

TALYTA GALAFASSI ZARPELON

**MAPEAMENTO GENÉTICO DA RESISTÊNCIA E A INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO
MINERAL NA INTENSIDADE DA MANCHA-DE-PTERIDIS EM EUCALIPTO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

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

T

Z38m
2011

Zarpelon, Talyta Galafassi, 1978-

Mapeamento genético da resistência e a influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-pteridis em eucalipto / Talyta Galafassi Zarpelon. – Viçosa, MG, 2011. viii, 58f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Mancha-de-folhas. 2. *Cylindrocladium sp.* - Controle.
3. Eucalipto - Resistência a *Cylindrocladium sp.*
4. Fertilidade do solo. 5. Eucalipto - Nutrição. 6. Eucalipto - Doenças e pragas - Controle. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 632.46

TALYTA GALAFASSI ZARPELON

**MAPEAMENTO GENÉTICO DA RESISTÊNCIA E A INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO
MINERAL NA INTENSIDADE DA MANCHA-DE-PTERIDIS EM EUCALIPTO**

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

APROVADA: 24 de fevereiro de 2011.

Prof. Nairam Félix de Barros
(Co-Orientador)

Prof. Luiz Antônio Maffia

Pesq. Lúcio Mauro da Silva Guimarães

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

Aos meus pais, José Maria Zarpelon e Maria Claudete Galafassi Zarpelon

Ao Marcelo Magalhães Coutinho

Dedido

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela Fé, Esperança e pelo Amor, por permitir a conclusão de mais esta etapa da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de realização dos cursos de graduação e pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Doutorado e pelo aporte de recursos para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro a congressos, durante o período de Mestrado e para a realização deste trabalho.

À EMBRAPA/Cenargen por disponibilizar equipamentos e laboratórios para a execução de parte dos experimentos desta tese.

À JARI pelo financiamento parcial e por disponibilizar e propagar o material vegetal utilizado nos experimentos.

A Suzano Papel e Celulose S/A por disponibilizar e propagar o material vegetal utilizado nos experimentos, em nome dos engenheiros Shinitiro Oda e o Dr. Edival Zauza.

Ao Prof. Acelino Couto Alfenas, pela amizade, orientação, confiança, pelos ensinamentos, pelo apoio na execução deste trabalho, pelas oportunidades e pelos incentivos durante a minha vida acadêmica na UFV.

Ao Dr. Dario Grattapaglia, pelo apoio, pelas sugestões e por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A Dra. Danielle Faria pela confiança, atenção e pelos ensinamentos sobre métodos e marcadores moleculares, empregados neste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Lúcio Guimarães, Prof. Luiz Maffia, Prof. Silvaldo e Prof. José Rogério, que contribuíram significativamente para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Maffia, pelo entusiasmo e incentivo em toda a pós-graduação e pela disponibilidade em ensinar.

Ao Dr. Lúcio Guimarães, pela paciência e pelas sugestões enriquecedoras deste trabalho.

Ao Prof. Nairam Félix de Barros, pela paciência, serenidade e pelo apoio e incentivo à pesquisa e por disponibilizar o solo utilizado no experimento de nutrição mineral.

Ao Prof. Victor Hugo, pela ajuda na determinação dos tratamentos.

Ao André, pela amizade e pelo valioso auxílio nas análises estatísticas e interpretações dos resultados.

À Márcia Maria Brandão, pelo convívio, pela paciência e dedicação em todos os momentos.

Aos amigos Bruna, Carol, Cesar, Dione, André, Ediene, Rodrigo, Vânia, e Taísa, em especial a Tati, Bruno e Marília, pelos agradáveis momentos vividos em Brasília e pelos ensinamentos de vida.

Ao Leo Bheringer, pela amizade e companhia em Brasília.

Aos estudantes de iniciação científica, Braz, Bruno, Camila Freitas, Ramon e Rodrigo Galvão, pela ajuda nas montagens e avaliações dos experimentos que foram decisivos para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Patomol, Camila, Carla, Cristina, Daniele, Denise, João Paulo, Leonardo, Marcela, Marisângela, Natália, Nicolle, Patrícia, Pedro, Rafael, Rodrigo, Thaísa e Vitor pela agradável convivência e pelo constante aprendizado.

À Renata Resende, pela amizade e por compartilhar as dúvidas e anseios da vida de “doutorandas”.

Ao Alexandre Alonso pela amizade, pelo aprendizado nos trabalhos de diagnose e pelas sugestões valiosas na conclusão deste trabalho.

À Ivanete, Luciana e ao Adilson pelo carinhoso convívio e, especialmente, à pequena Stella por trazer momentos de intensa alegria às nossas vidas.

Ao Marcelo, pelo amor, respeito, companheirismo, pela ajuda nas montagens e avaliações dos experimentos e pelo apoio emocional no *sprint* final de cada etapa deste doutorado.

Aos meus pais José Maria e Claudete, pelo infinito amor e carinho, pela dedicação, por me ensinarem a ter respeito ao próximo e por não pouparem esforços na minha formação profissional e pessoal.

Ao meu irmão Tiago e à minha cunhada Marina, pelos momentos de alegria e carinho.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e do Patomol, Alex, Délio, Eneir, Eduardo, Nunes, Ricardo, Renildo, Rita, Sara, Seu João, Seu Mário, Seu Sebastião e, especialmente à Mara pela amizade e valiosa colaboração durante o período da pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

TALYTA GALAFASSI ZARPELON, filha de José Maria Zarpelon e Maria Claudete Galafassi Zarpelon, nasceu em 18 de maio de 1978, em Cornélio Procópio, Estado do Paraná.

Em 1999, iniciou o Curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), quando foi bolsista de Iniciação Científica no Departamento de Fitopatologia, sob a orientação do Professor Acelino Couto Alfenas.

Em fevereiro de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na mesma Universidade, sob a orientação do Professor Acelino Couto Alfenas, concluindo sua dissertação intitulada “Caracterização de rizobactérias e eficiência do *Rizolyptus*[®] no enraizamento e crescimento de eucalipto”, em março de 2007.

Em abril de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado em Fitopatologia da UFV, sob a orientação do Professor Acelino Couto, submetendo-se à defesa da tese em fevereiro de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
ARTIGO 1	7
QTL associado à resistência à desfolha (<i>Cylindrocladium pteridis</i>) em <i>Eucalyptus</i> spp.	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ARTIGO 2	36
Nutrição mineral e progresso da mancha-de-pteridis do eucalipto causada por <i>Cylindrocladium pteridis</i>	36
RESUMO	37
ABSTRACT	38
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CONCLUSÕES GERAIS.....	58

RESUMO

ZARPELON, Talyta Galafassi, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Mapeamento genético da resistência e a influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-pteridis em eucalipto.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Co-Orientadores: Nairam Félix de Barros e Poliane Alfenas-Zerbini.

A mancha-de-pteridis, causada por *Cylindrocladium pteridis*, induz manchas foliares pequenas e intensa desfolha em plantios de eucalipto, em regiões quentes e úmidas. Para compreendermos melhor a influência de aspectos genéticos e nutricionais sobre a doença, objetivou-se: (i) avaliar a resistência em cinco famílias oriundas de cruzamentos controlados interespecíficos de *Eucalyptus* spp., visando ao mapeamento genético e a detecção dos QTLs (Quantitative Trait Loci) em uma das famílias de irmãos completos; (ii) validar marcadores microssatélites próximos aos QTLs que controlam a resistência à desfolha e (iii) determinar os efeitos das doses de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) na intensidade da mancha-de-pteridis. No primeiro estudo, detectou-se cinco QTLs, Rd-1, Rd-2, Rd-3, Rd-4 e Rd-5, na família de *Eucalyptus urophylla* (EU11) x *E. camaldulensis* (EC06), que explicaram, respectivamente, 22, 15, 16, 17 e 49 % da resistência à desfolha. Três QTLs no genitor EU11, Rd-1 e Rd-2 localizados no grupo de ligação (LG) 1, e Rd-4 localizado no LG6; e dois QTLs no mapa do genitor EC06, presentes nos LG2 (Rd-3) e LG8 (Rd-5). Marcadores ligados ao QTL Rd-2 foram validados em duas famílias não relacionadas pela análise de regressão linear simples. No segundo estudo, determinou-se, o efeito de doses de N, P e K na área foliar lesionada (AFL) e na desfolha (D). Para a D ajustou-se uma equação linear e para a AFL uma equação quadrática, em relação à adubação testada. O efeito do fósforo (P) na intensidade da doença não foi definido claramente, provavelmente devido à baixa absorção do elemento pela planta. Altas doses de K reduziram significativamente a D e a AFL. Detectou-se sinergismo entre N e K, em que maiores doses de K relacionadas com menores doses de N resultaram em menor D e AFL. O manejo da adubação, principalmente da potássica, de forma adequada e equilibrada em plantios clonais de eucalipto podem minimizar as perdas em volume de madeira devido a desfolhas consecutivas causadas por *C. pteridis*.

ABSTRACT

ZARPELON, Talyta Galafassi, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Genetic mapping of resistance and the influence of mineral nutrition on intensity of blight-to-pteridis on eucalyptus.** Advisor: Acelino Couto Alfenas. Co-advisors: Nairam Félix de Barros and Poliane Alfenas-Zerbini.

Cylindrocladium pteridis induces leaf blight and severe defoliation in plantations of eucalyptus in hot and humid regions. To better understand the influence of genetic and nutritional aspects of the disease, objective to: (i) evaluate the strength of five families from interspecific controlled crosses of *Eucalyptus* spp., aimed at mapping and QTL (Quantitative Trait Loci) detection in a full-sib family, (ii) to validate microsatellite markers close to QTLs that control resistance to defoliation and (iii) determine the effects of nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K) in the intensity of blight-to-pteridis. In the first study, there were five QTLs, Rd-1 Rd-2, Rd-3, Rd-4, Rd-5, the family of *Eucalyptus urophylla* (EU11) x *E. camaldulensis* (EC06), which explained, respectively 22, 15, 16, 17 and 49 % resistance to defoliation. Three QTLs were detected in the parental EU11, Rd-1 and Rd-2 located on linkage group (LG) 1 and Rd-4 located on LG6; and two QTLs located on the map of the parental EC06, present in LG2 (Rd-3) and LG8 (Rd-5). Markers linked to QTL Rd-2 were validated in two unrelated families by simple linear regression analysis. In the second study, we determined also the effect of N, P and K in diseased leaf area (DFA) and defoliation (D) caused by the disease. For the D was adjusted a linear equation and the DFA a quadratic equation. The effect of phosphorus (P) in the intensity of the disease was not clearly defined, probably due to poor absorption by the plant element. High doses of K and D significantly reduced the DFA. Synergism was detected between N and K, wherein K higher doses of related lower N rates resulted in lower D and DFA. The fertilizer management, mainly potassium, in a proper and balanced clonal eucalyptus can minimize losses in timber volume due to consecutive defoliation caused by *C. pteridis*.

INTRODUÇÃO GERAL

Diversas espécies do gênero *Cylindrocladium* foram relatadas como importantes patógenos em culturas florestais, agronômicas e em plantas ornamentais (Crous 2002), causando danos econômicos principalmente em culturas como amendoim, coco, pinus e eucalipto (Crous et al. 1991; Crous et al. 1993; Cedeño & Carrero 2000; Poltronieri et al. 2003; Lombard et al. 2009). Em eucalipto, *Cylindrocladium* spp. incide sobre miniestacas, nas fases da propagação clonal, e, no campo, em plantios clonais a partir de seis meses até a idade de corte, causando acentuadas perdas na produção de mudas e no crescimento volumétrico (Ferreira 1989; Alfenas et al. 2009). Dentre as espécies de *Cylindrocladium*, *C. pteridis* F.A. Wolf é comumente encontrada em viveiros e em plantios de eucalipto no campo, sendo considerado um dos principais patógenos da eucaliptocultura em regiões de clima quente e úmido (Ferreira 1989; Ferreira & Milani 2002; Alfenas et al. 2009).

No Brasil, *C. pteridis* foi relatado pela primeira vez em eucalipto, causando intensa desfolha em plantios clonais de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, com um ano de idade (Ferreira et al. 1995). As condições favoráveis à infecção de *C. pteridis* são altas temperaturas e períodos prolongados de chuva (Alfenas et al. 2009). A mancha-de-pteridis é observada, principalmente, em procedências de *E. camaldulensis* Dehnh., *E. cloeziana* F. Muell., *E. grandis*, *E. saligna* Smith, *E. tereticornis* Smith, *E. urophylla* S.T. Blake e híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, entre outros (Alfenas et al. 2009). Desta forma, em decorrência dos aspectos climáticos e da presença de hospedeiros suscetíveis em todo o território, esta doença encontra-se amplamente distribuída no Brasil. Em condições de campo, *C. pteridis* incita lesões foliares inicialmente pequenas e arredondadas de coloração cinza clara, progredindo para manchas que coalescem e se tornam de coloração marrom clara, podendo ocupar todo o limbo foliar, o que resulta em intensa desfolha dos genótipos suscetíveis (Ferreira et al. 1995). Além da redução da área foliar e, conseqüentemente, do crescimento volumétrico, a desfolha permite maior entrada de luz no sub-bosque, o que favorece o crescimento de plantas invasoras, expondo as árvores aos efeitos de matocompetição (Alfenas et al. 2009).

Dentre os princípios de controle, que podem ser adotados no campo para redução da mancha-de-pteridis estão à imunização e a regulação (Alfenas et al. 2009). No que se

refere à resistência genética, a ampla variabilidade genética inter e intraespecífica quanto à resistência à mancha foliar e a desfolha, causada por *C. pteridis*, possibilita a seleção e o plantio clonal de genótipos resistentes (Alfenas et al. 2009). Entretanto, além da seleção de genótipos resistentes, é essencial conhecer a base genética da resistência e a variabilidade na população do patógeno a fim de embasar os programas de melhoramento genético e prever a estabilidade da resistência. O mapeamento de regiões genômicas e, ou, a identificação de marcadores moleculares ligados a genes que conferem resistência pode auxiliar na seleção precoce de materiais promissores e no entendimento dos mecanismos de resistência. Em um dos primeiros estudos sobre a base genética da resistência, mapeou-se em uma família de irmãos completos de *E. grandis*, um gene de efeito principal, denominado *Ppr1* (*Puccinia psidii* resistance 1), que confere resistência à ferrugem do eucalipto (Junghans et al. 2003). Este gene determina a primeira forma geneticamente conhecida de resistência a uma doença em eucalipto. Atualmente, avanços na área genômica, associados à redução dos custos de tecnologias de genotipagem, clonagem e sequenciamento de DNA, têm favorecido a aplicação de técnicas moleculares ao melhoramento genético do eucalipto (Grattapaglia 2004, 2007; Poke et al. 2005). Diversos mapas de ligação cobrindo quase a totalidade do genoma foram construídos para eucalipto (Grattapaglia & Sederoff 1994; Thamarus et al. 2002; Brondani et al. 2006) e QTLs (Quantitative Trait Loci) para características de interesse foram mapeados em alguns desses mapas (Grattapaglia et al. 1995; Grattapaglia et al. 1996; Thamarus et al. 2002; Junghans et al. 2003; Thamarus et al. 2004). O mapeamento de algumas regiões que conferem resistência a doenças também foram relatadas, como o gene *Ppr1*, posicionado no grupo de ligação 3 e flanqueado pelos marcadores EMBRA125 e EMBRA1071 (Mamani et al. 2010) e dois QTLs que conferem resistência a *Teratosphaeria* spp. em eucalipto, sob infecção natural (Freeman et al. 2008).

