b), com quatro graus de severidade, sendo S0 e S1 resistentes e S2 e S3 suscetíveis. Para a análise de QTL foi considerada as informações das quatro classes fenotípicas separadamente (S0, S1, S 2 e S 3) ao invés do padrão binário (resistente vs suscetível). Assim, as técnicas de detecção de QTLs foram aplicadas a dados de uma variável discreta multicategórica.

3.2. Informação genotípica

Foram utilizadas as informações genotípicas, multialélicas e co-dominantes dos sete locos microssatélites do grupo de ligação três (EMBRA 227, EMBRA 189, EMBRA 122, EMBRA 171, EMBRA 125, EMBRA 239, EMBRA 181).

A escolha do grupo de ligação três foi baseada no conhecimento prévio da existência de um gene de resistência à ferrugem, mapeado neste grupo, por Bueno et. al. (2004)

Todas as análises foram realizadas no programa GQMOL (Cruz 2007).

3.3. Método de detecção de QTL

3.3.1. Mapeamento por marca simples

ANOVA e Contraste entre médias

Na detecção de QTLs por meio da análise de variância (ANOVA) foi empregado o seguinte modelo linear simples com apenas um fator:

$$y_{ij} = \mu + M_i + \varepsilon_{ij}$$

em que,

y_{ij} : valor da característica no j -ésimo indivíduo ($j=1,2\dots n_i$) portador do i -ésimo genótipo do marcador ($i=1,2,3,4$ – para famílias completamente informativas);

μ : média da população;

M_i : efeito do i -ésimo alelo do marcador

ε_{ij} : erro aleatório $\sim N(0, \sigma^2)$

A análise de variância foi realizada para verificar a existência de diferença significativa em relação às médias dos indivíduos na descendência, agrupados segundo as classes genotípicas do marcador. O modelo, com um único fator foi empregado para decompor a variação entre e dentro das classes genotípicas dos marcadores. O esquema da análise de variância empregado está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Análise de Variância para detecção de QTL pelo modelo linear inteiramente casualizado

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>H₀</i>
Marcador	$g - 1$	QMM	QMM/QMR	$\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_g$
Resíduo	$N - g - 1$	QMR		
Total	$N - 1$			

g: número de classe genotípica associada ao marcador

A ANOVA permite avaliar a existência de diferença significativa entre as médias dos genótipos avaliados. Um teste adicional foi utilizado, baseado na estatística t, que possibilita avaliar a existência de diferença significativa entre médias de indivíduos portadores de alelos específicos. Para tanto, foram considerados os diferentes tipos de configuração e de informatividade, de cada loco marcador (EMBRA227, EMBRA 189, EMBRA 122, EMBRA 125, EMBRA 239 e EMBRA 181) para formação dos contrastes. Dessa forma, a descendência do cruzamento, irmãos completos, entre os genitores 7074 e 1213 gerou diferentes configurações de médias associados à diferentes probabilidades condicionais $P(Q_j|M_i)$.

Para exemplificar a metodologia de contrastes entre médias será considerado um cruzamento totalmente informativo entre o genitor 1 (A_1Q_1/A_2Q_2) x genitor 2 (A_3Q_3/A_4Q_4). Assim, na Tabela 2 estão dispostos os genótipos e as respectivas probabilidades condicionais $P(Q_j|M_i)$ para este tipo de cruzamento.

Tabela 2. Probabilidades condicionais, constituição genotípica e valores médios de genótipos de QTL em família de irmão completo completamente informativa supondo que a frequência de recombinação entre M e Q seja r

P(Q _j M _i) ¹	Gametas	(1-r)	r	r	(1-r)
		M ₃ Q ₃	M ₃ Q ₄	M ₄ Q ₃	M ₄ Q ₄
(1-r)	M ₁ Q ₁	M ₁ M ₃ ($\mu_{Q_1Q_3}$)	M ₁ M ₃ ($\mu_{Q_1Q_4}$)	M ₁ M ₄ ($\mu_{Q_1Q_3}$)	M ₁ M ₄ ($\mu_{Q_1Q_4}$)
r	M ₁ Q ₂	M ₁ M ₃ ($\mu_{Q_2Q_3}$)	M ₁ M ₃ ($\mu_{Q_2Q_4}$)	M ₁ M ₄ ($\mu_{Q_2Q_3}$)	M ₁ M ₄ ($\mu_{Q_2Q_4}$)
r	M ₂ Q ₁	M ₂ M ₃ ($\mu_{Q_1Q_3}$)	M ₂ M ₃ ($\mu_{Q_1Q_4}$)	M ₂ M ₄ ($\mu_{Q_1Q_3}$)	M ₂ M ₄ ($\mu_{Q_1Q_4}$)
(1-r)	M ₂ Q ₂	M ₂ M ₃ ($\mu_{Q_2Q_3}$)	M ₂ M ₃ ($\mu_{Q_2Q_4}$)	M ₂ M ₄ ($\mu_{Q_2Q_3}$)	M ₂ M ₄ ($\mu_{Q_2Q_4}$)

¹: Probabilidade condicional de ocorrer o alelo Q_j (Q₁ ou Q₂ para P₁; Q₃ ou Q₄ para P₂) entre indivíduos portadores do alelo M_i (M₁ ou M₂ para P₁; M₃ ou M₄ para P₂)

As médias esperadas de cada classe de marcador foram obtidas multiplicando-se o valor genotípico médio do QTL pela sua probabilidade condicional, somando-se todas as ocorrências dentro de cada classe genotípica, para cada loco marcador analisado.

