

30

**MARCADORES MOLECULARES EM
ESPÉCIES FLORESTAIS: *Eucalyptus*
COMO MODELO**

DARIO GRATTAPLAGIA^{1,2}

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372 - CEP: 70770-900 - Brasília, DF.

²Universidade Católica de Brasília, SGAN 916 Módulo B, CEP: 70790-160 - Brasília, DF.

1. INTRODUÇÃO

Plantios intensivos de florestas de espécies de rápido crescimento suprem, de modo racional e eficaz, a demanda por biomassa lenhosa de alta qualidade que de outro modo viria de florestas tropicais nativas. Nas décadas por vir, a expansão destas “fazendas de fibras” provavelmente será limitada pelo crescimento do plantio de culturas agrícolas e pela pressão da opinião pública. Produtividades florestais crescentes e refinamentos na qualidade dos produtos de madeira por meio de melhoramento genético, tornar-se-ão cada vez mais estratégicos para a indústria florestal. Ferramentas moleculares baseadas na identificação direta de variações úteis no DNA fornecerão novas oportunidades para a manipulação genética do crescimento, forma e propriedades da madeira de árvores cultivadas.

Quase dez anos se passaram desde que os primeiros experimentos de melhoramento genético molecular (*molecular breeding*) de espécies florestais iniciaram. O desenvolvimento de mapas de ligação e informação de QTL (*Quantitative Trait Loci*), locos controladores de características quantitativas em árvores foi significativamente acelerado pelo advento de tecnologias de marcadores de DNA mais acessíveis baseadas em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), novos conceitos em mapeamento genético e estratégias inovadoras de melhoramento florestal em gerações avançadas (O'Malley *et al.*, 1996). Desde o princípio foram geradas muitas expectativas a respeito do desenvolvimento de métodos rápidos e acurados de seleção precoce baseada em marcadores. Progresso significativo tem sido feito e o conhecimento reunido levou a oportunidades reais a curto prazo para a incorporação da análise genômica na genética e melhoramento florestal. Entretanto, também se tornou claro que diversos desafios ainda estão pela frente antes que aplicações mais refinadas e de maior impacto possam ser implementadas.

Neste capítulo é apresentada uma revisão, que não pretende ser exaustiva, da situação atual do melhoramento genético molecular de espécies florestais utilizando *Eucalyptus* como modelo. Plantações de *Eucalyptus* constituem a maior parte das florestas plantadas de *hardwoods* no mundo, ocupando entre 10 a 15 milhões de hectares, sendo 40% desta área plantados no Brasil (Eldridge *et al.*, 1994). Taxas de crescimento rápido, propriedades da madeira flexíveis para a produção de carvão, celulose e papel e uma ampla variação na capacidade de adaptação contribuíram para o grande interesse que as espécies de *Eucalyptus* recebem em muitos países fora da sua zona de ocorrência natural. Além disso, as estratégias de melhoramento e plantio operacional de espécies do gênero *Eucalyptus* apresentam peculiaridades que favorecem a utilização de técnicas de marcadores moleculares. Ênfase particular é dada às aplicações atuais em programas de melhoramento operacional e os desafios técnicos existentes. O termo melhoramento genético molecular, do inglês *molecular breeding*, é usado aqui em *latu sensu*, i.e., não somente seleção assistida por marcadores (SAM) para alelos favoráveis através de dados de mapeamento de QTL,

mas também abrangendo todas as práticas que envolvem o uso de informação genética derivada da análise direta de polimorfismos de sequência no DNA.

2. TECNOLOGIAS PARA A DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM *Eucalyptus*

Um marcador molecular pode ser definido como qualquer fenótipo molecular derivado de um polimorfismo específico na sequência de DNA, conhecido ou anônimo, que pode corresponder ou não a um gene expresso. Estes polimorfismos são tipicamente detectados por clivagem do DNA com enzimas de restrição seguida por hibridização do DNA com sondas específicas gerando marcadores RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição) ou por amplificação do DNA via PCR direcionado por *primers* (ou iniciadores) específicos ou arbitrários. Os marcadores úteis seguem as regras mendelianas de segregação genética e podem exibir herança dominante ou codominante.

Diversas tecnologias para a detecção de marcadores moleculares têm sido desenvolvidas nos últimos anos, particularmente após a descoberta da PCR no final dos anos 80. Quando inventadas, cada uma destas tecnologias recebeu um acrônimo que descrevia as suas principais características e tentava ser atraente para o melhorista genético molecular. Como resultado, uma gama desconcertante de tipos de marcadores, tais como RFLP, RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso), AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado), SSR (Sequências Simples Repetitivas, também chamados de microssatélites), e muitos outros se encontram disponíveis hoje para análise genética em organismos vivos (veja revisão por Caetano-Anolles, 1996). Cada sistema de marcadores é caracterizado por uma série de vantagens e limitações que fogem ao escopo desta discussão, mas podem ser encontradas na literatura (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Rafalski *et al.*, 1996). A questão principal é que a escolha de uma ou outra tecnologia deve ser direcionada principalmente pela questão particular que se pretende resolver, levando-se em conta ainda os aspectos de capacitação técnica e instalações necessárias, custo e limitações quanto ao acesso a reagentes específicos e patentes, assim como *royalties* que necessitem ser pagos para a aplicação comercial destas tecnologias.

Marcadores RAPD têm contribuído significativamente para o desenvolvimento rápido de mapas genômicos e análise de variabilidade e *fingerprinting* (ou “impressão digital” do DNA) em *Eucalyptus* e em árvores em geral (Grattapaglia *et al.*, 1992; O'Malley *et al.*, 1996). Marcadores RAPD dispensaram a necessidade de desenvolvimento de sondas específicas, empregando reagentes universais “de bancada” e forneceram uma entrada rápida e tecnicamente simples à análise de segregação, ligação genética, construção de mapas e *fingerprinting* de indivíduos. Embora preocupações tenham sido levantadas quanto à confiabilidade do ensaio RAPD, tem-se demonstrado claramente, que quando se tomam os devidos cuidados, podem ser obtidos mapas e genotipagens de alta qualidade. A principal limitação dos marcadores RAPD é o seu baixo conteúdo informativo por loco, uma vez que estes marcadores tipicamente exibem uma herança dominante e tecnicamente detectam apenas um alelo por loco, sendo que todos os outros alelos são agrupados em uma única classe caracterizada pela ausência de amplificação de banda.

Marcadores AFLP compartilham a maioria das vantagens e limitações técnicas do RAPD. Eles também empregam reagentes universais e também são dominantes. Embora sejam tecnicamente mais trabalhosos do que os marcadores RAPD, tanto em capacitação técnica quanto em instalações necessárias, eles apresentam uma vantagem que os distingue. Marcadores AFLP apresentam uma razão multiplex mais elevada, i.e., o número de locos genéticos que podem ser analisados simultaneamente em cada ensaio, tipicamente uma pista de corrida em eletroforese em gel, é frequentemente de 5 a 10 vezes maior (Figura 1). Enquanto o ensaio RAPD em *Eucalyptus* tipicamente amostra entre 5 e 10 locos, dos quais entre 2 e 6 são polimórficos, um ensaio AFLP pesquisa entre 100 e 200 locos genéticos, dos quais 10 a 40 são polimórficos e claramente interpretáveis, dependendo da estrutura genealógica e divergência genética do material em estudo (Gaiotto *et al.*, 1997a,b; Marques *et al.*, 1998a).

SSR (Seqüências Simples Repetitivas) ou marcadores microssatélites são os marcadores atualmente disponíveis com maior conteúdo informativo. O que distingue os microssatélites é a sua natureza multialélica, herança codominante, abundância e ampla distribuição no genoma e possibilidade de detectar variações de seqüência por meio de um ensaio simples de PCR, tal como RAPD e AFLP. Adicionalmente, marcadores SSR em geral são altamente transferíveis de genoma para genoma dentro de uma espécie e, frequentemente, entre espécies geneticamente relacionadas. Afora o método PCR, nenhum licenciamento específico para patente é necessário para seu uso em plantas e o uso compartilhado de seqüências de *primers* entre laboratórios facilita muito o fluxo de informação, colaborações e estudos comparativos. A principal desvantagem dos marcadores baseados em microssatélites é o custo inicial relativamente alto e a necessidade de conhecimento e infra-estrutura de biologia molecular para o desenvolvimento de seqüências específicas de *primers*. Os métodos atuais para o descobrimento de marcadores baseados em SSR tipicamente requerem a construção de uma biblioteca genômica, triagem de uma biblioteca para elementos repetitivos, seqüenciamento do DNA de clones positivos, desenho dos *primers*, seleção dos locos informativos e caracterização da variação alélica.

Nos últimos anos o desenvolvimento de marcadores baseados em SSR tem se tornado cada vez mais acessível principalmente devido a estratégias inovadoras de enriquecimento de bibliotecas genômicas e a tecnologias rápidas de seqüenciamento automático baseadas em fluorescência (Rafalski *et al.*, 1996). Embora o custo do desenvolvimento ainda seja elevado, este custo é facilmente compensado pela ampla gama de potencialidades de pesquisa e desenvolvimento que se abrem ao se possuir tal tecnologia para uma determinada espécie. Particularmente para a análise genética de alta resolução e mapeamento de espécies altamente heterozigotas de *Eucalyptus*, a disponibilidade de marcadores multialélicos codominantes baseados em PCR se tornou absolutamente fundamental. Brodani *et al.* (1998) iniciaram um esforço sistemático e bem sucedido rumo ao desenvolvimento e mapeamento de grandes baterias de marcadores baseados em microssatélites altamente informativos para análise genética em *Eucalyptus*. Todas as seqüências de *primers* foram disponibilizadas da mesma forma que tem ocorrido com a comunidade científica envolvida no mapeamento do genoma humano, com o objetivo de facilitar o mapeamento comparativo e colaborativo, bem como experimentos de *fingerprinting*.

A disponibilidade de informações de seqüências parciais ou completas de um grande número de genes permitirá o desenvolvimento crescente de marcadores gênicos baseados em PCR para estudos genômicos funcionais e para a construção de mapas transcripcionais. Dezenas de milhares de EST (*Expressed Sequence Tags*, ou Etiquetas de Seqüências Expressas) já foram seqüenciadas para *Eucalyptus* na Nova Zelândia, mas permanecem sob domínio privado (Sederoff, R. – Comunicação pessoal). O conhecimento da função destes genes mapeados viria da sua seqüência esperada de aminoácidos e comparação com seqüências conhecidas de espécies modelo, tal como *Arabidopsis* e outras para as quais além de existirem grandes números de EST's depositados em bases de dados, o genoma completo está também sendo rapidamente seqüenciado.

Em teoria, o uso de genes como marcadores ao invés de marcadores anônimos de DNA tais como RAPD, AFLP ou SSR pareceria ser a melhor escolha, uma vez que isto facilitaria o estabelecimento de relações putativas entre genes candidatos e QTL específicos mapeados em sua vizinhança, i.e., o uso da abordagem do gene candidato (Lander, 1996). Na prática, no entanto, seqüências de cDNA são muito mais conservadas e, portanto, a detecção de polimorfismo de seqüência e variação alélica de indivíduo para indivíduo se torna uma tarefa relativamente árdua com a tecnologia atual, tornando difícil o uso destes marcadores para o desenvolvimento rápido de informação de ligação genética e mapeamento. Abordagens alternativas baseadas na detecção de polimorfismos de nucleotídeos únicos estão sendo rapidamente desenvolvidas e poderão se tornar extremamente eficientes para a detecção de polimorfismos dentro de genes.