A constituição genética, o ambiente e suas interações podem influenciar diretamente na expressão da resistência à mancha foliar e a desfolha, causada por *C. pteridis* em *Eucalyptus*. Assim, além de se estudar a herança da resistência, outro importante aspecto é o da nutrição mineral das plantas que se enquadra no princípio de controle da regulação, e que por ser manipulável pode aumentar ou reduzir a resistência das plantas a doenças (Marschner 1995; Zambolim & Ventura 1993). Diversos trabalhos foram desenvolvidos para avaliar os efeitos de nutrientes em vários patossistemas, mas o seu modo de ação geralmente não é totalmente esclarecido (Biggs et al. 1997; Long et

al. 2000). Atualmente, tem-se demonstrado mais claramente a atuação dos nutrientes na expressão dos genes de defesa da planta e na patogenicidade do patógeno (Ros et al. 2008; Snoeijers et al. 2000). Entretanto, estudos que relacionam nutrição mineral e doenças do eucalipto são escassos. Um trabalho pioneiro com o patossistema eucalipto-*Xanthomonas axonopodis* demonstrou que a intensidade da bacteriose foi reduzida com o aumento dos teores de potássio nos tecidos das plantas e que teores intermediários a altos de nitrogênio aumentaram a suscetibilidade das plantas à bacteriose (Silva et al. 2005; Silva 2007).

O conhecimento sobre a natureza da resistência da interação eucalipto-*C. pteridis* e dos níveis adequados de nutrição mineral que influenciam a resistência das plantas é fundamental para embasar as estratégias de controle da doença. Desta forma, neste trabalho objetivou-se: (i) realizar a fenotipagem de cinco famílias provenientes de cruzamentos interespecíficos de *Eucalyptus* spp., visando ao mapeamento genético e a detecção de QTLs em uma família de irmãos completos e a validação dos marcadores microssatélites ligados aos QTLs que controlam a resistência à desfolha em eucalipto e (ii) avaliar os efeitos de diferentes doses de nitrogênio, fósforo e potássio na resistência do eucalipto à doença. O trabalho foi dividido em dois artigos, sendo o primeiro intitulado: “QTL associado à resistência à desfolha (*Cylindrocladium pteridis*) em *Eucalyptus* spp.”, e o segundo “Nutrição mineral e progresso da mancha-de-pteridis do eucalipto causada por *Cylindrocladium pteridis*”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2009) Clonagem e doenças do eucalipto. 2ªed. Editora UFV, Viçosa-MG. 500p.
- Biggs AR, El-Kholi MM, El-Neshawy S, Nickerson R (1997) Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. Plant Disease 81:399-403.
- Brondani RP, 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 Biol 6:20.
- Cedeño L, Carrero C (2000) *Cylindrocladium pteridis* causando manchas foliares en eucaliptos de Portuguesa-Venezuela. Revista Forest Venezuela 44:101-106.
- Crous PW (2002) Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium (Calonectria)* and allied genera. American Phytopathological Society, Minnesota. 278p.
- Crous PW, Phillips AJL, Wingfield MJ (1991) The genera *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella* with reference to forestry nurseries in South Africa. South African Forestry Journal 157:69-85.
- Crous PW, Phillips AJL, Wingfield MJ (1993) New records of *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella* spp. in South Africa. Plant Pathology 42:302-305.
- Ferreira FA (1989) Patologia Florestal: Principais doenças florestais no Brasil. SIF, Viçosa-MG. 570p.
- Ferreira FA, Alfenas AC, Moreira AM, Demuner NL (1995) Mancha-de-pteridis doença foliar de eucalipto em áreas tropicais brasileiras. Fitopatologia Brasileira 20:107-110.
- Ferreira FA, Milani D (2002) Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. International Paper, Mogi Guaçu-SP. 98p.
- Freeman JS, Potts BM, Vaillancourt RE (2008) Few Mendelian genes underlie the quantitative response of a forest tree, *Eucalyptus globulus*, to a natural fungal epidemic. Genetics 178 (1):563-571.
- Grattapaglia D, Sederoff R (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. Genetics 137 (4):1121-1137.
- Grattapaglia D, Bertolucci FL, Sederoff RR (1995) Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. Theor Appl Genet 90:933-947.

- Grattapaglia D, Bertolucci FL, Penchel R, Sederoff RR (1996) Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers. *Genetics* 144 (3):1205-1214.
- Grattapaglia D (2004) Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. *Genet Mol Res* 3 (3):369-379.
- Grattapaglia D (2007) Marcadores moleculares: aplicações operacionais no melhoramento de *Eucalyptus*. In: Borém A (ed) *Biotecnologia Florestal*. Editora UFV, Viçosa-MG, 482p.
- Junghans DT, Alfenas AC, Brommonschenkel SH, Oda S, Mello EJ, Grattapaglia D (2003) Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in eucalyptus: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 108 (1):175-180.
- Lombard L, Rodas CA, Crous PW, Wingfield BD, Wingfield MJ (2009) *Calonectria* (*Cylindrocladium*) species associated with dying *Pinus* cuttings. *Persoonia* 23:41-47.
- Long DH, Lee FN, TeBeest DO (2000) Effect of nitrogen fertilization on disease progress of rice blast on susceptible and resistant cultivars. *Plant Disease* 84:403-409.
- Mamani EMC, Bueno NW, Faria DA, Guimarães LMS, Lau D, Alfenas AC, Grattapaglia D (2010) Positioning of the major locus for *Puccinia psidii* rust resistance (*Ppr1*) on the *Eucalyptus* reference map and its validation across unrelated pedigrees. *Tree Genetics & Genomes*. 6 (6):953-962.
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2° ed. Academic Press, San Diego, CA, USA. 902p.
- Poke FS, Vaillancourt RE, Potts BM, Reid JB (2005) Genomic research in *Eucalyptus*. *Genetica* 125 (1):79-101.
- Poltronieri LS, Trindade DR, Alfenas AC, Albuquerque FC, Carvalho JEU (2003) Podridão peduncular de coco causada por *Cylindrocladium floridanum* no estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira* 28 (1):106.
- Ros B, Mohler V, Wenzel G, Thummler F (2008) *Phytophthora infestans*-triggered response of growth- and defense-related genes in potato cultivars with different levels of resistance under the influence of nitrogen availability. *Physiol Plant* 133 (2):386-396.
- Silva AG, Alfenas AC, Barros NF, Sartório RC, Fonseca S (2005) Influência de nutrientes e de Aminon-25 na severidade da mancha foliar de eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis*. In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Brasília. Anais do XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Sociedade Brasileira de Fitopatologia, pp. s7-s425.
- Silva AG (2007) Histologia e influência de nutrientes na intensidade da bacteriose foliar do eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis*. Departamento de Fitopatologia. 58p.

- Snoeiijers SS, Pérez-García A, Joosten MHAJ, De Wit PJGM (2000) The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 106:493–506.
- 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 (2-3):379-387.
- 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.
- Zambolim L, Ventura JA (1993) Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas. *Revisão anual de patologia de plantas* 1:275-318.

ARTIGO 1

QTL associado à resistência à desfolha (*Cylindrocladium pteridis*) em *Eucalyptus* spp.

RESUMO

A mancha-de-pteridis e a desfolha, causada por *Cylindrocladium pteridis*, é uma das principais doenças foliares do eucalipto em regiões com altas temperaturas, períodos prolongados de chuva e na presença de hospedeiros suscetíveis. A variabilidade inter e intraespecífica na intensidade da desfolha indicam que o controle pode ser realizado com o plantio de materiais resistentes. De modo a orientar os programas de melhoramento genético e predizer a estabilidade da resistência é fundamental conhecer o controle genético da resistência do eucalipto a mancha-de-pteridis. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram o de construir os mapas genéticos da família *Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis* (EU11 x EC06), mapear e posicionar QTLs (Quantitative Trait Loci) relacionados à resistência a desfolha e validar os marcadores microssatélites associados aos QTLs em quatro famílias não relacionadas envolvendo diferentes espécies de *Eucalyptus*. A desfolha foi avaliada nos ramos do terço basal das plantas inoculadas em condições controladas. Foram detectados cinco QTLs para à resistência à desfolha (Rd), sendo três no mapa do genitor EU11, Rd-1 e Rd-2 localizados no grupo de ligação (LG) 1 e Rd-4 localizado no LG6; e dois QTLs no mapa do genitor EC06, presentes nos LG2 (Rd-3) e LG8 (Rd-5). Marcadores ligados ao QTL Rd-2 foram validados em duas famílias não relacionadas pela análise de regressão linear simples. Este é o primeiro mapeamento de regiões genômicas associadas à resistência a desfolha, causada por *C. pteridis*, em *Eucalyptus*.

Palavras-chave: Mancha foliar; mapa genético; marcadores microssatélites

ABSTRACT

Leaf blight and defoliation caused by *Cylindrocladium pteridis* is one of the main leaf diseases found in Brazilian eucalypt plantations in warm and high rainfall regions. The inter and intraspecific variability in the intensity of defoliation indicate that your control can be achieved by planting resistant genotypes. In order to guide breeding programs and to predict the stability of resistance is essential to understand the genetic control of resistance in eucalypts to defoliation. Thus, the objectives of this paper were to map QTLs (Quantitative Trait Loci) associated with resistance to defoliation in a *Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis* (EU11 x EC06) family and validate microsatellite markers linked to QTLs in four unrelated pedigrees involving different *Eucalyptus* species. Defoliation was evaluated on the branches of the lower third of the plants inoculated under controlled conditions. We identified five QTLs for resistance to defoliation (Rd), three on the map of the parental EU11, Rd-1 and Rd-2 located on linkage group (LG) 1 and Rd-4 located on LG6; and two QTLs located on the map of the parental EC06, present in LG2 (Rd-3) and LG8 (Rd-5). Markers linked to QTL Rd-2 were validated in two unrelated families by simple linear regression analysis. This is the first genomic map of QTLs associated with resistance to defoliation caused by *C. pteridis* in *Eucalyptus*.

Keywords: Leaf blight, genetic mapping, microsatellite markers

INTRODUÇÃO

A mancha-de-pteridis (Ferreira et al. 1995), causada por *Cylindrocladium pteridis*, é uma das principais doenças do eucalipto em regiões de clima quente, períodos prolongados de chuva e na presença de hospedeiros suscetíveis (Alfenas et al. 2009). Em plantios clonais de eucalipto, o patógeno incide em plantas a partir de seis meses até a idade de corte (Ferreira 1989; Alfenas et al. 2009). A mancha-de-pteridis causa redução da área foliar e do crescimento volumétrico, e a desfolha permite maior entrada de luz no sub-bosque, o que favorece o crescimento de plantas invasoras, expondo as árvores aos efeitos da matocompetição (Alfenas et al. 2009).

Em decorrência da variabilidade inter e intraespecífica observada em plantios seminais e clonais, quanto à resistência à mancha-de-pteridis em eucalipto, a seleção de genótipos resistentes pode ser adotada como estratégia de controle na redução das perdas causadas pela doença (Alfenas et al. 2009). Para a seleção de plantas resistentes, é essencial aperfeiçoar os protocolos de inoculação, conhecer as condições ótimas para o desenvolvimento da doença, a biologia do patógeno e os estádios fenológicos do hospedeiro, mais suscetíveis à infecção, para embasar a escolha dos componentes de resistência. Estudos recentes têm preenchido algumas destas lacunas com bastante sucesso (Graça et al. 2009; Guimarães et al. 2010) possibilitando a seleção de clones resistentes à mancha-de-pteridis em inoculações sob condições controladas. Entretanto, para que o controle de doenças via resistência genética tenha sustentabilidade, além da seleção de genótipos resistentes, é essencial conhecer o controle genético da resistência. Desta forma, esse conhecimento torna-se fundamental para que seja realizada a seleção precoce de genótipos resistentes à desfolha.

O mapeamento de regiões genômicas (QTLs - Quantitative Trait Loci) que conferem resistência a doenças pode auxiliar no entendimento do modelo de herança da resistência à mancha-de-pteridis, em eucalipto. Este tipo de estudo possibilita também a identificação de marcadores moleculares ligados a QTLs/genes que conferem resistência, podendo, auxiliar na seleção precoce de genótipos promissores e no entendimento dos mecanismos de resistência. Diversos mapas de ligação que cobrem quase a totalidade do genoma foram construídos para diversas espécies de *Eucalyptus* (Grattapaglia & Sederoff 1994; Thamarus et al. 2002; Brondani et al. 2006) e a partir

desses mapas foram detectados QTLs para características de interesse (Grattapaglia et al. 1995; Grattapaglia et al. 1996; Thamarus et al. 2002; Junghans et al. 2003; Thamarus et al. 2004). No entanto, os trabalhos sobre a base genética da resistência as doenças em *Eucalyptus* se restringem a patógenos, como *Puccinia psidii* e *Terathosphaeria* spp. (Junghans et al. 2003; Freeman et al. 2008; Rosado et al. 2010; Mamani et al. 2010; Rosado etl al., 2011; Alves et al. 2012).

De forma a suprir a falta de trabalhos desenvolvidos para a detecção de regiões e, ou genes relacionados à resistência a doenças, e devido à importância da mancha-de-pteridis em plantios clonais de eucalipto, esse trabalho teve como objetivos: (i) construir os mapas genéticos utilizando a estratégia de mapeamento por “pseudo-testcross” (Grattapaglia & Sederoff 1994) para os genitores da família *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake x *E. camaldulensis* Dehnh. (EU11 x EC06); (ii) detectar QTLs para resistência à desfolha, na família de irmãos completos EU11 x EC06, utilizando marcadores microssatélites e (iii) confirmar a presença e a posição dos QTLs encontrados por meio da validação dos marcadores microssatélites em quatro famílias.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Empregou-se uma família de irmãos completos, constituída por 89 indivíduos (n) derivados de um cruzamento entre *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake x *E. camaldulensis* Dehnh (EU11 x EC06). A validação dos QTLs encontrados foi realizada em quatro famílias, não relacionadas com a família de detecção, e que segregavam quanto à resistência à desfolha. Duas famílias de validação parcialmente relacionadas, com o genitor materno em comum: (i) 9882 x 6021 (*E. grandis* Hill ex Maiden x *E. urophylla*) x (*E. grandis*) n=33 e (ii) 9882 x 869 (*E. grandis* x *E. urophylla*) x (*E. urophylla*) n=56; e duas independentes: (iii) G26 x G27 (*E. grandis*) n=17 e (iv) (DxG) x (UxGL) (*E. dunnii* Maiden x *E. grandis*) x (*E. urophylla* x *E. globulus* Labill) n=55.