Para verificar a ligação entre o QTL (Q) e cada marcador (A) as médias dos indivíduos com os diferentes alelos para cada loco marcador foram agrupadas de modo a formar um grupo de médias de alelos para o genitor feminino (μ_1 e μ_2) e para o genitor masculino (μ_3 e μ_4) e dessa forma, estabelecer o contraste entre alelos de um dado genitor.

Tomando como exemplo uma população totalmente informativa para loco marcador e para o QTL, o seguinte contraste pode ser estabelecido, para o genitor 1:

$$\delta = \mu_1 - \mu_2 = (1 - 2r) \left(\frac{\mu_{Q1Q3} + \mu_{Q1Q4}}{2} - \frac{\mu_{Q2Q3} + \mu_{Q2Q4}}{2} \right)$$

Os valores estimados dos contrastes foram obtidos a partir dos seguintes estimadores:

$\hat{\mu}_1 = \hat{\mu}_{A1}$: correspondente à média da característica quantitativa dos indivíduos portadores do alelo A_1 do genitor 1.

$\hat{\mu}_2 = \hat{\mu}_{A2}$: correspondente à média da característica quantitativa dos indivíduos portadores do alelo A_2 do genitor 1.

Assim, o contraste estimado é obtido por:

$$\hat{\delta} = \hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2$$

As médias dos genótipos relativos ao loco Q foram expressas em função dos efeitos aditivos (α_i) e devido a dominância ($\delta_{ii'}$), como se segue:

$$\delta = (1 - 2r) \left[(\alpha_1 - \alpha_2) + \frac{\delta_{13} + \delta_{14}}{2} - \frac{\delta_{23} + \delta_{24}}{2} \right]$$

Para avaliar $H_0 : \delta = 0$ utilizou-se a estatística t definida pela expressão:

$$t = \frac{\hat{\delta}}{\sqrt{\hat{V}(\hat{\delta})}} = \frac{\hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2}{\sqrt{\hat{V}(\hat{\mu}_1) + \hat{V}(\hat{\mu}_2)}} \text{ associada a } n_1 + n_2 - 2 \text{ graus de liberdade}$$

sendo:

n_1 : número de indivíduos da FIC que apresentam alelo A_1 ;

n_2 : número de indivíduos da FIC que apresentam alelo A_2 .

De forma análoga foi avaliado o contraste considerando as informações do genitor 2, dado por:

$$\delta = \mu_3 - \mu_4 = (1 - 2r) \left(\frac{\mu_{Q1Q3} + \mu_{Q2Q3}}{2} - \frac{\mu_{Q1Q4} + \mu_{Q2Q4}}{2} \right)$$

Regressão de Haseman & Elston (1972)

Esta estratégia baseou-se numa regressão em que a variável dependente (Y_j) é estabelecida pelo quadrado da diferença fenotípica entre os indivíduos do j -ésimo par de irmãos e a variável independente é dada pelo valor de alelos idênticos por descendência (IBD) do par de irmãos considerados.

O modelo adotado foi:

$$Y_j = \beta_0 + \beta_1 \pi_j + \varepsilon_j, \text{ em que}$$

$Y_j = (X_{1j} - X_{2j})^2$, sendo X_{1j} e X_{2j} os valores observados da característica para o primeiro e o segundo irmão do j -ésimo par;

$\pi_j = \frac{1}{2} f_{j1} + f_{j2}$, sendo f_{j1} a probabilidade de que o j -ésimo par de irmão tenha 1 alelo IBD e f_{j2} a probabilidade de que o j -ésimo par de irmão tenha 2 alelos IBD.

β_0 e β_1 são os parâmetros do modelo.

Como X_{1j} e X_{2j} são os valores observados da característica para o primeiro e o segundo irmão, respectivamente, no j -ésimo par, foi assumido o seguinte modelo geral:

$$X_{1j} = \mu + g_{1j} + e_{1j}$$

e

$$X_{2j} = \mu + g_{2j} + e_{2j}$$

em que:

μ : média geral;

g_{ij} : efeito genético associado ao indivíduo i do j -ésimo par de irmãos;

e_{ij} : efeito ambiental sobre o indivíduo i do j -ésimo par de irmãos.

Neste modelo foi assumido que a população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg e que somente dois alelos, Q_1 e Q_2 , com frequência p e q , respectivamente, estão envolvidos na determinação de g_{ij} . Também foi

assumido a escala de valores genotípicos a , d e $-a$, para Q_1Q_1 , Q_1Q_2 e Q_2Q_2 , respectivamente. Dessa forma, a variância genotípica σ_G^2 do caráter é estabelecida pelos componentes σ_A^2 , que mede a variância aditiva, e σ_D^2 , que mede a variância devida aos desvios da dominância, dadas por:

$$\sigma_A^2 = 2pq\alpha^2$$

$$\sigma_D^2 = (2pqd)^2$$

em que $\alpha = a + d(q - p)$ é o efeito médio de substituição gênica.

