

ALEXANDRE ALONSO ALVES

**HERANÇA E MAPEAMENTO GENÉTICO DA RESISTÊNCIA À
FERRUGEM (*Puccinia psidii*) EM CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS
DE *Eucalyptus***

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

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

T

A474h
2008

Alves, Alexandre Alonso, 1983-
Herança e mapeamento genético da resistência
à ferrugem (*Puccinia psidii*) em cruzamentos
interespecíficos de *Eucalyptus* / Alexandre Alonso Alves.
– Viçosa, MG, 2008.
xi, 58f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Resistência a doenças e pragas.
2. Marcadores genéticos. 3. Mapeamento genético.
4. *Puccinia psidii*. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 572.8

ALEXANDRE ALONSO ALVES

HERANÇA E MAPEAMENTO GENÉTICO DA RESISTÊNCIA À
FERRUGEM (*Puccinia psidii*) EM CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS
DE *Eucalyptus*.

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de “Magister
Scientiae”.

Aprovada: 21 de fevereiro de 2008.



Marcos Deon Vilela Resende



Cosme Damião Cruz



Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Co-orientador)



Dario Grattapaglia
(Co-orientador)


Ácelino Couto Alfenas
(Orientador)

Penso, logo existo.
René Descartes

Existo, logo penso.
Friederich Nietzsche

É preciso verificar.
Nada nos engana tanto quanto nossa própria opinião.
Leonardo da Vinci

*Ao meu pai José Donizeti Alves
Minha mãe Vânia Aparecida Alonso
E a minha namorada Gisele P. Domiciano*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudo durante o curso.

Ao Prof. Acelino Couto Alfenas pela amizade, pelos conselhos, ensinamentos, pela orientação, pelas críticas e sugestões além de apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Sérgio H. Brommonschenkel por muito ter me ensinado, pela orientação e pelas sugestões durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Dario Grattapaglia pela orientação, pelas críticas e sugestões e também por todo o apoio que tem me dado desde minha estadia em Brasília.

Ao Dr. Douglas Lau pela amizade, por muito ter me ensinado e pela orientação e sugestões.

Ao Prof. Cosme Damiano Cruz pelas sugestões na construção dos mapas genéticos e detecção de QTLs e também no desenvolvimento da metodologia que possibilitou mapear o gene de resistência.

Ao Dr. Lúcio Mauro Silva Guimarães pela amizade e pelas inúmeras revisões e críticas deste trabalho.

Ao Dr. Marcos Deon Vilela Resende pelas críticas e sugestões a este trabalho.

A Dr. Eva Mamani e a Dr. Danielle de Assis de Faria da Embrapa/CENARGEN pela disposição em me ajudar sempre que foi necessário.

A Márcia Brandão pela amizade e por ter sido sempre tão eficiente.

Aos meus amigos do Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno – BIOAGRO/UFV pela agradável convivência.

Aos amigos do Laboratório de Genômica – BIOAGRO/UFV pela ótima convivência, por terem me apoiado e muito me ensinado nesse período.

Aos amigos do Laboratório de Bioinformática – BIOAGRO/UFV pelas valiosas contribuições.

Aos amigos do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da UFV.

Aos amigos do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da UFV.

Ao meu pai José Donizeti Alves por sempre ter sido incansável não só em seu papel de pai, mas também de orientador.

A minha mãe, Vânia Aparecida Alonso, por ter sempre estado ao meu lado me oferecendo amor e carinho.

A meus irmãos, Aléssio Alonso Alves e Guilherme Alonso Alves assim como as minhas tias Vera Lúcia Alonso e Mirian Sueli Alonso por serem pessoas tão maravilhosas em minha vida.

A minhas tias e tios por terem sempre estado ao meu lado.

E em especial, a minha namorada, Gisele P. Domiciano por ser uma pessoa tão especial em minha vida.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
<i>CAPÍTULO 1</i>	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Material Genético	15
2.2. Inoculação	15
2.3. Avaliação da resistência à ferrugem	16
2.4. Herdabilidade da resistência à ferrugem	16
3. RESULTADOS	18
3.1. Herança da resistência à ferrugem	18
3.2. Herdabilidade da resistência à ferrugem	21
4. DISCUSSÃO	23
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
<i>CAPÍTULO 2</i>	30
RESUMO	31
ABSTRACT	33
1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1. Material genético	38
2.2. Inoculação	38
2.3. Avaliação da resistência à ferrugem	39
2.4. Extração e quantificação de DNA	39
2.5. Genotipagem de microssatélites (SSR)	40
2.6. Mapeamento genético	40
2.7. Mapeamento genético de QTLs para resistência à ferrugem	41

2.8. Mapeamento do gene de resistência à ferrugem.....	42
3. RESULTADOS.....	43
3.1. Avaliação da resistência	43
3.2. Mapeamento genético: mapa integrado e mapas pseudo-testcross	43
3.3. Mapeamento genético de QTLs.....	44
3.4. Mapeamento do gene de resistência à ferrugem.....	46
4. DISCUSSÃO	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
CONCLUSÕES GERAIS	58

RESUMO

Alves, Alexandre Alonso. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Herança e mapeamento genético da resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em cruzamentos interespecíficos de *Eucalyptus*.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Co-orientadores: Sérgio Hermínio Brommonschenkel, Dario Grattapaglia e Douglas Lau.

Visando estender os atuais estudos de herança, avaliou-se por meio de inoculações artificiais, a resistência de 10 progênies interespecíficas de *Eucalyptus* spp. desenvolvidas no Projeto Genolyptus. Os padrões de segregação obtidos para as dez progênies sugerem a ocorrência de epistasia recessiva dupla. Desse modo, a resistência à ferrugem deve depender de dois genes principais, um que codifica para uma proteína R, que reconhece proteínas Avr de *Puccinia psidii* de modo direto e o outro que codifique para um membro importante da cadeia de transdução de sinais como, por exemplo, uma proteína quinase que atua downstream do reconhecimento R-Avr. A falta da molécula sinalizadora bloquearia a ativação dos mecanismos de resistência do mesmo modo que a falta da proteína R resultaria em suscetibilidade. Alternativamente a resistência à ferrugem pode seguir o modelo guarda, onde uma proteína R, codificada por um dos genes, monitora uma proteína da planta tida como alvo de virulência pelo patógeno, codificada pelo segundo gene. A fim de se mapear o gene/QTL para resistência à ferrugem em um cruzamento interespecífico, 188 plantas obtidas do cruzamento [(*E. dunnii* x *E. grandis* 2) x (*E. urophylla* x *E. globulus*)] foram avaliadas quanto à resistência à ferrugem e genotipadas com um grupo de microssatélites que cobre todo o grupo de ligação 3. Apesar do padrão de

segregação da resistência à ferrugem no cruzamento em questão corresponder àquele esperado para um caráter monogênico dominante, a resistência foi tratada como um caráter quantitativo e análises de QTL foram realizadas para estimar a posição e o efeito do loco envolvido na expressão da resistência. Para o mapeamento de QTLs em mapa integrado foi utilizada a estratégia de mapeamento por intervalo desenvolvida por Fulker & Cardon e para o mapeamento de QTLs nos mapas pseudo-testcross previamente construídos foi utilizada a estratégia de mapeamento por intervalo desenvolvida por Lander & Botstein. Como essas análises detectou-se um QTL para resistência à ferrugem no grupo de ligação 3. Esse QTL foi detectado com grande significância estatística pela metodologia de Fulker & Cardon entre os marcadores Embra286 e Embra122, e pela estratégia de Lander & Botstein entre os marcadores Embra350 e Embra239. A estimativa é que estes QTLs expliquem 71 e 42% da variação fenotípica, respectivamente, e sendo a herdabilidade da resistência à ferrugem neste cruzamento igual a 84%, esses QTLs devem explicar 84 e 50% da resistência à ferrugem nesse cruzamento, respectivamente. Uma vez que esses QTLs foram identificados na mesma região do grupo de ligação 3, eles devem corresponder a um mesmo loco. Para se obter o exato posicionamento do gene de resistência no mapa integrado previamente construído para a família $(DxG2)x(UxGL)$ os dados de resistência à ferrugem foram analisados com um algoritmo implementado no software QMOL. Com esta análise foi possível localizar o gene de resistência na região entre os marcadores Embra286 e Embra239 em uma janela genética de 14,6cM, confirmando ainda a hipótese que os dois genitores são heterozigotos para o gene de resistência. Os marcadores que flanqueiam esse gene/QTL podem ser utilizados em experimentos de introgressão com uma eficiência esperada de aproximadamente 99% na seleção de plantas resistentes, assumindo ausência de interferência de recombinação na região genômica alvo.

ABSTRACT

Alves, Alexandre Alonso. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2008.
Inheritance and genetic mapping of rust (*Puccinia psidii*) resistance in interspecific crosses of *Eucalyptus*. Advisor: Acelino Couto Alfenas. Co-advisors: Sérgio Hermínio Brommonschenkel, Dario Grattapaglia and Douglas Lau.

Aiming to extend the actual inheritance studies resistance of 10 interspecific progenies of *Eucalyptus* spp. developed in the Genolyptus Project were assessed by artificial inoculation. The segregation pattern of all ten families suggests the occurrence of double recessive epistasis. Rust resistance must then depends on two major effect genes, one that codes for an R protein, capable of recognize *Puccinia psidii* Avr proteins directly and the other that codes for an extremely important member of the transduction pathway, i.e. a protein kinase that acts downstream of R-Avr recognition. The lack of a signaling molecule would block the activation of the defense mechanisms in the same way that the lack of the R protein would result in susceptibility. Alternatively rust resistance in eucalypts might follow the guard hypothesis, with a classic R protein coded by one locus monitoring the protein that is target for pathogens effector molecules and that is coded by the second locus. In order to map resistance gene/QTL, 188 plants obtained from an interspecific cross [(*E. dunnii* x *E. grandis* 2) x (*E. urophylla* x *E. globulus*)] were assessed for resistance and genotyped with a set of microsatellites scanning all linkage group 3. Although the segregation pattern for rust resistance in that specific cross corresponds to that expect to a dominant monogenic trait, the resistance was treated as a quantitative trait and QTL analysis

were performed to estimate the position and the effect of the locus involved in resistance expression. For QTL mapping in the integrated map an interval mapping strategy developed by Fulker & Cardon was used, and for QTL mapping in the pseudo-testcross maps an interval mapping strategy developed by Lander & Botstein was used. With these analysis it was detected a major effect QTL for rust resistance in linkage group 3. This QTL was detected with high confidence by the methodology of Fulker & Cardon in the region between markers Embra286 and Embra122 and by the strategy of Lander & Botstein in the region between markers Embra350 and Embra239. The estimates are that these QTLs explains near 71 and 42% of the phenotypic variation, respectively and since rust resistance inheritability in this cross was estimated in 84%, the detected QTLs should explain near 84% and 50% of rust resistance in this family, respectively. Hence these QTLs were detected in a same region of linkage group 3, they must correspond to the same locus. Aiming to obtain the exact position of the resistance locus on the integrated map previously constructed for $(DxG2) \times (UxGL)$ family, the resistance data was analyzed with an algorithm implemented in the GQMOL software. With this analysis it was possible to locate the resistance locus in the region between markers Embra286 and Embra239 in a genetic window of 14,61cM also confirming the hypothesis that both parents are heterozygotes for the resistance locus. The flanking markers of this gene/QTL could be used in introgression experiments with an expected efficiency near 99% for selecting resistant plants, assuming no recombination interference in the target genomic area.

INTRODUÇÃO GERAL

A área plantada com eucalipto (*Eucalyptus* spp.) em todo o mundo ocupa cerca de 18 milhões de hectares (FAO, 2006) e destes 3,4 milhões de hectares são de plantações florestais brasileiras (SBS, 2006). Florestas industriais de eucalipto estão amplamente espalhadas pelo território nacional, principalmente, nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Espírito Santo (SBS, 2006). O uso múltiplo de sua madeira como carvão vegetal, madeira serrada e para produção de celulose, mourões de cercas e postes tem estimulado não somente o desenvolvimento da cultura no país, mas também do setor florestal como um todo (Embrapa, 2006 e SBS, 2006). Em 2005, o valor total da produção do setor de base florestal foi de US\$ 27,8 bilhões, o que equivale a 3,5% do PIB brasileiro. No cenário internacional, o Brasil contribui, com 4,6% das exportações mundiais de produtos florestais madeireiros, destacando-se ainda como o maior produtor e exportador de celulose branqueada de eucalipto (SBS, 2006). As receitas de exportações de celulose e papel, madeira sólida, painéis e móveis chegaram a US\$ 7,4 bilhões em 2005 sendo superadas apenas pelos complexos da soja e de carnes.

Até meados da década de 70, o eucalipto era considerado uma espécie florestal praticamente livre de doenças, contudo, a utilização de espécies sem o conhecimento prévio de sua resistência a doenças, a uniformidade genética dos plantios e a expansão da cultura para regiões de clima mais favorável à infecção têm favorecido a ocorrência de várias doenças (Alfenas et al., 2004 e Ferreira et al., 2006). Dentre essas, destaca-se a ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter (Junghans et al., 2003a). *Puccinia psidii*, sob condições de ambiente favorável infecta órgãos tenros da parte aérea de mudas em viveiro e plantas

jovens no campo até o estágio fenológico B (Ferreira, 1983), cerca de 2m de altura, podendo causar redução de crescimento e perda de dominância apical, além da morte de brotações após o corte raso, bem como a morte e refugo de mudas para o plantio. Em genótipos altamente suscetíveis pode causar ainda deformações, necroses, hipertrofia, minicrâncos e morte das porções terminais de crescimento (Ferreira, 1983 e Alfnas et al., 2004), constituindo desse modo uma das principais enfermidades da eucaliptocultura moderna (Junghans et al., 2003a e 2003b, Booth et al., 2000 e Glen et al., 2007).