Para a avaliação da desfolha empregaram-se cinco réplicas de cada indivíduo da progênie, com a exceção da família (DxG) x (UxGL), na qual foram utilizadas quatro réplicas por indivíduo. Plantas dos clones 6021 (*E. grandis*, híbrido de Rio Claro) e 9882 (*E. grandis* x *E. urophylla*) foram utilizadas, respectivamente, como comparadores resistente e suscetível nas inoculações da família EU11 x EC06. As mudas clonais de todas as progênies foram transplantadas para vasos de 6 L de capacidade contendo uma mistura de solo:areia:esterco (3:1:1), complementado com 4 g.dm⁻³ de NPK (6:30:6) e mantidas em casa de vegetação. Adubações quinzenais de 100 mL/vaso a 8,0 g.L⁻¹ do fertilizante Ouro Verde® (15 % N, 15 % P₂O₅, 20 % K₂O) foram realizadas até idade e altura ideal para inoculação.

Inóculo

Utilizou-se o isolado monoconidial LPF59, de *C. pteridis*, obtido de amostras de folhas lesionadas coletadas em Monte Dourado, no Pará, local que apresenta condições de temperatura e umidade favoráveis à infecção do patógeno. Além disso, ensaios demonstraram que este isolado era patogênico e esporulante, características fundamentais para a sua utilização nas inoculações artificiais. O isolado encontra-se armazenado, na micoteca do Laboratório de Patologia Florestal, DFP/BIOAGRO (UFV), pelo método de Castelani. O inóculo foi preparado conforme descrito por Graça et al. (2009). Para isso, discos de cultivo da cultura original de *C. pteridis* foram semeados em

placas de Petri contendo meio de aveia-dextrose-ágar (AVDA). As placas foram mantidas a 28° C, sob fotoperíodo de 12 h e 20 $\mu\text{mol photons s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ de intensidade de luz, por 20 dias, até que o fungo colonizasse toda a superfície do meio de cultura. Após este período, visando estimular a produção de conídios, as culturas do fungo foram submetidas a estresse físico, por meio de deposição de 20 mL de água destilada autoclavada na superfície da cultura. Posteriormente, foi realizada a fricção com um pincel de cerdas macias, autoclavado, na superfície da colônia, de modo a retirar todo o micélio aéreo presente na superfície do meio. Após a remoção do micélio, foram depositados na placa 10 mL de água destilada esterilizada, de modo a submergir a cultura, por 48 horas. Após a remoção do excesso de água, as culturas foram mantidas em condições de laboratório (25° C \pm 3° C) por mais 48 h, até a esporulação do patógeno. Para obter a suspensão de inóculo, os conídios foram removidos por meio da deposição de água destilada esterilizada na superfície da colônia e raspados com pincel autoclavado. A suspensão foi filtrada, em camada dupla de gaze esterilizada, à que se adicionou Tween 20 na proporção de 0,05 %. A concentração da suspensão foi ajustada para 1×10^4 conídios.mL⁻¹ (Graça et al. 2009).

Inoculação

Cerca de 150 dias após o transplante das mudas para vasos foi realizada a inoculação do patógeno. Dois dias antes de cada inoculação, as folhas de seis ramos do terço basal de cada planta, foram contadas e marcadas. A suspensão de inóculo foi atomizada homogeneamente nas superfícies abaxial e adaxial das folhas das plantas com o auxílio de um pulverizador costal (4 L), acoplado a um regulador de pressão com bico do tipo leque nº 1001. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 48 h, com nebulização intermitente a cada 1 h durante 10 s das 6:00 às 18:00 h, e a cada 3 h por 10 s das 18:00 às 6:00 h. Posteriormente, as mudas foram transferidas para casa de vegetação com nebulização a cada 2 h com duração de 20 s das 6:00 às 18:00 h, e a cada 3 h por 10 s das 18:00 às 6:00 h, onde permaneceram até a avaliação. Foram anotadas diariamente as temperaturas máximas e mínimas no período em que as plantas estavam na câmara de nevoeiro e posteriormente na casa de vegetação.

Avaliação da resistência

Aos 30 dias após a inoculação, avaliou-se a desfolha nos seis ramos basais anteriormente marcados em cada planta. Para isso, foi anotado o número de folhas marcadas antes da inoculação, contadas e anotadas as folhas existentes em cada ramo após a inoculação, para em seguida calcular a porcentagem (%) de desfolha de cada planta.

Delineamento experimental e análise dos dados

Os ensaios foram instalados em blocos casualizados, sendo a parcela experimental constituída por uma planta e cada indivíduo representado uma vez no bloco. Cada indivíduo foi representado por quatro [(DxG) x (UxGL)] ou cinco (demais famílias) réplicas. Esse procedimento foi adotado na fenotipagem das cinco famílias.

Extração de DNA

O DNA de uma das réplicas de cada indivíduo e dos parentais das cinco famílias foi extraído (Grattapaglia & Sederoff 1994), e em seguida, ressuspensão em 50 µL de água MiliQ autoclavada. O DNA de todas as amostras foi quantificado em NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) e a concentração ajustada para 1 ng.µL⁻¹.

Amplificação dos locos microssatélites via PCR

As amplificações via PCRs (*Polymerase Chain Reaction*) dos locos microssatélites foram realizadas em sistemas triplex até hexaplex combinando os marcadores de forma que locos cujos alelos migram no mesmo intervalo foram marcados com diferentes fluorocromos, sendo 6-FAM (azul), NED (amarelo) ou HEX (verde). Cada reação de PCR foi conduzida em placas com 96 poços utilizando o Kit Multiplex PCR Qiagen® e composta por: 2,5 µL de *PCR Master Mix*; 0,5 µL de *Q-Solution*; 0,1 µL de uma solução contendo os *primers* direto e reverso juntos (10 µM); 0,4 µL de *RNase-free water* e 1,0 µL de DNA (2 ng.µL⁻¹) para um volume final de 5 µL. A PCR foi realizada utilizando um programa com uma etapa inicial de desnaturação a 95° C por 15 min, seguidos de 35 ciclos envolvendo uma etapa inicial de desnaturação (94° C por 30 s), uma de anelamento dos *primers* (57° C por 90 s) e uma de extensão (72° C por 1 min), finalizando com uma etapa única de extensão final a 60° C por 30 min. O produto da PCR foi diretamente submetido à eletroforese capilar.

Geração dos dados genotípicos dos locos microssatélites

Após a reação de PCR, 1 µL da reação foi adicionada a 8 µL de formamida *Hi-Di* (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.) e a 1 µL do padrão de tamanho em pares de base marcado com fluorescência ROX (Brondani & Grattapaglia 2001). O DNA das amostras foi desnaturado (95° C por 5 min) e colocado imediatamente no gelo para a desnaturação dos fragmentos amplificados. Posteriormente, a placa foi submetida à eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3100XL (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo padrão utilizado no laboratório para detecção dos fragmentos.

Os programas GenScan e Genotyper, ambos da Applied Biosystems, foram utilizados para analisar os dados brutos gerados (eletroferogramas). Os dois programas permitiram a obtenção das planilhas com tamanho estimado dos alelos a cada loco. Essas planilhas foram submetidas, ao programa Allelobin (Idury & Cardon 1997) para que o valor em pares de base de cada alelo fosse arredondado.

Mapeamento genético da família de detecção (EU11 x EC06)

As pressuposições de segregação mendeliana dos marcadores foram verificadas por meio do teste de qui-quadrado (χ^2), a 20 % de probabilidade para todo o genoma (“experiment wise”) utilizando, para estabelecimento do nível crítico individual, a proteção de Bonferroni a partir dos múltiplos testes.

As tabelas de genotipagem dos microssatélites foram recodificadas para análise da segregação de cada parental, separadamente, de acordo com a estratégia de “pseudo-testcross” (Grattapaglia & Sederoff 1994). Assim, os locos foram separados em dois grupos: um com aqueles marcadores que segregaram no parental feminino e outro com aqueles que segregaram no parental masculino, sendo que os marcadores que segregam para os dois parentais foram alocados em ambos os grupos. Em cada grupo, os alelos segregantes ao loco foram codificados como 1 ou 2. Como não se dispõe da informação do genótipo dos progenitores dessa família e, portanto, não se conhece a fase da ligação dos marcadores, para que a ligação pudesse ser detectada e a frequência de recombinação estimada entre marcadores em repulsão, cada loco foi duplicado, invertendo-se os códigos dos seus genótipos (1 passou a ser 2 e vice-versa) de acordo com a metodologia descrita na abordagem de “pseudo-testcross”.

As análises de ligação foram realizadas utilizando o programa MapMaker, versão 2.0 (Lander et al. 1987). Um LOD score mínimo de 3 e uma fração de recombinação

máxima (θ) de 0,40 foram utilizados como parâmetros para estabelecimento dos grupos de ligação, usando a função “group”. Após o agrupamento dos marcadores, esses foram permutados dentro de cada grupo de ligação (comando “ripple”) para verificar a consistência do ordenamento. As distâncias entre marcadores, em centiMorgans (cM), foram calculadas por meio da função de mapeamento de Kosambi. As apresentações gráficas dos grupos de ligação foram obtidas usando o programa MapChart, versão 2.1 (Voorrips 2002).

Análise de QTLs

As análises para detecção de QTLs foram conduzidas utilizando-se o modelo de retrocruzamento do programa QTL Cartographer, versão 2.5 para Windows (Wang et al. 2006). Para o mapeamento de QTLs utilizou-se a estratégia de intervalo composto. Os pontos de corte para a característica de resistência foram determinados pelo programa, via testes de permutação (Churchill & Doerge 1994; Doerge & Churchill 1996), sendo utilizadas 1000 permutações, com três repetições, e um nível de significância de 0,05. O tamanho da janela de análise adotada foi de 10 cM e a resolução do mapeamento de 1 cM. A escolha dos cofatores, marcadores supostamente ligados a QTLs, a serem incluídos como variáveis independentes no modelo de regressão múltipla, foi feita mediante uma regressão *stepwise* (método *forward*) pelo próprio programa. Nas análises, para cada parental, foram utilizados os cofatores 0, 5, 8, 12, 15 e 18, empregando-se o modelo 6 do QTL Cartographer. Com isso, escolheu-se, para cada característica, o modelo cujo número de cofatores proporcionou o maior número de QTLs com as maiores significâncias estatísticas (maior valor de LOD).

Análise e validação dos marcadores

Foi realizada a amplificação dos locos microssatélites via PCR e a geração dos dados genotípicos nas quatro famílias de validação, conforme descrito anteriormente para a família de detecção. Foram amplificados 33 marcadores microssatélites - correspondentes aos marcadores ligados aos QTLs detectados na família EU11 x EC06 - nas progênies das famílias de validação, 9882 x 6021, 9882 x 869, G26 x G27 e (DxG) x (UxGL). Efetuou-se a verificação das pressuposições de segregação mendeliana dos marcadores para cada família de validação por meio de um teste de qui-quadrado (χ^2)

com um nível de significância igual a 20 %, para todo o genoma utilizando a proteção de Bonferroni para múltiplos testes.

Para se determinar a influência que cada marcador exerce sobre o nível de desfolha (variável dependente), causada por *C. pteridis*, realizou-se análise de regressão linear simples com a aplicação do teste F e obtenção do coeficiente de determinação (r^2). As análises para as famílias de validação foram realizadas com o software GQMOL (Cruz 2008).

RESULTADOS

Manchas foliares pequenas, circulares ou alongadas e de coloração cinza-clara progredindo para marrom-clara e a desfolha ascendente são os sintomas característicos da mancha-de-pteridis em plantios de eucalipto no campo. Estes sintomas característicos da doença, foram observados em todos os indivíduos das famílias avaliadas a partir do sétimo dia após as inoculações artificiais realizadas sob condições controladas. A temperatura no interior da câmara de nevoeiro durante o período de molhamento foliar, 48 h depois da inoculação, considerando as inoculações de todas as cinco famílias, variou de 11,5° a 37° C. No interior da casa de vegetação, a amplitude térmica foi de 10° a 41,5° C, onde as plantas foram mantidas após a retirada da câmara de nevoeiro até a avaliação.

A distribuição de frequência para as classes de desfolha, causada por *C. pteridis*, nas cinco famílias indicou a presença de indivíduos com diferentes níveis de resistência (Figura 1). Na família 9882 x 6021 foi observado um maior número de indivíduos nas classes acima de 50 % de desfolha. Ao contrário, na família G26 x G27, os indivíduos ocuparam classe com menor nível de desfolha (Figura 1). A média de desfolha obtida, nas cinco famílias avaliadas ficou entre 42,2 %, para a (DxG) x (UxGL), e 68,9 %, para a 9882 x 6021 (Tabela 1). Já para a família de detecção dos QTLs, EU11 x EC06, a média foi de 47,5 %, variando entre 3,2 % de desfolha, para o indivíduo mais resistente, a 81,4 %, para o mais suscetível. Os comparadores, 6021 e 9882, inoculados nesta família obtiveram média de desfolha de 18,6 e 63,1 %, respectivamente, resistente e suscetível a *C. pteridis* (Tabela 1). A maior amplitude de desfolha foi observada na família (DxG) x (UxGL), que variou de 9,8 % a 97,8 %. Em relação às medidas de dispersão, o menor desvio padrão (DP) calculado foi 12,0, referente aos dados coletados em cinco réplicas de cada indivíduo da família G26 x G27. Entretanto, o menor coeficiente de variação (CV) foi de 25,5 na família 9882 x 6021 (Tabela 1).