Reunindo as informações das diferenças quadráticas (Y_j) e das frequências esperadas para cada par de irmãos condicionais à π_j (Tabela 3), foi possível calcular a esperança $E(Y_j | \pi_j)$. Dessa forma, são obtidos os seguintes valores:

$$E(Y_j | \pi_j = 1) = E[e_j^2 (p^2 + q^2 + 2pq)] = E(e_j^2) = \sigma_e^2$$

$$E(Y_j | \pi_j = 1/2) = E[e_j^2 (p^3 + q^3 + pq)] + E\{p^2q[(a-d+e_j)^2 + (-a+d+e_j)^2]\} \\ + E\{pq^2[(a+d+e_j)^2 + (-a-d+e_j)^2]\} = \sigma_e^2 + \sigma_A^2 + 2\sigma_D^2$$

e, de forma análoga,

$$E(Y_j | \pi_j = 0) = \sigma_e^2 + 2\sigma_A^2 + 2\sigma_D^2$$

Tabela 3. Freqüências esperadas para cada par de irmãos, considerando os valores de π_j , e a sua diferença quadrática Y_j

Par de irmãos	Y_j	Probabilidade condicional (ipd)		
		$\pi_j = 0$	$\pi_j = 1/2$	$\pi_j = 1$
$Q_1Q_1 - Q_1Q_1$	e_j^2	p^4	p^3	p^2
$Q_2Q_2 - Q_2Q_2$	e_j^2	q^4	q^3	q^2
$Q_1Q_2 - Q_1Q_2$	e_j^2	$4p^2q^2$	pq	$2pq$
$Q_1Q_1 - Q_1Q_2$	$(a - d + e_j)^2$	$2p^3q$	p^2q	0
$Q_1Q_2 - Q_1Q_1$	$(-a + d + e_j)^2$	$2p^3q$	p^2q	0
$Q_1Q_2 - Q_2Q_2$	$(a + d + e_j)^2$	$2pq^3$	pq^2	0
$Q_2Q_2 - Q_1Q_2$	$(-a - d + e_j)^2$	$2pq^3$	pq^2	0
$Q_1Q_1 - Q_2Q_2$	$(2a + e_j)^2$	p^2q^2	0	0
$Q_2Q_2 - Q_1Q_1$	$(-2a + e_j)^2$	p^2q^2	0	0

Admitido que $\sigma_D^2 = 0$ e ligação completa entre o marcador e o QTL, pode ser generalizado:

$$E(Y_j | \pi_j) = (\sigma_e^2 + 2\sigma_A^2) - 2\sigma_A^2\pi_j$$

que pode ser reescrito pelo modelo:

$$E(Y_j | \pi_j) = \beta_0 + \beta_1\pi_j$$

em que

$$\beta_0 = \sigma_e^2 + 2\sigma_A^2$$

$$\beta_1 = -2\sigma_A^2$$

Logo, conhecendo-se π_j é possível ajustar uma equação linear por regressão a partir do modelo $E(Y_j | \pi_j) = \beta_0 + \beta_1\pi_j$ em que $-1/2\beta_1$ é um estimador não viesado de σ_A^2 .

Quando o QTL e o marcador não estiverem completamente ligados, a proporção esperada de IBD do QTL deve ser estimada indiretamente pela IBD

do marcador, cuja informação é disponibilizada nas análises moleculares. Assim, ao se substituir π_j por $\hat{\pi}_j$ têm-se o seguinte modelo:

$$E(Y_j | \hat{\pi}_j) = \beta_0 + \beta_1 \hat{\pi}_j$$

Considerando-se o caso especial de ausência de dominância e completa informação sobre os genitores, tem-se que:

$$\beta_1 = -2(1-2r)^2 \sigma_A^2$$

em que r é a porcentagem de recombinação entre os locos do marcador e o controlador da característica avaliada.

Uma fração da herdabilidade do QTL foi estimada por meio da expressão:

$$h_p^2 = (1-2r)^2 h_p^2 = -\frac{\hat{\beta}_1}{2\hat{\sigma}_F^2}$$

em que:

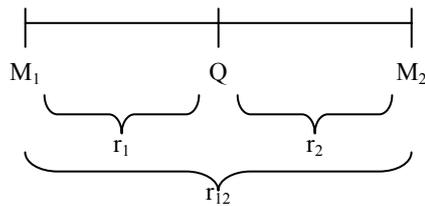
$\hat{\sigma}_F^2$ é a variância fenotípica da característica

3.3.2. Mapeamento por intervalo simples

Regressão de Fulker & Cardon (1994)

Para realização dessa metodologia, a proporção IBD de marcas adjacentes em um grupo de ligação foram usadas para estimar a proporção de alelos IBD de um possível QTL ao longo do intervalo entre as marcas. A posição que confere um melhor ajuste da regressão foi tomada como a posição estimada do QTL no grupo de ligação. Assim, foi possível obter estimativas do efeito do QTL sobre a variância genética aditiva e de sua posição separadamente.

Considera-se nesta metodologia a existência de dois locos marcadores (M_1 e M_2) que flanqueiam o loco Q controlador da característica quantitativa. Também é admitido que r_1 representa a porcentagem de recombinação entre M_1 e Q, e r_2 representa a porcentagem de recombinação entre Q e M_2 , conforme ilustrado a seguir:



Nesta ilustração, r_{12} representa a fração de recombinação entre os locos flanqueadores, a qual pode ser estimada por metodologia de máxima verossimilhança a partir dos dados observados nas famílias de irmãos. Pela metodologia de Haseman & Elston (1972), a análise separada para cada loco do marcador produz os seguintes resultados:

a) Para a marca M_1 : $\beta_1 = -2(1 - 2r_1)^2 \sigma_A^2$

b) Para a marca M_2 : $\beta_2 = -2(1 - 2r_2)^2 \sigma_A^2$

Como r_1 , r_2 e r_{12} podem ser relacionados por meio de uma determinada função de mapeamento, torna-se possível obter solução única para σ_A^2 . Entretanto, se a posição do QTL fosse exatamente conhecida e houvesse informação sobre o valor de π_{qj} para este loco particular então, segundo Haseman & Elston (1972), ter-se-ia a seguinte relação:

$$E(Y_j | \pi_{jq}) = \beta_0 + \beta_q \pi_{jq}$$

em que $\beta_q = -2\sigma_A^2$

Assim, substituindo o valor de β_q nas estimativas de β_1 e β_2 , obtêm-se:

$$\beta_1 = (1 - 2r_1)^2 \beta_q$$

$$\beta_2 = (1 - 2r_2)^2 \beta_q$$

Essa metodologia fundamenta-se em usar as estimativas de $\hat{\pi}_{1j}$ e $\hat{\pi}_{2j}$ para estimar os valores da taxa de alelos IBD entre os pares de irmãos para o loco Q, definido por π_{qj} , assumindo uma faixa de valores da porcentagem de

recombinação entre os locos M₁ e M₂. A estimação de π_{qj} é feita por meio da equação de regressão:

$$\hat{\pi}_{qj} = \beta_0 + \beta_{\pi_1} \hat{\pi}_{1j} + \beta_{\pi_2} \hat{\pi}_{2j} + \varepsilon_j$$

A solução para o sistema acima é dada por:

$$\hat{\beta}_{\pi_1} = \frac{(1-2r_1)^2 - (1-2r_{12})^2(1-2r_2)^2}{1-(1-2r_{12})^4}$$

$$\hat{\beta}_{\pi_2} = \frac{(1-2r_2)^2 - (1-2r_{12})^2(1-2r_1)^2}{1-(1-2r_{12})^4}$$

e

$$\beta_0 = \bar{\pi}_q - \hat{\beta}_{\pi_1} \bar{\pi}_1 - \hat{\beta}_{\pi_2} \bar{\pi}_2 = (1 - \hat{\beta}_{\pi_1} - \hat{\beta}_{\pi_2}) / 2$$

Depois de obtida a estimativa de $\hat{\pi}_{qj}$ para uma determinada posição do loco Q, este valor é utilizado como variável independente no modelo de regressão $Y_j = \beta_0 + \beta_q \pi_{qj}$. Ressalta-se que, para uma determinada posição entre M₁ e M₂, devem ser obtidas estimativas de $\hat{\pi}_{qj}$ para C_n^2 combinações de pares de irmãos. Dessa forma, é possível realizar a regressão com base nos valores de Y_j e $\hat{\pi}_{qj}$ estimados para cada par de irmãos.

Para cada valor de r_1 e r_2 , assumido dentro do intervalo r_{12} para a posição de Q, será obtida uma estimativa de $\hat{\beta}_q$ com base no modelo $Y_j = \beta_0 + \beta_q \pi_{qj}$. Se este intervalo é dividido X vezes, haverá X conjuntos de estimativas de $\hat{\beta}_q$. Desse modo é possível realizar X regressões, permitindo escolher a equação dentro do intervalo que apresente a menor soma de quadrados residuais ou com maior ajuste R^2 . Nessa posição a estimativa de $\hat{\beta}_q$, que corresponde ao critério ótimo de escolha da equação de regressão, permite determinar a posição do QTL e o valor da contribuição dada pelo QTL para a variância aditiva σ_A^2 do caráter, estimada por $-\beta_q / 2$.

Para que a análise completa do grupo de ligação três fosse efetuada, bastou obter estimativas de $\hat{\beta}_q$ para todos os intervalos do grupo. Estes

valores foram plotados em um gráfico utilizando-se o valor de R^2 para as estimativas de $\hat{\beta}_q$ no eixo das ordenadas e os valores das distâncias nos intervalos no eixo das abscissas.

A herdabilidade do QTL foi estimada pela expressão:

$$h^2 = \frac{\hat{\beta}_q}{2\hat{\sigma}_F^2}$$

Sendo $\hat{\sigma}_F^2$ a variância fenotípica da característica estudada.

A estatística F foi utilizada para avaliar a existência de QTLs nos intervalos dentro do grupo de ligação 3. Para a declaração do QTL foi adotado valor de F crítico igual a 10,828 e nível de significância de 0,1%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Mapeamento por marca simples

ANOVA e Contraste entre média

Pela análise de variância verificou-se que os marcadores EMBRA 125 EMBRA 181 e EMBRA 171 tiveram efeito significativo, pelo teste F a 5% de probabilidade, quanto à ligação ao QTL de resistência à ferrugem, no cruzamento analisado. O marcador EMBRA 125 foi o que apresentou o maior valor de F (6,60) e, portanto, maior efeito (Tabela 4).

Apesar da ANOVA identificar marcadores associados à QTLs responsáveis pela resistência à ferrugem, ela não permite identificar qual dos genitores possuem alelos favoráveis à manifestação do caráter. Dessa forma, a estratégia adicional de análise de QTLs por contraste de médias foi empregada visando identificar a influência dos alelos de cada genitor sobre a característica.