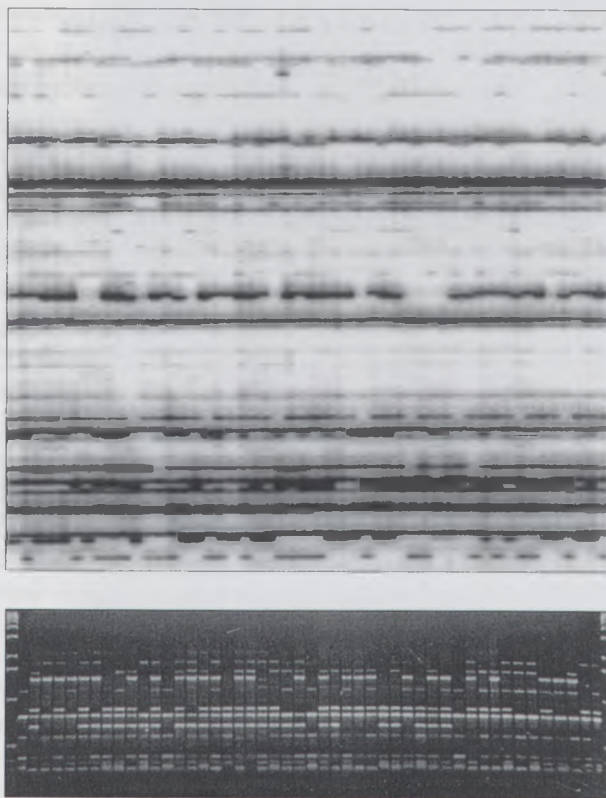


FIGURA 1. Marcadores dominantes segregando em uma configuração pseudocruzamento teste (*pseudotestcross*) em uma família F_1 de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*. Uma razão multiplex quatro vezes maior foi obtida com a tecnologia AFLP (20 marcadores AFLP informativos segregando por corrida de gel - Painel A) quando comparada à tecnologia RAPD (5 marcadores RAPD informativos segregando por corrida de gel - Painel B).

3. MAPAS DE LIGAÇÃO DE *Eucalyptus*

Uma série de relatos na literatura demonstraram que marcadores moleculares podem ser usados de modo eficiente para a construção de mapas de ligação de alta cobertura genômica de árvores individuais em diversas espécies de *Eucalyptus*. Estes mapas de ligação têm sido construídos por meio de análise de marcadores RAPD dominantes (Grattapaglia & Sederoff, 1994; Verhaegen & Plomion, 1996), marcadores AFLP dominantes (Gaiotto *et al.*, 1997a; Marques *et al.*, 1998a) segregando em uma configuração pseudocruzamento teste em famílias F_1 , ou uma combinação de marcadores RFLP e RAPD segregando em diversas configurações em um cruzamento F_2 não endogâmico (Byrne *et al.*, 1995).

Para todos os mapas de *Eucalyptus* construídos até hoje, independentemente do tipo de marcador molecular e do *pedigree* utilizado, o número de grupos de ligação determinado sempre foi equivalente ou próximo do número haplóide de cromossomos ($n=11$) de *Eucalyptus*. A distância de mapa em unidades de recombinação foi sempre obtida em valores próximos à distância total estimada de mapa, sugerindo que uma cobertura do genoma acima de 95% foi alcançada. O comprimento total do mapa tem sido estimado entre 1156 cM para *Eucalyptus urophylla* a 1620 cM para *E. grandis* (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Dada uma distância média do mapa total de 1300 cM e um genoma de tamanho médio em torno de 650 Mbp/1C, o equivalente físico médio de 1cM corresponderia a algo em torno de 500 pares de kilobases. Esta distância física relativamente pequena por unidade de recombinação, quando comparada à da maioria das outras espécies de plantas e à maioria das árvores, facilitaria o mapeamento físico e a abordagem de clonagem posicional (Grattapaglia & Bradshaw, 1994).

A construção de mapas em *Eucalyptus* tem utilizado *pedigrees* disponíveis extraídos de programas operacionais de melhoramento. Estes *pedigrees* geralmente envolvem somente os dois genitores altamente heterozigotos e sua prole F_1 . Este fato, juntamente com a disponibilidade de polimorfismo abundante entre os genitores foi a razão pela qual o mapeamento de ligação em *Eucalyptus* tem sido realizado principalmente por meio da estratégia de pseudocruzamento teste. Quando combinada a marcadores dominantes baseados em PCR de alto desempenho, esta estratégia é muito poderosa para a geração rápida de informação de ligação para ambos os genitores do cruzamento. Esta estratégia se baseia, entretanto, na seleção de polimorfismos de DNA em dose única presentes em um dos genitores e ausentes no outro, de modo que os mapas são indivíduo-específico e não podem ser alinhados ou integrados como tais, a não ser que também sejam usados outros marcadores comuns a ambos os mapas (Grattapaglia, 1997).

Homologias preliminares foram estabelecidas para 3 e 4 grupos de ligações respectivamente em *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* com base em pares de marcadores RAPD mapeados em diferentes árvores e diferentes laboratórios. Isto foi facilitado pelo uso de um conjunto comum de *primers* RAPD e de nomenclatura para os marcadores gerados (Verhaegen & Plomion, 1996). Um levantamento de 60 marcadores RAPD mapeados em 10 famílias de irmãos completos de *Eucalyptus urophylla* indicou que uma média de 64% dos marcadores RAPD poderiam ser prontamente transferíveis e informativos entre mapas de ligação para árvores distintas

de uma mesma população (Brondani & Grattapaglia, 1997; Brondani *et al.*, 1997). Entretanto, a transferabilidade de marcadores informativos entre árvores dentro de uma mesma espécie rapidamente declina para abaixo de 15% se as árvores forem oriundas de populações geograficamente distantes (Grattapaglia & Sederoff, 1994).

Para integrar mapas de ligação construídos pela estratégia pseudocruzamento teste, marcadores codominantes multialélicos com alelos segregando em ambos os genitores seriam mais eficientes, fornecendo um conjunto de locos comuns que poderiam ser usados como locos-ponte (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Um mapa de ligação baseado em marcadores RFLP codominantes e marcadores RAPD dominantes foi gerado usando um *pedigree* F_2 não endogâmico de três gerações (Byrne *et al.*, 1995). Marcadores RFLP segregando de modo totalmente informativo, i.e., com 3 ou 4 alelos diferentes segregando na família F_1 , permitiu a integração de marcadores dominantes em um único mapa. Entretanto, a despeito do fato de que um amplo cruzamento interpopulacional de *E. nitens* foi utilizado, somente 22% dos marcadores RFLP foram totalmente informativos. Além do baixo desempenho da tecnologia de marcadores RFLP na geração de dados, com uma proporção tão baixa de marcadores totalmente informativos, o suporte estatístico para a ligação e o ordenamento linear dos locos em um mapa integrado têm baixa consistência e, mais provavelmente, complica posteriormente a precisão do mapeamento de QTL (Liu, 1998).

Em suma, embora diversos mapas de ligação de *Eucalyptus* tenham sido construídos, o uso da informação de ligação tende a permanecer restrito ao *pedigree* utilizado para o mapeamento, limitando o compartilhamento interexperimental de dados de QTL. Além disso, um detalhamento preciso dos efeitos individuais dos alelos aos QTL em *pedigrees* não endogâmicos não é possível (veja item 4). Portanto, de modo semelhante à genética humana na era pré-microsatélite, um obstáculo chave à construção de mapas de ligação e análise de QTL de maior resolução em *Eucalyptus* tem sido a natureza não endogâmica dos cruzamentos utilizados e o conteúdo limitado de informação genética das classes de marcadores moleculares mapeados até o momento.

4. MAPEAMENTO DE QTL EM *Eucalyptus*

Dando seguimento à construção de mapas de ligação, diversos grupos relataram a identificação de regiões genômicas que têm efeito significativo na expressão de características economicamente importantes em *Eucalyptus*. QTL para características juvenis, tais como a altura de plântulas, área foliar e tolerância da muda à geada foram mapeados (Vaillancourt *et al.*, 1995a; Byrne *et al.*, 1997a,b). Características relacionadas à habilidade de propagação vegetativa, tais como enraizamento adventício, brotamento de toco e multiplicação de plântulas *in vitro* também foram detectados (Grattapaglia *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 1998b). Finalmente, QTL importantes também foram encontrados para características em idade de rotação, tais como crescimento volumétrico, densidade básica da madeira, espessura da casca e forma do caule (Grattapaglia *et al.*, 1996; Verhaegen *et al.*, 1997; Squilassi & Grattapaglia, 1997) (Figura 2). QTL para resistência a insetos e características responsáveis pela produção de óleos essenciais foram mapeados (Shepherd *et al.*, 1995) e, recentemente, um QTL de maior efeito para resistência à

ferrugem de *Puccinia psidii* com herança mendeliana simples foi encontrado e mapeado em *E. grandis* (Junghans *et al.*, 1998). Diversas classes de marcadores moleculares e tipos de *pedigrees* diferentes têm sido utilizados nestes experimentos. QTL têm sido detectados em F_1 , F_2 parcialmente endogâmicas ou não e famílias de meios-irmãos com ou sem replicação clonal.

Todos os estudos de mapeamento de características quantitativas em *Eucalyptus* têm demonstrado, com sucesso, abordagens experimentais para a localização de QTL. Estes experimentos forneceram evidências quanto aos números e magnitude de efeitos de QTL controlando características quantitativas em espécies comercialmente importantes deste gênero. Da mesma forma que tem sido observado para diversas características em várias espécies de plantas cultivadas, em *Eucalyptus* também foram detectados poucos locos de maior efeito controlando uma proporção relativamente grande (entre 10% e 40%) da variação fenotípica total de uma ampla variedade de características herdadas quantitativamente, desde crescimento volumétrico e densidade básica da madeira até enraizamento adventício de estacas e tolerância à geadas. Entretanto, devido ao tamanho relativamente pequeno das progênies empregadas, a precisão limitada na avaliação do fenótipo, o número reduzido de *backgrounds* genéticos testados (i.e. número de cruzamentos) e as limitações inerentes aos tipos de marcadores moleculares e *pedigrees* utilizados, os números reais, a posição precisa e particularmente a magnitude do efeito dos QTL detectados para todas as características ainda são insuficientemente compreendidos.

O mapeamento de QTL em *Eucalyptus* bem como na maioria de espécies florestais tem sido conduzido principalmente através da configuração de pseudocruzamento teste. Conforme descrito anteriormente (Grattapaglia *et al.*, 1995;

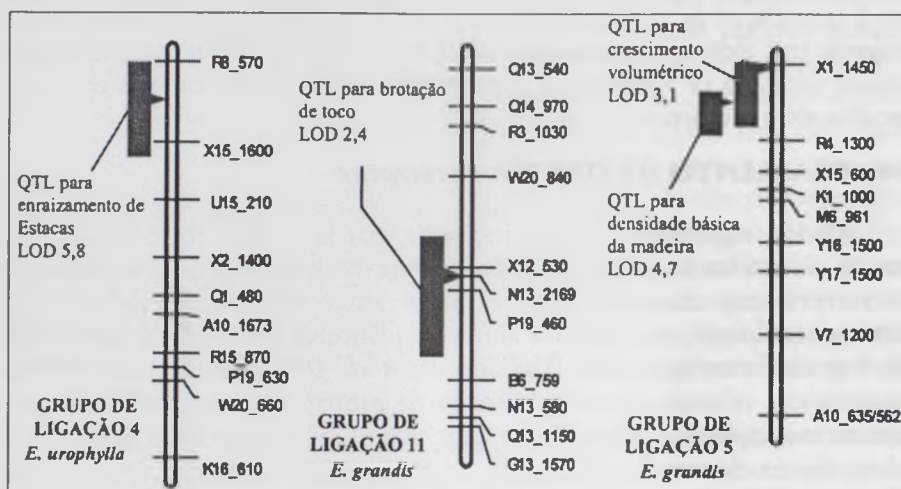


FIGURA 2. Mapas de QTL de maior efeito em *Eucalyptus*. Mapas de ligação de marcadores RAPD foram construídos usando MAPMAKER e os marcadores foram ordenados com suporte de verossimilhança > 1000:1. O comprimento da barra na esquerda dos grupos de ligação corresponde ao intervalo de suporte de 1,0 LOD para a localização do QTL. As setas nas barras indicam a posição mais provável estimada com MAPMAKER-QTL. A detecção de QTL foi declarada com um LOD (*Likelihood of Odds*) maior ou igual a 2,0 (extraído de Grattapaglia *et al.*, 1995; 1996).