Os 11 grupos de ligação (LG) de *Eucalyptus* foram mapeados para os genitores da família de *Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis* (EU11 x EC06), seguindo a estratégia de “pseudo-testcross” (Figura 2). Cento e trinta marcadores foram amplificados, destes 49 % foram homozigotos ou monomórficos, sendo 35 marcadores homozigotos para o genitor EU11 e 45 para o genitor EC06. No genitor EC06, 31 % do total dos marcadores

homozigotos estão presentes no LG7, seguido por 13,3 e 11, 1 % nos LG's 1 e 2, respectivamente. No genitor EU11, o maior número de locos homozigóticos foi observado nos LG's 1 e 8, perfazendo 34 % do total de marcadores monomórficos para esse parental. Nos LG's 1, 2, 3, 6, 7, 10 e 11 foram observados marcadores com alelo nulo no loco correspondente a um dos genitores. A média de marcadores mapeados em relação ao total de marcadores amplificados, para os genitores EU11 e EC06, foi de 57 e 50 %, respectivamente. No LG7, do genitor EC06, foi determinada a menor porcentagem de marcadores mapeados em relação aos amplificados, uma vez que nesse grupo de ligação também foi encontrado o maior número de locos homozigotos. Além disso, o LG5, para ambos os genitores, e o LG3, somente para o EC06, foram os grupos de ligação com menor número de marcadores mapeados, conseqüentemente os de menor tamanho (cM) (Figura 2). Do total de 104 marcadores mapeados, 57,7 % foram completamente informativos, isto é, segregaram em ambos os parentais resultando em três ou quatro alelos diferentes. Os LG's com maior número de marcadores mapeados, para o genitor EU11, foram os LG7, LG1 e LG6, com 14, 11 e 11 marcadores, respectivamente, e para o mapa genético do genitor EC06, o LG1 com 12 marcadores mapeados (Figura 2). O tamanho médio dos LG's foi de 111,9 e 95,0 cM para os genitores EU11 e EC06, respectivamente. No mapa EU11 os maiores grupos de ligação foram LG1 e LG10, com 176,3 cM; e no mapa do EC06, o LG7 com o tamanho de 185,6 cM (Figura 2).

Pelo método de intervalo composto foi possível detectar cinco regiões genômicas relacionados à resistência à desfolha (Rd), sendo que quatro destes QTLs estão em diferentes cromossomos. Três QTLs foram detectados usando o mapa do genitor EU11, sendo dois (Rd-1 e Rd-2) localizados no LG1 e o terceiro (Rd-4) no LG6. Os outros dois QTLs foram encontrados no mapa genético do genitor EC06, presentes nos LG2 (Rd-3) e LG8 (Rd-5) (Figura 2). A variação fenotípica (R^2) estimada para cada QTL variou de 15 a 49 %. O LOD máximo observado foi de 8,58 para o Rd-5, localizado no LG8 do mapa paterno (EC06), que também apresentou o maior R^2 . Entretanto, o menor LOD foi observado para o Rd-1, presente no LG1 do mapa genético do genitor materno (EU11) e que explica 22 % da variação fenotípica. O Rd-2, localizado no LG1 do mapa do genitor EU11, foi o QTL que abrangeu o maior número de marcadores, sendo EMBRA154, EMBRA2002 e EMBRA70 (Tabela 2). Os marcadores que mais se aproximaram do pico máximo dos QTLs, Rd-1, Rd-2, Rd-3, Rd-4 e Rd-5, foram EMBRA1562, EMBRA70, EN16, EG96 e EMBRA203/EMBRA197, respectivamente (Tabela 2).

Na análise realizada para a validação dos marcadores, o EMBRA2002 e o EMBRA70 foram significativos pelo teste F para o genitor 6021, de *E. grandis*, e os marcadores EMBRA222 e EMBRA70 significativos para o genitor 869, de *E. urophylla*, sendo que estes marcadores estão relacionados ao QTL, Rd-2, encontrado no genitor EU11 (Tabela 3). Nenhum marcador relacionado aos QTLs encontrados na família EU11 x EC06 foi significativo pela análise de regressão linear simples para os genitores das famílias G26 x G27 e (DxG) x (UxGL) (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Neste estudo, utilizando-se a estratégia de mapeamento por “pseudo-testcross” (Grattapaglia & Sederoff 1994), foi possível construir os 11 grupos de ligações (LG) dos genitores da família EU11 x EC06. Mapas genéticos já foram construídos para diversas espécies de *Eucalyptus*, como: *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. globulus*, *E. nitens* e *E. camaldulensis* e são ferramentas indispensáveis na detecção de locos que conferem características de interesse, utilizando diferentes técnicas moleculares (Grattapaglia & Sederoff 1994; Grattapaglia et al. 1996; ; Agrama et al. 2002; Thamarus et al. 2002; Myburg et al. 2003; Brondani et al. 2006; Thumma et al. 2010). Os mapas de ambos os genitores da família EU11 x EC06 possuíram alta similaridade, em relação à posição e a distância entre os marcadores, com o mapa genético de referência para *Eucalyptus* (Brondani et al. 2006). Em relação ao mapa de *E. camaldulensis* publicado anteriormente (Agrama et al. 2002), o mapeamento dos 11 grupos de ligação (LG) foi realizado com 73 marcadores RAPDs, 81 RFLPs e 14 SSRs. Neste trabalho, foram mapeados 75 marcadores microssatélites no parental paterno de *E. camaldulensis*, saturando o mapa genético com marcadores codominantes e que apresentam alto nível de polimorfismo e alta reprodutibilidade (Grattapaglia, 2007). Foi observado para alguns LG's uma alta porcentagem de marcadores microssatélites homozigotos para um dos parentais ou com locos duplicados, o que resultou em LG's mapeados com poucos marcadores, como observado principalmente para o LG3 e LG7 em relação ao genitor de *E. camaldulensis* (EC06) e para o LG5 em ambos os genitores da família. Em geral, tem-se observado que o LG3 do mapa de *Eucalyptus* é um cromossomo difícil de ser mapeado quando comparado aos demais e em decorrência disto, frequentemente o tamanho e a saturação por marcadores ficam reduzidos (Brondani et al. 2006; Manani et al. 2010). Recentemente, o gene de *Ppr1* (*Puccinia psidii* resistance 1) (Junghans et al. 2003), que confere resistência à ferrugem do eucalipto, causado por *Puccinia psidii*, foi posicionado no mapa genético de referência de *Eucalyptus* (Brondani et al. 2006) entre os marcadores EMBRA125 e EMBRA1071, localizados no LG3 (Manani et al. 2010). O trabalho discute a hipótese do gene *Ppr1* estar localizado em uma região de recentes duplicações em tandem no genoma, em que os microssatélites são frequentemente amplificados em locos duplicados, impossibilitando seu mapeamento (Manani et al. 2010). Os produtos

das regiões NBS (Nucleotide-binding site – Sítios de ligação a nucleotídeos) e LRR (Leucine-rich repeats - Repetições ricas em Leucina) associadas aos domínios NBS-LRR, podem conferir resistência (genes R) a doenças, como relatado em álamo e videira (Kohler et al. 2008; Yang et al. 2008). Estas regiões também organizadas em tandem, foram detectadas em *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* e *Populus trichocarpa*, por meio da análise do genoma completo destas plantas (Kohler et al. 2008; Tamura & Tachida 2011). Trabalhos futuros, principalmente com *E. camaldulensis*, devem priorizar o mapeamento de marcadores microssatélites nos cromossomos que apresentaram reduzido número de marcadores, podendo-se determinar outra região responsável pela resistência à desfolha, a qual não foi detectada neste estudo.

Eucalyptus camaldulensis possui madeira de alta densidade e resistente a seca, sendo destinada principalmente à produção de carvão e madeira serrada. Seu crescimento é lento e em decorrência da suscetibilidade ao psilídeo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*), praga relatada em florestas de eucalipto no estado de São Paulo, em 2003 (Wilcken et al. 2003), algumas matrizes de alto rendimento foram eliminadas dos pomares de hibridização, no Brasil. Uma alternativa para transferir as qualidades desejáveis da madeira desta espécie é a obtenção de cruzamentos com outras espécies, como realizado na família EU11 x EC06, gerando inicialmente 200 progênies. Após o teste de paternidade, com a amplificação de 12 marcadores microssatélites em todos os indivíduos da família, detectou-se que somente 89 indivíduos eram irmãos completos, isto é, 44,5 % da progênie eram indivíduos contaminantes. Várias causas resultam nas altas taxas de contaminações, como por exemplo, a falta de cuidado e critério nas etapas de coleta e beneficiamento de pólen. Neste trabalho foi adotada a técnica de protogênia artificialmente controlada (PAI) (Assis et al. 2005) em ambiente não protegido, o que provavelmente aumentou a taxa de indivíduos contaminantes. Estudos de paternidade realizados com diferentes espécies de eucalipto estimaram que o índice de contaminação por pólen foi de 17,6 % em um pomar de *E. globulus* (Rao et al. 2008), 39 % em um pomar de *E. grandis* (Chaix et al. 2003), 29 % em um pomar de sementes de *E. urophylla* (Grattapaglia et al. 2004) e 46 % para uma população de *E. grandis* (Jones et al. 2008). Diante destes resultados, destaca-se que a análise da paternidade por meio de marcadores microssatélites é indispensável nos estudos genéticos e de melhoramento, pois assegura a realização correta das análises genéticas.

Como consequência do número reduzido de indivíduos na família de detecção dos QTLs (*Quantitative Trait Loci*) (EU11 x EC06), foi necessário incluir outras famílias não relacionadas para a validação dos marcadores ligados aos QTLs, de modo a determinar a transferibilidade das regiões genômicas de resistência à desfolha em diferentes espécies de eucalipto.

A maior parte da resistência da progênie detectado na família EU11 x EC06 foi proveniente do genitor materno EU11 com a presença três QTLs. No LG1 do genitor materno foram detectados dois QTLs explicando 22 e 15 % da variação fenotípica, isto é, da resistência à desfolha nos indivíduos desta família. A variação fenotípica (R^2) estimada para cada QTL em essências florestais, geralmente é inferior a 5 % (Neale & Kremer, 2011), dependendo da característica estudada. Entretanto, quando se refere a QTLs que conferem resistência em *Eucalyptus* a patógenos, tem-se observado valores maiores atribuídos a R^2 . Um estudo sobre a resistência em *Eucalyptus* à mancha foliar, causada por *Teratosphaeria cryptica* (Cooke) Hansf., detectou dois QTLs que explicaram 52 % da variação fenotípica na severidade do dano causado por *T. cryptica*, segundo o qual pode ser classificado como um controle oligogênico (Freeman et al. 2008). Outro exemplo importante, refere-se a base genética da resistência de *Eucalyptus* á ferrugem, causada por *Puccinia psidii*, no qual mapeou-se o gene *Ppr1* (Junghans et al. 2003) e posteriormente, detectou-se um QTL explicando entre 29,8 e 44,8 % da variação fenotípica (Alves et al., 2012). Uma maneira de se verificar que o QTL realmente expressa a característica desejada e, por consequência, o quanto está sendo explicado desta característica é por meio da validação dos marcadores ligados ao QTL. Assim, recentemente a presença e o posicionamento do gene *Ppr1*, foi validado em três famílias de irmãos completos não relacionados geneticamente (Mamani et al. 2010).

Atualmente, a detecção do QTL seguida da validação em diferentes genótipos tornou-se fundamental para a utilização desta ferramenta nos programas de melhoramento assistido por marcadores (MAS) (Collard & Mackill 2008). Os marcadores ligados aos QTLs devem revelar polimorfismo em diferentes populações derivadas de uma ampla gama de diferentes genitores para que as regiões genômicas selecionadas sejam independentes dos genótipos e do ambiente (Langridge et al. 2001; Collard & Mackill 2008). Em espécies florestais o uso do mapeamento de QTLs é limitada em decorrência da validação em outros genótipos não relacionados ao de detecção (Neale & Kremer, 2011). Neste trabalho, foi realizada a validação dos marcadores microssatélites

próximos ao Rd-2, no LG1, que foram significativos para os genitores, 6021 e 869, das famílias de validação 9882 x 6021 e 9882 x 869, respectivamente, confirmando a importância do Rd-2 na resistência à desfolha. Futuramente é importante investigar os LGs dos demais QTLs, saturando a região com marcadores, para que a característica estudada, a resistência à desfolha, seja amplamente definida.

Diversos fatores afetam a detecção e a validação de um QTL, como o tamanho da amostra, a magnitude do efeito do QTL e a herdabilidade da característica estudada (Erickson et al. 2004). Dentre estes, o tamanho reduzido de indivíduos nas famílias pode superestimar os efeitos dos QTLs detectados, como observado em espécies de *Pinus* para características da madeira (Beavis 1998; Sewell et al. 2000; Lerceteau et al. 2001). Entretanto, é frequente no caso de espécies florestais, onde o alto custo e tempo envolvidos na obtenção e manutenção de vários cruzamentos com número de indivíduos elevados sejam fatores que reduzem a obtenção de grandes progênies (Devey et al. 2004; Grattapaglia 2007). Nesse caso, é difícil determinar quantos QTLs poderiam ser detectados e quais os seus efeitos na resistência à desfolha causada por *C. pteridis*. Assim, certamente o número reduzido de indivíduos nas famílias de validação impediu a validação de todos os QTLs detectados na família EU11 x EC06.

Outro fator que afeta diretamente o estudo de herança e mapeamento da resistência a doenças são os fatores ambientais e de infecção do patógeno que refletem nos dados fenotípicos. Nas coletas das variáveis para o mapeamento de QTLs em ambiente com inoculação natural do patógeno (Freeman et al. 2008; Teixeira et al. 2009; Riaz et al. 2011) pode haver escape que não é detectado prontamente, e pode levar a erros na detecção das regiões genômicas. No presente estudo, a determinação prévia das condições de ambiente adequadas para avaliar a desfolha (Graça et al. 2009), foi essencial para que a inoculação do patógeno fosse realizada em condições controladas e padronizadas para as diferentes famílias ao longo do tempo. Assim, o molhamento foliar, a temperatura e o tamanho das plantas foram adequados para o desenvolvimento da doença. A baixa temperatura observada no interior da câmara de nevoeiro e posteriormente na casa de vegetação no período noturno não prejudicou a infecção por *C. pteridis* nas plantas inoculadas, conforme previamente observado nos resultados de germinação de conídios x temperatura (Alfenas et al. 2006). Os primeiros sintomas de mancha foliar foram observados 48 h após a inoculação e com o progresso da doença formaram-se manchas características da doença, com esporulação do fungo, seguida de

desfolha, principalmente nos ramos do terço basal das plantas (Graça et al. 2009), onde se determinou a porcentagem de desfolha de cada indivíduo.

A característica quantitativa dos dados fenológicos de desfolha é essencial para a detecção dos QTLs para a resistência a *C. pteridis*. O cruzamento entre *E. urophylla* (EU11) e *E. camaldulensis* (EC06) gerou indivíduos com ampla variação fenotípica, resultando em maior segregação da resistência à desfolha causada por *C. pteridis* em experimentos anteriormente realizados (dados não publicados). Neste trabalho, os resultados fenotípicos obtidos evidenciaram que as diferenças no nível de resistência à doença manifestaram-se por diferenças quantitativas, expressas pela variação nos níveis de desfolha, não sendo evidente a separação dos genótipos em classes binárias (suscetível e resistente) ou por escala de notas como foi realizada em outros patossistemas (Junghans et al. 2003; Devey et al. 2004; Riaz et al. 2011). Assim, por se tratar de uma característica quantitativa, a resistência a *Cylindrocladium* é influenciada por múltiplos locos genéticos, bem como, pelo ambiente e pelas interações epistáticas.