Tabela 4. Análise de Variância para os marcadores do grupo de ligação três (E) derivadas do cruzamento entre o genitor feminino 7074 e o genitor masculino 1213

Progênie										
Marca	Pais	A1A1	A1A2	A1A3	A1A4	A2A3	A2A4	QMT	QMR	F
E227	12x34				1,50 ⁽¹⁾	1,31	1,50	0,24	1,80	1,13 ns
				0	52 ⁽²⁾	16	36			
E189	12x34			1,70	0,0	1,66	1,43	1,94	1,77	1,09 ns
				43	2	35	7			
E122	12X34				1,10	1,54	1,62	3,37	1,74	1,93ns
				0	49	13	43			
E 171	11x12	1,23	1,72					6,37	1,72	3,68*
		32	67							
E 125	12x13	1,64	0,72	1,96		2,17		9,83	1,49	6,60**
		22	36	26		6				
E239	12x34			1,13	1,55	1,74	1,14	1,95	1,69	1,15 ns
				15	27	19	29			
E181	12x13	0,7	1,70	1,19		0,0		4,88	1,68	2,90*
		10	63	48		1				

(1): Valor médio da característica

(2): Número de indivíduos

* : Valor abaixo do nível crítico especificado (5%)

ns: Valor acima do nível crítico especificado (5%)

Por meio da análise de contraste de médias (Tabela 5) verificou-se que para os marcadores EMBRA 227, EMBRA 189, EMBRA 122 e EMBRA 239, os contrastes não foram significativos pelo teste t a 1% de probabilidade, indicando que não existe associação entre os alelos desses marcadores, para ambos os genitores, e o possível QTL de resistência à ferrugem. Ao contrário para os marcadores EMBRA 171, EMBRA 125, EMBRA 181 e EMBRA 122 o teste t evidenciou que existe uma associação desses locos marcadores com o QTL, sendo que a origem dos alelos significantes variou entre esses marcadores. Assim, para o marcador EMBRA 125 o teste t foi significativo para ambos os parentais, ou seja todos os alelos segregantes estão associados ao QTL de ferrugem. Para o marcador EMBRA 171 foram significantes os alelos originados do parental masculino (1213) e para o EMBRA 181 apenas os alelos do genitor feminino (7074) tiveram associação significativa ao QTL de resistência à ferrugem.

O teste de contraste de médias também evidenciou maior significância para o marcador EMBRA 125 (Tabela 5).

Pelos métodos da ANOVA e de contraste de médias, apenas o efeito de associação entre um determinado marcador e o QTL pôde ser estimado, não sendo possível determinar a posição do QTL em relação ao marcador testado. Assim, a maior significância do EMBRA 125 em ambos os teste é resultado da ação confundida da distância entre esse marcador e o QTL, do efeito aditivo e do efeito de dominância do QTL, não sendo possível diferenciar se essa grande significância deve-se a presença de um QTL de maior efeito para expressão da resistência à ferrugem ou se é devido a proximidade desse marcador a um QTL de menor efeito.

Apesar do confundimento entre efeito e posição, a metodologia de mapeamento por marca simples (ANOVA e contraste de média) por não necessitar da informação prévia de ordenamento das marcas ao longo dos grupos de ligação, é útil como uma primeira análise exploratória dos dados. Assim, por este método há um primeiro indício de um putativo QTL de resistência a ferrugem ligado ao EMBRA 125. Entretanto, para validar a existência desse QTL foram realizados outros testes.

Tabela 5. Resultado da análise de contraste entre médias para os marcadores (E) derivadas do cruzamento entre o genitor feminino 7074 e o genitor masculino 1213.

Marca	Genitores	N1	N2	M(Ai)	M(Aj)	Var(M1)	Var(M2)	t	P (%)
E 227	♀ 12x34	52	52	1,50	1,44	0,03	0,03	0,22	82,08 ns
E227	♂ 12x34	16	88	1,31	1,50	0,09	0,02	0,54	59,36 ns
E189	♀ 12x34	45	42	1,62	1,61	0,03	0,04	0,01	98,77 ns
E189	♂ 12x34	78	9	1,68	1,11	0,02	0,20	1,18	23,67 ns
E122	♀ 12x34	49	56	1,10	1,60	0,10	0,03	1,96	4,96*
E122	♂ 12x34	13	92	1,53	1,34	0,14	0,01	0,46	64,78 ns
E 171	♂11x12	32	67	1,78	1,23	0,04	0,02	1,98	4,78*
E125	♀12x13	48	42	1,81	0,92	0,03	0,03	3,33	0,14**
E125	♂ 12x13	58	32	1,06	2,00	0,02	0,04	3,37	0,12**
E239	♀ 12x34	42	48	1,40	1,37	0,04	0,03	0,10	91,16 ns
E239	♂ 12x34	34	56	1,47	1,33	0,05	0,04	0,45	65,26 ns
E181	♀ 12x13	58	64	1,10	1,67	0,03	0,02	2,40	1,69*
E181	♂ 12x13	73	49	1,56	1,16	0,02	0,03	1,63	10,11ns

* : Valor abaixo do nível crítico especificado (5%)

ns: Valor acima do nível crítico especificado (5%)

Regressão de Haseman & Elston (1972)

O resultado da regressão segundo Haseman e Elston (1972) está apresentado na tabela 5.

Tabela 6. Regressão de Haseman e Elston (1972) para família de irmãos completos, derivadas do cruzamento entre os genitores 7074 e 1213, genotipada com sete marcadores do grupo de ligação três.