Grattapaglia, 1997) esta estratégia possui duas limitações. Primeiro, devido à natureza não domesticada das espécies para as quais esta tecnologia é interessante, não é disponível qualquer informação genética prévia sobre o genótipo dos genitores e não é possível portanto a “construção” planejada de genótipos aos QTL para maximizar a segregação fenotípica para as características de interesse quando estes genótipos contrastantes construídos forem cruzados. Portanto, os únicos QTL que podem ser potencialmente detectados são aqueles que, por acaso, encontram-se em heterozigose nos genitores do cruzamento e onde o efeito diferencial entre alelos alternativos aos QTL é relativamente grande para permitir detecção estatística com o tamanho amostral (i.e. número de descendentes) disponível. Em segundo lugar, devido à provável heterozigosidade em quaisquer dos locos QTL em ambos os genitores, e o fato de que polimorfismos de dose única e herança dominante são usados, o valor quantitativo de genótipos alternativos de marcadores é medido como o efeito de uma substituição alélica (presença ou ausência de uma banda RAPD ou AFLP) tirada como a média dos dois alelos alternativos potenciais ao QTL herdados do outro genitor (ambos vistos igualmente como ausência de uma banda). Se o genótipo de um genitor no loco QTL é $Q1/Q2$, e para o outro genitor é $Q3/Q4$, a análise QTL testa essencialmente a diferença entre o valor médio da característica ($Q1/Q3 + Q1/Q4$) versus ($Q2/Q3 + Q2/Q4$) no primeiro genitor e ($Q3/Q1 + Q3/Q2$) versus ($Q4/Q1 + Q4/Q2$) no segundo genitor. Nenhuma interação intraloco específica que possa ocorrer e afetar o fenótipo final pode ser levada em consideração nesta análise e nenhuma classificação (*ranking*) de alelos por magnitude do efeito de substituição pode ser realizada. Esta situação de informação genética incompleta pode resultar em erros do Tipo I e II na detecção de QTL e estimativa imprecisa da magnitude do efeito do QTL. Claramente, como a maioria dos QTL em *Eucalyptus* e em outras árvores florestais geneticamente heterogêneas provavelmente são multialélicos (Groover *et al.*, 1994), somente marcadores multialélicos codominantes permitirão o rastreio, compreensão e manipulação adequada de toda a variabilidade alélica que segrega aos QTL em trabalhos experimentais e aplicados.

Abordagens alternativas para o mapeamento de QTL têm sido testadas com sucesso em *Eucalyptus*. Grattapaglia *et al.* (1996) demonstrou que o desequilíbrio de ligação em uma família de meios-irmãos permite a identificação de regiões genômicas com efeitos significativos sobre características quantitativas relevantes para a produtividade florestal de *Eucalyptus*. Famílias de meios-irmãos amostram mais da variabilidade genética da população uma vez que o efeito dos alelos segregando ao QTL no genitor maternal comum é medido frente à toda a população de melhoramento. Em outras palavras, comparam-se os efeitos dos dois alelos maternos, efeitos estes computados como a média com uma amostra muito maior de alelos ao mesmo QTL que são contribuídos pelo *pool* de pólen. QTL identificados em famílias de meios-irmãos podem, em princípio, ser diretamente relacionados ao valor de melhoramento, variação genética aditiva e, portanto, com a teoria e prática do melhoramento florestal baseado em populações (O'Malley & McKeand, 1994). Entretanto, tem sido demonstrado que com amostras de mesmo tamanho, o poder de detecção de QTL em famílias de meios-irmãos é sempre menor do que em uma família de irmãos germanos (Muranty, 1996).

Uma segunda abordagem alternativa muito promissora tem sido a utilização do desequilíbrio de ligação em delineamentos genéticos de acasalamento fatorial. Nestes casos têm sido demonstrado que o uso de uma única família grande de irmãos germanos para a detecção de QTL em espécies alógamas é frequentemente menos potente do que o uso de várias progênies menores oriundas de acasalamentos de um maior número de genitores. Como os genitores para experimentos de QTL em árvores são muitas vezes escolhidos ao acaso entre bons genitores, o uso de múltiplos genitores em acasalamentos fatoriais aumenta o poder de detecção de QTL, uma vez que é amostrado um maior número de alelos aos QTL o que aumenta a probabilidade de se observar segregação aos mesmos (Muranty, 1996). Verhaegen (1996) detectou correlações significativas entre as frequências de marcadores RAPD específicos e a média aditiva interespecífica para crescimento volumétrico em um delineamento multifatorial 13 x 13 compreendendo cerca de 87 famílias de irmãos germanos de *E. grandis* x *E. urophylla*. Em um experimento semelhante, Squilassi & Grattapaglia (1997) mapearam um QTL de maior efeito para crescimento volumétrico em *E. urophylla* utilizando o desequilíbrio de ligação que existe em um pequeno grupo elite de melhoramento com uma origem comum na Austrália. A frequência de marcadores selecionados presentes nos genitores masculinos e ausentes no genitor feminino (configuração pseudocruzamento teste) foi determinada em cada uma das 12 famílias de irmãos germanos, e uma correlação entre esta frequência e o crescimento volumétrico medido como CAP (Circunferência à altura do peito) médio da família foi estimada. Marcadores foram considerados como associados a um QTL quando a correlação era significativa ($p < 0,01$). A detecção de QTL foi validada por mapeamento de intervalo e estimativa de máxima verossimilhança com LOD = 6,37.

Atualmente, experimentos de mapeamento de QTL em *Eucalyptus* estão sendo aperfeiçoados e expandidos em alguns laboratórios pelo mundo (Verhaegen & Marques¹) incluindo o nosso. Estes experimentos são baseados em maiores tamanhos amostrais de descendentes e famílias, quando possível replicação clonal para melhorar a avaliação de fenótipos, tecnologias de marcadores geneticamente mais informativos e delineamentos experimentais envolvendo múltiplos genitores em acasalamentos fatoriais para aumentar o poder de detecção de QTL e melhorar as estimativas de magnitude de efeitos dos alelos aos QTL. Uma tendência semelhante está acontecendo com álamo e coníferas (Bradshaw *et al.*²) com o objetivo comum de elucidar os vários aspectos da arquitetura genética de características quantitativas importantes em árvores e gerar fundamentos mais sólidos para o estabelecimento de procedimentos de seleção assistida por marcadores.

5. ESTABILIDADE DE EXPRESSÃO DE QTL EM *Eucalyptus*

Muito poucos estudos têm sido realizados em plantas em geral com o objetivo de avaliar aspectos da interação QTL x *background* genético e QTL x idade. Isto se deve principalmente ao fato de que a maioria dos experimentos de mapeamento de QTL têm sido conduzidos em espécie anuais com uma base genética muito estreita e origem do germoplasma conhecido. Nestas espécies, são usados *backgrounds* genéticos muito bem definidos para gerar o estoque de plantio e características alvo para melhoramento molecular são herdadas, na maioria dos casos, de forma simples,

¹Verhaegen, D.; Marques, C. (CIRAD; Grupo Raiz). Comunicação pessoal, 1998.

²Bradshaw, T.; Neale, D.; O'Malley, D. (University of Washington; USDA Forest Service; North Carolina State University). Comunicação pessoal, 1998.

envolvendo alelos dominantes de grande efeito fenotípico, tais como de resistências a doenças. Nestas condições, a interação QTL x *background* genético não é uma questão relevante e considerações sobre a interação QTL x idade simplesmente não existem tendo em vista o ciclo curto da cultura. Entretanto em milho, por exemplo, Beavis *et al.* (1991) relataram que poucos QTL para altura da planta eram comuns entre diferentes populações F_2 derivadas de linhagens diferentes. A detecção e expressão de QTL que controlam características quantitativas, tais como altura da planta ou produtividade em *backgrounds* genéticos distintos parece, portanto, ser uma consideração importante para espécies anuais e deve ser ainda maior para espécies florestais geneticamente heterogêneas como o *Eucalyptus*. Uma vez que árvores são geneticamente heterogêneas, é razoável esperar-se que a expressão de um determinado alelo de QTL contribuído por uma das árvores genitoras à progênie possa variar de acordo com o *background* genético existente, i.e. a outra árvore com a qual foi cruzada. Interações QTL x idade e QTL x ambiente também seriam esperadas considerando-se que correlações juvenil x adulto em árvores tipicamente são baixas e uma interação genótipo x ambiente significativa é a regra na maioria dos programas de melhoramento genético florestal que atendem a grandes áreas de plantio.

Uma maior estabilidade da expressão de QTL em diferentes idades foi observada por Verhaegen *et al.* (1997) em um mapeamento experimental de *E. grandis* x *E. urophylla*. Aproximadamente 70% dos QTL detectados para crescimento volumétrico e densidade da madeira eram estáveis entre as idades de 12 e 38 meses. Diversos QTL, entretanto, foram detectados em uma única idade. Verhaegen (1996) também relatou a detecção de alguns QTL cruzamento-específico e QTL gerais quando comparou os QTL detectados por análise de co-segregação em uma família de irmãos completos, com aqueles detectados em um cruzamento fatorial.

Campinhos *et al.* (1997) estudaram a estabilidade da expressão de alelos a QTL no controle do crescimento de *Eucalyptus grandis* em diferentes *backgrounds* genéticos e idades. A análise da estabilidade da expressão de QTL foi conduzida analisando-se alelos de quatro QTL não ligados (em cromossomos diferentes) que controlam crescimento volumétrico. Estes QTL, previamente mapeados na árvore *E. grandis* em idade de rotação, foram analisados em cinco famílias de irmãos completos aos 12 meses. Todos os quatro QTL foram detectados na idade de 12 meses, indicando não ter havido nenhuma interação significativa QTL x idade. Porém, foi observado um efeito significativo do *background* genético na possibilidade de se detectar um QTL. Somente um dos 4 QTL pôde ser detectado em todas as cinco famílias de irmãos completos. A explicação mais provável para isto é que nestas famílias onde um determinado QTL não foi detectado, o QTL não estava segregando, i.e. que os genitores eram efetivamente ou funcionalmente homozigotos ao QTL de forma que nenhuma diferença estatística entre os alelos poderia ser detectada. Além da hipótese óbvia de multialelismo ao QTL, outras explicações possíveis para estes resultados são a expressão dependente do genoma (epistasia) e efeito amostral.