A ampla variabilidade genética inter e intra-específica para resistência à ferrugem têm permitido o controle da doença por meio do plantio de clones, progênies ou espécies resistentes. No entanto, embora a seleção de materiais resistentes venha sendo praticada há alguns anos e muito se conheça a respeito da variabilidade inter e intraespecífica (Carvalho et al., 1998; Dianese et al., 1984; Alfnas et al., 1997 e Coutinho et al., 1998), pouco ainda se conhece sobre a base genética da resistência. Junghans et al., (2003a) verificaram que parte da variação fenotípica da resposta de defesa à ferrugem em várias famílias de *E. grandis* é controlada por um gene dominante com penetrância incompleta e/ou expressividade variável dependendo do background genético (genes de efeito secundário e modificadores). Utilizando marcadores RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*), Junghans et al., (2003a) mapearam este gene de efeito principal para resistência à ferrugem, denominado *Ppr1* (*Puccinia psidii* resistance gene 1) em uma família de irmãos completos de *E. grandis*. Este gene determina a única forma geneticamente conhecida de resistência à ferrugem em eucalipto até o momento.

Em função das limitações inerentes a técnica de RAPD, o uso da informação de ligação restringe-se ao pedigree utilizado para o mapeamento. Os marcadores RAPD mapeados próximos a *Ppr1*, mesmo quando convertidos em marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), não possibilitaram transferibilidade e polimorfismo suficiente para permitir a validação deste gene em outros pedigrees. Isto tem limitado o compartilhamento inter-experimental de dados e a possibilidade de validação de *Ppr1* em outras espécies e em outros *backgrounds* genéticos, o que permitiria determinar se a

resistência à ferrugem em outras espécies de *Eucalyptus* é igualmente determinada por *Ppr1*, se por outros genes distintos ou da interação entre *Ppr1* e outros genes e/ou QTLs para resistência à ferrugem.

Sendo o entendimento dos fatores que afetam a interação patógeno-hospedeiro como, por exemplo, o número de locos envolvidos no controle da resistência, essencial para o manejo de qualquer doença e também, no contexto do melhoramento genético, para se traçar as melhores estratégias a fim de se obter materiais resistentes à ferrugem, há a necessidade de determinar se existem diferentes genes/QTLs atuando na resistência à ferrugem em diferentes espécies de eucalipto. Informações detalhadas a respeito da posição e magnitude dos locos controladores da resistência à ferrugem em eucaliptos podem permitir ainda que a seleção assistida por marcadores (SAM) possa ser efetivamente implementada no melhoramento genético da cultura e também na clonagem, identificação e validação funcional de genes de resistência.

Atualmente, os avanços na área de ciências genômicas, associados à redução dos custos de tecnologias de genotipagem, clonagem e sequenciamento de DNA, têm estimulado a aplicação de técnicas moleculares ao melhoramento genético do eucalipto (Grattapaglia, 2003, 2004 e 2007; Missiaggia, 2005 e Poke et al., 2005). Estudos genômicos têm sido direcionados para o sequenciamento de genes expressos, construção de mapas genéticos, mapeamento de locos controladores de características quantitativas (QTLs), mapeamento de QTLs para resistência a doenças, mapeamento físico e clonagem posicional, estudos de expressão gênica, desenvolvimento de ferramentas de bioinformática e genética estatística para integrar e disponibilizar toda a informação visando à seleção de árvores superiores (Grattapaglia, 2004 e Poke et al., 2005). Diversos mapas de ligação cobrindo quase a totalidade do genoma foram construídos para eucalipto (Grattapaglia & Sederoff, 1994; Brondani et al., 1998, 2002, 2006 e Thamarus et al., 2002) e QTLs para características de interesse têm sido mapeados em alguns desses mapas (Grattapaglia et al., 1995; Junghans et al., 2003a; Thamarus et al., 2004).

A atual disponibilidade de locos microssatélites transferíveis, co-dominantes, multialélicos (Byrne et al., 1996, Brondani et al., 1998, 2002 e 2006;

CSIRO, 2000; Steane et al., 2001 e 2005; Glaubitz et al., 2001; Ottewell et al., 2005) representa uma melhoria na habilidade de conduzir mapeamento de ligação e análise de QTLs em *Eucalyptus*, pois permite a determinação da sintenia de QTLs interespecíficos além de facilitar uma busca dirigida de novas variações alélicas de um QTL conhecido dentro e entre espécies, expandindo as oportunidades para introgressão e SAM no melhoramento por hibridização (Grattapaglia, 2004).

Assim, uma estratégia interessante para contornar a baixa transferibilidade de marcadores RAPD próximos a *Ppr1* é mapear um grande número de marcadores microssatélites altamente transferíveis e polimórficos (Brondani et al., 1998, 2002 e 2006) próximos a *Ppr1* e então usar um par de microssatélites ligados a esse gene como uma maneira eficiente de triagem de sua variabilidade em outras árvores (procedências, progênes, espécies diferentes) (Junghans et al., 2003a) e como guias para SAM. Bueno et al., (2004) trabalhando com mesma progênie de *E. grandis* utilizada por Junghans et al., (2003a) e utilizando marcadores microssatélites e as estratégias de *Bulk Segregant Analysis* (BSA) e genotipagem seletiva verificaram a existência de ligação fatorial entre *Ppr1* e o marcador microssatélite Embra227. A frequência de recombinação entre os locos foi estimada em 12,16%, posicionando o *Ppr1* no grupo de ligação 3 do mapa de referência de *Eucalyptus* (Brondani et al., 2006). O posicionamento de *Ppr1* no mapa de referência abre possibilidade de se empreender buscas dirigidas a *Ppr1* ou outros genes de resistência em pedigrees não relacionados por meio da genotipagem de indivíduos de uma população segregante com os microssatélites do grupo de ligação 3. Neste contexto, cruzamentos interespecíficos permitirão determinar se parte da resistência à ferrugem em diferentes espécies é controlada pela mesma região genômica, isto é, *Ppr1* ou por genes/QTLs distintos.

Desse modo, o presente trabalho objetivou estudar a resistência de progênes interespecíficas de *Eucalyptus* spp., com vistas a um melhor entendimento do controle genético da resistência (Capítulo 1) além de detectar um QTL/gene de efeito principal para resistência à ferrugem em um cruzamento interespecífico por meio de marcadores microssatélites (Capítulo 2). As informações geradas, quando associadas àquelas provenientes do mapeamento

físico do genoma (Brommonschenkel et al., 2005) e do sequenciamento completo do genoma de *E. grandis* (Eucagen, 2007) poderão ser utilizadas em conjunto para permitir não só a implementação de SAM, mas também para a clonagem, identificação e validação funcional de genes de resistência, possibilitando assim, uma dissecação fina do controle genético da resistência de *Eucalyptus* spp. à ferrugem, no sentido de se potencializar o uso da manipulação genética no melhoramento genético molecular do eucalipto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas AC, Valle LAC, Xavier AA, Brommonschenkel SH, Grattapaglia D, Silva CC, Bertolucci FL & Penchel R (1997) *Eucalyptus* rust: genetic variability of elite clones and histological characterization of the resistance reaction. Proceedings. IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypt 2:60-64.
- Alfenas AC, Zauza EAV, Maffia RG & Assis TF (2004) Clonagem e Doenças do Eucalipto. 1ª Edição. Viçosa MG. Editora UFV. 442p.
- Booth TH, Old KM & Jovanovic T (2000) A preliminary assessment of high risk areas for *Puccinia psidii* (*Eucalyptus* rust) in the Neotropics and Australia. Agriculture, Ecosystems and Environment 82:295-301.
- Brommonschenkel SH, Brondani RPV, Buselli RF, Lourenço RT, Novaes E, Bandeira L, Pappas GJ, Santos SN, Pova A, Pappas MR, Coelho ASG & Grattapaglia D. (2005) A BAC library of *Eucalyptus grandis*: characterization, fingerprinting, BAC-end sequencing and shotgun assembly of lignification genes. IUFRO Tree Biotechnology, 2005, Pretoria. Proceedings of the IUFRO Tree BiotechnologyY.
- Brondani RPV, Brondani C & Grattapaglia D (2002) Towards the construction of a genus wide reference linkage map for *Eucalyptus* based on microsatellite markers. Molecular and General Genomics 267:338-347.
- Brondani RPV, Williams ER, Brondani C & Grattapaglia D (2006) A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. BMC Plant Biology 6:20.
- Brondani RPV, Brondani C, Tarchini R & Grattapaglia D (1998) Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. Theor. Appl. Genet. 97:816-827.
- Bueno NW, Junghans DT, Alfenas AC, Brommonschenkel SH & Grattapaglia D (2004) Localized mapping of the *Puccinia psidii* resistance (*Ppr1*) locus in *Eucalyptus* with microsatellite markers. Proceedings: 50º Congresso Brasileiro de Genética. GP217.
- Byrne M & Marquez-Garcia M (1996) Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. Australian Journal of Botany 44:331-341.

- Carvalho ADO, Alfenas AC, Maffia LA & Carmo MGF (1998) Resistance of Eucalytus Species, Progenies and Prevanences to *Puccinia psidii*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 33:139-147.
- Coutinho TA, Wingfield MJ, Alfenas AC & Crous PW (1998) *Eucalyptus* rust: A disease with the potential for serious international implications. Plant Disease 82:819-825.
- CSIRO: <http://www.ffp.csiro.au/tigr/molecular/eucmsps.html>. 2000.
- Dianese JC, Moraes TSD & Silva AR (1984) Reponse of Eucalytus species to field infection by *Puccinia psidii*. Plant Disease 68: 314-316.
- Embrapa (2006) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Disponível em: www.embrapa.br.
- Eucagen (2007) – International *Eucalyptus* Genome Network – Disponível em: www.ieugc.up.ac.za.
- FAO (2006) - <http://faostat.fao.org/site/381/default.aspx>
- Ferreira FA (1983) Ferrugem do eucalipto. Revista Árvore 7:91-109.
- Ferreira FA, Maffia LA, Barreto RW, Demuner RL & Pigatto S (2006) Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbria* em *Eucalyptus*. R. Árvore 30:155-162.
- Glaubitz JC, Emebiri LC & Moran GF (2001) Dinucleotide microsatellites from *Eucalyptus siberi*: inheritance, diversity e improved scoring of single-base differences. Genome 44:1041-1045.
- Glen M, Alfenas AC, Zauza EAV, Wingfield MJ & Mohammed C (2007) *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy - a review. Australasian Plant Pathology 36:1-16.
- Grattapaglia D & Sederoff RR (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers, Genetics 137:1121-1137.
- Grattapaglia D (2003) Genolyptus. In: Borém A, Giudice M & Sedyama T (Eds). Melhoramento Genômico. Viçosa, Editora UFV. pp 51-71.
- Grattapaglia D (2004) Integrating Genomics into *Eucalyptus* breeding. Genetics and Molecular Research 3: 369-379.
- Grattapaglia D (2007) Marcadores Moleculares: Aplicações Operacionais no Melhoramento de *Eucalyptus*. In: Borém A Biotecnologia Florestal. Viçosa, Editora UFV.
- Grattapaglia D, Bertolucci FL & Sederoff RR (1995) 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.

- Junghans DT, Alfenas AC, Brommonschenkel SH, Oda S, Mello EJ & Grattapaglia D (2003a) Resistance to Rust (*Puccinia psidii*) in *Eucalyptus*: Mode of Inheritance and mapping of major gene with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 108:175–180.
- Junghans DT, Alfenas AC & Maffia LA (2003b) Escala de Notas para a quantificação da ferrugem do eucalipto. *Fitopatologia Brasileira* 25:382-390.
- Missiaggia AA (2005) Mapeamento Genético de QTL para qualidade da madeira e florescimento precoce e, estudos de expressão gênica alelo específica em *Eucalyptus* spp. Piracicaba, Esalq/USP. 236p. Tese de Doutorado.
- Ottewell KM, Donnellan SC, Moran GF & Paton DC (2005) Multiplexed microsatellite markers for genetic analysis of *Eucalyptus leucoxylon* (Myrtaceae) and their utility for ecological and breeding studies in other *Eucalyptus* species. *Journal of Heredity* 96:445-451.
- Poke FS, Vaillancourt RE, Potts BM & Reid JB (2005) Genomic research in *Eucalyptus*. *Genetica* 125:79-101.
- SBS (2006) – Disponível em: <http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>.
- Steane DA, Jones RC & Vaillancourt RE (2005) A set of chloroplast microsatellites primers for *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Mol. Ecol. Notes*. 5:538-541.
- Steane DA, Vaillancourt RE, Russell J, Powell W, Marshall D & Potts BM (2001) Development and characterization of microsatellites in *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Silvae Genetica* 50:89-91.
- Thamarus KA, Groom K, Bradley A, Raymond CA, Schileck LR, Williams ER & Moran GF (2004) Identification of quantitative trait loci for wood and fiber properties in two full-sib progenies of *Eucalyptus globulus*. *Theoretical and Applied Genetics* 190:856-864.
- Thamarus KA, Groom K, Murrell J, Byrne M & Moran GF (2002) A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre, and floral traits. *Theor Appl Genet*. 104:379-387.

CAPÍTULO 1

**RESISTÊNCIA À FERRUGEM EM CRUZAMENTOS
INTERESPECÍFICOS DE *Eucalyptus***

RESUMO

A ferrugem, causada por *Puccinia psidii*, é atualmente, uma das principais doenças da eucaliptocultura brasileira. Até o presente apenas um gene para resistência à ferrugem (*Ppr1*) foi caracterizado em *Eucalyptus grandis*. Todavia, tendo em vista a baixa durabilidade da resistência monogênica em outros patossistemas e o fato de *E. grandis* ser predominantemente suscetível à ferrugem, é necessário identificar outros locos de resistência provenientes de outras espécies de *Eucalyptus*. Visando estender os atuais estudos de herança, avaliou-se por meio de inoculações artificiais, a resistência de 10 progênies interespecíficas de *Eucalyptus* spp. desenvolvidas no Projeto Genolyptus. Os padrões de segregação obtidos para as dez progênies sugerem a ocorrência de epistasia recessiva dupla. Desse modo, a resistência à ferrugem deve depender de dois genes principais, um que codifica para uma proteína R, que reconhece proteínas Avr de *Puccinia psidii* de modo direto e o outro que codifique para um membro importante da cadeia de transdução de sinais como, por exemplo, uma proteína quinase que atua downstream do reconhecimento R-Avr. A falta da molécula sinalizadora bloquearia a ativação dos mecanismos de resistência do mesmo modo que a falta da proteína R resultaria em suscetibilidade. Alternativamente a resistência à ferrugem pode seguir o modelo guarda, onde uma proteína R, codificada por um dos genes, monitora uma proteína da planta tida como alvo de virulência pelo patógeno, codificada pelo segundo genes.