Marca	IBD	B0	B1	R ² (%)	F	Prob	h_p^2
E 227	0,61	3,33	0,32	0,091	4,921	0,02 *	-0,09
E189	065	3,59	-0,07	0,009	0,353	1,0 ns	0,02
E122	0,63	3,70	- 0,25	0,049	2,674	0,10 ns	0,07
E171	0,52	3,58	-0,71	0,002	0,10	1,0 ns	0,20
E125	0,51	4,19	-1,27	1,653	67,31	0,0 **	0,37
E239	0,51	3,36	0,06	0,004	0,1678	1,0 ns	- 0,017
E181	0,50	3,64	-0,23	0,083	6,150	0,01 *	0,067

Variância fenotípica : 1,7028

h_p^2 = fração da herdabilidade do QTL

* : Valor abaixo do nível crítico especificado (5%)

ns: Valor acima do nível crítico especificado (5%)

O valores de F significativos para os marcadores EMBRA 125, EMBRA 181 e EMBRA 227, indicam que o valor da variável dependente y_j pode ser predito por esses marcadores, ou seja, existe uma relação entre o quadrado da diferença fenotípica dos indivíduos fenotipados, combinados dois a dois, e o IBD desses locos marcadores. No entanto, não tem como diferenciar se a existência dessa relação é devida à proximidade desses marcadores ao QTL ou ao valor alto de σ_A^2 dos mesmos.

O mapeamento pela regressão de Haseman & Elston evidenciou que o marcador EMBRA 125 possuem o maior valor de F ($F=67,31$), ou seja, é o mais significativo. Esse resultado é equivalente ao teste da ANOVA e contraste entre médias e assim como estes, não detecta a posição do QTL. No entanto, por este método, adicionalmente, é possível predizer estimativas de frações da herdabilidades associadas a cada loco marcador (Tabela 6) Pode-se observar que o maior valor da herdabilidade foi estimado para o loco EMBRA 125 (37%), evidenciado uma possível ligação ao QTL responsável pela resistência à ferrugem.

4.2. Mapeamento por intervalo simples

Regressão de Fulker & Cardon (1994)

Para o mapeamento de QTLs por intervalo por meio da estratégia de pares de irmãos, desenvolvida por Fulker e Cardon (1994), foi necessário a utilização das informações de ligação dos locos microssatélites do grupo de ligação três, estabelecidas no capítulo 2.

Pelo método de regressão proposto por Fulker & Cardon (1994) para cada valor de r_1 e r_2 , assumido dentro do intervalo r_{12} para a posição do loco Q, foi obtida uma estimativa de $\hat{\beta}_q$ com base no modelo $Y_j = \beta_0 + \beta_q \pi_{qj}$. Este intervalo foi dividido, de forma que se obteve várias estimativas de $\hat{\beta}_q$. Desse modo foi possível realizar várias regressões, permitindo escolher a equação dentro do intervalo que apresentou a menor soma de quadrados residuais ou com maior ajuste R^2 . Nessa posição, a estimativa de $\hat{\beta}_q$, que corresponde ao critério ótimo de escolha da equação de regressão, permitiu determinar a posição do QTL e o valor da contribuição dada pelo QTL para a variância aditiva σ_A^2 do caráter, estimada por $-\beta_q / 2$.

Dessa forma os resultados indicaram que a posição correspondente ao EMBRA 125 foi o que apresentou o maior valor de R^2 (2,15%) e nessa posição a estimativa de $\hat{\beta}_q$ foi de -1,45. Portanto pode-se calcular a variância aditiva

nesse ponto com base na estimativa $\sigma_A^2 = -\beta_q / 2 = 0,72$. Como a variância do valor fenotípico da característica foi $\sigma_F^2 = 1,7028$, a herdabilidade do QTL foi também estimada $h_Q^2 = (\sigma_A^2 / \sigma_F^2) \times 100 = 42\%$.

O maior valor do R^2 (2,15%) ainda é baixo se comparado com os métodos de regressão descritos para populações endogâmicas. No entanto, eles não são comparáveis, pois o R^2 nas populações endogâmicas é estimado de modo que seu valor explica o quanto da variância genética explica a variação fenotípica da característica. Por este método de regressão, o qual considera populações exogâmicas, o R^2 representa o quanto a variância do IBD (genética) explica a diferença fenotípica ao quadrado, ou seja o vetor y neste caso é um componente quadrático que gera R^2 baixo e não comparável.

Este método, portanto, além de identificar o efeito do QTL sobre variância aditiva também identificou a posição do QTL no grupo de ligação três. A posição do QTL é demonstrada por meio do gráfico contendo na ordenada o valor da estatística F e na abscissa os intervalos, em cM, entre os marcadores contidos no grupo de ligação três (Figura 1).