No presente trabalho determinou-se pioneiramente a herança da resistência em *Eucalyptus* à mancha-de-pteridis, por meio do mapeamento de regiões genômicas (QTLs) responsáveis por esta característica. Foram detectados cinco QTLs para a resistência à desfolha em uma família de irmãos completos de *E. urophylla* x *E. camaldulensis*, sendo que o Rd-2 detectado no LG1 do genitor *E. urophylla*, foi validado pelos marcadores EMBRA2002 e EMBRA70, para o genitor 6021, e pelos marcadores EMBRA222 e EMBRA70, no genitor 869, em duas famílias de validação distintas. Estudos devem ser realizados para validação completa de todas as regiões que conferem resistência à desfolha em *Eucalyptus* visando à seleção precoce de materiais promissores resistentes a *C. pteridis*. Contudo ganhos de resistência podem ser obtidos por meio da propagação clonal dos indivíduos resistentes selecionados dentro das famílias e pela identificação precoce dos QTLs presentes principalmente no LG1.

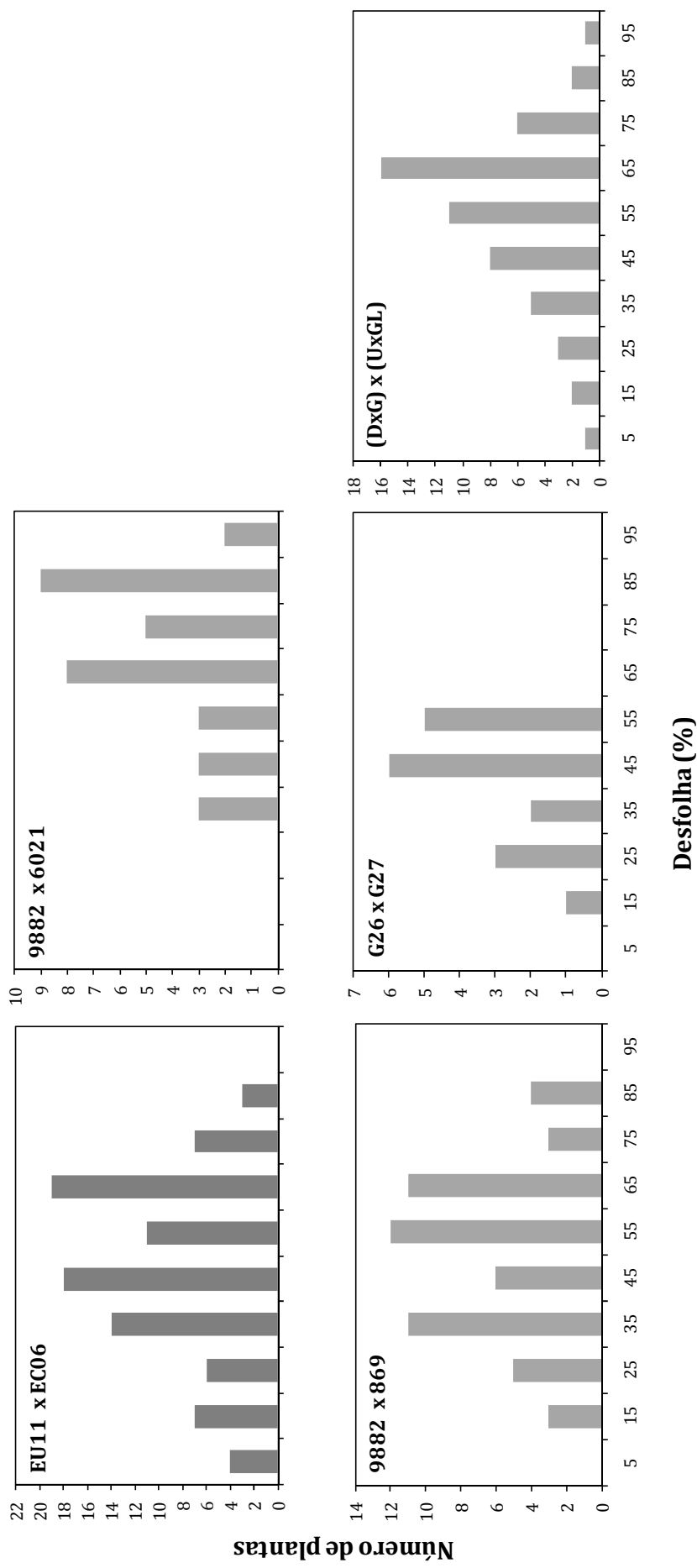


Figura 1. Distribuição de frequência para a desfolha, causada por *Cylindrocladium pteridis*, na família de detecção EU11 x EC06 (*Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis*) e nas famílias de validação: 9882 x 6021 [(*E. grandis* x *E. urophylla*) x *E. grandis*]; 9882 x 869 [(*E. grandis* x *E. urophylla*) x *E. urophylla*]; G26 x G27 [*E. grandis*] e (DxG) x (UxGL) [(*E. dunnii* x *E. grandis*) x (*E. urophylla* x *E. globulus*)], 30 dias após a inoculação sob condições controladas.

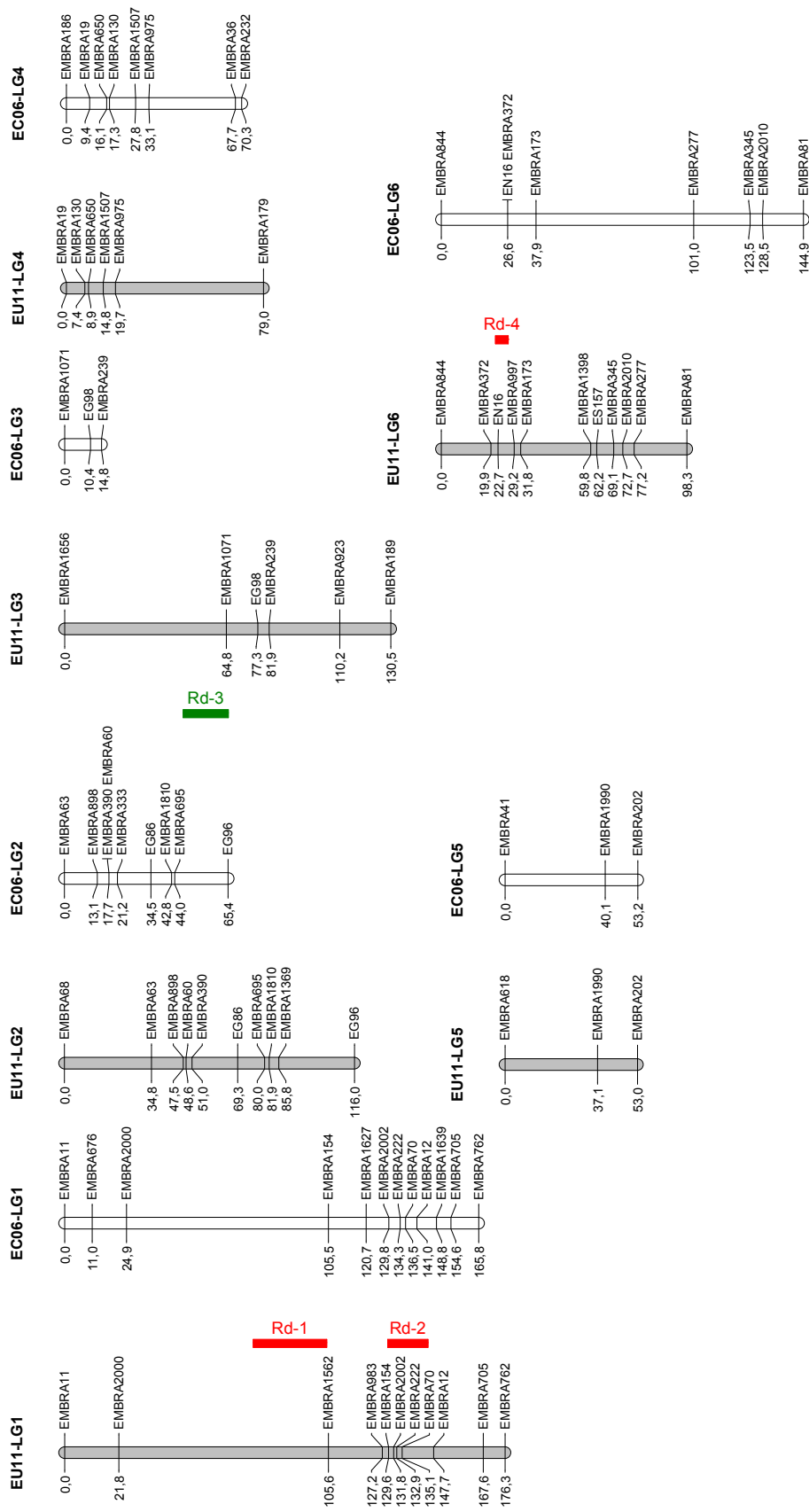


Figura 2. Mapa genético de cada genitor da família *Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis* (EU11 x EC06) (n=89) e a detecção por intervalo composto dos QTLs para a resistência à desfolha, causada por *Cylindrocladum pteridis* (isolado LPF59). Barras em vermelho indicam QTLs detectados no genitor materno (EU11) e barras em verde indicam os QTLs localizados no genitor paterno (EC06).

Continua...

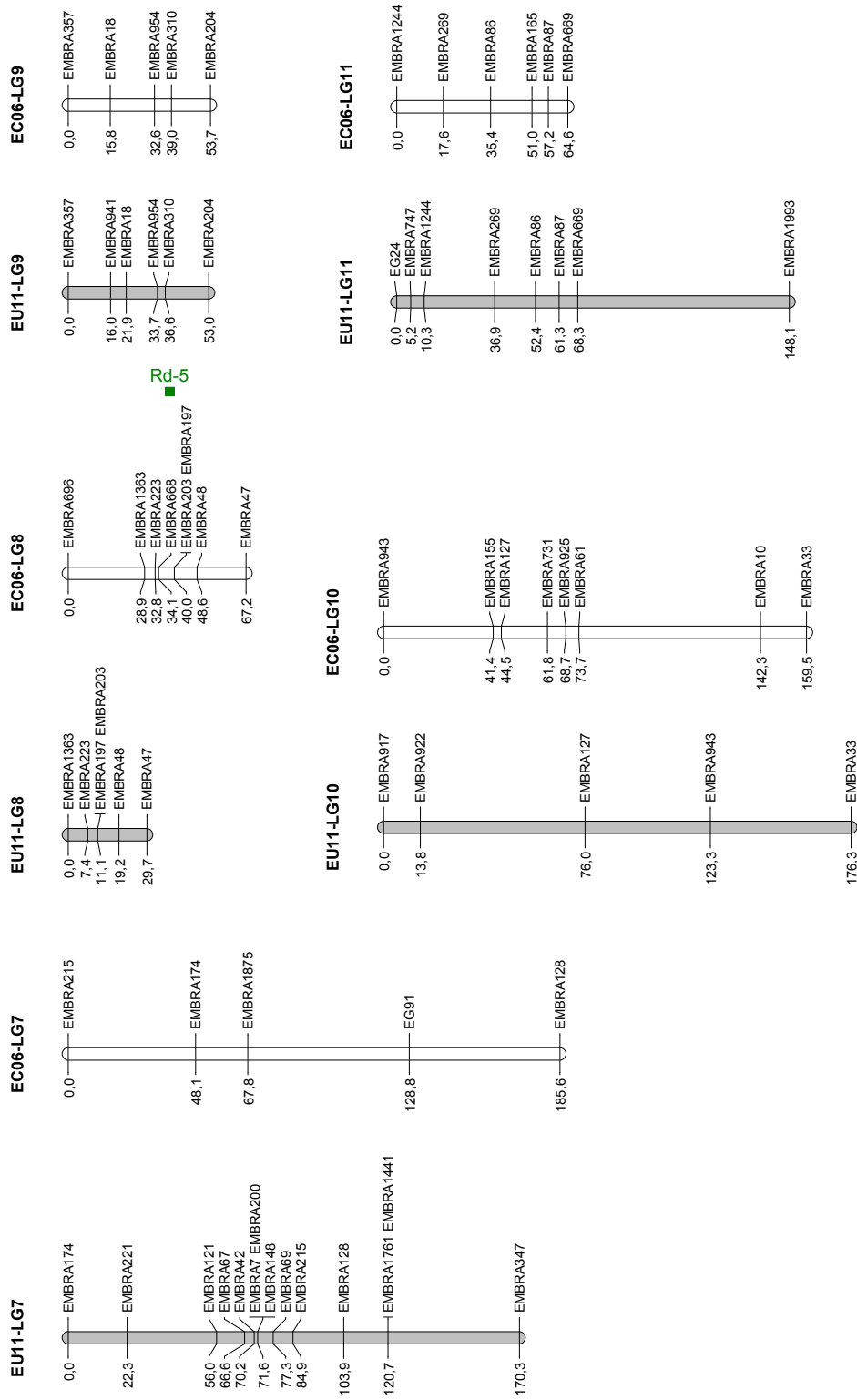


Figura 2 (cont.). Mapa genético de cada genitor da família *Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis* (EU11 x EC06) (n=89) e a detecção por intervalo composto dos QTLs para a resistência à desfolha, causada por *Cylinodrocladium pteridis* (isolado LPF59). Barras em vermelho indicam QTLs detectados no genitor materno (EU11) e barras em verde indicam os QTLs localizados no genitor paterno (EC06).