Embora progressos significativos na construção de mapas de ligação e detecção de QTL em *Eucalyptus* tenham sido feitos nos últimos 6 anos, ainda há várias perguntas a serem respondidas quanto à variabilidade alélica existente e o comportamento interativo de QTL específicos, antes que dados moleculares possam ser usados

operacionalmente na prática do melhoramento genético. Os resultados destes estudos apontam para o fato de que no eucalipto tropical a interação QTL x idade pode não ser uma limitação importante para a implementação de SAM precoce. Porém um alelo a um QTL, detectado em um determinado cruzamento pode não ser o melhor alelo que existe na população de melhoramento e outros alelos de efeito igual ou até melhor muito provavelmente existem. Isto fundamentalmente é um reflexo do fato que o processo de domesticação de populações de *Eucalyptus* é extremamente recente quando comparado ao de plantas agrícolas anuais, o que faz com que uma grande variabilidade alélica ainda existe para ser explorada e utilizada. A SAM em *Eucalyptus* e em árvores em geral dependerá portanto da capacidade de se descobrir, mapear e medir a magnitude do efeito dos alelos existentes a QTL de maior efeito em populações de melhoramento. Somente através da alteração das frequências dos alelos de grande efeito aos QTL mais relevantes é que a SAM suplantará a seleção fenotípica convencional e será de fato útil para o melhoramento genético.

6. RUMO A UM MAPA DE LIGAÇÃO "REFERÊNCIA" PARA *Eucalyptus* BASEADO EM MARCADORES MICROSSATÉLITES

A construção de um mapa de ligação abrangente baseado em microssatélites para espécies comerciais de *Eucalyptus* se encontra em fase de finalização em nosso laboratório. O desenvolvimento, caracterização genética e mapeamento de ligação de uma bateria de locos microssatélites em *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* foi relatado por Brondani *et al.* (1998). Este estudo revelou a abundância de microssatélites em *Eucalyptus* e o alto conteúdo informativo destes marcadores para mapeamento e identificação individual. Sequências de *primers* para um conjunto de locos EMBRA (*Eucalyptus Microsatellites from Brazil*) altamente informativos foram publicadas juntamente com a sua posição no mapa e estimativas de heterozigiosidade esperada e variação do tamanho do alelo. Transportabilidade absoluta entre as duas espécies e níveis bastante elevados de variabilidade alélica e heterozigiosidade esperada (H_e) foram observados em todos os locos microssatélites desenvolvidos. O número de alelos por loco variou de 9 a 26 com uma média de $16,3 \pm 4,8$. A H_e média de 15 locos foi $0,86 \pm 0,04$ e $0,83 \pm 0,08$ respectivamente para *E. urophylla* e *E. grandis*. Na análise de mapeamento, 16 de 20 locos marcadores, i.e. 80%, segregaram em uma configuração totalmente informativa (Figura 3), permitindo a determinação imediata da sintenia de 6 dos 11 grupos de ligação homólogos entre mapas de marcadores RAPD existentes para os dois genitores.

A similaridade morfológica e compatibilidade genética de cruzamentos sexuais entre espécie de *Eucalyptus*, particularmente no mesmo subgênero, sugere, a princípio, uma alta homologia do genoma que deveria traduzir-se em conservação das sequências de DNA que flanqueiam as regiões de microssatélites. A conservação de 4 locos SSR entre as espécies dentro de subgênero *Symphyomyrtus* foi descrita por Byrne *et al.* (1996) entre *E. nitens* e três outras espécies, incluindo *E. grandis*. Em outro estudo, uma centena de pares de *primers* para microssatélites que amplificam produtos na espécie doadora (*E. grandis*) foram testados quanto à transferabilidade para quatro espécies de *Eucalyptus* pertencentes a subgêneros diferentes (Kirst *et al.*, 1997). Setenta e oito por cento dos locos amplificaram produtos em *E. dunnii* pertencentes ao mesmo

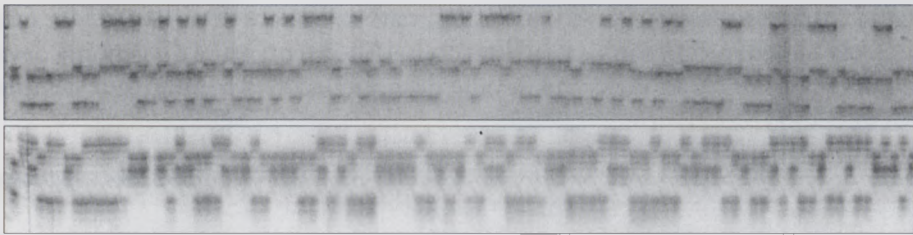


FIGURA 3. Padrões de segregação de dois locos microssatélites (painel superior e inferior) totalmente informativos em uma população de mapeamento de *E. grandis* x *E. urophylla*. A primeira pista na esquerda corresponde ao DNA padrão de fragmentos de tamanho conhecido. As pistas 2 e 3 são os dois genitores, ambos heterozigotos. Quatro genótipos distintos segregam na progênie F_1 (cortesia R. Brondani).

subgênero, mas de uma seção diferente. Entre 25% e 59% dos locos foram transferíveis entre espécies de subgêneros diferentes sendo que a transferabilidade diminuiu, a medida que foram analisadas espécies filogeneticamente mais distantes. Estes resultados indicam claramente que a perspectiva de transferência de informação de mapeamento gerada com marcadores microssatélites entre espécies de *Eucalyptus* é excelente, particularmente dentro de um subgênero, mas também em uma menor taxa entre subgêneros distantes.

A disponibilidade de locos SSR transportáveis, codominantes, multialélicos, baseados em PCR representa uma melhoria dramática na habilidade de conduzir mapeamento de ligação e análise de QTL em *Eucalyptus*. Esta taxa elevada de conservação de locos microssatélites entre as espécies mais importantes de *Eucalyptus* no mundo é um privilégio. Com isso, a perspectiva de um mapa “referência” útil para a maioria das espécies comercialmente importantes de *Eucalyptus* é real. Isto permitirá a rápida disseminação do uso destes marcadores em análises genéticas de *Eucalyptus*, facilitando a troca e comparação de informação entre laboratórios, particularmente quanto ao mapeamento de QTL e procedimentos de seleção assistida por marcadores. Dada a ampla base genética da maioria dos programas de melhoramento genético de *Eucalyptus*, e heterozigosidade na faixa de 0,7 a 0,9 para os locos SSR, é possível prever que essencialmente toda família que segregar fenotipicamente para a característica de interesse deverá fornecer informação de ligação genética entre marcador e QTL. Isto permitirá a integração dos dados de mapeamento de QTL provenientes de experimentos totalmente independentes. Finalmente, a transportabilidade de locos SSR entre cruzamentos não apenas dentro da mesma espécie, mas também entre espécies do mesmo subgênero deverá permitir a determinação da sintenia de QTL interespecíficos e deverá facilitar uma busca dirigida de novas variações alélicas a um QTL conhecido dentro e entre espécies, expandindo as oportunidades para introgressão e seleção assistida por marcadores no melhoramento por hibridização.

Até o momento mais de 150 locos microssatélites foram mapeados e todos os 11 grupos de ligação esperados identificados. Baseado em estimativas de heterozigosidade esperada, a proporção esperada de marcadores totalmente informativos seria de aproximadamente $0,8 \times 0,8$, i.e. 64%, ligeiramente menor do que os 80% observados para o primeiro conjunto de 20 marcadores, mas ainda

bastante alto, três vezes maior do que as estimativas obtidas com RFLP. Um mapa "referência" de marcadores microssatélites com 95% de cobertura do genoma deverá ser completado em meados do ano 2000 e disponibilizado à comunidade científica no mesmo ano (Brondani³).

7. SELEÇÃO ASSISTIDA DE MARCADORES (SAM) EM *Eucalyptus*

Atualmente, exemplos operacionais de seleção assistida por marcadores em plantas são essencialmente um sinônimo de retrocruzamento assistido por marcadores. É a aplicação mais direta desta tecnologia e está se tornando comum em programas de melhoramento genético de plantas anuais por todo o mundo (veja Lee, 1995). Marcadores moleculares fortemente ligados a alelos favoráveis a serem introgrididos a partir de um genitor selvagem para uma linhagem comercial ou de uma linhagem para outra, são usados para monitorar a sua herança em gerações de retrocruzamento. Ao mesmo tempo, seleção também é realizada para marcadores do genitor recorrente com o objetivo de recuperar o mais rápido possível a maior proporção do genoma recorrente. Este esquema acelera significativamente o lançamento de novas variedades ou híbridos. Em *Eucalyptus*, nenhuma característica de herança simples e grande impacto no melhoramento foi identificada até o momento que justificaria esta abordagem de melhoramento genético.

O desafio para a aplicação de SAM em espécies florestais é, em princípio, mais complexo do que em plantas anuais uma vez que pressupõe: a) a manipulação de características poligênicas com herdabilidade variável em populações de melhoramento com uma base genética heterogênea e provavelmente em equilíbrio de ligação; b) sua incorporação em esquemas de melhoramento genético que envolvem a alteração de frequências de alelos favoráveis através de seleção recorrente em grandes populações; c) lidar com correlações idade x idade e ambientes variáveis. No contexto do melhoramento de *Eucalyptus* as perspectivas, no entanto, são positivas. O melhoramento genético em esquemas de pequenos grupos reprodutivos de indivíduos altamente selecionados para desempenho como genitores de híbridos, em combinação com a propagação clonal de indivíduos selecionados, está sendo cada vez mais utilizado. Níveis elevados de desequilíbrio de ligação são gerados por hibridização e quantidades substanciais de variação genética não-aditiva podem ser capturadas através de propagação vegetativa. Estas são condições favoráveis para SAM (Strauss *et al.*, 1992). Alelos favoráveis poderiam ser identificados e "rankeados" em árvores que compõem populações de melhoramento de modo eficaz analisando suas descendências seja de meios-irmãos ou irmãos completos. A seleção dentro de famílias para indivíduos superiores em geração: de melhoramento avançado poderia ser aperfeiçoada significativamente através da incorporação de informação de marcadores.

Seja a teoria da genética quantitativa assim como o bom senso sugerem que a seleção assistida por marcadores em espécies florestais deveria ser útil particularmente em situações onde a herdabilidade da característica é baixa e a seleção ocorre ao nível de árvore individual. Porém, a implementação de SAM para tais características é uma tarefa desafiadora. É necessária uma informação extremamente precisa sobre a posição e efeito do QTL que somente pode ser derivada de experimentos com progênies extremamente grandes (da ordem de centenas ou milhares de indivíduos),

³Brondani, R. (UnB; Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia). Comunicação pessoal. 1998.

replicação clonal e em *backgrounds* genéticos e ambientes representativos. Até o momento, todos os QTL mapeados para características de herança realmente complexa não se enquadram nesta descrição. Na maioria dos experimentos até o momento, foram mapeados QTL para características que exibem herdabilidade intermediária à alta e, provavelmente, não foram identificados os melhores alelos que existem nas populações base, uma vez que somente uma amostra muito limitada de cruzamentos foi contemplada.

Experimentos de seleção assistida por marcadores em árvores têm visado principalmente crescimento volumétrico. Trata-se de uma característica de interesse universal, fácil de mensurar e tipicamente de baixa herdabilidade. Provavelmente em nossas condições tropicais, entretanto, esta não será uma característica alvo de primeira linha para SAM. A herdabilidade para características de crescimento é relativamente alta em eucaliptos tropicais, de forma que ganhos significativos podem ser facilmente alcançados adotando-se abordagens biométricas convencionais, uma vez que quantidades adequadas de variabilidade genética são geralmente disponíveis em populações de melhoramento. Estes ganhos podem ser impulsionados significativamente se for usada propagação clonal no plantio. Além disto se puderem ser utilizados clones no processo seletivo, a herdabilidade em sentido amplo ao nível de média de clone é freqüentemente da ordem de 0,8 a 0,9 permitindo um ordenamento quase perfeito e seleção de clones em uma idade muito precoce (1 a 2 anos) em condições tropicais (Rezende *et al.*, 1994). Marcadores moleculares para crescimento volumétrico nestas condições dificilmente trarão uma contribuição significativa para o aumento dos ganhos genéticos por unidade de tempo.