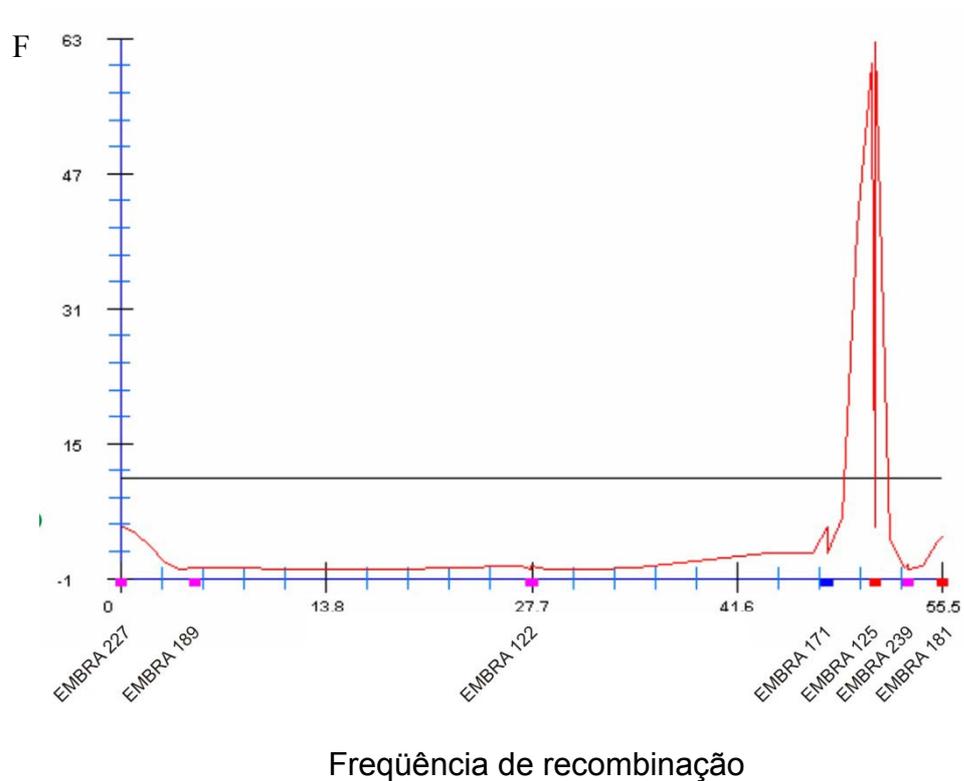


Figura 1 - Gráfico gerado pelo programa QMOL demonstrando o QTL para resistência à ferrugem mapeados pela regressão de Fulker e Cardon, no grupo de ligação 3. Eixo Y: valor de F; Eixo X: intervalos entre os marcadores do grupo de ligação 3. O nível de significância definido foi de 0,1% ($F=10,8$).

Na Figura 1 pode-se observar que o QTL foi mapeado muito próximo do loco EMBRA 125 (distância de 0,002 cM), entre os marcadores EMBRA 171 e EMBRA 239.

O mapeamento de QTLs pela estratégia de regressão de Fulker & Cardon é muito utilizado em genética humana, onde a obtenção de grandes famílias para mapeamento genético é bastante difícil. Os resultados obtidos neste trabalho, demonstraram ser possível a detecção de QTLs em uma única família de irmãos completos.

Em plantas, esta estratégia foi utilizada num estudo de mapeamento de QTLs em *Eucalyptus* realizado por Novaes (2006), no qual a estratégia

de regressão de Fulker e Cardon foi comparada a estratégia de pseudo-cruzamento teste para quatro caracteres de importância: profundidade de penetração do Pilodyn, teor de lignina da madeira e porcentagem de álcali efetivo utilizado na polpação e viscosidade da polpa celulósica. Segundo este autor, de forma geral, os QTLs de maior significância foram identificados de forma precisa com as duas estratégias, sendo que alguns QTLs identificados pela estratégia de Fulker e Cardon só puderam ser localizados pela estratégia de pseudo-cruzamento teste com a inclusão de co-fatores no mapeamento, indicando que a regressão Fulker e Cardon tem maior poder de detecção de QTLs.

Esta metodologia pode ser melhor explorada não só em espécies vegetais perenes, para as quais a obtenção de delineamentos clássicos de mapeamento é pouco factível, mas também em espécies anuais para múltiplas famílias com várias gerações de melhoramento. A principal dificuldade dessa estratégia seria o estabelecimento de um mapa consenso que melhor explica as frequências de recombinação dos marcadores nos diferentes conjuntos meióticos (cruzamentos). No entanto, atualmente o programas GQMOL (Cruz e Schuster, 2004) já possui algoritmos capazes de realizar os cálculos de frequência de recombinação levando em consideração a informação simultânea das meioses dos dois parentais heterozigóticos para produzir um mapa integrado.

Na região onde foi localizado o QTL para ferrugem pelo mapeamento por intervalo simples de Fulker e Cardon também foi identificado marcador significativamente ligados ao QTL pela metodologias baseadas em marca simples. Isto demonstra que uma porção da variabilidade fenotípica relacionada à resistência é devido a efeitos genéticos, ou seja, há heterozigosidade nos QTLs e os alelos desses locos possuem diferenças de efeitos médios suficientemente grandes para permitir a detecção do QTL, responsável pela resistência, em uma família pequena de irmãos-completos. Apesar da importância da identificação de genes responsáveis pela resistência à ferrugem para serem usados nos programas de melhoramento assistida por marcadores moleculares apenas um estudo de mapeamento de genes para ferrugem foi realizado até hoje. Neste estudo foi mapeado um gene via marcadores RAPD, em uma família de irmãos completos de *Eucalyptus*

grandis, de resistência à ferrugem, denominado *Ppr-1* (Junghans, 2003a). Entretanto marcadores RAPD não permitem a trasferabilidade e polimorfismo suficiente para possibilitar a validação do gene *Ppr-1* em outros pedigrees.

Como os genitores da família de irmãos completos desse trabalho são árvores elite, utilizadas em populações de melhoramento clássico, as informações a respeito da identificação desse QTL podem ser extremamente útil para propor experimentos de seleção assistida por marcadores em descendências derivadas destes genitores. Os microssatélites flanqueadores desse QTL podem ser utilizados como guias em seleções assistidas por marcadores, podendo os alelos favoráveis desse QTL serem positivamente selecionados, auxiliando os processos seletivos do melhoramento florestal clássico.

Além disso, à proximidade física entre o marcador EMBRA 125 e o QTL para resistência a ferrugem e a disponibilidade de uma biblioteca de BACs com grande cobertura genômica para *Eucalyptus*, (Brommonschenkel et al., 2005), torna possível a realização de uma eventual clonagem posicional de genes de resistência, com potencial uso no melhoramento.