ABSTRACT

Rust is one of the most-damaging eucalypt diseases in Brazil. Up to date, only a single dominant gene (*Ppr1*) conferring resistance was characterized in *E. grandis*. However, due to the low durability of monogenic resistance in other pathosystems and since *E. grandis* is considered to be susceptible, screening for resistance genes in other eucalypt species was necessary. Aiming to extend the actual inheritance studies resistance of 10 interspecific progenies of *Eucalyptus* spp. developed in the Genolyptus Project were assessed by artificial inoculation. The segregation pattern of all ten families suggests the occurrence of double recessive epistasis. Rust resistance must then depends on two major effect genes, one that codes for an R protein, capable of recognize *Puccinia psidii* Avr proteins directly and the other that codes for an extremely important member of the transduction pathway, i.e. a protein kinase that acts downstream of R-Avr recognition. The lack of a signaling molecule would block the activation of the defense mechanisms in the same way that the lack of the R protein would result in susceptibility. Alternatively rust resistance in eucalypts might follow the guard hypothesis, with a classic R protein originated from one locus monitoring a protein that is target for pathogens effector molecules and that is originated from a second locus.

1. INTRODUÇÃO

Eucalyptus é o gênero florestal de maior importância no mundo, e sua madeira é extensivamente utilizada na construção civil, como mourões de cerca, postes de eletricidade e também nos setores moveleiro, de papel e celulose e carvão vegetal para siderurgia. Estima-se que a área plantada com eucalipto em todo o mundo ocupe cerca de 18 milhões de hectares (FAO, 2006) dos quais cerca de 3,5 milhões de hectares são de plantações florestais brasileiras (SBS, 2006).

Florestas industriais de eucalipto, geralmente estabelecidas sob a forma de grandes plantios clonais, estão amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, como Brasil, África do Sul e Austrália. Essas regiões são, no entanto, particularmente favoráveis à ocorrência de doenças como a ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter. Esta ferrugem é hoje uma das principais doenças da eucaliptocultura moderna e uma ameaça aos plantios localizados em áreas onde ainda não há registro de sua ocorrência, como na Austrália, África do Sul e Ásia (Alfenas et al., 2004; Coutinho et al., 1998; Booth et al., 2000 e Glen et al., 2007). *Puccinia psidii*, sob condições de ambiente favorável infecta órgãos tenros da parte aérea de mudas em viveiro e plantas jovens no campo até o estágio fenológico B (Ferreira, 1983), cerca de 2m de altura, podendo causar redução de crescimento e perda de dominância apical, além da morte de brotações após o corte raso, bem como a morte e o refugo de mudas para plantio. Em genótipos altamente suscetíveis pode causar deformações, necroses, hipertrofia, minicrâncos e morte das porções terminais de crescimento (Ferreira, 1983 e Alfenas et al., 2004).

A ampla variabilidade genética inter e intra-específica para resistência à ferrugem têm permitido o controle da doença por meio do plantio de clones, progênies ou espécies resistentes (Alfenas et al., 2004). No entanto, embora a seleção de genótipos resistentes venha sendo praticada há alguns anos e muito se conheça a respeito da variabilidade inter e intra-específica para resistência (Carvalho et al., 1998; Dianese et al., 1984; Alfenas et al., 1997 e Coutinho et al., 1998), pouco se conhecia sobre a base genética da resistência até o início da última década. Junghans et al., (2003a) determinaram que parte da resistência à ferrugem em uma família de *E. grandis* era controlada por um gene de efeito principal, denominado *Ppr1* (*Puccinia psidii* resistance gene 1). Aparentemente, a resistência à ferrugem está associada ao desencadeamento da resposta de hipersensibilidade, uma vez que em materiais resistentes, visualiza-se a necrose das células localizadas no sítio de penetração do patógeno (Xavier et al., 2000). Assim, postula-se que o(s) gene(s) de resistência à ferrugem codifique(m) para uma proteína que reconheça direta (modelo receptor-elecitor – Hammond-Kozack & Parker, 2003) ou indiretamente (modelo guarda – Hammond-Kozack & Parker, 2003 e Dangl & Jones, 2001) o patógeno, em um modelo gene-a-gene (Flor, 1971) desencadeando o processo de defesa. Além da proteína ativadora do processo de defesa, proteínas envolvidas na transdução de sinais e proteínas que atuam diretamente sobre o patógeno parecem ser fundamentais ao processo de defesa da planta, tendo em vista a variação do nível de resistência (Junghans et al., 2003a e b).

Uma vez que a eucaliptocultura moderna é predominantemente clonal, o uso de uma única fonte de resistência à ferrugem certamente não é uma estratégia de manejo adequada, em virtude de possibilidade de seleção de linhagens virulentas na população de *P. psidii* capazes de suplantar a resistência conferida por *Ppr1*. Assim, novas fontes de resistência, distintas de *Ppr1*, são fundamentais no contexto do manejo da doença via materiais resistentes. Ademais, clones elites de *E. grandis* e seus híbridos têm sido extensivamente utilizados sem o prévio conhecimento de sua resistência à ferrugem (Junghans et al., 2003a), mesmo sendo esses altamente suscetíveis à ferrugem (Zauza, 2007).

Assim, este trabalho visou estender a investigação do controle genético da resistência à ferrugem em *Eucalyptus* spp. utilizando um conjunto amplo e geneticamente diverso de progênies interespecíficas de irmãos completos envolvendo diferentes espécies de *Eucalyptus* spp.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Genético

Dez famílias interespecíficas selecionadas a partir de diversos cruzamentos realizados no âmbito do Projeto Genolyptus (Grattapaglia, 2003), foram avaliadas quanto à resistência à ferrugem. Esses cruzamentos envolvem espécies e híbridos de *E. grandis* (G), *E. dunni* (D), *E. globulus* (GL), *E. urophylla* (U), *E. camaldulensis* (C) e *E. tereticornis* (E). Inicialmente foram utilizadas 20 plantas por progênie e posteriormente algumas famílias foram ampliadas para a confirmação dos resultados.

2.2. Inoculação

Empregou-se o isolado monopustular UFV-2 de *P. psidii* pertencente à raça 1 (Xavier, 2002). Esse isolado é predominante em diferentes regiões do Brasil (Xavier, 2002). O isolado foi mantido em mudas de jameiro [*Syzygium jambos* (L.) Alston], mediante re-inoculações periódicas a cada 20 dias (Ruiz et al., 1989). Uma suspensão de inóculo a 2×10^4 urediniósporos/mL foi atomizada homogeneamente nas superfícies abaxial e adaxial das folhas, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº15, acoplado a um compressor elétrico ajustado para 0,6-0,8 Kgf/cm² de pressão. Após a inoculação, as mudas foram mantidas por 24h em câmara de nevoeiro no escuro, e a seguir transferidas para câmara de crescimento a 22°C com fotoperíodo de 12h e intensidade luminosa de 40 μ m

fótons $s^{-1}m^{-2}$ (Ruiz et al., 1989). Após a avaliação, as plantas inoculadas foram podadas, re-conduzidas e re-inoculadas para confirmação dos resultados.

2.3. Avaliação da resistência à ferrugem

A avaliação da severidade da ferrugem foi realizada aos 20 dias após a inoculação utilizando-se a escala de notas (Figura 1) preconizada por Junghans et al., (2003b). Plantas S0 e S1 foram consideradas resistentes e plantas S2 e S3 suscetíveis (Junghans et al., 2003a). Após as avaliações efetuou-se a verificação das pressuposições de segregação mendeliana da resistência através de um teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$) e de um teste exato de Fisher ($p \leq 0,05$) para progênies expandidas e não expandidas, respectivamente.

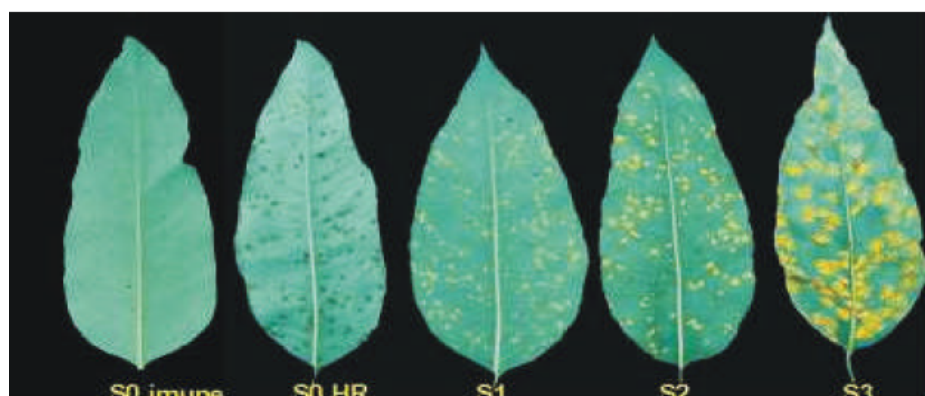


Figura 1. Escala de notas para avaliação da resistência à ferrugem do eucalipto, com quatro classes de severidade: S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade do tipo “fleck” ou necrótico; S1 = pústulas $< 0,8$ mm de diâmetro; S2 = pústulas de $0,8$ a $1,6$ mm de diâmetro; e S3 = pústulas $> 1,6$ mm de diâmetro (Junghans et al., 2003b).

2.4. Herdabilidade da resistência à ferrugem

A estimativa da herdabilidade da resistência à ferrugem para a família $(D \times G_2) \times (U \times GL)$ foi obtida por meio do cálculo do coeficiente repetibilidade. Este coeficiente foi obtido por meio da análise de variância (ANOVA) dos dados de resistência, segundo o modelo estatístico:

$Y_{ij} = m + g_i + a_j + e_{ij}$, onde:

Y_{ij} : observação referente a i-ésimo indivíduo e a j-ésima avaliação (severidade da ferrugem – S0, S1, S2, S3 convertido em 1, 2, 3 e 4);

m: media geral;

g_i : efeito aleatório do indivíduo i sob influência de condições ambientais permanentes (i = 1, 2, ..., 205 indivíduos);

a_j : efeito da avaliação j (j = 1, 2) e,

e_{ij} : erro experimental associado com a observação Y_{ij} .

Neste contexto o coeficiente de repetibilidade é dado por:

$$r = \frac{\hat{C}OV(Y_{ij}, Y_{ij'})}{\sqrt{\hat{V}(Y_{ij})\hat{V}(Y_{ij'})}} = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_Y^2} = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}^2 + \hat{\sigma}_g^2},$$

que se aproxima da herdabilidade da característica quando condições permanentes de ambiente não afetam consideravelmente o caráter. σ^2 foi estimado por meio da expressão:

$$\sigma^2 = (QMG - QMR)/n, \text{ onde:}$$

QMG é o quadrado médio de genótipos,

QMR é o quadrado médio do resíduo e

n é o número de avaliações.

As análises foram realizadas com o software GENES (Cruz, 2006). O software GENES está disponível para download gratuitamente em www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm.

3. RESULTADOS

3.1. Herança da resistência à ferrugem

Entre as dez famílias interespecíficas inicialmente inoculadas com *Puccinia psidii*, três foram avaliadas como suscetíveis e duas como completamente resistentes. As outras famílias segregaram para resistência à ferrugem em diferentes razões fenotípicas (Tabela 1).

Tabela 1: Segregação da resistência à ferrugem em progênies oriundas de cruzamentos interespecíficos de *Eucalyptus* spp.

	Família	Nº de plantas/classes de severidade (S0:S1:S2:S3)	Razão ^a	Razão esperada R:S ^b	P value
1	<i>CIx(UxGL)</i>	18:1:1:0	19:1	1:0	0.5 ^{ns}
2	<i>GIxGL2</i>	2:2:5:11	4:16	1:3	0.5 ^{ns}
3	<i>U2xEI35</i>	0:6:3:11	6:14	1:3	0.62 ^{ns}
4	<i>U2xGL1</i>	0:5:3:12	5:15	1:3	1 ^{ns}
5	<i>(DxG)2xGL2</i>	0:1:2:17	1:19	0:1	0.5 ^{ns}
6	<i>GIx(UxGL)</i>	13:2:5:0	15:5	3:1	1 ^{ns}
7	<i>UIx(UxGL)</i>	18:2:0:0	20:0	1:0	1 ^{ns}
8	<i>(DxG2)x(UxGL)</i>	15:2:3:0	17:3	3:1	0.395 ^{ns}
9	<i>(DxG2)xCI</i>	0:2:8:10	2:18	0:1	0.2436 ^{ns}
10	<i>(DxG2)xU2</i>	0:2:10:8	2:18	0:1	0.2436 ^{ns}

^a A razão Resistente:Suscetível (R:S) é baseado em R=S0+S1 e S=S2+S3. ^b Hipotetizou-se que a resistência fosse controlada por um único gene dominante. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade e ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade pelo teste exato de Fisher.