O custo envolvido para uma análise de marcadores moleculares implica que a aplicação mais provável de SAM em *Eucalyptus* será para características de qualidade. Há uma melhor justificativa do custo de SAM para características que resultem em um valor agregado significativo ao produto final, tais como hábito de ramificação (para madeira sólida), características químicas da madeira para rendimento ou qualidade de celulose e/ou papel, ou que permitam desenvolvimento clonal, tal como enraizamento adventício ou resposta à embriogênese somática. Considerando-se todas as possíveis características de qualidade, a opção seria feita para aquelas que demonstram maior herdabilidade, mas onde a avaliação de fenótipo é difícil ou cara. Características de qualidade da madeira tipicamente exigem que a árvore atinja a maturidade, envolvem amostragens destrutivas e procedimentos muitas vezes longos para a avaliação fenotípica em laboratório. Além da densidade básica da madeira, existem diversas características de qualidade da madeira que exibem tal comportamento e tem forte impacto nas propriedades finais da polpa de celulose e papel. Por exemplo, a herdabilidade em sentido amplo para o conteúdo de pentosanas, conteúdo de lignina e composição e espessuras da parede fibrosa são acima de 0,7 em *Eucalyptus* tropical no Brasil (Demuner & Bertolucci, 1992). Estes tipos de características representam excelentes alvos para SAM em *Eucalyptus*. Uma alta herdabilidade deveria a princípio refletir um número pequeno de locos controlando a variação da característica. Isto permite uma estimativa mais precisa da localização e magnitude de efeito dos principais QTL e uma manipulação mais rápida em gerações de melhoramento.

Estudos de simulação sobre a eficiência esperada de SAM em plantas abundam na literatura (por exemplo Lande & Thompson, 1990). Muito pouco, no entanto, é relatado sobre resultados experimentais, mesmo em plantas anuais. Em árvores, resultados de um estudo em andamento visando avaliar a eficiência de SAM precoce em testes de progênie de *Eucalyptus* foram relatados por Squilassi & Grattapaglia (1997). SAM foi conduzida com base em marcadores RAPD flanqueando 4 alelos de QTL previamente mapeados para crescimento volumétrico aos 6,5 anos para uma árvore elite de *Eucalyptus grandis*. Foi conduzida uma análise da coincidência entre quais indivíduos seriam selecionados com base em medidas de crescimento nas idades 12, 24 e 36 meses e quais seriam selecionados com base somente na presença dos alelos favoráveis aos QTL maternos (valor genotípico). Nas condições experimentais empregadas, somente 40% dos indivíduos selecionados, com base no fenótipo aos 36 meses, possuíam uma composição genotípica superior aos 4 QTL. Quando a eficiência da SAM foi avaliada levando-se em conta a contribuição dos QTL tanto a partir do genitor feminino como dos masculinos, esta continuou baixa para seleção de árvores individuais, mas foi respectivamente 100% e 83% nas idades de 24 e 36 meses para seleção de famílias de irmãos completos, i.e. 100% de coincidência entre famílias selecionadas com base no crescimento médio e valor genotípico médio da família. Os resultados indicaram que a SAM foi muito eficiente para seleção precoce ao nível de média de família, mas não ao nível de cada árvore individual. Considerando que as correlações juvenil x adulto em árvores são tipicamente baixas, é possível que a coincidência de seleção fenotípica e SAM ao nível individual melhore à medida que a idade de rotação se aproxime (6,5 anos). Este experimento deve ser visto portanto como em andamento.

Independentemente da característica, espera-se que um impacto significativo da SAM possa ser realizado na seleção precoce. Isto poderia se concretizar tanto no contexto de seleção recorrente em populações elite pequenas, bem como para a seleção de indivíduos para propagação vegetativa. Na seleção recorrente, indivíduos selecionados poderiam ser mais rapidamente recombinados para produzir a próxima geração, potencialmente aumentando o ganho genético por unidade de tempo. Na seleção de genótipos a serem usados como clones, a possibilidade de se praticar uma intensa seleção preliminar em um estágio bastante juvenil, evitaria o problema comum de perda de capacidade de regeneração ou de enraizamento adventício com a mudança da fase fisiológica. A pré-seleção de genótipos candidatos seria conduzida com base na composição de alelos favoráveis a QTL específicos antes que eles entrassem na fase de teste clonal, o que potencialmente reduziria a dimensão e custos destes testes. Para espécies com problemas de enraizamento, indivíduos selecionados poderiam então ser micropropagados ou poderiam ser mantidos em fase juvenil. Em uma primeira fase deste procedimento, resultados de testes clonais em campo seriam necessários para corroborar a seleção preliminar. Em estágios posteriores do programa, uma vez que a validação e experimentos preditivos tenham sido realizados, uma seleção rígida aos QTL poderia ser implementada e indivíduos selecionados poderiam ser encaminhados de forma imediata para jardins clonais visando à multiplicação operacional de clones.

A seleção assistida por marcadores para características múltiplas enfrentará muitas das mesmas dificuldades encontradas pela seleção convencional de

características múltiplas. Progenies de tamanhos muito grandes teriam que ser geradas para se obter uma probabilidade razoável de recuperar os genótipos com combinações favoráveis de alelos na maioria dos QTL de interesse. Ao se empregar a SAM, deverão ser estabelecidas prioridades, não somente para as características, mas também para os QTL específicos de cada característica. Isto vai demandar uma compreensão muito profunda da magnitude relativa de cada QTL e dos alelos segregando a estes locos, bem como de potenciais interações entre QTL e *backgrounds* genéticos e efeitos pleiotrópicos dos QTL. Entretanto, o mapeamento de ligação permitirá ao melhorista compreender as bases de correlações negativas entre características e potencialmente romper estas ligações indesejadas por meio da seleção de genótipos recombinantes específicos.

Uma estratégia realista para a implementação de SAM em *Eucalyptus* poderia ser a busca de somente alguns dos principais QTL para uma característica de qualidade que confere um valor agregado significativo. Teoricamente, quando a proporção total da variância genética aditiva explicada pelo locos marcadores excede a herdabilidade da característica, a seleção de marcadores *per se* é mais eficiente do que a seleção de um fenótipo individual. É possível que para uma característica específica, com apenas alguns alelos aos QTL de grande efeito, tal meta seja alcançada. Por outro lado, caso nenhum gene de maior efeito seja detectado em um experimento de tamanho razoável, talvez seja mais sábio descartar o uso da SAM para aquela característica. Embora estimativas de herdabilidade de uma característica sejam específicas para materiais genéticos e ambientes distintos, estes valores podem ser úteis para fornecer uma pista inicial. Intuitivamente, a probabilidade da existência de genes de maior efeito para características de baixa herdabilidade é menor do que para características de herdabilidade alta. Porém isto não pode ser usado como um parâmetro para descartar possíveis experimentos de mapeamento de QTL. Mesmo com baixa herdabilidade, as características ainda poderiam exibir QTL de maior efeito, e particularmente nestes casos SAM teria o maior impacto.

Com o advento de marcadores moleculares mais eficientes para a análise genômica, o mapeamento contínuo de QTL de maior efeito, a identificação dos genes responsáveis por estes QTL em espécies modelo, e o aprimoramento das estratégias de melhoramento para melhor explorar a variação dentro de famílias, as perspectivas de se usar SAM em gerações avançadas de melhoramento genético de eucaliptos são promissoras. Entretanto, a opção por seleção assistida por marcadores deve ser feita caso-a-caso e as expectativas não devem ser superestimadas até que dados experimentais sólidos sejam acumulados sobre os ganhos realizados com base na incorporação de seleção assistida por marcadores em comparação àqueles realizados exclusivamente com a seleção fenotípica convencional.

8. GERENCIAMENTO DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE MELHORAMENTO COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES

Enquanto que o uso de mapas genéticos para a seleção de genótipos superiores ainda representa um desafio que depende de pesquisa adicional, marcadores moleculares podem ser usados de modo imediato para resolver várias questões relacionadas ao gerenciamento e estruturação da variabilidade genética e identificação

individual em populações de melhoramento e produção. Estas aplicações podem ser particularmente úteis em espécies de *Eucalyptus* para as quais vários programas de melhoramento genético ainda estão em fase iniciais de estabelecimento.

Embora marcadores isoenzimáticos tenham sido tradicionalmente utilizados para estes propósitos (Moran & Bell, 1983), polimorfismos de DNA fornecem um outro nível de resolução e variabilidade tanto ao nível de loco individual com valores de heterozigosidade muito maiores, quanto ao nível de genoma com maior cobertura. Tecnologias de marcadores moleculares de alto desempenho permitem uma amostragem muito eficiente do genoma e uma estimativa precisa de divergência genética, variabilidade e discriminação entre genótipos. Algumas aplicações operacionais dos marcadores moleculares para o gerenciamento da variabilidade genética em *Eucalyptus* são apresentadas a seguir.

8.1 DISCRIMINAÇÃO E VERIFICAÇÃO DE CLONES ELITE

Marcadores de DNA são muito potentes para a resolução de questões de identidade clonal. A identificação correta de clones tem implicações importantes em diversos procedimentos de melhoramento genético, gerenciamento e controle de qualidade de pomares de sementes e plantios operacionais. Em um estudo de discriminação e verificação de genótipos de *Eucalyptus*, a similaridade baseada em marcadores RAPD foi relativamente alta. Porém, todos os indivíduos analisados puderam ser distinguidos entre si. Perfis RAPD únicos permitiram a detecção de casos onde clones de eucalipto haviam sido identificados incorretamente. Um exemplo envolveu a confirmação de que um único clone era de fato uma mistura de dois clones diferentes (Keil & Griffin, 1994). Estudos deste tipo são hoje muito comuns e rotineiramente utilizados por um número crescente de empresas florestais em todo o mundo.

Embora marcadores RAPD forneçam um poder de discriminação razoável para a identificação clonal, em situações não raras de existência de parentesco entre clones ou em investigações mais refinadas de relacionamento genético entre clones, ou ainda para o estabelecimento de um *fingerprint* genético robusto para fins de registro de cultivares ou disputa legal torna-se absolutamente necessário o uso de marcadores moleculares mais específicos e com maior conteúdo informativo tais como marcadores baseados em microssatélites.