Tabela 1. Porcentagem de desfolha e as medidas de dispersão das famílias de *Eucalyptus* e dos comparadores após 30 dias da inoculação de *Cylindrocladium pteridis* (isolado CMD 22.1), sob condições controladas

Família	Cruzamento	Número de indivíduos por progênie	Desfolha (%)		Desvio padrão (DP)	Coeficiente de variação (CV)		
			Mínimo	Máximo				
EU11 x EC06	<i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i>	89	3,2	47,5	81,4	19,8	41,7	
9882 x 6021	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) x <i>E. grandis</i>	33	30,7	68,9	95,2	17,6	25,5	
9882 x 869	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) x <i>E. urophylla</i>	56	16,0	50,2	87,7	17,8	35,5	
G26 x G27	<i>E. grandis</i>	17	20,2	42,2	59,0	12,0	28,4	
DG X UGL	(<i>E. dunnii</i> x <i>E. grandis</i>) x (<i>E. urophylla</i> x <i>E. globulus</i>)	55	9,8	54,9	97,8	18,3	33,3	
Comparador								
6021	<i>E. grandis</i>	-	9,6	18,6	33,3	8,6	46,2	
9882	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	-	39,5	63,1	86,7	19,9	31,5	

Tabela 2. Parâmetros associados aos locos para características quantitativas (QTL) para a resistência à desfolha detectada pelo mapeamento em intervalo composto de QTLs em uma família de irmãos completos de *Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis* (EU11 x EC06), após 30 dias da inoculação de *Cylindrocladium pteridis* (isolado LPF59), sob condições controladas

Parental	QTL	LG ^a	LOD ^b	Cofator	Intervalo (cM)	Distância (cM)	R ² (%) ^d	Marcador (es) ^e
EU11	Rd-1	1	3,87	15	75,5 - 104,9	105,5	22	EMBRA1562
EU11	Rd-2	1	6,12	18	129,3 - 145,4	135,1	15	EMBRA154; EMBRA2002; EMBRA222; EMBRA70
EU11	Rd-4	6	4,59	15	21,8 - 26,8	22,7	17	EN16
EC06	Rd-3	2	4,25	18	47,5 - 65,5	65,4	16	EMBRA695; EG96
EC06	Rd-5	8	8,58	18	36,6 - 39,7	40,0	49	EMBRA203; EMBRA197

^a- LG - grupo de ligação.

^b- LOD (logarithm (base 10) of odds).

^c- distância, em centi Morgans (cM), do marcador microsatélite, em negrito, mais próximo ao pico máximo do QTL.

^d- R² - coeficiente de determinação - proporção da variação fenotípica explicada por cada QTL.

^e- Marcador(es) molecular(es) próximo(s) ao pico de probabilidade de cada QTL.

Tabela 3. Marcadores microsatélites ligados aos QTLs, detectados na família EU11 x EC06 (*Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis*), e validados nas famílias 9882 x 6021 [(*E. grandis* x *E. urophylla*) x *E. grandis*]; 9882 x 869 [(*E. grandis* x *E. urophylla*) x *E. urophylla*]; G26 x G27 [*E. grandis*] e (DxG) x (UxGL) [(*E. dunnii* x *E. grandis*) x (*E. urophylla* x *E. globulus*)] por meio de análise de regressão linear simples, com as respectivas significâncias para o teste F

Marcador	LG ^a	QTL ^b	Família de validação										
			9882 x 6021		9882 x 869		G26 x G27		(DxG) x (UxGL)				
			alelo1/alelo2 (bp)	9882	alelo1/alelo2 (bp)	9882	alelo1/alelo2 (bp)	G26	alelo1/alelo2 (bp)	G27	alelo1/alelo2 (bp)	DxG	UxGL
EMBRA1562	1	Rd-1	n.a. ^c	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
EMBRA154	1	Rd-2	233/247	219/247	233/247	205/nulo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
EMBRA2002	1	Rd-2	261/267	257/267*	262/267	267/nulo	240/nulo	240/252	240/246	221/221	219/221	261/267	261/267
EMBRA222	1	Rd-2	74/87	74/85	74/87	76/80**	86/86	76/78	66/76	66/76	66/76	66/76	66/76
EMBRA70	1	Rd-2	155/177	154/181*	154/176	162/168**	152/160	154/171	144/144	144/144	164/168	164/168	164/168
EG96	2	Rd-3	274/280	274/292	274/280	274/nulo	271/283	271/277	226/230	226/230	214/226	214/226	214/226
EMBRA695	2	Rd-3	141/168	157/157	141/168	131/147	136/145	136/169	154/166	154/166	112/138	112/138	112/138
EN16	6	Rd-4	155/165	163/165	155/165	163/163	158/166	164/170	168/174	168/174	168/178	168/178	168/178
EMBRA203	8	Rd-5	341/346	338/341	341/346	334/344	333/345	339/355	333/349	333/349	325/337	325/337	325/337
EMBRA197	8	Rd-5	276/nulo	268/nulo	276/nulo	263/273	272/275	268/284	250/280	250/280	252/260	252/260	252/260

^a - LG - grupo de ligação.

^b - QTL - quantitative trait loci.

^c - n.a.: marcador não amplificado para a família.

Alelos na cor cinza foram não informativos para a família correspondente.

Marcador microsatélite, em negrito, foram significativos a 5% (*) ou a 1% (**) de probabilidade segundo o teste F.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrama HA, George TL, Salah SF (2002) Construction of Genome Map for *Eucalyptus camaldulensis* DEHN. *Silvae Genet* 51:5-6.
- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2009) Clonagem e doenças do eucalipto. 2º ed. Editora UFV, Viçosa-MG. 500p.
- Alfenas RF, Lau D, Alfenas AC (2006) Germinação in vitro de *Cylindrocladium pteridis* sob diferentes temperaturas. XV Simpósio de Iniciação Científica UFV. Anais Cd-room, Viçosa-MG.
- Alves AA, Rosado CCG, Faria DA, Guimarães LMS, Lau D, Brommonschenkel SH, Grattapaglia D, Alfenas AC (2012) Genetic mapping provides evidence for the role of additive and non-additive QTLs in the response of inter-specific hybrids of *Eucalyptus* to *Puccinia psidii* rust infection. *Euphytica* 183 (1):27-38.
- Assis T, Warburton P, Harwood C (2005) Artificially induced protogyny: an advance in the controlled pollination of *Eucalyptus*. *Australian Forestry* 68 (1):27-33.
- Beavis WD (1998) QTL analyses: power, precision, and accuracy. In: Paterson AH (ed) *Molecular dissection of complex traits*. CRC, Boca Raton, Florida, pp 145–162.
- Brondani RP, Grattapaglia D (2001) Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. *Biotechniques* 31 (4):793-800.
- Brondani RP, 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 Biol* 6:20.
- Chaix G, Gerber S, Razafimaharo V, Vigneron P, Verhaegen D, Hamon S (2003) Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 107 (4):705-712.
- Churchill GA, Doerge RW (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138 (3):963-971.
- Collard BC, Mackill DJ (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363 (1491):557-572.
- Cruz CD (2008) GQMOL: Programa para análise de genética quantitativa molecular. Versão 2008.6.1. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>>, Desenvolvido pelo setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa.
- Devey ME, Groom KA, Nolan MF, Bell JC, Dudzinski MJ, Old KM, Matheson AC, Moran GF (2004) Detection and verification of quantitative trait loci for resistance to *Dothistroma* needle blight in *Pinus radiata*. *Theor Appl Genet* 108 (6):1056-1063.
- Doerge RW, Churchill GA (1996) Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* 142 (1):285-294.
- Erickson DL, Fenster CB, Stenoien HK, Price D (2004) Quantitative trait locus analyses and the study of evolutionary process. *Mol Ecol* 13 (9):2505-2522.
- Ferreira FA (1989) *Patologia Florestal: Principais doenças florestais no Brasil*. SIF, Viçosa-MG. 570p.

- Ferreira FA, Alfenas AC, Moreira AM, Demuner NL (1995) Mancha-de-pteridis doença foliar de eucalipto em áreas tropicais brasileiras. *Fitopatologia Brasileira* 20:107-110.
- Freeman JS, Potts BM, Vaillancourt RE (2008) Few Mendelian genes underlie the quantitative response of a forest tree, *Eucalyptus globulus*, to a natural fungal epidemic. *Genetics* 178 (1):563-571.
- Graça RN, Alfenas AC, Maffia LA, Titon M, Alfenas RF, Lau D, Rocabado JMA (2009) Factors influencing infection of eucalyptus by *Cylindrocladium pteridis*. *Plant Pathology* 58 (5):971-981.
- Grattapaglia D (2007) Marcadores moleculares: aplicações operacionais no melhoramento de *Eucalyptus*. In: Borém A (ed) *Biotecnologia Florestal*. Editora UFV, Viçosa-MG, p 482.
- Grattapaglia D, Bertolucci FL, Penchel R, Sederoff RR (1996) Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers. *Genetics* 144 (3):1205-1214.
- Grattapaglia D, Bertolucci FL, Sederoff RR (1995) Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. *Theor Appl Genet* 90:933-947.
- Grattapaglia D, Ribeiro VJ, Rezende GDSP (2004) Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for *Eucalyptus*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 109 (1):192-199. doi:10.1007/s00122-004-1617-9
- Grattapaglia D, Sederoff R (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137 (4):1121-1137.
- Guimarães LMS, Titon M, Lau D, Rosse LN, Oliveira LSS, Rosado CCG, Christo GGO, Alfenas AC (2010) *Eucalyptus pellita* as a source of resistance to rust, ceratocystis wilt and leaf blight. *Crop breeding and applied biotechnology* 10 (2):124-131.
- Idury RM, Cardon LR (1997) A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. *Genome Res* 7 (11):1104-1109.
- Jones M, Shepherd M, Henry R, Delves A (2008) Pollen flow in *Eucalyptus grandis* determined by paternity analysis using microsatellite markers. *Tree Genet Genomes* 4 (1):37-47.
- Junghans DT, Alfenas AC, Brommonschenkel SH, Oda S, Mello EJ, Grattapaglia D (2003) Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in eucalyptus: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 108 (1):175-180.
- Kohler A, Rinaldi C, Duplessis S, Bauchet M, Geelen D, Duchaussoy F, Meyers B, Boerjan W, Martin F (2008) Genome-wide identification of NBS resistance genes in *Populus trichocarpa*. *Plant Molecular Biology* 66 (6):619-636.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newberg LA (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1 (2):174-181.

- Langridge P, Lagudah ES, Holton TA, Appels R, Sharp PJ, Chalmers KJ (2001) Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Aust J Agr Res* 52 (11-12):1043-1077.
- Lerceteau E, Szmidt A, Andersson B (2001) Detection of quantitative trait loci in *Pinus sylvestris* L. across years. *Euphytica* 121 (2):117-122.
- Mamani EMC, Bueno NW, Faria DA, Guimarães LMS, Lau D, Alfenas AC, Grattapaglia D (2010) Positioning of the major locus for *Puccinia psidii* rust resistance (*Ppr1*) on the *Eucalyptus* reference map and its validation across unrelated pedigrees. *Tree Genetics & Genomes* 6 (6): 953-962.
- Myburg AA, Griffin AR, Sederoff RR, Whetten RW (2003) Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F1 hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach. *Theor Appl Genet* 107 (6):1028-1042.
- Neale DB, Kremer A (2011) Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nat Rev Genet* 12 (2):111-122.
- Rao H-x, Patterson B, Potts B, Vaillancourt R (2008) A microsatellite study on outcrossing rates and contamination in an *Eucalyptus globulus* breeding arboretum. *Journal of Forestry Research* 19 (2):136-140.
- Riaz S, Tenschler A, Ramming D, Walker M (2011) Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 122 (6):1059-1073.
- Rosado TB, Tomaz RS, Ribeiro Junior MF, Rosado AM, Guimarães LMS, de Araújo EF, Alfenas AC, Cruz CD (2010) Detection of QTL associated with rust resistance using IBD-based methodologies in exogamic *Eucalyptus* spp. populations. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 10:321-328.
- Rosado TB, Tomaz RS, Rocha RB, Rosado AM, Alves AA, Araújo EFd, Alfenas AC, Cruz CD (2011) Detection and mapping of a lethal locus in a eucalyptus hybrid population. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46:1021-1028.
- Sewell MM, Bassoni DL, Megraw RA, Wheeler NC, Neale DB (2000) Identification of QTLs influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). I. Physical wood properties. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 101 (8):1273-1281.
- Tamura M, Tachida H (2011) Evolution of the number of LRRs in plant disease resistance genes. *Molecular Genetics and Genomics* 1-10.
- Teixeira JEC, Guedes FTP, Dias DC, Bonine CAV, Camargo LEA (2009) Análise da herança da resistência a *Puccinia psidii* em progênies de híbridos interespecíficos de eucalipto avaliadas sob condições naturais de infecção. *Tropical Plant Pathology* 34 (4):203-210.
- 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 (2-3):379-387.

- Thumma BR, Southerton SG, Bell JC, Owen JV, Henery ML, Moran GF (2010) Quantitative trait locus (QTL) analysis of wood quality traits in *Eucalyptus nitens*. *Tree Genetics & Genomes* 6 (2):305-317.
- Voorrips RE (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* 93 (1):77-78.
- Wang S, Basten CJ, Zeng ZB (2006) Windows QTL Cartographer 2.5. North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Wilcken CF, Couto EBd, Orlato C, Ferreira Filho PJ, Firmino DC (2003) Ocorrência do psilídeo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*) (Hemiptera: *Psyllidae*) em florestas de eucalipto no Brasil. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais Circular técnica 201 (Piracicaba):11.
- Yang S, Zhang X, Yue J-X, Tian D, Chen J-Q (2008) Recent duplications dominate NBS-encoding gene expansion in two woody species. *Molecular Genetics and Genomics* 280 (3):187-198.

ARTIGO 2

**Nutrição mineral e progresso da mancha-de-pteridis do eucalipto causada por
*Cylindrocladium pteridis***

RESUMO

A mancha-de-pteridis, causada por *Cylindrocladium pteridis*, incita sintomas de manchas foliares e desfolha das plantas que resultam em perdas de crescimento volumétrico dos plantios de *Eucalyptus* spp.. No intuito de reduzir os impactos negativos dessa doença, avaliaram-se neste trabalho, os efeitos da nutrição mineral, na severidade da doença e desfolha das plantas. Para isso, mudas com raízes nuas do clone 6021 (híbrido de *Eucalyptus grandis* – Rio Claro) foram transplantadas para vasos contendo solo que receberam cinco doses de N (0; 55; 99; 143 e 198 mg.dm⁻³), combinadas com cinco de P (0; 82,5; 148,5; 214,5 e 297 mg.dm⁻³) e cinco de K (0; 55; 99; 143 e 198 mg.dm⁻³), de acordo com o modelo da matriz experimental Plan Plueba III modificada. O experimento foi montado em delineamento de blocos casualizados, com 16 tratamentos e quatro repetições. Mudas com 200 dias do transplântio foram inoculadas e após 45 dias foram quantificadas a área foliar lesionada (AFL) e a desfolha (D) das plantas. A D e a AFL não se correlacionaram significativamente, porém foram influenciadas pelas diferentes concentrações de NPK e pelo tamanho das mudas. Para a D ajustou-se uma equação linear e para a AFL uma equação quadrática, em relação à adubação testada. O efeito do fósforo (P) na intensidade da mancha-de-pteridis não foi definido, provavelmente devido à baixa absorção do elemento pela planta, confirmado pela análise foliar. Altas doses de K reduziram significativamente a D e a AFL. As interações N K e P K foram significativas e evidenciaram o efeito importante do K tanto individualizado quanto nas interações, com ambos os nutrientes, na redução da desfolha. O sinergismo entre N e K foi observado, sendo que maiores doses de K relacionadas com menores doses de N, apresentaram menores D e AFL. As doses de 100:300:200 e 100:80:160 mg.dm⁻³ (N-P-K) reduziram, respectivamente, a área foliar lesionada e a desfolha. O manejo da adubação, principalmente da potássica, de forma adequada e equilibrada em plantios clonais de eucalipto podem minimizar as perdas em volume de madeira devido a desfolhas consecutivas causadas por *C. pteridis*.