Apesar de os genitores não terem sido fenotipados é possível com base nos resultados prever quais árvores devem ser resistentes e quais devem ser

suscetíveis à ferrugem. Uma vez que todas as três famílias que segregam para resistência à ferrugem em padrão 3R:1S, tem o híbrido (*UxGL*) como genitor comum, esta árvore deva ser resistente à ferrugem. Também parece evidente que os alelos de resistência à ferrugem são herdados das árvores (*DxG2*), *U1* e *G1*, uma vez que essas árvores estão envolvidas nos cruzamentos 6, 7 e 8, que segregam em um padrão 3R:1S. É interessante ressaltar que o padrão de segregação 3:1 é esperado nos casos onde ambos os genitores são heterozigotos para o gene de resistência. As outras árvores provavelmente devem ser suscetíveis à ferrugem, uma vez que elas não contribuem para resistência em cruzamentos em que estão envolvidas.

Os padrões de segregação fenotípica obtidos nesse estudo são esperados se um único gene dominante controlar a resistência nas famílias 6, 7 e 8 e se um gene recessivo controlar a resistência nas famílias 2, 3 e 4. Contudo, apesar de os padrões de segregação 3R:1S e 1S:3R poderem ser explicados com base na hipótese de genes dominantes e recessivos, os resultados das famílias 8, 9 e 10, em conjunto, sugerem um padrão de herança mais complexo. Se o híbrido (*DxG2*) for de fato heterozigoto para o gene de resistência, em concordância com os resultados da família 8, a ausência de segregação nas famílias 9 e 10 deve ser decorrente da ocorrência de interação epistática entre o gene de resistência com outros genes. Para confirmar os padrões de segregação das famílias 8, 9 e 10 essas foram expandidas e re-inoculadas (Tabela 2).

Tabela 2: Segregação da resistência à ferrugem em progênes expandidas.

Família	Nº de plantas/classes de severidade (S0:S1:S2:S3)	Razão ^a	Razão esperada R:S ^b	χ^2	P value
8 (<i>DxG2</i>)x(<i>UxGL</i>)	144:28:19:14	172:33	3:1	8.665	0.3243 ^{ns}
9 (<i>DxG2</i>)x <i>C1</i>	1:4:43:189	5:232	0:1	-	-
10 (<i>DxG2</i>)x <i>U2</i>	1:0:19:138	1:157	0:1	-	-

^a A razão Resistente:Suscetível (R:S) é baseado em R=S0+S1 e S=S2+S3. ^b Hipotetizou-se que a resistência fosse controlada por um único gene dominante. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade e ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado.

Os resultados obtidos nessa avaliação confirmam que as famílias 9 e 10 são completamente suscetíveis à ferrugem e corroboram a existência de um gene

epistático que bloqueia a expressão da resistência nessas famílias. Além disso, o excesso de plantas suscetíveis nas famílias 2, 3 e 4 (segregação tipo 1R:3S) também sugere um padrão mais complexo de herança, uma vez que a relação de dominância teria de ser invertida para algumas progênies derivadas dos mesmos genitores segregarem na razão de 3R:1S e outras na razão de 1R:3S.

Para testar se os padrões de segregação 3R:1S e 1R:3S e a existência de famílias inteiramente resistentes ou suscetíveis podem ser explicadas em conjunto por um modelo de dois genes independentes que interagem epistaticamente, deduziu-se as segregações esperadas para todos os tipos de cruzamento possíveis envolvendo dois genes (Tabelas 3).

Tabela 3: Cruzamentos e segregações possíveis considerando que a resistência a ferrugem em cruzamentos interespecíficos de *Eucalyptus* spp. seja condicionada por um gene de resistência que interage epistaticamente com outro gene. (A – gene de resistência e B – gene de efeito epistático).

Genótipos		Segregação	Genótipos		Segregação	Genótipos		Segregação
AABB	AABB	1R:0S	AaBB	AABB	1R:0S	aaBB	AABB	1R:0S
	AABb	1R:0S		AABb	1R:0S		AABb	1R:0S
	AAbb	1R:0S		AAbb	1R:0S		AAbb	1R:0S
	AaBB	1R:0S		AaBB	3R:1S		AaBB	1R:1S
	aaBB	1R:0S		aaBB	1R:1S		aaBB	0R:1S
	AaBb	1R:0S		AaBb	3R:1S		AaBb	1R:1S
	aaBb	1R:0S		aaBb	1R:1S		aaBb	0R:1S
	Aabb	1R:0S		Aabb	3R:1S		Aabb	1R:1S
	aabb	1R:0S	aabb	1R:1S	aabb	0R:1S		
AABb	AABB	1R:0S	AaBb	AABB	1R:0S	aaBb	AABB	1R:0S
	AABb	3R:1S		AABb	3R:1S		AABb	3R:1S
	AAbb	1R:1S		AAbb	1R:1S		AAbb	1R:1S
	AaBB	1R:0S		AaBB	3R:1S		AaBB	1R:1S
	aaBB	1R:0S		aaBB	1R:1S		aaBB	0R:1S
	AaBb	3R:1S		AaBb	9R:7S		AaBb	3R:5S
	aaBb	3R:1S		aaBb	3R:5S		aaBb	0R:1S
	Aabb	1R:1S		Aabb	3R:5S		Aabb	1R:3S
	aabb	1R:0S	aabb	1R:3S	aabb	0R:1S		
AAbb	AABB	1R:1S	Aabb	AABB	1R:0S	aabb	AABB	1R:0S
	AABb	1R:1S		AABb	1R:1S		AABb	1R:0S
	AAbb	0R:1S		AAbb	0R:1S		AAbb	0R:1S
	AaBB	1R:0S		AaBB	3R:1S		AaBB	1R:1S
	aaBB	1R:0S		aaBB	1R:1S		aaBB	0R:1S
	AaBb	1R:1S		AaBb	3R:5S		AaBb	1R:3S
	aaBb	1R:1S		aaBb	1R:3S		aaBb	0R:1S
	Aabb	0R:1S		Aabb	0R:1S		Aabb	0R:1S
	aabb	0R:1S	aabb	0R:1S	aabb	0R:1S		

Verifica-se que assumindo-se tal modelo há possibilidade de ocorrência de segregações do tipo 1R:3S ou 3R:5S (que por serem próximas podem ser confundidas), 3R:1S e também famílias completamente resistentes ou suscetíveis, o que dá maior sustentação ao modelo.

3.2. Herdabilidade da resistência à ferrugem

Apesar da resistência aparentemente ser controlada por um gene de efeito principal que interage epistaticamente com outros genes, a variação fenotípica em todas as 10 famílias também aponta para a existência de genes de menor efeito, uma vez que existem pequenas variações fenotípicas dentro das plantas resistentes, plantas S0 Imune, S0 Fleck e S0 HR e S1, e entre as plantas suscetíveis, S2 ou S3 (Figura 2).

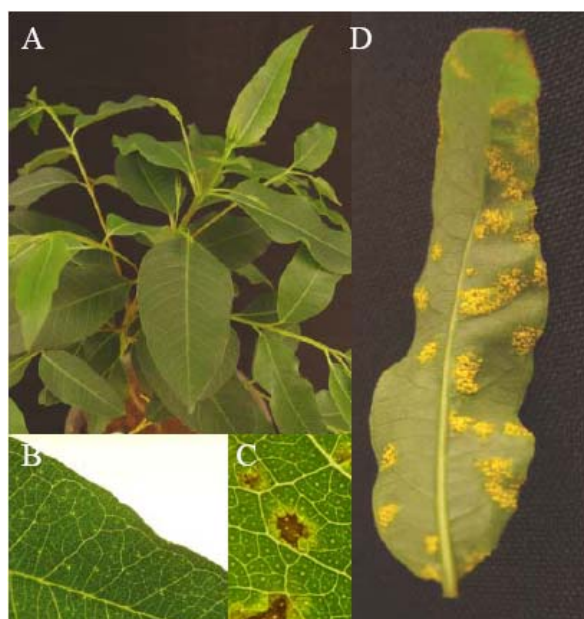


Figura 2: Segregação da resistência à ferrugem em plantas da família $(DxG2)x(UGL)$. A) Ausência de sintomas macroscópicos (planta S0). B) Detalhe da reação tipo “Fleck” C) Detalhe da reação de hipersensibilidade. D) Folha exibindo pústulas S3.

Baseado no valor fenotípico de cada planta da família $(DxG2)x(UxGL)$ em duas diferentes avaliações (20 dias após a inoculação cada) a herdabilidade da

resistência à ferrugem foi estimada por meio do coeficiente de repetibilidade em 84,53% (coeficiente de repetibilidade 20 dai). Outros parâmetros genéticos como, média fenotípica, variância fenotípica e variância genética foram obtidas para essa família (Tabela 3). Em conjunto esses resultados fornecem um quadro geral da resistência à ferrugem em um cruzamento interespecífico de *Eucalyptus*.

Tabela 3: Parâmetros genéticos para resistência à ferrugem na família (DXG2)x(UxGL).

Parâmetros genéticos	Valores
Média fenotípica	0,74
Variância fenotípica	1,2855
Variância genotípica^a	1,0278

^a Estimado por meio do coeficiente de repetibilidade.

4. DISCUSSÃO

As análises fenotípicas realizadas neste estudo envolveram um grande número de famílias interconectadas que apresentam diferentes padrões de segregação para resistência à ferrugem. Interessantemente a população derivada do cruzamento 8 segregou para resistência à ferrugem em uma razão de 3R:1S enquanto populações derivadas dos cruzamentos 9 e 10 não mostraram segregação fenotípica. Esse resultado é intrigante, pois assumindo-se que a resistência à ferrugem em cruzamentos interespecíficos seja controlada por um único gene do mesmo modo que ocorre em *E. grandis* (Junghans et al., 2003a) o padrão 3R:1S sugere que o híbrido (*DxG2*), seja heterozigoto para gene de resistência à ferrugem, enquanto que o padrão 0R:1S sugere que esta mesma árvore é homozigota recessiva para o gene de resistência. No entanto, sendo o híbrido (*DxG2*) de fato heterozigoto para o gene de resistência à ferrugem, em concordância com os resultados da família 8, a ausência de segregação nas famílias expandidas 9 e 10 deve ser decorrente da interação epistática do gene de resistência à ferrugem com outros genes. Além disso, a inversão na relação de dominância observada nas famílias 2, 3 e 4 também suporta um padrão mais complexo de herança, uma vez que tal inversão parece improvável. A maioria dos genes de resistência identificados até o momento possui interação alélica do tipo dominância completa (Hammond-Kozac & Parker, 2003 e Dangl & Jones, 2001) sendo poucos os casos de genes de resistência recessivos. Em geral herança recessiva é mais frequentemente observada no caso de resistência a vírus, onde a falta de uma molécula do hospedeiro pode impedir que o vírus complete seu ciclo (Hammond-Kozack & Jones, 2000).

Interações patógeno-hospedeiro onde a resistência é condicionada por um único gene são geralmente interpretadas por meio do modelo gene-a-gene (Flor, 1971). Recentemente, entretanto, tem sido demonstrado que um grande número de eventos se segue ao reconhecimento de proteínas Avr do patógeno por meio de proteínas R, como por exemplo, influxo de cálcio, alcalinização do espaço extracelular, ativação de proteína quinases, produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, e reprogramação transcricional (Hammond-Kozack & Parker, 2003). Além disso, também tem sido relatado que em 15 minutos, um grupo de novos transcritos que codificam moléculas sinalizadoras que incluem proteínas quinases e fatores de transcrição pode ser identificado na maioria das interações incompatíveis (Dangl & Jones, 2001). O envolvimento de proteínas quinases presumivelmente resulta na ativação fatores de transcrição latentes, que são requeridos para ativação de genes de defesa. As funções de genes de defesa incluem a biosíntese de ácido salicílico, indução da biosíntese de etileno, reforço da parede celular, lignificação, produção de compostos de ação antimicrobiana e a ativação de uma forma de morte celular rápida e localizada conhecida como reação de hipersensibilidade (Jones & Dangl, 2006).

Nesse contexto, um fenômeno epistático pode ocorrer se a resistência à ferrugem depender de dois genes principais, um que codifica para proteína R, que pode reconhecer proteínas Avr de *Puccinia psidii* de modo direto e o outro que codifique para um membro importante da cadeia de transdução de sinais como, por exemplo, uma proteína quinase que atua downstream do reconhecimento R-Avr. A falta da molécula sinalizadora bloquearia a ativação dos mecanismos de resistência do mesmo modo que a falta da proteína R resultaria em suscetibilidade, o que caracteriza um fenômeno de epistasia recessiva dupla.

Alternativamente, um fenômeno epistático poderia ocorrer se a resistência à ferrugem em eucaliptos seguir a hipótese guarda. Nesse modelo, proteínas R associam-se fisicamente com alvos de moléculas efetoras do patógeno. Esses alvos podem incluir componentes do sistema de defesa das plantas, ou proteínas do hospedeiro cuja função é modificada para nutrir o patógeno. Geralmente quando proteínas efetoras entram na célula hospedeira e interagem com os alvos, os complexos resultantes são reconhecidos pelas proteínas R, que são então

ativadas para iniciar o processo de defesa. Na ausência de uma proteína R específica, o alvo do hospedeiro não é monitorado, e uma vez estabelecido o contato com a proteína efetora a doença progride (Dangl & Jones, 2001). Neste último modelo, a resistência à ferrugem em eucaliptos dependeria de dois genes de efeito principal, um que codifica para uma proteína de resistência clássica e o segundo para uma proteína que é alvo de moléculas efetoras do patógeno. A molécula alvo quando modificada, não seria reconhecida pela proteína R após o contato com as moléculas efetoras do patógeno, o que bloquearia a ativação dos mecanismos de resistência do mesmo modo que a falta da proteína R resultaria em suscetibilidade, caracterizando assim um fenômeno de epistasia recessiva dupla.