Uma vez posicionado o QTL, no grupo de ligação três, a distância dele em relação ao loco letal pode ser determinada (35,6 cM), assim como sua taxa de distorção (14%), usando o estimador desenvolvido no capítulo 2. Esta estimativa da taxa de distorção do QTL é útil para auxiliar o estudo de herança, descrito no capítulo 1, para o cruzamento envolvendo o clone 7074 e 1213.

5. CONCLUSÕES

- Pela metodologia da ANOVA, os locos microssatélites EMBRA 181 e EMBRA125, apresentaram associação significativa sobre o QTL responsável pela resistência à ferrugem.
- Pelo método de contraste entre médias foi possível verificar que a significância do loco microssatélite EMBRA 181 estava relacionada com os alelos derivados do genitor feminino 7074 e a significância do loco microssatélite EMBRA 125 foi devida aos alelos de ambos os genitores.
- Pelos três métodos baseados em marca simples, ANOVA, contraste entre médias e regressão foi verificada maior significância estatística para o loco microssatélite EMBRA 125.
- Pela metodologia de regressão Fulker & Cardon (1994), baseada em intervalo simples, foi possível localizar o QTL, responsável pela resistência à ferrugem, e quantificar o seu efeito. O QTL foi mapeado no grupo de ligação três, a 0,002 cM do loco microssatélite EMBRA 125 e explica 42% da variação fenotípica.
- O QTL mapeado nesse cruzamento pode ser muito útil em programas de melhoramento baseado em seleção assistida e para clonagem posicional do gene de resistência à ferrugem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. & ZAUZA, E. A. V. **Doenças na cultura do eucalipto**. SIF – Viçosa, 2007. 164p.

ALFENAS, A.C, ZAUZA, E. A. V, MAFIA, R. G, ASSIS, T. F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Editora UFV, Viçosa, 2004. 442p.

BROMMONSCHENKEL, S.H.; BRONDANI, R.P.V.; BUSELLI, R.F.; LOURENÇO, R.T.; NOVAES, E.; BANDEIRA, L.; PAPPAS, G.J.; SANTOS, S.N.; POVOA, A.; PAPPAS, M.R.; COELHO, A.S.G. E GRATTAPAGLIA, D. A BAC library of *Eucalyptus grandis*: characterization, fingerprinting, BAC-end sequencing and shotgun assembly of lignification genes. In: IUFRO Tree Biotechnology, 2005, Pretoria. Proceedings of the IUFRO Tree Biotechnology 2005.

BUENO, N.W , JUNGHANS D.T. , ALFENAS A.C., BROMMONSCHENKEL S.H.; GRATTAPAGLIA, D. Localized mapping of the *Puccinia psidii* resistance (ppr1) locus in *Eucalyptus* with microsatellite markers Resumos do 50º Congresso Brasileiro de Genética. Resumo GP217. 2004

CRUZ, C.D. **GQMOL**: Programa para análise de genética quantitativa molecular. Versão 2007.2.1. Desenvolvido pelo setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm

CRUZ, C.D. & SCHUSTER, I. Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. Editora UFV, Viçosa, 2004. 568p.

FULKER, D.W. & CARDON, L.R. A sib-pair approach to interval mapping of quantitative trait loci. **Am. J. Hum. Genet**, v. 5, p.1092-1103. 1994.

HASEMAN, J.K. & ELSTON, R.C.. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. **Behav Genetics**, v 2, p.3-19. 1972.

JUNGHANS, D. T., ALFENAS, A. C., MAFFIA, L. A. Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira** v.28, p184-188, 2003b.

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

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

LYNCH, M. & WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland, USA: Sinauer Associates, Inc. Ed., 1998.

MISSIAGGIA, A.A. **Mapeamento genético de QTL para qualidade da madeira e florescimento precoce e estudos de expressão gênica alelo específica em *Eucalyptus* spp.** 2005. 236p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

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, 1028-1042. 2003.

NOVAES E. **Mapeamento de QTLS para qualidade da madeira em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e ancoragem de clones BAC no mapa genético.** Viçosa, 2006. 171p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

4. CONCLUSÕES GERAIS

- Foi comprovada a existência de um alelo letal no grupo de ligação três, responsável pela distorção de segregação gamética, em taxas diferenciadas, dos locos desse grupo.
- Os estimadores desenvolvidos para determinar as taxas de distorção dos locos microssatélites do grupo de ligação três, bem como a metodologia apresentada para mapear esses locos, em relação ao gene letal, proporcionaram resultados satisfatórios e devem ser considerados em estudos futuros.
- O gene letal foi mapeado a 11,22 cM do loco microssatélite EMBRA 189 e 8,20 cM do loco microssatélite EMBRA 122.
- O loco microssatélite EMBRA 125 foi o que apresentou o maior efeito significativo, pelos métodos baseados em marca simples, em relação ao QTL responsável pela resistência à ferrugem, no cruzamento interespecífico analisado.
- O método baseado em intervalo simples de Fulker & Cardon (1994) também verificou maior significância para o loco microssatélite EMBRA 125, sendo que, por essa metodologia, o QTL foi posicionado a 0,002 cM desse loco e responsável por 42% da variação fenotípica da resistência à ferrugem.
- O QTL mapeado no grupo de ligação três desse cruzamento, posicionado muito próximo ao loco microssatélite EMBRA 125 e com grande significância estatística, poderá ser de grande utilidade em seleção assistida

por marcadores e eventual clonagem posicional do gene de resistência à ferrugem