O alto grau de multialelismo e a herança mendeliana codominante simples e clara dos microssatélites fornecem um sistema extremamente potente para a identificação única de indivíduos de *Eucalyptus* principalmente quando existe a possibilidade de existir ascendentes em comum entre os indivíduos. Kirst *et al.* (1998) demonstraram o alto poder de resolução desta classe de marcadores em *Eucalyptus*. Uma população de melhoramento de 192 indivíduos de *E. grandis* foi genotipada com um conjunto de seis microssatélites altamente polimórficos (Figura 4). O número de alelos detectados variou de 6 a 33 com uma média de $19,8 \pm 9,2$. A heterozigosidade esperada foi em média $0,86 \pm 0,11$. Ao se utilizarem 3 locos, todos os 192 indivíduos puderam ser prontamente discriminados. A probabilidade combinada de identidade (i.e. a probabilidade de dois indivíduos terem o mesmo genótipo multiloco devido simplesmente ao acaso) considerando-se todos os 6 locos conjuntamente era inferior

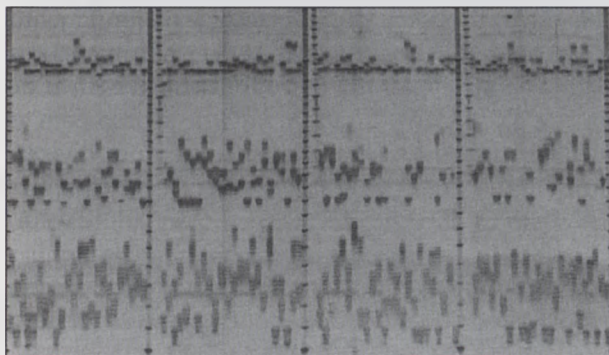


FIGURA 4. Perfis genéticos de 96 indivíduos elite de *E. urophylla* obtidos com um sistema *multiplex* de três locos microssatélites com detecção em nitrato de prata. Os genótipos multiloco altamente heterozigotos observados permitiram a discriminação imediata de todos os 96 indivíduos. Conjuntos de 24 indivíduos são separados por padrões de tamanho (escada alélica de 10 bp - Gibco) (Kirst *et al.*, 1998).

a 1 em 2 bilhões. Estimativas de coeficientes de similaridade calculadas a partir de dados de microssatélites foram bem menores do que aquelas normalmente obtidas em estudos semelhantes com marcadores RAPD e AFLP. A análise de locos microssatélites em sistemas *multiplex* (i.e. vários locos analisados simultaneamente) com múltiplas fluorescências e genotipagem em sequenciador automático tem sido aperfeiçoada para a detecção simultânea de até seis locos (Kirst *et al.*, 1998; Kirst, 1999).

8.2 CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE MELHORAMENTO

Populações de melhoramento podem ser caracterizadas pela quantificação dos níveis e organização de variabilidade genética dentro e entre subpopulações, grupos de reprodução e progênies. Estes dados podem ser utilizados para melhorar a estrutura das populações de melhoramento, para infundir material novo em populações e decidir sobre a seleção, enriquecimento ou eliminação de acessos de germoplasma em bancos. A redução de variabilidade genética em populações de melhoramento é essencialmente o resultado da seleção direcional aliada ao incremento da endogamia devido a cruzamentos aparentados e processos de deriva genética. A restrição da contribuição genética de uma mesma família para a população selecionada, i.e. número de indivíduos selecionados por família, promove a manutenção da variabilidade, mas por outro lado tipicamente reduz o ganho genético potencial. A restrição do número de famílias pode aumentar o ganho mas reduz a variabilidade genética. Em sistemas de *pedigree* incompletos, frequentemente usados na forma de famílias de meios-irmãos para avançar gerações de melhoramento de *Eucalyptus*, um sistema de monitoramento genético baseado em marcadores para acompanhar os níveis de variabilidade genética ao longo dos diferentes ciclos de um programa de melhoramento poderia ser particularmente útil, uma vez que permitiria uma flexibilidade muito maior durante o processo de seleção e auxiliaria no controle da taxa de incremento da endogamia.

Gaiotto & Grattapaglia (1997) estimaram a distribuição da variabilidade genética dentro e entre famílias de polinização aberta de uma população de melhoramento a longo prazo de *E. urophylla* empregando marcadores AFLP. Uma análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que uma proporção significativamente mais elevada da variação genética foi mantida dentro das famílias (69%) em comparação à variação encontrada entre famílias (31%). Uma análise da similaridade genética indicou que

as 121 famílias de polinização aberta que compuseram a população de melhoramento exibiram uma distribuição uniforme de similaridade genética sem agrupamentos significativos das famílias. A diversidade genética total entre indivíduos dentro de famílias foi calculada e as famílias foram ordenadas ("rankeadas") de acordo com as estimativas de diversidade genética da mais para a menos geneticamente diversa. Com base nesta análise, foi proposta uma estratégia de seleção intra e interfamiliar baseada na incorporação das estimativas de diversidade genética. Esta abordagem, aplicada de forma complementar à seleção fenotípica com base no *ranking* das famílias para características de importância econômica, permite a maximização do ganho genético simultaneamente à maximização da diversidade genética mantida na nova população selecionada.

Um protocolo para isto envolveria os seguinte passos: a) com base em testes de progênie, famílias de polinização aberta poderiam ser ordenadas pelo valor fenotípico de acordo com um índice de seleção; b) uma amostra de 12 a 16 indivíduos de cada família classificada fenotipicamente como sendo de ponta, seriam genotipados com uma combinação de AFLP ou RAPD e microssatélites, fornecendo uma ampla cobertura da variabilidade seja ao nível de locos como de genoma. Cerca de duas vezes o número de famílias a serem selecionadas seria genotipado. Isto permitiria flexibilidade de escolha no momento da utilização da informação de diversidade genética intrafamiliar; c) os dados de marcadores seriam usados para calcular a diversidade genética existente dentro de cada família; as famílias seriam ordenadas conforme a diversidade genética; d) no momento da seleção inter e intrafamiliar, seria incorporada a informação sobre diversidade genética para cada família. Por exemplo, em casos onde famílias forem equivalentes para o valor fenotípico, a seleção seria baseada na diversidade genética, i.e. a família com maior diversidade seria selecionada. Além disso, nestas famílias um número maior de indivíduos poderia ser selecionado para a próxima geração.

8.3 ESTIMATIVA DE SIMILARIDADE GENÉTICA PARA O DELINEAMENTO DE CRUZAMENTOS E PLANTIOS OPERACIONAIS

Em programas de melhoramento florestal, independentemente da espécie, cruzamentos controlados são geralmente caros, levam tempo e demandam pessoal treinado. Em função da dificuldade de realizar todos os possíveis cruzamentos entre indivíduos selecionados, escolhas sempre têm que ser feitas sobre quais árvores elite devem ser acasaladas. Alguma seleção, baseada no desempenho de cada indivíduo seja como árvore *per se* ou como genitor, ou ainda em informações de origem, deve ser feita antes de incluir um indivíduo em um esquema de cruzamento. Apesar dos recentes desenvolvimentos de novas metodologias mais rápidas e baratas para a realização de cruzamentos controlados em *Eucalyptus* (de Assis, T.F. – Comunicação pessoal), a realização de um grande número de cruzamentos controlados ainda é um fator limitante em vários programas de melhoramento. Qualquer método que permita prever o desempenho de uma árvore como genitor merece atenção. Um dos "cálculos sagrados" dos melhoristas moleculares tem sido a possibilidade de prever com precisão o desempenho da progênie baseando-se em estimativas de distância genética entre os genitores obtidas a partir de dados de marcadores moleculares. Vaillancourt *et al.* (1995b) utilizaram distâncias genéticas baseadas em marcadores RAPD para

predizer a heterose em progênies de *E. globulus*. A capacidade da distância genética em prever heterose foi significativa, mas explicou somente 5% da variação na capacidade específica de combinação. Baril *et al.* (1997) utilizaram a estrutura da diversidade genética estimada com marcadores RAPD dentro e entre *E. grandis* e *E. urophylla* para determinar equações de predição para crescimento volumétrico de híbridos com 38 meses. Este estudo surpreendentemente mostrou que a distância genética baseada em marcadores RAPD com frequências semelhantes nas duas espécies previu com sucesso o valor de um cruzamento. Por este modelo, a distância genética estimada entre indivíduos das duas espécies explicou a capacidade geral de combinação e a capacidade específica de combinação para crescimento volumétrico com um coeficiente global de determinação de 81,6%.

Marcadores RAPD foram usados para recomendar cruzamentos entre indivíduos geneticamente mais divergentes em um programa de seleção recorrente recíproca entre *E. grandis* e *E. urophylla* para melhoramento híbrido no Brasil (Ribeiro *et al.*, 1997). O conjunto dos 20 cruzamentos mais divergentes e os 20 menos divergentes entre as duas espécies que constituem as duas populações, foi recomendado. A perspectiva deste estudo é que cruzamentos entre os indivíduos mais divergentes irão potencialmente maximizar a segregação nas progênies resultantes e que segregantes transgressivos sejam recuperados e clonados. Cruzamentos entre indivíduos menos divergentes também foram recomendados com o objetivo de fornecer um controle experimental e potencialmente com a finalidade de recuperar progênies híbridas mais uniformes. Estas hipóteses serão testadas quando as progênies F₁ derivadas dos cruzamentos divergentes e próximos alcançarem a idade de avaliação. Dependendo dos resultados deste experimento em andamento, serão feitas recomendações futuras sobre a possibilidade de utilizar dados de marcadores moleculares nestas populações. Se estas hipóteses forem confirmadas, uma economia significativa de tempo e recursos poderá advir, uma vez que a realização de todos os cruzamentos controlados possíveis entre os indivíduos selecionados de cada população na fase recíproca não seria uma meta atingível.

Dados de marcadores RAPD foram usados para quantificar a similaridade genética entre clones elite de *Eucalyptus* para fins de plantio operacional de talhões clonais. Como a história do melhoramento genético seletivo em *Eucalyptus* é muito recente, informações sobre a origem de muitos destes clones são precárias. Plantações clonais de *Eucalyptus* geralmente envolvem apenas alguns genótipos superiores de origem desconhecida. Costa e Silva & Grattapaglia (1997) utilizaram marcadores RAPD para quantificar a similaridade genética em um grupo de 15 clones elite. Análises comparativas de similaridade genética mostraram que existia maior variabilidade genômica no grupo de clones do que dentro e entre famílias de meios-irmãos de polinização aberta. Dados de similaridade genética entre clones também foram usados para propor uma estratégia de plantio em “mosaico” genético, i.e. evitando o plantio de clones geneticamente mais próximos em talhões contíguos de floresta. Esta estratégia proposta se baseou na premissa de que clones geneticamente relacionados compartilham uma origem e ancestralidade comuns, tendo estado sob pressões seletivas semelhantes e portanto compartilham com maior probabilidade os mesmos alelos de suscetibilidade ou tolerância a pragas e patógenos.

8.4 SISTEMA DE CRUZAMENTO E DETERMINAÇÃO DE PATERNIDADE EM POPULAÇÕES DE MELHORAMENTO

A prática do melhoramento florestal com controle de ambos os sexos é difícil e demorado em espécies de *Eucalyptus*. A polinização controlada requer a emasculação e o número de sementes obtidas por cápsula é normalmente pequeno. A condução das populações de melhoramento via polinização aberta e controle exclusivo do genitor materno com testes de progênes de meios-irmãos é prática comum na maioria dos programas de melhoramento genético de espécies do gênero. É uma opção de baixo custo que permite boa estimativa do valor de melhoramento dos genitores maternos. Entretanto, a maior parte da variabilidade genética é encontrada dentro das famílias e a intensidade de seleção dentro de famílias normalmente é limitada pelo número de indivíduos plantados em um teste de progênie (geralmente menos do que 50 por família). O conhecimento de taxas de fecundação cruzada *versus* autofecundação é essencial para a manutenção de níveis adequados de variabilidade genética para ganhos contínuos. A taxa de fecundação cruzada em uma população de melhoramento de *Eucalyptus urophylla* conduzida por polinização aberta foi estimada usando-se dois tipos de marcadores dominantes baseados em PCR, RAPD e AFLP. As estimativas de taxas de fecundação cruzada indicaram a predominância de fecundação cruzada ($\approx 90\%$) sugerindo que estava ocorrendo uma manutenção adequada de variabilidade genética dentro de famílias (Gaiotto *et al.*, 1997b).