Este último modelo fornece ainda uma explicação plausível para o fato de espécies de *Eucalyptus* originárias da Austrália serem suscetíveis a um patógeno nativo das Américas e também para a existência de resistência genética do tipo gene-a-gene neste patossistema. Isso porque se um número limitado de complexos protéicos do hospedeiro for alvo de moléculas efetoras do patógeno, um único complexo protéico do hospedeiro pode ser alvo de múltiplos efetores de um mesmo patógeno (Dangl & Jones, 2001) e em última instância de moléculas efetoras de múltiplos patógenos geneticamente relacionados. Moléculas efetoras de *P. psidii* podem, neste caso, reconhecer como alvo, os mesmos complexos protéicos reconhecidos por patógenos geneticamente relacionados nativos na Austrália, para os quais espécies de *Eucalyptus* possuem proteínas R que as guardam.

Os resultados desse trabalho indicam assim, que a resistência à ferrugem em cruzamentos interespecíficos é geneticamente controlada por um único gene, a semelhança do relatado por Junghans et al., (2003a) para resistência de *E. grandis* à ferrugem. Entretanto, esse gene de resistência interage epistaticamente com outros genes, resultando em alterações nos padrões de segregação esperados. No entanto, apesar da resistência à ferrugem ser controlada por um gene de efeito principal que interage epistaticamente com outros genes, dependendo do background genético, a variação fenotípica em todas as 10 famílias também indica a existência de genes de efeito secundário, uma vez que existem variações dentro de cada classe fenotípica. Isso sugere que o fenótipo tenha penetrância incompleta

ou expressividade variável dependendo do background genético. Junghans et al., (2003a) argumenta que plantas que possuem o gene de efeito principal em combinação favorável com genes de efeito secundário devem exibir o fenótipo classificado como S0, enquanto que plantas que possuem o gene de efeito principal porém, em combinações não favoráveis com genes de pequeno efeito devem exibir fenótipo classificado como S1. Pelos mesmos motivos, plantas sem o gene de efeito principal, mas com background genético favorável devem exibir fenótipo S2, enquanto plantas com background genético desfavorável devem exibir fenótipo S3. Essa argumentação parece explicar do modo satisfatório os resultados obtidos nesse estudo, demonstrando a relação próxima entre a resistência à ferrugem em cruzamentos inter e intraespecíficos.

Apesar das estratégias de melhoramento dependerem de estimativas acuradas da herdabilidade das características de interesse, nenhuma estimativa para herdabilidade da resistência à ferrugem havia sido relatada até o momento. Como não é esperado que condições permanentes de ambiente alterem significativamente o fenótipo no caso de resistência à ferrugem, a herdabilidade da resistência na família $(D \times G2) \times (U \times GL)$ foi estimada por meio do coeficiente de repetibilidade. O coeficiente de repetibilidade aproxima-se da herdabilidade quando condições permanentes de ambiente não são significativas. A herdabilidade estimada (84%) é relativamente alta, indicando que o caráter, resistência à ferrugem, possui de fato um forte componente genético e pequena influência ambiental. Esse é o primeiro relato de herdabilidade da resistência à ferrugem.

Ppr1 é, até o presente, o único loco de resistência à ferrugem conhecido. Após a identificação de matrizes homozigotas para *Ppr1*, a exemplo da matriz G26 (Junghans et al., 2003a) programas de melhoramento têm buscado utilizar tais matrizes como fonte de resistência à ferrugem. Contudo, o uso de uma única fonte de resistência à ferrugem não é a estratégia de longo prazo mais adequada para o manejo da doença, considerando a existência de especialização fisiológica em *P. psidii* (Junghans et al., 2003a, Xavier et al., 2000) e a possibilidade de suplantação da resistência conferida por *Ppr1*. Considerando que atualmente as plantações de eucaliptos são predominantemente clonais, constituídas

principalmente por *E. grandis*, *E. urophylla* e seus híbridos e o fato de *E. grandis* ser uma das espécies mais suscetíveis à ferrugem (Junghans et al., 2003a e Zauza, 2007), torna-se fundamental identificar outros genes de resistência à ferrugem que possam ser incorporados nos programas de melhoramento genético do eucalipto. A possibilidade revelada neste estudo de que a resistência seja geneticamente determinada por um único gene de resistência que interage epistaticamente com o outro gene, abre possibilidades de identificação e utilização imediata de árvores homozigóticas para ambos os locos (gene de resistência e gene epistático) como genitores femininos em pomares de polinização aberta, o que resultaria na geração de famílias inteiramente resistentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas AC, Valle LAC, Xavier AA, Brommonschenkel SH, Grattapaglia D, Silva CC, Bertolucci FL & Penchel R (1997) *Eucalyptus* rust: genetic variability of elite clones and histological characterization of the resistance reaction. Proceedings. IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypt 2:60-64.
- Alfenas AC, Zauza EAV, Maffia RG & Assis TF (2004) Clonagem e Doenças do Eucalipto. 1ª Edição. Viçosa MG. Editora UFV. 442p.
- Booth TH, Old KM & Jovanovic T (2000) A preliminary assessment of high risk areas for *Puccinia psidii* (*Eucalyptus* rust) in the Neotropics and Australia. Agriculture, Ecosystems and Environment 82:295-301.
- Carvalho ADO, Alfenas AC, Maffia LA & Carmo MGF (1998) Resistance of Eucalytus Species, Progenies and Prevanences to *Puccinia psidii*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 33:139-147.
- Coutinho TA, Wingfield MJ, Alfenas AC & Crous PW (1998) *Eucalyptus* rust: A disease with the potential for serious international implications. Plant Disease 82:819-825.
- Cruz CD (2006) Programa Genes: Biometria. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p.
- Dangl JL & Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411:826-33.
- Dianese JC, Moraes TSD & Silva AR (1984) Reponse of Eucalytus species to field infection by *Puccinia psidii*. Plant Disease 68: 314-316.
- FAO (2006) - <http://faostat.fao.org/site/381/default.aspx>
- Ferreira FA (1983) Ferrugem do eucalipto. Revista Árvore 7:91-109.
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology 9: 275-296.

- Glen M, Alfenas AC, Zauza EAV, Wingfield MJ & Mohammed C (2007) *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy - a review. *Australasian Plant Pathology* 36:1-16.
- Grattapaglia D (2003) Genolyptus. In: Borém A, Giudice M & Sedyama T (Eds). *Melhoramento Genômico*. Viçosa, Editora UFV. pp 51-71.
- Hammond-Kosack KE & Parker JE (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 177-193.
- Hammond-Kozack KE & Jones JDG (2000) Responses to Plant Pathogens. In: Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rocket Ville, Maryland. 1367p.
- Jones JDG & Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444 doi:10.1038/nature05286.
- Junghans DT, Alfenas AC, Brommonschenkel SH, Oda S, Mello EJ & Grattapaglia D (2003a) Resistance to Rust (*Puccinia psidii*) in *Eucalyptus*: Mode of Inheritance and mapping of major gene with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 108:175-180.
- Junghans DT, Alfenas AC & Maffia LA (2003b) Escala de Notas para a quantificação da ferrugem do eucalipto. *Fitopatologia Brasileira* 25:382-390.
- Ruiz RAR, Alfenas AC, Ferreira FA & Ribeiro Do Vale FXR. (1989) Influência da temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. *Fitopatologia Brasileira* 14: 55-61.
- SBS (2006) – Disponível em: <http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>.
- Xavier AA, Matsuoka K, Alfenas AC, Sanfuentes EE & Junghans DT (2000) Reação de *Eucalyptus globulus* e *E. nitens* a ferrugem (*Puccinia psidii*). *Fitopatologia Brasileira* 25:434.
- Xavier AA (2002) Histopatologia da Interação *Puccinia psidii* e virulência de isolados do patógeno em espécies de Myrtaceae. Tese de Doutorado em Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa.
- Zauza EAV (2007) Epidemiologia da ferrugem do eucalipto e resistência genética. Tese de Doutorado (Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa.

CAPÍTULO 2

**MAPEAMENTO GENÉTICO DA RESISTÊNCIA À FERRUGEM EM UM
CRUZAMENTO INTERESPECÍFICO DE *Eucalyptus***

RESUMO

A fim de se mapear o gene/QTL para resistência à ferrugem em um cruzamento interespecífico, 188 plantas obtidas do cruzamento [(*E. dunnii* x *E. grandis* 2) x (*E. urophylla* x *E. globulus*)] foram avaliadas quanto à resistência à ferrugem e genotipadas com um grupo de microssatélites que cobre todo o grupo de ligação 3. Apesar do padrão de segregação da resistência à ferrugem no cruzamento em questão corresponder àquele esperado para um caráter monogênico dominante, a resistência foi tratada como um caráter quantitativo e análises de QTL foram realizadas para estimar a posição e o efeito do loco envolvido na expressão da resistência. Para o mapeamento de QTLs em mapa integrado foi utilizada a estratégia de mapeamento por intervalo desenvolvida por Fulker & Cardon e para o mapeamento de QTLs nos mapas pseudo-testcross previamente construídos foi utilizada a estratégia de mapeamento por intervalo desenvolvida por Lander & Botstein. Com essas análises detectou-se um QTL para resistência à ferrugem no grupo de ligação 3. Esse QTL foi detectado com grande significância estatística pela metodologia de Fulker & Cardon entre os marcadores Embra286 e Embra122, e pela estratégia de Lander & Botstein entre os marcadores Embra350 e Embra239. A estimativa é que estes QTLs expliquem 71 e 42% da variação fenotípica, respectivamente, e como a herdabilidade da resistência à ferrugem neste cruzamento igual a 84% esses QTLs devem explicar 84 e 50% da resistência à ferrugem nesse cruzamento, respectivamente. Uma vez que esses QTLs foram identificados na mesma região do grupo de ligação 3, eles devem corresponder a um mesmo loco. Para se obter o exato posicionamento do gene de resistência no mapa integrado previamente construído para a família (*DxG2*)x(*UxGL*) os dados

de resistência à ferrugem foram analisados com um algoritmo implementado no software GQMOL. Com esta análise foi possível localizar o gene de resistência na região entre os marcadores Embra286 e Embra239 em uma janela genética de 14,6cM, confirmando ainda a hipótese que os dois genitores são heterozigotos para o gene de resistência. Os marcadores que flanqueiam esse gene/QTL podem ser utilizados em experimentos de introgressão com uma eficiência esperada de aproximadamente 99% na seleção de plantas resistentes, assumindo ausência de interferência de recombinação na região genômica alvo.

ABSTRACT

In order to map resistance gene/QTL 188 plants obtained from an interspecific cross [(*E. dunnii* x *E. grandis* 2) x (*E. urophylla* x *E. globulus*)] were assessed for resistance and genotyped with a set of microsatellites scanning all linkage group 3. Although the segregation pattern for rust resistance in that specific cross corresponds to that expect to a dominant monogenic trait, the resistance was treated as a quantitative trait and QTL analysis were performed to estimate the position and the effect of the locus involved in resistance expression. For QTL mapping in the integrated map, the interval mapping strategy developed by Fulker & Cardon was used, and for QTL mapping in the pseudo-testcross maps, the interval mapping strategy developed by Lander & Botstein was used. With these analysis it was detected a major effect QTL for rust resistance in linkage group 3. This QTL was detected with high confidence by the methodology of Fulker & Cardon in the region between markers Embra286 and Embra122 and by the strategy of Lander & Botstein in the region between markers Embra350 and Embra239. The estimates are that these QTLs explains near 71 and 42% of the phenotypic variation, respectively and since rust resistance inheritability in this cross was estimated in 84%, the detected QTLs should explain near 84% and 50% of rust resistance in this family, respectively. Hence these QTLs were detected in a same region of linkage group 3, they must correspond to the same locus. Aiming to obtain the exact position of the resistance locus on the integrated map previously constructed for (*DxG2*)x(*UxGL*) family the resistance data were analyzed with an algorithm implemented in the GQMOL software. With this analysis it was possible to locate the resistance locus in the region between

markers Embra286 and Embra239 in a genetic window of 14,61cM also confirming the hypothesis that both parents are heterozygotes for the resistance locus. The flanking markers of this gene/QTL could be used in introgression experiments with an expected efficiency near 99% for selecting resistant plants, assuming no recombination interference in the target genomic area.

1. INTRODUÇÃO

Resistência à ferrugem ocorre naturalmente em muitas espécies de *Eucalyptus* (Alfenas et al., 2004) e é conferida por uma reação de hipersensibilidade (Xavier, 2002). Esse é um tipo comum de resposta ativada quando proteínas R, codificadas por genes de resistência da planta reconhecem proteínas Avr codificadas por genes de avirulência do patógeno (Hammond-Kozack & Parker, 2003 e Dangl & Jones, 2001). Genótipos resistentes não exibem pústulas, ou pústulas pequenas (0,8 mm de diâmetro, com uma ou duas uredínias) enquanto genótipos suscetíveis exibem pústulas grandes, variando de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro em folhas, pecíolos ou ramos (Junghans et al., 2003b).

Sendo o melhoramento para resistência o método mais eficiente para o controle das doenças do eucalipto (Chimwamurombe et al., 2001 e Alfenas et al., 2004) identificar as bases genéticas da resistência à ferrugem é essencial para programas de melhoramento. Apesar de muitos genes participarem do sistema de defesa das plantas, apenas alguns foram estudados em *Eucalyptus*. O gene que codifica para a proteína inibidora de poligalacturonase (PGIP), que é produzida como parte do sistema de defesa da planta à infecção, foi parcialmente clonado em *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. nitens* e *E. saligna* (Chimwamurombe et al., 2001) e completamente clonado em *E. grandis* (Bhoora et al., 2003). Também demonstrou-se que um grande número de genes tem expressão diferencial entre plantas resistentes e suscetíveis por meio de bibliotecas SAGE (Moon et al., 2007) e até o momento apenas um gene de resistência à ferrugem, denominado *Ppr1*, foi mapeado em *E. grandis* (Junghans et al., 2003a).