Palavras-chave: Severidade; Desfolha; Potássio; Manejo nutricional

**Mineral nutrition and progress blight-to-pteridis in *Eucalyptus* caused by
*Cylindrocladium pteridis***

ABSTRACT

The blight-to-pteridis, caused by *Cylindrocladium pteridis* has symptoms of leaf blight and defoliation of plants that result in loss of volumetric growth of *Eucalyptus* spp.. To reduce the negative impacts of this disease, this study assessment the effects of mineral nutrition in disease severity and defoliation of plants. For this, seedlings with bare roots the clone 6021 (hybrid of *Eucalyptus grandis* - Rio Claro) were transplanted into pots containing soil, which received five doses of N (0, 55, 99, 143 and 198 mg.dm⁻³), combined with five of P (0, 82.5, 148.5, 214.5 and 297 mg.dm⁻³) and five K (0, 55, 99, 143 and 198 mg.dm⁻³), according to the experimental matrix model III Plan Plueba. The experiment was a randomized block design with 16 treatments and four replications. Plants were inoculated after 200 days of transplantation and 45 days was quantified diseased leaf area (DFA) and defoliation (D) of plants. The D and the DFA did not correlate significantly, but were influenced by the different concentrations of NPK and the seedling height. For the D was adjusted a linear equation and the DFA a quadratic equation, for the fertilization test. The effect of phosphorus (P) in the intensity of the disease has not been defined, probably due to poor absorption element by the plant leaf confirmed by analysis. High doses of K significantly reduced the D and the DFA. The NK and PK interactions were significant and showed the important effect of the K both individualized and in interactions with both nutrients, reducing defoliation. The synergism between N and K was observed, with higher doses of K related to lower rates of N, had lower D and DFA. Doses of 100:300:200 and 100:80:160 mg.dm⁻³ (NPK) reduced, respectively, the D and DFA. The fertilizer management, mainly potassium, in a proper and balanced clonal eucalyptus can minimize losses in timber volume due to consecutive defoliation caused by *C. pteridis*.

INTRODUÇÃO

Cylindrocladium pteridis F.A. Wolf é a espécie fúngica mais comumente encontrada causando mancha foliar e desfolha em plantios comerciais de *Eucalyptus* spp. no Brasil (Ferreira 1989; Ferreira & Milani 2002; Alfenas et al. 2009). A doença, conhecida como mancha-de-pteridis caracteriza-se por apresentar lesões foliares inicialmente pequenas e arredondadas de coloração cinza clara, progredindo para manchas que coalescentes de cor parda, podendo ocupar todo o limbo foliar, o que culmina em intensa desfolha dos genótipos suscetíveis (Ferreira et al. 1995). Além da redução da área foliar fotossinteticamente ativa e do crescimento volumétrico, a desfolha permite maior entrada de luz no sub-bosque, o que favorece o crescimento de plantas invasoras, expondo as árvores aos efeitos da matocompetição (Alfenas et al. 2009). No Brasil, esse patógeno encontra-se amplamente distribuído em regiões onde prevalecem hospedeiros suscetíveis, altas temperaturas e períodos prolongados de chuvas, condições essas favoráveis à infecção (Alfenas et al. 2009).

Medidas de manejo do ambiente como a nutrição mineral das plantas, pode tornar o meio desfavorável à ação do patógeno, ou ainda favorecer o aumento da resistência de plantas à doença (Marschner 1995; Agrios 2005). Os efeitos da nutrição mineral na incidência e severidade de doenças em espécies florestais ainda são pouco conhecidos e comumente relacionados às diferentes teores de N, P e K. Em geral, os estudos relatam que a maior disponibilidade de nitrogênio (N) para as plantas aumenta a suscetibilidade a doenças cujos patógenos incidem sobre tecidos jovens (El-Hajj et al. 2004; Blodgett et al. 2005); ao contrário, plantas em condições de falta de N são suscetíveis a patógenos que colonizam tecidos em senescência ou debilitados (Snoeijs et al., 2000; Agrios, 2005). Os trabalhos com fósforo (P) têm demonstrado que a pulverização foliar ou a injeção de fosfito (H_2PO_3^-) no tronco de árvores, forma reduzida de fosfato (H_2PO_4^-), e que é mais prontamente absorvido, resulta em uma maior resistência da planta ou menor sobrevivência do patógeno dependendo da concentração de fosfito, como observado especialmente para *Phytophthora cinnamomi* Stukely & Crane (1994) (Jackson et al. 2000; Wilkinson et al. 2001; Shearer et al. 2006; McCarren, 2009). Como exemplo, um estudo realizado com a aplicação de fosfito em um clone de *E. marginata* (326J51), classificado como moderadamente resistente a infecção

por *Phytophthora cinnamomi*, evidenciou a ação direta e indireta do fosfito sobre o patógeno, dependendo da concentração usada. Assim, o fosfito em baixas concentrações atuou como indutor de resistência e em altas concentrações inibiu o patógeno antes da associação com o hospedeiro, permanecendo suas defesas inalteradas (Jackson et al., 2000). Outro nutriente, o potássio (K), tem seu efeito na redução de doenças intimamente relacionado a outros elementos, como cálcio (Ca), magnésio (Mg) e cobre (Cu), bem como o equilíbrio entre eles (Marchner 1995; Biggs et al. 1997; Pozza et al. 2001; Agrios 2005). O K pode aumentar a resistência às doenças por promover rápida recuperação dos tecidos, aumentar a espessura da cutícula e da parede celular, ou ainda gerar um melhor controle estomático (Xu & Heath 1998; Fromm 2010). Um trabalho pioneiro, com o patossistema eucalipto-*Xanthomonas axonopodis*, demonstrou que a intensidade da mancha foliar foi reduzida com o aumento dos níveis de K na solução nutritiva e com a redução da relação N/K (Silva et al. 2005). Com base nestes resultados, algumas modificações nas adubações em viveiros clonais foram facilmente implantadas, reduzindo a incidência da mancha foliar, causada por essa fitobactéria.

Com base nos trabalhos realizados com espécies florestais, e nos relatos de resultados benéficos da atuação de nutrientes na redução das doenças em culturas agrônômicas (Leser & Treutter 2005; Nam et al. 2006; Tavernier et al. 2007; Ros et al. 2008; Xu et al. 2009), acredita-se que a nutrição mineral apresenta grande potencial para reduzir as perdas por doenças na cultura do eucalipto. No caso da eucaliptocultura, é uma medida de controle que pode ser facilmente implantada, na rotina de adubação, tanto em viveiro clonal, quanto no campo. Em virtude do potencial de redução das perdas causadas por doenças, por meio do manejo nutricional das plantas, avaliaram-se neste trabalho os efeitos de diferentes doses de N, P e K, na severidade da mancha foliar e na intensidade da desfolha em *Eucalyptus* spp., causada por *C. pteridis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se solo da região de Três Marias, Minas Gerais, cuja análise química revelou um pH de 5,0, teores de 0,2 e 7 mg.dm⁻³ para P e K, respectivamente, e 0,9 dag.Kg⁻¹ de matéria orgânica. A irrigação foi realizada para se atingir 85 % da capacidade de campo (cc) obtida com base na retenção de umidade do solo, determinada no Laboratório de Física do Solo, do Departamento de Solos, da UFV. Porções de 20 L de solo foram misturados em betoneira com os fertilizantes e as doses correspondentes de N, P e K. Em seguida, o solo foi dividido em quatro porções iguais e colocado em vasos plásticos com capacidade de 5 L. Após 24 h da mistura dos fertilizantes e aplicação de água ao solo, foi realizado o transplântio das mudas.

Os tratamentos consistiram de cinco doses de N (0; 55; 99; 143 e 198 mg.dm⁻³), cinco de P (0; 82,5; 148,5; 214,5 e 297 mg.dm⁻³), e cinco de K (0; 55; 99; 143 e 198 mg.dm⁻³), que foram combinadas de acordo com a matriz Plan Plueba III modificada (Leite 1984), com 2^k + 2k + 1 + 1 tratamentos, sendo k o número de fatores em estudo, acrescido de um ponto (+1) correspondente à dose zero NPK (testemunha). Os níveis máximos e mínimos da matriz foram de -11 a 209 para N (NH₄NO₃); -16,5 a 313,5 para P [Ca(H₂PO₄)₂.H₂O] e -11 a 209 mg.dm⁻³ para K (KCl) (Tabela 1). Assim, foram constituídos 16 tratamentos repetidos por quatro vezes. Empregou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso, sendo a parcela útil composta por uma planta.

As fontes utilizadas de N, P e K foram respectivamente: nitrato de amônio (NH₄NO₃), fosfato monocálcio [Ca(H₂PO₄)₂.H₂O] e cloreto de potássio (KCl), em diferentes concentrações, conforme o tratamento. Os demais nutrientes foram adicionados na mesma proporção para todos os tratamentos, como segue: cálcio (CaCO₃) a 1,5 cmol_c.dm⁻³ de solo; magnésio (MgCO₃) a 0,5 cmol_c.dm⁻³ de solo; enxofre (CaSO₄) a 60 mg.dm⁻³ de solo; e os micronutrientes, boro (H₃BO₃) a 0,63 mg.dm⁻³ de solo; cobre (CuSO₄.5H₂O) a 1,0 mg.dm⁻³ de solo; manganês (MnSO₄.H₂O) a 2,75 mg.dm⁻³ de solo; e zinco (ZnSO₄.7H₂O) a 3 mg.dm⁻³ de solo.

Empregaram-se mudas sadias, de altura uniforme (30 cm) e aparentemente bem nutridas do clone 6021, híbrido de *Eucalyptus grandis* (Rio Claro/SP), com 60 dias de idade. As mudas com raízes nuas e sistema radicular de 10 cm foram transplantadas para vasos sem abertura para o escoamento da água (fechados). As mudas

permaneceram sob telado de sombrite por 15 dias, e durante esse período foram borrifadas com água, três vezes ao dia, no intuito de minimizar os efeitos negativos das raízes nuas e manter a umidade da planta. Além disso, cerca de 20 vasos foram pesados diariamente para o ajuste da cc.

Para o combate de ácaros, pulgões e cochonilhas, após 90 dias do transplântio, as mudas foram pulverizadas com óleo de Neem, a 1 % na primeira semana; Confidor®, princípio ativo (p.a.) imidacloprid, a 0,6 g.L⁻¹ durante as três semanas seguintes e; Vertimec®, p.a. abamectina, a 2 mL.L⁻¹ durante quatro semanas consecutivas. Todos os produtos foram aplicados uma vez por semana em todos os tratamentos.

Foram realizadas duas adubações complementares, aos 170 e 190 dias após o transplântio das mudas, que consistiram de 20 % dos teores de NPK previamente definido nos 16 tratamentos, de modo a não desequilibrar as doses dos nutrientes, seguindo a mesma proporção. Na segunda adubação complementar, adicionou-se também cloreto de cálcio (CaCl₂) a 100 mg.L⁻¹ a todos os tratamentos.

Inóculo

Foi utilizado o isolado monoconidial LPF59, de *C. pteridis*, da micoteca do Laboratório de Patologia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, obtido de amostras de folhas lesionadas coletadas em Monte Dourado, no Pará. Para o preparo do inóculo, discos de cultivo da cultura original de *C. pteridis* foram repicados para placas de Petri contendo meio de aveia-dextrose-ágar (AVDA). As placas foram mantidas a 28 °C, em fotoperíodo de 12 h, por 20 dias, até que o fungo colonizasse toda a superfície do meio de cultura. Após este período, visando estimular a produção de conídios, as culturas do fungo foram submetidas a estresse físico, por meio de deposição de 20 mL de água destilada autoclavada na superfície da cultura. Posteriormente, foi realizada a fricção de um pincel de cerdas macias, autoclavado, na superfície da colônia, de modo a retirar todo o micélio aéreo presente na superfície do meio. Após a remoção do micélio, foram depositados na placa 10 mL de água destilada esterilizada, de modo a submergir a cultura. Decorrido 48 h, o excesso de água foi removido e as culturas mantidas em condições de laboratório por mais 48 h, até a esporulação do patógeno. Para obter a suspensão de inóculo, os conídios foram removidos por meio da deposição de água destilada na superfície da colônia e a raspagem com pincel autoclavado. A suspensão foi filtrada, em camada dupla de gaze esterilizada, e em seguida adicionados 0,05 % de

Tween 20. A concentração da suspensão foi ajustada para 1×10^4 conídios.mL⁻¹ (Graça et al. 2009).

Inoculação

A inoculação foi realizada aos 200 dias após o transplântio das mudas. Dois dias antes da inoculação, folhas de seis ramos do terço basal de cada planta foram contadas e marcadas (Graça et al. 2009). Imediatamente antes da inoculação, coletaram-se três folhas completamente expandidas de cada repetição, totalizando 12 folhas por tratamento, para análise nutricional das folhas antes da infecção. As diferentes doses dos macronutrientes, NPK, incorporadas ao solo refletiram os teores nas folhas expandidas das mudas de eucalipto, à exceção do tratamento testemunha (Tabela 1).

A suspensão de inóculo foi atomizada homogeneamente nas superfícies abaxial e adaxial das folhas das plantas com o auxílio de um pulverizador costal (4 L), acoplado a um regulador de pressão com bico do tipo leque nº 1001. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 48 h, com nebulização a cada 1 h durante 10 s das 6:00 às 18:00 h, e a cada 3 h por 10 s das 18:00 às 6:00 h. Posteriormente, as mudas foram transferidas para casa de vegetação com nebulização a cada 2 h com duração de 20 s das 6:00 às 18:00 h, e a cada 3 h por 10 s das 18:00 às 6:00 h, onde permaneceram até a época de avaliação. Foram anotadas diariamente as temperaturas máximas e mínimas no período em que as plantas permaneceram na câmara de nevoeiro e posteriormente na casa de vegetação até a data de avaliação.

Avaliações

A área foliar lesionada (AFL) foi quantificada aos 45 dias após a inoculação, por meio da captura de imagens digitais do segundo par de folhas (completamente expandidas) a partir da base de ramos situados na parte mediana do terço basal (Graça et al. 2009). As imagens obtidas foram analisadas no programa Quant (Vale et al. 2003), para estimar a porcentagem de área foliar lesionada e, assim, determinar a severidade da doença.

Aos 45 dias após a inoculação, quantificou-se o número de folhas remanescentes no ramo em relação ao número de folhas existentes imediatamente antes da inoculação, para em seguida, calcular a porcentagem de desfolha em cada planta.