Finalmente, grandes plantios operacionais de famílias de polinização aberta oriundos de pomares de semente estão se tornando prática comum em diversas empresas florestais. Ribeiro *et al.* (1998) empregaram marcadores microssatélites para o controle de qualidade das sementes provenientes do pomar e para a determinação de paternidade de indivíduos superiores selecionados em florestas operacionais deste tipo. A análise resultou na identificação de dois genitores masculinos específicos que geraram a maior parte dos indivíduos selecionados. Esta informação permitiu o desbaste do pomar existente e o estabelecimento de um pomar de semente triclinal para a produção de sementes de alta qualidade. Este estudo, além de demonstrar o poder de resolução da análise de marcadores moleculares para o controle de qualidade de contaminação de semente e pólen em descendências geradas de pomares de semente, estabeleceu uma nova metodologia com grande potencial de utilização no melhoramento de *Eucalyptus*, bem como de outras espécies florestais alógamas nas quais a realização de grande número de cruzamentos controlados é difícil e demorada. A utilização de baterias de marcadores moleculares microssatélites altamente hipervariáveis permitiu a determinação precisa de paternidade de descendentes superiores o que possibilitou a detecção de combinações específicas de genitores para a geração de descendências de maior crescimento volumétrico. Embora neste trabalho foram estudadas progênes de meios-irmãos e portanto em princípio não havia questionamento quanto à maternidade, o poder de resolução dos marcadores moleculares permitiria da mesma forma a determinação simultânea de maternidade e paternidade caso isso fosse necessário. No caso específico de *Eucalyptus*, esta metodologia representa uma ferramenta interessante para seleção retrospectiva, ou seja um desbaste seletivo de árvores em pomares de semente sejam eles pomares clonais ou por mudas.

9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Tecnologias de análise genômica com marcadores moleculares estão em constante e rápida evolução, sendo um dos desafios a caracterização da variação de sequência de DNA entre indivíduos em grande número de amostras com ampla cobertura genômica. Atualmente, diversas tecnologias que dispensam o uso de eletroforese baseando-se sim na hibridização de DNA em lâminas de algumas dezenas de milímetros quadrados contendo moléculas de DNA muito específicas imobilizadas em arranjos sistemáticos (os chamados *microarrays* ou *DNA chips*) estão se tornando disponíveis, principalmente para seres humanos e organismos modelo (por exemplo Chee *et al.*, 1996). Esta tecnologia está acelerando enormemente a análise de expressão gênica de milhares de genes “em paralelo” (i.e. simultaneamente) e espera-se que venha a revolucionar os procedimentos de genotipagem individual, geração de perfis de expressão e mapeamento de ligação em organismos vivos. Esta tecnologia está permitindo ainda a exploração de uma das classes mais abundantes de polimorfismos de DNA em genomas de eucariotos, os SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) ou polimorfismos de nucleotídeos únicos. Estas mutações em pares de bases individuais ocorrem em média uma vez a cada 1000 pares de base no genoma humano (Kruglyak, 1997) e requerem um ensaio binário do tipo +/- e não uma separação molecular por tamanho ou carga. Em seres humanos, a disponibilidade de grandes números de marcadores STS (*Sequence Tagged Sites*) ou seja sítios identificados (etiquetados) por sequências levou ao desenvolvimento de um grande número de marcadores bi-alelcos baseados em SNP. Um mapa genético do genoma humano com 2227 SNPs foi construído, e protótipos de *chips* de DNA para genotipagem foram desenvolvidos para permitir a genotipagem simultânea de 500 SNPs (Wang *et al.*, 1998). O desenvolvimento destas tecnologias depende essencialmente da disponibilidade de sequenciamento genômico em larga escala. Esta informação está rapidamente sendo gerada para seres humanos e organismos modelo incluindo *Arabidopsis* como o principal representante das plantas. Embora homologias de sequência existam para genes expressos, potencialmente permitindo rápidos avanços em estudos de expressão gênica, a homologia para sequências não codificantes, nas quais a maioria dos SNPs é encontrada cai rapidamente entre organismos taxonomicamente distantes. Sendo assim, algum tempo será necessário com a tecnologia disponível hoje para que a genotipagem de alto desempenho seja factível em espécies florestais e da mesma forma para a maioria das plantas cultivadas.

Os avanços nas tecnologias de análise genômica estão sendo acompanhados pelo estabelecimento de um número crescente de laboratórios privados de prestação de serviço especializado de genotipagem a custos competitivos. O desafio para o melhorista genético não será gerar informação de marcadores, mas sim ser rápido e criativo ao saber exatamente qual informação gerar e especialmente como utilizá-la. A este respeito, inovações nas táticas de melhoramento genético florestal terão que ser consideradas pelos melhoristas nas décadas por vir. Pequenos grupos de reprodução, testes de grandes famílias e seleção dentro de famílias com alta intensidade de seleção serão algumas delas. Novas e melhores ferramentas de análise estatística para dados discretos de marcadores moleculares têm sido desenvolvidas nos últimos anos e elas

estão se tornando cada vez mais refinadas, permitindo a análise e acomodação de diversos tipos de delineamentos para o mapeamento QTL e a construção de mapas genéticos, bem como a simulação de esquemas de seleção assistida por marcadores (Liu, 1998).

Cientes do tipo de informação que marcadores moleculares podem fornecer, e os custos envolvidos, a pergunta que resta é se há oportunidades reais no momento para a incorporação de tecnologias de marcadores moleculares em programas de melhoramento genético de espécies florestais. Claramente, os marcadores podem ser usados como uma ferramenta para gerenciar a variabilidade genética de forma inteligente. Esta é uma tecnologia pronta-para-uso e aplicável em diversos procedimentos operacionais tanto em programas de melhoramento iniciais quanto avançados. Embora útil, isto poderia não ser uma prioridade para programas ainda em fase de concepção, conduzidos com orçamentos muito limitados e onde ganhos genéticos significativos podem ser alcançados implementando-se procedimentos convencionais de seleção juntamente à propagação clonal. Em programas de melhoramento genético avançado, os marcadores poderiam ser úteis para seguir a herança e introgressão de alelos favoráveis. Nesta fase, quando alelos favoráveis de frequência intermediária e alta tiverem sido explorados, a variação se torna limitante e o progresso genético dependerá da sintonia fina de combinações genotípicas por meio da alteração das frequências de alelos raros com grande magnitude de efeito aos principais QTL. SAM seria aplicada mais provavelmente no melhoramento genético de populações elite múltiplas desenvolvidas especificamente para características de qualidade. Este esforço deverá contemplar os indivíduos geneticamente mais valiosos em uma população de melhoramento, e, provavelmente, iniciando com apenas uma característica em um grupo de reprodução específico ou em uma população elite específica para SAM. A SAM dificilmente seria justificável para o avanço da população base do programa da qual são extraídos os grupos de reprodução, seja devido ao grande número de indivíduos envolvidos quanto tendo em vista os objetivos gerais de seleção para adaptabilidade tipicamente utilizados nesta fase.

A incorporação efetiva de SAM no melhoramento genético de *Eucalyptus* claramente requer um esforço experimental adicional significativo. Para este fim, é essencial que experimentos de localização e caracterização de QTL sejam estabelecidos com grandes tamanhos amostrais, replicação clonal (sempre que possível), em diversos locais e *backgrounds* genéticos. Uma vez que os genitores utilizados nos experimentos de mapeamento de QTL em árvores são escolhidos ao acaso a partir das melhores árvores da população de melhoramento, o uso de múltiplos genitores em delineamentos fatoriais deve ser considerado, a fim de aumentar o poder de detecção de QTL e ordenamento dos efeitos alélicos a estes locos. O desafio para o melhorista molecular não será o mapeamento dos QTL, mas sim o descobrimento e ordenamento por magnitude de efeito da diversidade alélica existente aos QTL conhecidos. Para conduzir tal classificação, um mapa de ligação "referência" de marcadores microsatélites multialélicos transportáveis será fundamental. Somente através da localização de alelos de grande efeito, a SAM irá efetivamente superar a eficiência da seleção fenotípica e contribuirá para o avanço mais rápido de programas de melhoramento genético. Embora uma série de experimentos de mapeamento de QTL estejam em andamento em todo o mundo, eles certamente não são suficientes para

fornecer as respostas definitivas e rápidas para todos os principais desafios que existem para a implementação de SAM em espécies florestais. Uma vez que a SAM deve ser considerada caso-a-caso tanto em termos de características alvo quanto de material genético disponível, qualquer empresa florestal que deseje efetivamente adotar o melhoramento molecular, deve planejar um esforço significativo interno em pesquisa e desenvolvimento ou através de cooperativas de pesquisa pré-competitiva a fim de avaliar concretamente o potencial desta tecnologia no melhoramento genético.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais a todos os meus orientados de iniciação científica, mestrado e doutorado no Laboratório de Genética de Plantas da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia pelas suas valiosas contribuições nos trabalhos discutidos. Agradeço à ARACRUZ Celulose S.A e seu corpo técnico pela colaboração contínua na condução de experimentos. Este trabalho foi financiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia através de um projeto competitivo apoiado pelo PADCT/FINER, bem como uma bolsa de produtividade em pesquisa do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARIL, C.P.; VERHAEGEN, D.; VIGNERON, PH.; BOUVET, J.M.; KREMER, A. Structure of the specific combining ability between two species of *Eucalyptus*: I. RAPD data. *Theoretical and Applied Genetics*, v.94, p.796-803, 1997.
- BEAVIS W.D.; GRANT D.; ALBERTSEN M.; FINCHER, R. Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci, *Theoretical and Applied Genetics*, v.83, p.141-145, 1991.
- BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Comparative mapping in *Eucalyptus* reveals significant RAPD locus linkage and order conservation between trees and greater meiotic recombination in females. In: INTERNATIONAL IUFRO CONFERENCE ON EUCALYPTUS GENETICS AND SILVICULTURE, Salvador, 1997. *Proceedings*. Salvador, 1997. v.2, p.24-29.
- BRONDANI, R.P.V.; CAMPINHOS, E.; GRATTAPAGLIA, D. Mapped RAPD markers are transferable among *Eucalyptus* trees from the same population. In: INTERNATIONAL IUFRO CONFERENCE ON EUCALYPTUS GENETICS AND SILVICULTURE, Salvador, 1997. *Proceedings*. Salvador, 1997. v.2, p.111-115.
- BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development and mapping of microsatellite based markers in *Eucalyptus*. *Theoretical and Applied Genetics*, v.97, p.816-829, 1998.
- BYRNE, M.; MURRELL, J.C.; ALLEN, B.; MORAN, G.F. An integrated genetic linkage map for eucalypts using RFLP, RAPD and isozyme markers, *Theoretical and Applied Genetics*, v.91, p.869-875, 1995.
- BYRNE M.; MARQUES-GARCIA M.I.; UREN T.; SMITH D.S.; MORAN G.F. Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. *Australian Journal of Botany*, v.44, p.331-341, 1996.
- BYRNE M.; MURRELL J.C.; OWEN J.V.; KRIEDEMANN P.; WILLIAMS E.R.; MORAN, G.F. Identification and mode of action of quantitative trait loci affecting seedling height and leaf area in *Eucalyptus nitens*, *Theoretical and Applied Genetics*, v.94, p.674-681, 1997a.
- 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*, v.95, p.975-979, 1997b.
- CAETANO-ANOLLES, G. Scanning of nucleic acids by in vitro amplification: new developments and applications. *Nature Biotechnology*, v.14, p.1668-1674, 1996.
- CAMPINHOS, E.N.; GRATTAPAGLIA, D.; BERTOLUCCI, F.L.; ALFENAS, A. Stability of expression of QTL alleles controlling growth across variable genetic backgrounds in *Eucalyptus grandis*. In: INTERNATIONAL IUFRO CONFERENCE ON EUCALYPTUS GENETICS AND SILVICULTURE, Salvador, 1997. *Proceedings*. Salvador, 1997. v.2, p.186-191.
- CHEE M.; YANG, R.; HUBBEL, E.; BERNO, A.; HUANG, X.; STERN, D.; WINKLER, J.; LOCKHART, D.; MORRIS, M.; FODOR, S. Accessing genetic information with high-density DNA arrays, *Science*, v.74, p.610-614, 1996.