Uma vez que o mapeamento genético e o mapeamento de QTLs podem ser efetivamente utilizados no melhoramento genético do eucalipto por meio da implementação de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), para a seleção precoce e eficiente de plantas com determinado fenótipo de interesse (Williams & Neale, 1992; O'Malley & McKeand, 1994; Plomion et al., 1996; Spelman & Bovenhuis, 1998; Kumar & Garrick, 2001) Junghans et al., (2003a) sugeriram o uso potencial do marcador RAPD AT9/917, que co-segrega como fenótipo de resistência em programas de SAM. Entretanto, apesar da combinação entre marcadores RAPD e *Bulk Segregant Analysis* (BSA) utilizada por Junghans et al. ter se mostrado eficiente para a identificação de vários marcadores moleculares ligados a *Ppr1*, esta não permite mapeamento comparativo, devido à baixa transferibilidade de marcadores RAPD, o que limita a utilidade do marcador AT9/917 em SAM. Neste contexto, uma estratégia mais promissora é mapear um grande número de marcadores microssatélites altamente transferíveis e polimórficos (Brondani et al., 1998, 2002 e 2006) próximos a genes de resistência e então usar o par de microssatélites flanqueadores como guias na triagem de outras árvores (procedências, progênies, espécies diferentes). Seguindo esta estratégia, Bueno et al., (2004) utilizando marcadores microssatélites e as estratégias de BSA e genotipagem seletiva verificaram a existência de ligação fatorial entre *Ppr1* e o marcador microssatélite Embra227 no mesmo *pedigree* estudado por Junghans et al., (2003a). A frequência de recombinação foi estimada em 12,16% posicionando *Ppr1* no grupo de ligação 3 do mapa de referência de *Eucalyptus* spp. (Brondani et al., 2006).

O posicionamento de *Ppr1* no mapa de referência abre possibilidade de se efetuar buscas dirigidas a genes de resistência em cruzamentos não relacionados por meio da genotipagem de indivíduos de uma população segregante com os microssatélites do grupo de ligação 3. Neste contexto, cruzamentos interespecíficos permitirão determinar se parte da resistência à ferrugem em diferentes espécies é controlada pela mesma região genômica ou por genes/QTLs localizados em regiões distintas.

O objetivo deste trabalho, portanto, foi testar se a resistência à ferrugem em um cruzamento interespecífico de *Eucalyptus* é controlada pela mesma região genômica que controla a resistência à ferrugem *E. grandis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

Empregou-se 205 indivíduos de uma família de irmãos completos, cruzamento $(DxG2)x(UxGL)$ – Genolyptus [$(DxG2)$ – híbrido de *Eucalyptus dunnii* e *E. grandis*, $(UxGL)$ – híbrido de *E. urophylla* e *E. globulus*] segregante para resistência à ferrugem.

2.2. Inoculação

Empregou-se o isolado monopustular UFV-2 de *P. psidii* pertencente à raça 1 (Xavier, 2002). Esse isolado é predominante em diferentes regiões do Brasil (Xavier, 2002). O isolado foi mantido em mudas de jameiro [*Syzygium jambos* (L.) Alston], mediante re-inoculações periódicas a cada 20 dias (Ruiz et al., 1989). Uma suspensão de inóculo a 2×10^4 urediniosporos/mL foi atomizada homogeneamente nas superfícies abaxial e adaxial das folhas, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº15, acoplado a um compressor elétrico ajustado para 0,6-0,8 Kgf/cm² de pressão. Após a inoculação, as mudas foram mantidas por 24h em câmara de nevoeiro no escuro, e a seguir transferidas para câmara de crescimento a 22°C com fotoperíodo de 12h e intensidade luminosa de 40 $\mu\text{m s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (Ruiz et al., 1989). Após a avaliação, as plantas inoculadas foram podadas, re-conduzidas e re-inoculadas para confirmação dos resultados.

2.3. Avaliação da resistência à ferrugem

A avaliação da severidade da ferrugem foi realizada aos 20 dias após a inoculação utilizando-se a escala de notas (Figura 1) preconizada por Junghans et al., (2003b). Plantas S0 e S1 foram consideradas resistentes e plantas S2 e S3 suscetíveis (Junghans et al., 2003a). Após as avaliações efetuou-se a verificação das pressuposições de segregação mendeliana da resistência através de um teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$).

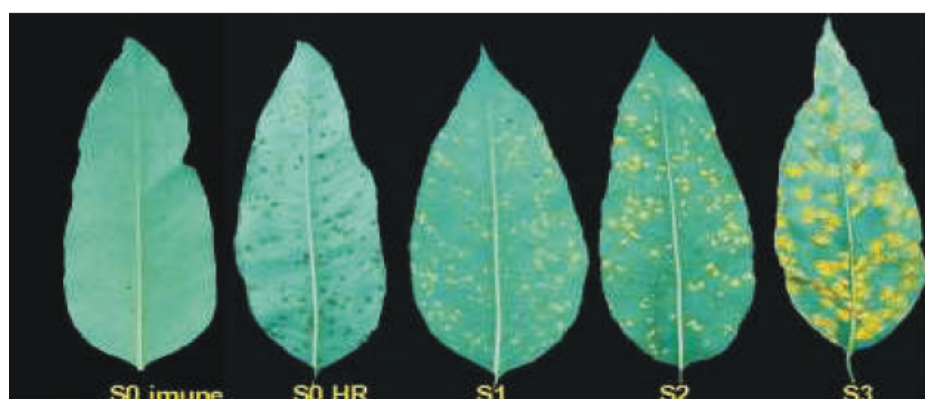


Figura 1. Escala de notas para avaliação da resistência à ferrugem do eucalipto, com quatro classes de severidade: S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade do tipo “fleck” ou necrótico; S1 = pústulas < 0,8 mm de diâmetro; S2 = pústulas de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro; e S3 = pústulas > 1,6 mm de diâmetro (Junghans et al., 2003b).

2.4. Extração e quantificação de DNA

O DNA de 188 plantas do cruzamento (*DxG2*) \times (*UxGL*) e dos parentais foi extraído segundo o protocolo proposto por Grattapaglia & Sederoff, (1994). O DNA foi resuspenso em 50 μ L de água MiliQ autoclavada. A quantificação do DNA foi realizada em géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo e a concentração estimada pela comparação direta com amostras de concentração conhecida e/ou pela utilização de espectrofotômetro. Posteriormente o DNA foi diluído a 1ng/ μ L. PCRs (*Polymerase Chain Reaction*) foram conduzidas para se verificar a amplificação das amostras e uma vez constatadas as amplificações as amostras de DNA foram distribuídas em placas de 96 poços.

2.5. Genotipagem de microssatélites (SSR)

O trabalho de genotipagem baseou-se no posicionamento prévio de *Ppr1* no grupo de ligação 3 por Bueno et al., (2004). Foram utilizados microssatélites pertencentes ao grupo de ligação 3 previamente desenvolvidos (Brondani et al., 2006 e CSIRO, 2000). A genotipagem dos SSR foi feita em 7 μ L de reação contendo 2 ng de DNA genômico, 0,2 mM de dNTP, tampão de PCR 1x, 0,1 μ M de cada primer, 1 unidade/ μ L de enzima Taq polimerase e 1,55 μ L de água MiliQ. Os ciclos de PCR foram realizados em Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA) e incluíram uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos com os seguintes passos: 94°C por 1 min, 57°C por 1 min para o anelamento do primer e 72°C por 1 min para extensão das novas cadeias de DNA; e, para finalizar, um último passo de 72 °C por 30 min. As PCRs foram conduzidas em sistemas multiplex, com três primers com fluorescências distintas (6-FAM, HEX e NED) por reação. Uma alíquota de 1 μ L de cada reação, foi acrescida de 8 μ L de HiDi formamida e mais 1 μ L do *internal size standart* ROX (Brondani e Grattapaglia, 2001) e então eletroinjetada ao analisador genético ABI 3100 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA) sendo os dados coletados sob um filtro virtual D usando o Data Collection (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA) e analisados no GeneMapper (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA).

2.6. Mapeamento genético

Efetuuou-se a verificação das pressuposições de segregação mendeliana dos marcadores através de um teste de Qui-quadrado (χ^2) com um nível de significância de 20% para todo o experimento (“experiment wise”) utilizando a proteção de Bonferroni para múltiplos testes.

Os locos foram mapeados integrando as informações das meioses de ambos os parentais, sendo o mapa integrado construído com programa QGMOL,

que possui rotinas computacionais adequadas para a análise de ligação entre marcadores co-dominantes segregantes em famílias de irmãos-completos derivadas de parentais heterozigóticos.

Para a construção dos mapas pseudo-testcross (Grattapaglia & Sederoff, 1994) as tabelas de genotipagem dos microssatélites foram re-codificadas para análise da segregação de cada parental, separadamente. Assim, os locos foram separados em dois grupos: um com marcadores que segregarem a partir do parental (*DxG2*) e outro com aqueles que segregarem a partir do parental (*UxGL*). Os marcadores completamente informativos (segregação 1:1:1:1) foram incluídos nos dois grupos e os marcadores que segregarem como num delineamento F_2 (segregação 1:2:1) foram excluídos das análises devido à impossibilidade de identificação da origem parental dos alelos. Em cada grupo, os genótipos foram codificados com 0 e 1, identificando a ausência e presença de um determinado alelo (dominância) ou a presença de cada um dos dois alelos segregantes a partir do parental (co-dominância). Como não se dispõe da informação do genótipo dos progenitores dessa família e, portanto, não se conhece a fase de ligação dos marcadores, cada loco foi duplicado invertendo-se os códigos dos seus genótipos (0 passará a ser 1 e vice-versa).

A máxima frequência de recombinação de 30% e o valor mínimo de LOD (logaritmo da razão de verossimilhança) de 3,0 foram os parâmetros utilizados para determinar a ligação entre marcadores. As distâncias entre marcadores, em cM, foram calculadas através da função de mapeamento de Kosambi.

2.7. Mapeamento genético de QTLs para resistência à ferrugem

Nos mapas previamente construídos foram realizadas buscas por QTLs através das estratégias de pares de irmãos (Fulker & Cardon, 1994) e intervalo simples (Lander & Botstein, 1989). A estratégia de Fulker & Cardon foi aplicada ao mapa integrado enquanto que a estratégia de Lander & Botstein foi aplicada aos mapas pseudo-testcross. A estatística F foi utilizada para avaliar a existência de QTLs nos intervalos dentro do grupo de ligação 3 pela estratégia de Fulker & Cardon, (1994) e a estatística LOD pela estratégia de Lander & Botstein, 1989. Os

níveis de significância adotados para a declaração do QTL foi um valor de F com 1 grau de liberdade no numerador, infinito no denominador e nível de significância de 0,1% ($F_{1,\infty; 0,001} = 10,828$) e $LOD = 3,0$.

As análises foram realizadas com o software GQMOL (Cruz, 2008). O software GQMOL está disponível para download gratuitamente em www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm.

2.8. Mapeamento do gene de resistência à ferrugem

Baseado na hipótese de herança mendeliana da resistência à ferrugem (S0 e S1 versus S2 e S3 – Junghans et al., 2003a) empregou-se uma metodologia alternativa para posicionamento do gene de resistência à ferrugem. Para tanto se utilizou o algoritmo que está implementado no software GQMOL (Cruz, 2008). Tal algoritmo permite o posicionamento de marcadores/caracteres dominantes que segregam na razão de 3:1 em um mapa integrado de famílias de irmãos completos baseado na sua frequência de recombinação com os marcadores co-dominantes previamente mapeados. Este algoritmo foi aplicado aos dados de resistência à ferrugem no intuito de se obter o exato posicionamento do gene de resistência no mapa integrado previamente construído.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da resistência

Entre as 205 plantas que compõem a família $(DxG2) \times (UxGL)$ 144 receberam nota S0 por apresentarem-se imunes ou exibirem reação de hipersensibilidade com necrose ou "fleck", 28 plantas receberam nota S1 por possuírem pústulas puntiformes, 19 plantas nota S2 por apresentarem pústulas de tamanho mediano, com esporulação mais abundante e 14 plantas receberam nota S3 por possuírem pústulas grandes e esporulação intensa em ambas as faces das folhas. Considerando-se resistentes as plantas que receberam nota S0 e S1 como indicam Junghans et al., (2003a) e suscetíveis às demais, as pressuposições de segregação mendeliana são satisfeitas considerando-se que ambos os genitores são heterozigotos para gene de resistência à ferrugem e que a segregação esperada é 3R:1S ($\chi^2 = 8,665$ e $pvalue = 0,3243^{ns}$).

3.2. Mapeamento genético: mapa integrado e mapas pseudo-testcross

Dos 23 marcadores que compõem o grupo de ligação 3 de *Eucalyptus* apenas 13 amplificaram alelos distintos e segregaram na família $(DxG2) \times (UxGL)$. Entre esses, seis eram completamente informativos (segregação 1:1:1:1), quatro informativos apenas para o genitor $(DXG2)$ (segregação 1:1) e cinco foram informativos para o genitor $(UxGL)$ (segregação 1:1).

O teste de qui-quadrado ($\alpha=0,20$ sob a proteção de Bonferroni) foi aplicado aos marcadores segregantes para testar desvios das classes genotípicas das razões

esperadas segundo herança mendeliana, mas nenhuma distorção foi detectada. Dos 13 marcadores segregantes, apenas seis puderam ser mapeados com alta confiabilidade no mapa integrado (Figura 2).

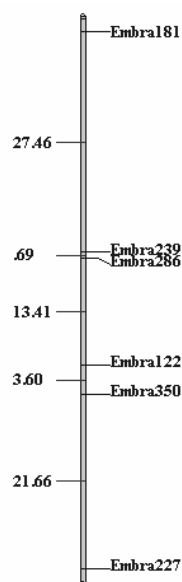


Figura 2. Mapa integrado para a família (DxG2)x(UxGL) dos microssatélites que compõem o grupo de ligação 3 de *Eucalyptus*.

O comprimento total do mapa foi de 66,82cM com um intervalo médio entre marcadores de 11,14cM. A maior distância entre marcadores adjacentes foi de 27,46cM. A ordem dos marcadores foi mantida em relação ao mapa de referência de Brondani et al., (2006).

Uma vez que desses 6 marcadores, 4 eram informativos para o genitor feminino e 5 para o genitor masculino, e nenhum marcador segregou na razão de 1:2:1, isto é, heterozigoto idêntico em ambos os genitores, procedeu-se a construção de mapas individuais para ambos os genitores baseado na estratégia de pseudo-testcross (Grattapaglia & Sederoff, 1994) (Figura 3).

3.3. Mapeamento genético de QTLs

Como discutido anteriormente, apesar do padrão de segregação da resistência à ferrugem no cruzamento (DxG2)x(UxGL) corresponder àquele esperado para um caráter monogênico dominante, devido a limitações dos

programas computacionais em calcular a distância entre um marcador co-dominante e um marcador dominante que segrega na razão de 3:1, a resistência foi tratada como um caráter quantitativo e as análises de QTL foram realizadas para estimar a posição e o efeito do loco envolvido na expressão da resistência.

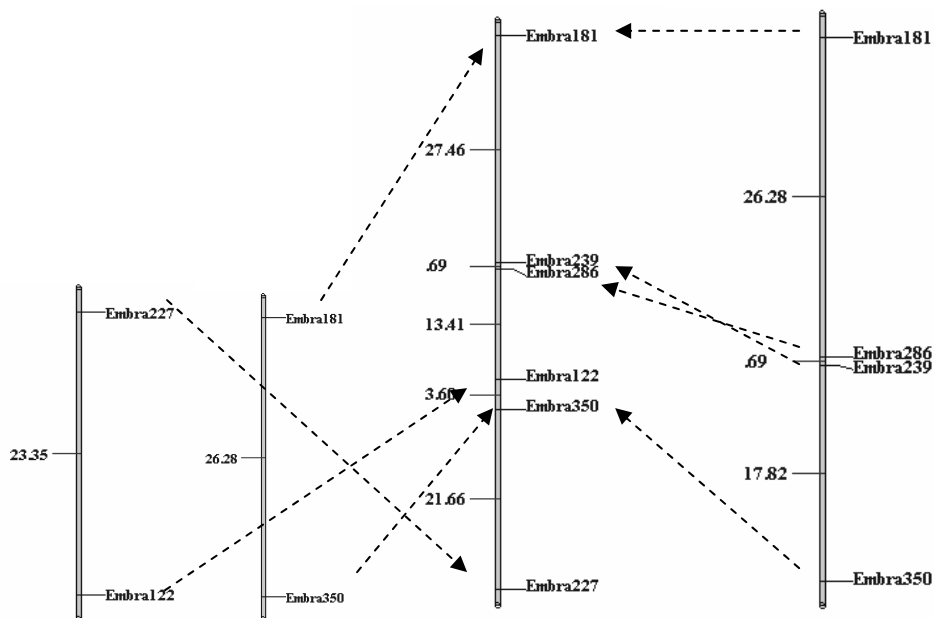


Figura 3. Mapas pseudo-testcross para as árvores (*DxG2*) e (*UxGL*) e o mapa integrado de microssatélites que compõem o grupo de ligação 3 de *Eucalyptus*.

A severidade da ferrugem em cada planta, S0, S1, S2 e S3 foi convertida em 1, 2, 3 e 4, respectivamente, e esse valor foi usado como valor fenotípico de planta. Para o mapeamento de QTLs foi realizada uma regressão entre o quadrado da diferença fenotípica de dois irmãos completos e o IBD do QTL obtido segundo a estratégia por intervalo de Fulker & Cardon, (1994). Essa análise demonstrou a existência de QTL de efeito principal para resistência à ferrugem no grupo de ligação 3. Esse QTL foi detectado com grande confiabilidade (LR=487) na região entre os marcadores Embra286 e Embra122 (Figura 4). De acordo com Fulker & Cardon, (1994), variância genética aditiva atribuída ao QTL pode ser calculada pela expressão $-\beta q/2$, e variação fenotípica explicada pelo QTL segundo a seguinte expressão:

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

Com estas expressões foi estimado que o QTL detectado entre os marcadores Embra286 e Embra122 explica cerca de 71% da variação fenotípica. E uma vez que a herdabilidade da resistência à ferrugem nesse cruzamento foi estimada em 84% (Capítulo 1), o QTL detectado deve explicar cerca de 84% da resistência à ferrugem na família $(DxG2) \times (UxGL)$. Esses resultados mostram claramente que a resistência à ferrugem em um cruzamento interespecífico de *Eucalyptus* é controlada por um único QTL de efeito principal, como anteriormente verificado por Junghans et al., (2003a) em um família de irmãos completos de *E. grandis*.

A estratégia de mapeamento por intervalo (Lander & Botstein, 1989) também foi empregada para mapear QTLs para resistência à ferrugem nos mapas pseudo-testcross previamente construídos. Essas análises demonstraram a existência de um QTL de efeito principal para resistência à ferrugem no grupo de ligação 3 do genoma do híbrido $(UxGL)$. Esse QTL foi detectado com grande confiabilidade (LOD=11,4) na região entre os marcadores Embra350 e Embra239 (Figura 4). Esse QTL detectado explica cerca de 42% da variação fenotípica. Uma vez que a herdabilidade da resistência à ferrugem nesse cruzamento foi estimada em 84% (Capítulo 1), o QTL detectado deve explicar cerca de 50% da resistência à ferrugem na família $(DxG2) \times (UxGL)$.

Infelizmente não foi possível detectar QTLs para resistência à ferrugem no genoma do híbrido $(DxG2)$ usando a estratégia de mapeamento de QTLs por intervalo em função da baixa saturação do mapa e ao fato de que no mapa pseudo-testcross para esta árvore o grupo de ligação 3 foi dividido em dois.

3.4. Mapeamento do gene de resistência à ferrugem

Uma vez que não foi possível mapear um QTL para resistência à ferrugem no genoma do híbrido $(DxG2)$, para testar a hipótese de que ambos os genitores

são heterozigotos para o loco que contém o gene de resistência, uma estratégia de mapeamento alternativa foi utilizada.

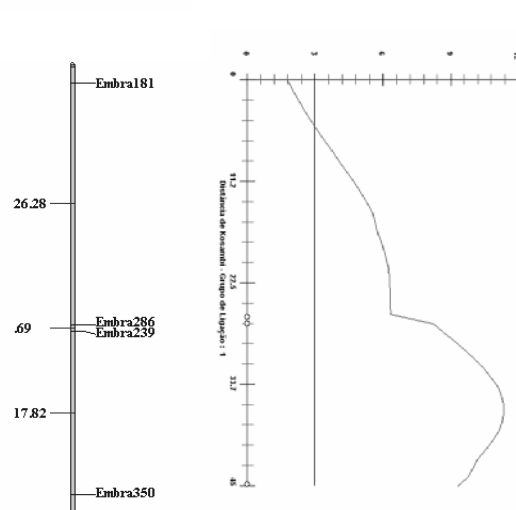
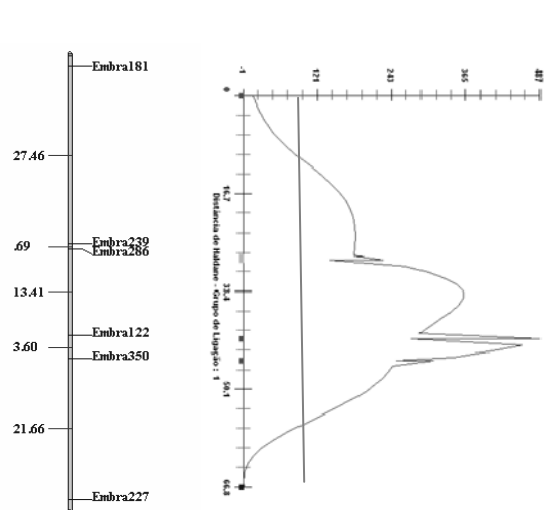


Figura 4. Mapa integrado para a família $(DxG2)x(UxGL)$ e o mapa pseudo-testcross do híbrido $(UxGL)$. A. Análise de QTLs pela estratégia de Fulker & Cardon, (1994) demonstrando a existência de um QTL para resistência à ferrugem entre os Embra286 e Embra122. Esse QTL explica cerca de 71% da variação fenotípica para resistência à ferrugem na família $(DxG2)x(UxGL)$. B. Mapeamento de QTLs por intervalo mostrando a existência para resistência à ferrugem entre os marcadores Embra350 e Embra239. Esse QTL explica cerca de 42% da variação fenotípica para resistência à ferrugem no híbrido $(UxGL)$.

Para este propósito foi utilizado o algoritmo implementado no software QQMOL (Cruz, 2008), que permite o posicionamento de marcadores/caracteres

dominantes que segregam na razão de 3:1 em um mapa integrado de famílias de irmãos completos baseado na sua frequência de recombinação com os marcadores co-dominantes previamente mapeados. As estimativas da frequência de recombinação entre o marcador dominante e os marcadores co-dominantes são obtidas seguindo o método da máxima verossimilhança. Este algoritmo foi aplicado aos dados de resistência à ferrugem no intuito de se obter o exato posicionamento do gene de resistência no mapa integrado previamente construído para a família $(D \times G2) \times (U \times GL)$, assumindo que a resistência nessa família é herdada como um caráter monogênico dominante, e que ambos os genitores são heterozigotos para o gene de resistência. Com esta análise foi possível localizar o gene de resistência na região entre os marcadores Embra286 e Embra239 (Figura 5) em uma janela genética de 14,6cM. Esses resultados confirmam a hipótese que os dois genitores são heterozigotos para o gene de resistência, pois se isso não fosse verdade, não seria possível mapear o gene uma vez que a estratégia de mapeamento é dependente de frequências genotípicas esperadas para um único gene e ambos os genitores heterozigotos.

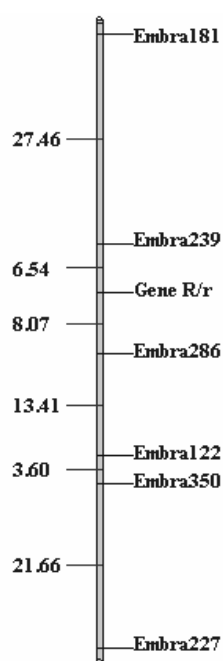


Figura 5. Mapa integrado para a família $(D \times G2) \times (U \times GL)$ mostrando a localização do gene de resistência à ferrugem (Gene R/r).

Como o mapeamento genético e o mapeamento de QTLs podem ser efetivamente utilizados no melhoramento genético do eucalipto por meio da implementação de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), para a seleção precoce e eficiente de plantas com determinado fenótipo de interesse (Williams & Neale, 1992; O'Malley & McKeand, 1994; Plomion et al., 1996; Spelman & Bovenhuis, 1998; Kumar & Garrick, 2001) sugere-se o uso potencial dos marcadores Embra239 e Embra286 em programas de melhoramento via SAM. Espera que esses marcadores possam ser utilizados em futuros experimentos de introgressão com um precisão esperada de 99,5% ($0,0654 \times 0,0807 = 0,00528$) na seleção de plantas que carregam o gene de resistência assumindo ausência de interferência de recombinação na região genômica.

4. DISCUSSÃO

Apesar do padrão de segregação da resistência à ferrugem no cruzamento $(DxG2) \times (UxGL)$ corresponder àquele esperado para um caráter monogênico dominante, a resistência foi tratada como um caráter quantitativo e análises de QTL foram realizadas para estimar a posição e o efeito do loco envolvido na expressão da resistência. Para o mapeamento de QTLs em mapa integrado foi utilizada a estratégia de mapeamento por intervalo desenvolvida por Fulker & Cardon, (1994) e para o mapeamento de QTLs nos mapas pseudo-testcross previamente construídos foi utilizada a estratégia de mapeamento por intervalo desenvolvida por Lander & Botstein, (1989). Com essas análises detectou-se um QTL para resistência à ferrugem no grupo de ligação 3. Esse QTL foi detectado com grande significância estatística pela metodologia de Fulker & Cardon, (1994) entre os marcadores Embra286 e Embra122, e pela estratégia de Lander & Botstein, (1989) entre os marcadores Embra350 e Embra350. A estimativa é que estes QTLs expliquem 71 e 42% da variação fenotípica, e sendo a herdabilidade da resistência à ferrugem neste cruzamento igual a 84% esses QTLs devem explicar 84 e 50% da resistência à ferrugem nesse cruzamento, respectivamente. Uma vez que esses QTLs foram identificados na mesma região do grupo de ligação 3, eles devem corresponder ao mesmo loco. Diferenças na posição podem ser atribuídas às diferentes estratégias de mapeamento, e as diferenças de efeito ao fato de que o QTL detectado no mapa integrado resulta da informação de ambos os genitores, ao passo que o QTL detectado no mapa pseudo-testcross do híbrido $(UxGL)$ obviamente resulta da informação apenas desse genitor. Infelizmente não foi possível detectar QTLs para resistência à ferrugem no genoma do híbrido

(*DxG2*) usando a estratégia de mapeamento de QTLs por intervalo. Entretanto, deve ser ressaltado que, de acordo com Fulker & Cardon, (1994) as estimativas de herdabilidade dos QTLs, ou em outras palavras, a variação fenotípica explicada pelo QTL é subestimada, uma vez que os marcadores não estão localizados na exata posição do QTL. Desse modo, o QTL detectado no mapa integrado pode explicar mais de 90% da variação fenotípica, e uma vez que o QTL detectado no genoma do híbrido (*UxGL*) explica entre 42-50% da variação fenotípica, o restante deve ser atribuído a um QTL no genoma do híbrido (*DxG2*). Isso está de acordo com os resultados obtidos após a aplicação do algoritmo implementado no software QMOL. Com esta última análise foi possível mapear o gene de resistência à ferrugem na região entre os marcadores Embra286 e Embra239, em uma janela genética de 14,6cM. Esses resultados confirmam a hipótese que os dois genitores são heterozigotos para o gene de resistência, em concordância com os resultados da fenotipagem, e a existência de gene epistático que bloqueia a expressão da resistência nas famílias 9 e 10 (Capítulo 1). Se os genitores não fossem heterozigotos para o gene de resistência não seria possível mapear o gene uma vez que a estratégia de mapeamento é dependente de frequências genotípicas esperadas para um único gene e ambos os genitores heterozigotos. Esses resultados em conjunto mostram claramente que apesar da expressão da resistência ser condicionada ao background genético (ocorrência epistasia em alguns cruzamentos), a resistência à ferrugem em cruzamentos interespecíficos de *Eucalyptus* é controlada por um único gene/QTL de efeito principal. Isso está de acordo com os resultados obtidos por Junghans et al., (2003a) para famílias de irmãos completos de *E. grandis*.