- COSTA E SILVA, C.; GRATAPAGLIA, D. RAPD relatedness of elite clones, applications in breeding and operational clonal forestry. In: INTERNATIONAL IUFR0 CONFERENCE ON EUCALYPTUS GENETICS AND SILVICULTURE, Salvador, 1997. *Proceedings*. Salvador, 1997. v.2, p.161-166.
- DEMUNER, B. J.; BERTOLUCCI, F.L.G. Tree breeding, a new approach through evaluation of genetic and phenotypic parameters of eucalypt wood and pulp. In: CONGRESS OF THE BRAZILIAN PULP AND PAPER INDUSTRIES, 26., São Paulo, 1992. *Proceedings*. São Paulo, 1992. p.411-423.
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, D.; HARWOOD, C.; VAN WYK, G. *Eucalypt domestication and breeding*. Oxford: Clarendon Press, 1994.
- GAIOTTO, F.A.; GRATAPAGLIA, D. Estimation of genetic variability in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers. In: INTERNATIONAL IUFR0 CONFERENCE ON EUCALYPTUS GENETICS AND SILVICULTURE, Salvador, 1997. *Proceedings*. Salvador, 1997. v.2, p.46-52.
- GAIOTTO, F.A.; CIAMPI, A.Y.; GRATAPAGLIA, D. AFLP in *Eucalyptus*: fast construction of linkage maps and estimation of mating system and genetic variation in a breeding population. In: PLANT AND ANIMAL GENOME, 5., San Diego, 1997. *Abstracts*. San Diego, 1997a. p.276.
- GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, M.; GRATAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* s.t. Blake with dominant RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, v.95, p.842-849, 1997b.
- GRATAPAGLIA, D. Pseudo-testcross mapping strategy using RAPD markers. In: MICHELI, M.R.; BOVA, R. (Ed.) *Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR*. Berlin: Springer Verlag, 1997. p.201-218.
- GRATAPAGLIA, D.; BRADSHAW, H.D. JR. Nuclear DNA content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. *Canadian Journal of Forest Research*, v.24, p.1074-1078, 1994.
- GRATAPAGLIA, 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, p.1121-1137, 1994.
- GRATAPAGLIA, 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*, v.90, p.933-947, 1995.
- GRATAPAGLIA, 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, p.1205-1214, 1996.
- GRATAPAGLIA, D.; CHAPARRO, J.X.; WILCOX, P.; MCCORD, S.; WERNER, D.; AMERSON, H.; MCKEAND, S.; BRIDGWATER, F.; WHETTEN, R.; O'MALLEY, D.; SEDEROFF, R.R. Mapping in woody plants with RAPD markers, application to breeding in forestry and horticulture. In: CSA/AAHS SYMPOSIUM "APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING", Minneapolis, 1992. *Proceedings*. Minneapolis, 1992. p.37-40.
- GROOVER, A.; DEVEY, M.; FIDDLER, T.; LEE, J.; MEGRAW, R.; MITCHELL-OLDS, T.; SHERMAN, B.; VUJCIC, S.; WILLIAMS, C.; NEALE, D.B. Identification of quantitative trait loci influencing wood specific gravity in an outbred pedigree of loblolly pine. *Genetics*, v.138, p.1293-1300, 1994.
- JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C.; BROMMONSHENKEL, S.H.; VALLE, L.A.C.; CHEAVEGATTI, A.; ODA, S.; MELLO, E.J. Inheritance of the rust (*Puccinia psidii*) resistance in *Eucalyptus grandis*. *Genetics and Molecular Biology*, v.21, p.185, 1998.
- KEIL, M.; GRIFFIN, A.R. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. *Theoretical and Applied Genetics* v. 89, 442-450, 1994.
- KIRST, M. Desenvolvimento e aplicação de sistemas de genotipagem multiloco semi-automatizados, baseados em marcadores microsatélites, para espécies do gênero *Eucalyptus*. Viçosa: UFV, 1999. 149p. Dissertação, Mestrado.
- KIRST M., BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; GRATAPAGLIA, D. Screening of designed primer pairs for recovery of microsatellite markers and their transferability among species of *Eucalyptus*. In: INTERNATIONAL IUFR0 CONFERENCE ON EUCALYPTUS GENETICS AND SILVICULTURE, Salvador, 1997. *Proceedings*. Salvador, 1997. v.2, p.167-171.
- KIRST, M.; BRONDANI, R.P.V.; CIAMPI, A.Y.; GAIOTTO, F.A.; GOMES, M.; GRATAPAGLIA, D. Fingerprinting *Eucalyptus* genotypes with highly informative microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, v.21, p.185, 1998.
- KRUGLYAK, L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nature Genetics*, v.17, p.21-24, 1997.
- LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, v.124, p.743-756, 1990.
- LANDER, E.S. The new genomics, global views of biology. *Science*, v.274, p.536-539, 1996.
- LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy*, v.55, p.265-344, 1995.
- LIU, B.H. *Statistical genomics*. Boca Raton: CRC Press, 1998.

- MARQUES, C.M.; ARAUJO, J.A.; FERREIRA, J.G.; WHETTEN, R.; O'MALLEY, D.M.; LIU, B.H.; SEDEROFF, R. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. *Theoretical and Applied Genetics* v.96, p.727-737, 1998a.
- MARQUES, C.M.; VASQUEZ-KOOL, J.; CAROCHA, V.J.; FERREIRA, J.G.; O'MALLEY, D.M.; LIU, B.H.; SEDEROFF, R.R. Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998b. /Sumetido/
- MORAN, G.F.; BELL, J.C. *Eucalyptus*. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Ed.) *Isozymes in plant genetics and breeding*. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.423-441.
- MURANTY, H. Power of tests for quantitative trait loci detection using full-sib families in different schemes. *Heredity*, v.76, p.156-165, 1996.
- O'MALLEY, D.M.; GRATTAPAGLIA, D.; CHAPARRO, J.X.; WILCOX, P.L.; AMERSON, H.V.; LIU, B.H.; WHETTEN, R.; MCKEAND, S.; KUHLMAN, E.G.; MCCORD, S.; CRANE, B.; SEDEROFF, R.R. Molecular markers, forest genetics and tree breeding. In: GUSTAFSON, J.P.; FLAVELL, R.B. (Ed.) *Genomes of plants and animals*. New York: Plenum Press, 1996. p.87-102.
- O'MALLEY, D.M.; MCKEAND, S.E. Marker assisted selection for breeding value in forest trees. *Forest Genetics*, v.1, p. 231-242, 1994.
- RAFALSKI, J.A.; VOGEL, J.M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, E.; LAI, E. (Ed.) *Nonmammalian genomic analysis: a practical guide*. London: Academic Press, 1996. p. 75-134.
- REZENDE, G.D.S.P.; BERTOLUCCI, F.L.G.; RAMALHO, M.A.P. Eficiência da seleção precoce na recomendação de clones de eucalipto avaliados no norte do Espírito Santo e sul da Bahia. *Cerne*, v.1, p.45-50, 1994.
- RIBEIRO, V.J.; BERTOLUCCI, F.L.G.; GRATTAPAGLIA, D. RAPD marker-guided matings in a reciprocal recurrent selection program of *Eucalyptus*. In: INTERNATIONAL IUFR0 CONFERENCE ON EUCALYPTUS GENETICS AND SILVICULTURE, Salvador, 1997. *Proceedings*. Salvador, 1997. v.2, p.156-160.
- RIBEIRO, V.J.; BRONDANI, R.P.V.; CIAMPI, A.Y.; GRATTAPAGLIA, D. Paternity determination of superior open pollinated progenies of *Eucalyptus* based on microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, v.21, p.212, 1998.
- SHEPHERD, M.; CHAPARRO, J.; DALE, G.; JEFFERSON, L.; DUONG, H.; VOGEL, H.; WALSH, J.; GIBBINGS, M.; TEASDALE, R. Mapping insect resistance and essential oil traits in a tropical *Eucalyptus* hybrid. In: CRC/IUFRO CONFERENCE - EUCALYPT PLANTATIONS, IMPROVING FIBRE YIELD AND QUALITY, Hobart, 1995. *Proceedings*. Hobart, 1995. p.420-423.
- SQUILASSI, M.G.; GRATTAPAGLIA, D. Mapping QTL using linkage disequilibrium and efficiency of early marker assisted selection in *Eucalyptus*. In: PLANT AND ANIMAL GENOME, 5., San Diego, 1997. *Abstracts*. San Diego, 1997. p.296.
- STRAUSS, S.H.; LANDE, R.; NAMKOONG, G. Limitations of molecular-marker aided selection in forest tree breeding. *Canadian Journal of Forest Research*, v.22, p.1050-1061, 1992.
- VAILLANCOURT, R.E.; POTTS, B.M.; MANSON, A.; ELDRIDGE, T. AND REID J.B. Using RAPDs to detect QTL in an interspecific F2 hybrid of *Eucalyptus*. In: CRC/IUFRO CONFERENCE - EUCALYPT PLANTATIONS, IMPROVING FIBRE YIELD AND QUALITY, Hobart, 1995. *Proceedings*. Hobart, 1995a. p.430-433.
- VAILLANCOURT, R.E.; POTTS, B.M.; WATSON, M.; VOLKER, P.W.; HODGE, G.R.; REID J.B.; WEST, A.K. Prediction of heterosis using RAPD generated distances between *Eucalyptus globulus* trees. In: CRC/IUFRO CONFERENCE - EUCALYPT PLANTATIONS, IMPROVING FIBRE YIELD AND QUALITY, Hobart, 1995. *Proceedings*. Hobart, 1995b. p.455-456.
- VERHAEGEN, D. Prediction des valeurs genetiques, cartographie genetique et recherche de QTL dans un croisement interspecific *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. Paris: Universite de Paris-Sud, 1996. 138p. These, Docteur.
- VERHAEGEN, D.; PLOMION, C. Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers. *Genome*, v.39, p.1051-1061, 1996.
- 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*, v.95, p.597-608, 1997.
- WANG, D.G.; FAN, J.B.; SIAO, C.J.; BERN0, A.; YOUNG, P.; SAPOLSKY, R.; GHANDOUR, G.; PERKINS, N.; WINCHESTER, E.; SPENCER, J.; KRUGLYAK, L.; STEIN, L.; HSIE, L.; TOPALOGLOU, T.; HUBBELL, E.; ROBINSON, E.; MITTMANN, M.; MORRIS, M.S.; SHEN, N.; KILBURN, D.; RIOUX, J.; NUSBAUM, C.; ROZEN, S.; HUDSON, T.J.; LIPSHUTZ, R.; CHEE, M.; LANDER, E.S. Large-scale identification, mapping, and genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the human genome. *Science*, v.280, p.1077-1082, 1998.