Junghans et al., (2003a) demonstraram que o marcador AT9/917 está completamente ligado ao gene *Ppr1*. Baseado no tamanho da progênie segregante utilizada no estudo, à máxima distância entre AT9/917 e *Ppr1* foi estimada em 0,462cM. Usando uma combinação de BSA e marcadores microssatélites *Ppr1* foi posicionado no grupo de ligação 3 de *Eucalyptus*, próximo ao marcador Embra227 (12cM) (Bueno et al., 2004). Nesse estudo foi mapeado por diferentes estratégias uma região genômica do grupo de ligação 3 que está associada à resistência à ferrugem em um cruzamento interespecífico de *Eucalyptus*. Mesmo

sendo o cruzamento utilizado nesse estudo diferente daquele utilizado por Junghans et al., (2003a) (*G38xG21*), não pode-se excluir a possibilidade de que o gene de resistência mapeado na família (*DxG2*)x(*UxGL*) seja alélico a *Ppr1*. Entretanto, uma vez que a distância do gene detectado nesse estudo e o marcador Embra227 é consideravelmente diferente da distância de *Ppr1* a esse mesmo loco, sugere-se que o loco mapeado na família (*DxG2*)x(*UxGL*) seja designado como *Ppr2*.

Locos para resistência à ferrugem em espécies florestais são geralmente raça-específicos, como o gene *Fr1* em *Pinus taeda* (Wilcox et al., 1996), ou de grande espectro como o gene *Mer* em *Populus* (Cervera et al., 1996). Junghans et al., (2003a) sugere que o gene de resistência à ferrugem identificado em *E. grandis* não possui especificidade por raças, ou que exista pequena variação na virulência na população de *P. psidii*. Assim, é interessante verificar como diferentes genes/alelos se comportarão quando desafiados com isolados distintos de ferrugem.

Sob a perspectiva de um programa de melhoramento, uma importante questão relacionada à resistência à ferrugem é a durabilidade da resistência em campo. Apesar de alguns genes de resistência à ferrugem terem se mantido efetivos por mais de 20 em cevada, este nem sempre é o caso. Por exemplo, resistência à ferrugem da folha do trigo no Brasil, controlada por genes raça-específicos não permanecem efetivos por mais de 2 anos (Barcellos et al., 1997) e a resistência à ferrugem da soja conferida pelos locos *Rpp1* e *Rpp3* foi simultaneamente suplantada apenas 2 anos após o primeiro relato de ocorrência da ferrugem da soja no Brasil (Garcia et al., 2008). Uma vez que florestas de eucaliptos são estabelecidas sob a forma de grandes plantios clonais, o uso de uma única fonte de resistência certamente não é adequado como estratégia de manejo da ferrugem em longo prazo, considerando a possibilidade de seleção natural de isolados virulentos (Pinon et al., 1987; Steenackers et al., 1994; McIntosh & Brown, 1997). Junghans et al., (2003a) sugerem que deve-se buscar novas fontes de resistência para serem incorporadas nos programas de melhoramento genético do eucalipto. Nesse respeito, indiferentemente de serem genes proximamente ligados ou alelos do mesmo gene, a existência de alelos para resistência à

ferrugem em espécies distintas de *E. grandis* representa nova variabilidade genética para programas de melhoramento genético que buscam desenvolver clones de *Eucalyptus* resistentes à ferrugem.

Junghans et al., (2003a) também sugeriram o uso potencial do marcador RAPD AT9/917, que co-segrega com o fenótipo de resistência em programas de melhoramento baseados em SAM. Mas devido a limitações dos marcadores RAPD, como por exemplo, baixa transferibilidade, isso não pôde ser totalmente implementado. Uma vez que marcadores SSR, não compartilham das mesmas limitações que marcadores RAPD, espera-se que esses marcadores possam ser eficientemente utilizados em programas de melhoramento baseados em SAM. A introgressão dos alelos de resistência à ferrugem, derivados das árvores (*DxG2*) e (*UxGL*) ao loco correspondente em árvores suscetíveis, poderia ser monitorada com os marcadores flanqueantes Embra239 (a 6,5cM) e Embra286 (a 8,0cM) com eficiência estimada de 99,5%, assumindo ausência de interferência de recombinação no segmento genômico alvo. É verdade, entretanto, que sem nenhuma informação prévia a eficiência de seleção de plantas resistentes em um cruzamento envolvendo essas árvores em particular, seria ao redor de 75 ou 50% dependendo se a segregação para a resistência for de 3R:1S ou 1R:1S. Apesar de poder-se facilmente identificar as plantas resistentes apenas inoculando as plantas de interesse, em programas de melhoramento testes clonais poderiam ser otimizados para resistência à ferrugem se as plantas, derivadas de cruzamentos que envolvem os híbridos (*DxG2*) ou (*UGL*) fosse previamente selecionadas para resistência à ferrugem com os microssatélites ligados ao gene de resistência. Isso permitiria que em estágios finais dos programas de melhoramento, quando a resistência à ferrugem é geralmente avaliada, que uma menor quantidade de clones fosse rejeitada devido à suscetibilidade à ferrugem.

É interessante ressaltar que, a identificação de um QTL de efeito principal para a resistência à ferrugem não exclui a possibilidade de existência de outros locos de efeito secundário. Entretanto, devido às limitações da caracterização fenotípica, apenas quatro diferentes classes fenotípicas, é pouco provável que se consiga detectar esses locos. Para tal, as avaliações fenotípicas deveriam ser baseadas em tamanho de lesão, número de urediniosporos por pústula, ou outros

caracteres que convergem para a distribuição normal. Isso deve permitir que pequenas diferenças fenotípicas sejam detectadas entre plantas resistentes ou suscetíveis e o mapeamento de QTLs de efeito secundário para resistência à ferrugem.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas AC, Zauza EAV, Maffia RG & Assis TF (2004) Clonagem e Doenças do Eucalipto. 1ª Edição. Viçosa MG. Editora UFV. 442p.
- Barcellos AL, Moraes-Fernandes MIB, Roelfs AP (1997) Ferrugem da folha do trigo (*Puccinia recondita*): durabilidade da resistência. Summa Phytopatol 23:101–117.
- Bhoora R, Berger DK, M.J. Wingfield MJ & Wingfield BD (2003) PCR cloning by genome walking of a complete polygalacturonase-inhibiting protein gene from *Eucalyptus grandis*. S. Afr. J. Sci. 99(9–10): 410–412.
- Brondani RPV & Grattapaglia D (2001) Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. Biotechniques 31:793-795.
- Brondani RPV, Brondani C & Grattapaglia D (2002) Towards the construction of a genus wide reference linkage map for *Eucalyptus* based on microsatellite markers. Molecular and General Genomics 267:338-347.
- Brondani RPV, Brondani C, Tarchini R & Grattapaglia D (1998) Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. Theor. Appl. Genet. 97:816-827.
- Brondani RPV, Williams ER, Brondani C & Grattapaglia D (2006) A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. BMC Plant Biology 6:20.
- Bueno NW, Junghans DT, Alfenas AC, Brommonschenkel SH & Grattapaglia D (2004) Localized mapping of the *Puccinia psidii* resistance (Ppr1) locus in *Eucalyptus* with microsatellite markers. Proceedings, 50º Congresso Brasileiro de Genética. GP217.
- Byrne M & Marquez-Garcia M (1996) Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. Australian Journal of Botany 44:331-341.
- Cervera MT, Gusmão J, Steenackers M, Peleman J, Storme V, Vanden Broeck A, Van Montagu M, Boerjan W (1996) Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. Theor Appl Genet 93:733–737.

- Chimwamurombe PM, Botha AM, Wingfield MJ & Wingfield BD (2001) Molecular relatedness of the polygalacturonase-inhibiting protein genes in *Eucalyptus* species. *Theor. Appl. Genet.* 102: 645–650.
- Cruz CD (2008) GQMOL: Programa para análise de genética quantitativa molecular. Versão 2004.2.1. Desenvolvido pelo setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm.
- CSIRO: <http://www.ffp.csiro.au/tigr/molecular/eucmsps.html>. 2000.
- Dangl JL, Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-33.
- Fulker DW & Cardon LR (1994) A sib-pair approach to interval mapping of quantitative trait loci. *Am J Hum Genet* 54:1092-1103.
- Garcia A, Calvo ES, Kiihl RAS, Harada A, Hiromoto DM and Vieira LGE (2008) Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. *Theor Appl Genet* doi:10.1007/s00122-008-0798-z.
- Grattapaglia D & Sederoff RR (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers, *Genetics* 137:1121-1137.
- Hammond-Kosack KE, Parker JE (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 177-193.
- Jones JDG & Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444 doi:10.1038/nature05286.
- Junghans DT, Alfenas AC & Maffia LA (2003b) Escala de Notas para a quantificação da ferrugem do eucalipto. *Fitopatologia Brasileira* 25:382-390.
- Junghans DT, Alfenas AC, Brommonschenkel SH, Oda S, Mello EJ & Grattapaglia D (2003a) Resistance to Rust (*Puccinia psidii*) in *Eucalyptus*: Mode of Inheritance and mapping of major gene with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 108:175–180.
- Kumar S & Garrick J (2001) Genetic response to within-family selection using molecular markers in some radiata pine breeding schemes. *Can. J. For. Res.* 31: 779-785.
- Lander ES & Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- McIntosh RA & Brown GN (1997) Anticipatory breeding for resistance to rust diseases in wheat. *Annu Rev Phytopathol* 35:311–326
- Moon DH, Salvatierra GR, Caldas DGG, Carvalho MCCG, Carneiro RT, Franceschini LM, Oda S & Labate CA (2007) Comparison of the expression profiles of susceptible and resistant *Eucalyptus grandis* exposed to *Puccinia psidii* Winter using SAGE Functional Plant Biology 34:1010–1018.

- O'malley DM & Mckeand SE (1994) Marker assisted selection for breeding value in forest trees. *For. Genet.* 1: 204-218.
- Ottewell KM, Donnellan SC, Moran GF & Paton DC (2005) Multiplexed microsatellite markers for genetic analysis of *Eucalyptus leucoxylon* (Myrtaceae) and their utility for ecological and breeding studies in other *Eucalyptus* species. *Journal of Heredity* 96:445-451.
- Pinon J, Van Dam BC, Genetet I & de Kam M (1987) Two pathogenic races of *Melampsora larici-populina* in North Western Europe. *Eur J For Pathol* 17:47-53.
- Plomion C, Durel CE and Verhaegen D (1996) Marker-assisted selection in forest tree breeding programs as illustrated by two examples: maritime pine and eucalyptus. *Ann. Sci. For.* 53: 819-848.
- Ruiz RAR, Alfenas AC, Ferreira FA & Ribeiro Do Vale FXR (1989) Influência da temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. *Fitopatologia. Brasileira.* 14: 55-61.
- Spelman R & Bovenhuis H (1998) Genetic response from marker assisted selection in an outbred population for differing marker bracket sizes and with two identified quantitative trait loci. *Genetics* 148: 1389-1396.
- Steane DA, Jones RC & Vaillancourt RE (2005) A set of chloroplast microsatellites primers for *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Mol. Ecol. Notes.* 5:538-541.
- Steane DA, Vaillancourt RE, Russell J, Powell W, Marshall D & Potts BM (2001) Development and characterization of microsatellites in *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Silvae Genetica* 50:89-91.
- Steenackers M, Steenackers V & Delporte T (1994) A new physiological race of *Melampsora populina* on Belgium. *Proc Int Poplar Commission and FAO, Working Group on Disease, FAO, Rome.*
- Wilcox PL, Amerson HV, Kuhlman EG, Liu BH, O'Malley DM, Sederoff RR (1996) Detection of a major gene for resistance to fusiform rust disease in loblolly pine by genomic mapping. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3859-3864
- Williams C G & Neale D B (1992) Conifer wood quality and marker-aided selection – A case study. *Can. J. For. Res.* 22: 1009-1017.
- Xavier AA (2002) Histopatologia da Interação *Puccinia psidii* e virulência de isolados do patógeno em espécies de Myrtaceae. Tese de Doutorado em Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa.

CONCLUSÕES GERAIS

- Os padrões de segregação obtidos nas dez famílias interespecíficas de *Eucalyptus* spp. podem ser explicados com base em dois genes independentes.
- Os padrões de segregação em progênies interespecíficas de *Eucalyptus* spp. são determinados pela ocorrência de epistasia resseciva dupla.
- A resistência à ferrugem em cruzamentos interespecíficos de *Eucalyptus* é controlada por um único gene/QTL de efeito principal.
- A expressão da resistência é condicionada ao background genético (ocorrência epistasia em alguns cruzamentos).
- Detectou-se um QTL de efeito principal envolvido resistência à ferrugem e mapeou-se o gene de resistência à ferrugem no grupo de ligação 3 *Eucalyptus* spp.
- A identificação de um QTL de efeito principal para a resistência à ferrugem não exclui a possibilidade de existência de outros locos de efeito secundário.
- Não se pode excluir a possibilidade de que o gene de resistência mapeado na família (DxG2)x(UxGL) seja alélico a *Ppr1*, no entanto, sugere-se que o loco mapeado nesta família seja designado como *Ppr2*.