Análises estatísticas

Foram ajustadas equações de regressão para as variáveis dependentes: desfolha (%) e área foliar lesionada (%). A desfolha (D) foi representada pela equação linear: $D=2,56 + 0,054 N + 0,035 P - 0,042 K - 0,00032 N K + 0,00008 P K$. Para a área foliar lesionada (AFL) foi ajustada uma equação quadrática: $AFL=4,202 - 0,0075 N - 0,0316 P + 0,0194 K - 0,000353 K^2 + 0,000474 N K$. Para estimar a superfície de resposta, foi ajustado o modelo quadrático às médias dos tratamentos (Alvarez V. 1991). Cada componente do modelo foi testado até o nível de 10% de probabilidade, pelo teste F. A partir das equações estimadas, elaboraram-se gráficos com as respectivas superfícies de resposta com doses de P fixas em 0, 100, 200 e 300 mg.dm⁻³. As equações foram estimadas com o auxílio do programa STATISTICA versão 7.0 (StatSoft 2004) e as superfícies de respostas plotadas no programa SigmaPlot (SIGMAPLOT 1999). Os valores de AFL e D foram submetidos à análise de correlação de Pearson, utilizando o programa SAS (The SAS Institute Inc., Version 6.01, Cary, NC, Estados Unidos).

RESULTADOS

O coeficiente de correlação de Pearson (r) entre as porcentagens de desfolha e de área foliar lesionada foi de 0,097, indicando que não houve associação entre as duas variáveis. Entretanto, a área foliar lesionada (AFL) e a desfolha (D) foram afetadas pelas doses de N, P e K e por suas interações. O N e o K foram os que mais afetaram as variáveis testadas, desta forma, valores de P foram fixados para obter a superfície de resposta e para que a observação dos efeitos de N e K sob a AFL e a D fossem mais abrangentes (Figuras 1 e 2).

O tratamento T16, correspondente à testemunha, em que não foi adicionado ao solo nenhuma dose de NKP demonstrou também as menores doses foliares desses nutrientes, com 0,56, 0,10 e 0,44 dag/Kg de folha, respectivamente. O coeficiente de correlação de Pearson (r) entre as doses adicionadas no solo de N, P e K e os teores destes nutrientes nas folhas foram de 0,81, 0,17 e 0,7, respectivamente, demonstrando que o elemento P não foi expresso nas folhas. A correspondência entre as doses no solo e teores dos nutrientes nas folhas também foi observada para as maiores doses de N e K, à exceção dos T8 e T10 para K em que foi detectado 0,52 e 0,60 dag/Kg de folha (Tabela 1). Nas maiores doses de N e menores de K no solo, a relação N/K na folha se manteve alta, como observado nos tratamentos T5, T7, T10 e T13. Os tratamentos T2, T6 e T11, com doses de K superiores às de P, adicionadas ao solo, resultaram em uma baixa relação P/K nas folhas (Tabela 1).

As plantas no momento da avaliação da desfolha possuíam altura média de 69,0 cm, com desvio padrão de 5,1 cm. Para a variável desfolha foi ajustada uma equação linear ($D=2,56 + 0,054^{**} N + 0,035^{**} P - 0,042^{**} K - 0,00032^{*} N K + 0,00008^{o} P K$) em relação à adubação testada. Foi observado o efeito significativo de N, P e K, e das interações entre N e K, e entre P e K. Os efeitos do N e do P seguiram a mesma tendência, de modo que nos maiores teores de N ou de P obteve-se uma maior porcentagem (%) de desfolha (Figura 1). Já o efeito do K na redução da desfolha foi negativo, assim quanto maior a dose de K, menor a desfolha. As interações N K e P K foram significativas e evidenciaram o efeito importante do K tanto individualizado quanto nas interações, com ambos os nutrientes, na redução da desfolha. A máxima porcentagem de desfolha foi observada, para todos os teores de P, quando as doses máximas de N e mínimas de K foram relacionadas. A menor porcentagem de desfolha foi

obtida nas doses com até 100 mg.dm⁻³ de P, combinado com doses altas de K, variando de 75 a 200 mg.dm⁻³, e baixas de N, inferiores a 100 mg.dm⁻³ (Figura 1).

Manchas foliares pequenas, circulares ou alongadas e de coloração cinza-clara progredindo para marrom-clara são os sintomas da mancha-de-pteridis em plantios de eucalipto no campo. Estas manchas foram observadas em todas as plantas a partir do quinto dia após as inoculações artificiais realizadas sob condições controladas. A severidade da mancha-de-pteridis, expressa pela porcentagem de área foliar lesionada, se relacionou de forma quadrática com NPK segundo a equação: $AFL=4,202 - 0,0075^{\circ} N - 0,0316 P + 0,0194 K - 0,000353^{\circ} K^2 + 0,000474^* N K$. O efeito significativo foi observado para o N, K² e na interação NK, sendo que os demais termos acrescentados (P e K) fazem parte do modelo matemático. O efeito do N na redução da AFL foi negativo, assim quanto maior a dose de N, menor a AFL observada. Entretanto, na interação do N com o K, em que maiores doses de K relacionadas com menores doses de N, foram observados menores valores de AFL (Figura 2). O K apresentou efeito quadrático negativo, indicando sua importância na redução da AFL por *C. pteridis*. Os maiores valores de AFL foram observado em doses altas de N e K relacionadas com baixas doses de P. Porém, os menores valores de AFL foram obtidos em doses de P superiores a 200 mg.dm⁻³, relacionadas a doses de K acima de 100 mg.dm⁻³, e doses N inferiores a 100 mg.dm⁻³ (Figura 2).

DISCUSSÃO

O nitrogênio (N), o fósforo (P) e o potássio (K) influenciaram a intensidade da doença causada por *Cylindrocladium pteridis*, em *Eucalyptus*. Como *C. pteridis* causa mancha foliar e desfolha em *Eucalyptus* foi essencial que as folhas do material vegetal utilizado neste estudo refletissem os tratamentos propostos para que pudéssemos estudar os efeitos da nutrição na intensidade desta doença. Os teores de nutrientes nas folhas corresponderam às doses de N e K incorporados ao solo, desta forma o solo utilizado foi adequado e contribuiu com ínfimas doses dos nutrientes não alterando as relações entre os nutrientes nas folhas. Da mesma forma, o clone 6021 foi eficiente em absorver os nutrientes adicionados ao solo. Assim as relações solo, planta e nutrição foram atingidas em níveis satisfatórios para que o estudo fosse realizado. Entretanto, as plantas apresentaram altura abaixo do esperado, provavelmente devido ao desbalanço nutricional em decorrência dos diferentes tratamentos e da utilização de vasos completamente fechados, o que prejudicou o desenvolvimento normal das raízes e conseqüentemente afetou o crescimento das plantas. Com isso os ramos basais, bem como as folhas não atingiram a maturidade para que a área foliar lesionada correspondesse à desfolha. A correlação entre estas variáveis foi observada em um estudo que se determinou as condições ideais para a inoculação artificial de *C. pteridis* em *Eucalyptus*. Plantas com altura acima de 100 cm foram definidas para que a quantificação da desfolha, expressa no terço basal (0-40 cm), correlacionasse fielmente com a área foliar lesionada pelo fungo (Graça et al. 2009).

O fósforo (P), componente de biomoléculas faz parte de importantes processos metabólicos nas plantas (Marschne 1995; Vance et al. 2003; Walters & Bingham 2007) e pode induzir respostas de defesas a patógenos (Nemestothy and Guest, 1990; Carnegie et al., 2001; Suddaby et al., 2008; Pilbeam et al., 2011). Na adubação é comumente utilizado na forma de fosfato (PO_4), porém este é absorvido em menor quantidade pela planta (Abel et al. 2002; Ghorbani et al., 2008) e translocado principalmente para folhas mais novas, o que possivelmente explica a não correlação entre as doses de P adicionadas no solo e os teores nas folhas. Neste trabalho, o efeito do P na intensidade da mancha-de-pteridis foi contraditório, uma vez que o aumento das doses de P resultou em aumento da D e redução da AFL. Este efeito pode ser explicado pela baixa absorção de PO_4 que limitou o crescimento, em altura, das mudas, e dificultou a quantificação do

efeito da doença em folhas completamente expandidas. Em contraste a este resultado, relatou-se redução da severidade da doença foliar causada por *Mycosphaerella cryptica* em *Eucalyptus globulus*, em maiores doses de P, aplicado na forma de superfosfato simples, sendo que a concentração deste elemento nas folhas correspondeu ao adicionado ao solo após 72 meses. Entretanto, neste mesmo trabalho não se observou os elementos N e K expressos nas folhas, bem como não houve efeito significativo destes na severidade da doença (Carnegie et al., 2001).

Uma alternativa ao uso do fosfato é o emprego da sua forma reduzida o fosfito ($H_2PO_3^-$), mas rapidamente absorvido pelas plantas. Tem-se relatado a eficiência do fosfito no controle de doenças fúngicas em espécies florestais por meio de aplicações foliares ou injetado no tronco (Jackson et al. 2000; Hardy et al. 2001; Wilkinson et al. 2001; Shearer et al. 2006). O fungo *Phytophthora cinnamomi*, tem reduzido a biodiversidade na Austrália por infectar as raízes de árvores nativas causando o seu declínio. Um trabalho com espécies de *Banksia* e *Eucalyptus marginata* demonstrou que o fosfito injetado no tronco destas árvores é uma opção de controle desta doença ao longo do tempo (Shearer et al. 2006). Outro trabalho também utilizando o patossistema *E. marginata*-*P. cinnamomi*, com a aplicação foliar de fosfito, demonstrou que o modo de ação do fosfito pode ser de forma direta ou indireta (Jackson et al. 2000). Assim em altas concentrações, o fosfito, atua inibindo o crescimento do patógeno (Guest & Grant, 1991; Wilkinson et al., 2001; Jackson et al., 2000; Nojosa et al., 2009) e em baixas concentrações estimula a produção das enzimas de defesa da planta (Guest & Bompeix, 1990; Panicker & Gangadharan, 1999). Em decorrência dos resultados benéficos do fosfito na redução de doenças em espécies florestais, a ação de fosfito em manchas foliares de eucalipto causadas por fitopatógenos pode ser estudada visando o seu controle, principalmente com a aplicação foliar.

Estudos têm relatado que a adição de potássio (K) aumenta a resistência de plantas as doenças, desde que não se interfira na absorção de cálcio (Ca), magnésio (Mg) e cobre (Cu), em decorrência da competição pelos sítios de absorção (Marschner, 1995; Saur et al., 2000; Pozza et al., 2001; Silva et al. 2005; May-De-Mio et al. 2008). O K participa de diversos processos fisiológicos, como por exemplo, fotossíntese, turgescência da célula, regulação estomática e sínteses de proteína e de amido nas folhas, cujas funções podem influenciar as fases de estabelecimento de uma doença a nível celular (Xu & Heath, 1998; Agrios, 2005). A relação entre os níveis de K na planta e

a redução de doenças foi relatada em eucalipto para a mancha foliar bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis*, que penetra e inicia sua colonização pelos estômatos. A redução da bacteriose foi observada com o aumento das doses de K e pela redução da relação N/K, e pode, em parte, ser explicada pelo melhor controle estomático proporcionado pelo K e também devido a redução dos teores de açúcares nas folhas (Silva et al. 2005). Estes resultados corroboram com o apresentado neste trabalho, uma vez que menor área foliar lesionada (AFL) foi observada nas baixas relações N/K. As maiores doses de K reduziram a desfolha e a área foliar lesionada causada por *C. pteridis*. Uma das hipóteses para explicar este efeito do K na redução da doença é a influência desse nutriente no maior controle estomático evitando a entrada do patógeno, uma vez que a penetração de *C. pteridis* em eucalipto ocorre principalmente na fase abaxial das folhas via estômatos (Graça et al. 2009). Além disso, os sintomas da mancha-de-pteridis foram avaliados em folhas expandidas no terço basal das plantas e essas, por não possuírem um controle estomático tão eficiente quanto às folhas jovens, provavelmente potencializaram o efeito do K sobre a regulação estomática dificultando a penetração de *C. pteridis*. Outra hipótese para explicar o efeito positivo do K na redução da doença é que com a adição de K as folhas apresentam menor senescência, isto é, possuam maior perspectiva de vida. Um trabalho realizado em um plantio de *Eucalyptus grandis*, demonstrou que com a adubação potássica a expectativa média de vida das folhas marcadas aumenta de 111 para 149 dias (Laclau et al. 2009). Acredita-se que este resultado seja em decorrência da diminuição do declínio da capacidade fotossintética da folha com o envelhecimento e da melhoria nos mecanismos de controle estomático, levando a uma diminuição na quantidade de água transpirada por área de folha.

Dentre os vários efeitos do N sobre a intensidade de doenças em plantas, destaca-se que altos níveis de N podem gerar o desbalanço de outros nutrientes importantes para defesa da planta (Anglberger & Halmschlager 2003), ou proporcionar maior fonte de energia para o crescimento e a sobrevivência dos patógenos (Snoeiijers et al. 2000; Walters & Bingham 2007), ou, ainda, reduzir a produção de alguns compostos inibitórios da planta aos patógenos (Blodgett et al. 2005). No presente trabalho não se determinou o efeito dos nutrientes sobre a planta ou o patógeno. Desta forma, sugere-se que trabalhos futuros sejam realizados para definir o fluxo de nutrientes do hospedeiro para o patógeno e desta forma determinar seus efeitos na intensidade da mancha-de-pteridis em eucalipto, como foi demonstrado no patossistema *Pseudotsuga menziesii* x

Phaeocryptopus gaeumannii, com a utilização de isótopos marcados de ^{15}N (El-Hajj et al. 2004). Neste trabalho observou-se um forte sinergismo entre N e K na redução da doença e alta correlação entre estes nutrientes adicionados ao solo e nos expressos nas folhas. A alta relação N e K foi também observada em frutos de cacaueteiro predispondo-os a infecção por *Moliniophthora* (= *Crinipelis*) *perniciosa*, em duas plantações com características de solos diferentes, uma de terra roxa estruturada eutrófica (TR) e outra de latossolo amarelo (LA) (Morais, 1998). Para o patossistema cafeeiro-*Phoma tarda*, não se observou interação significativa entre o N e o K na redução da mancha de Phoma. Porém as diferentes doses de N e K na solução nutritiva influenciaram a nutrição das mudas de cafeeiro, afetando significativamente os teores de N, K, Ca, S e B na parte aérea das mudas (Lima et al., 2010). Os efeitos dos nutrientes, bem como das interações variam de acordo com o patossistema estudado, as condições ambientais e principalmente das fontes utilizadas de cada nutriente (May-De-Mio et al., 2008; Pozza et al., 2001).

Neste trabalho foi observada a influência de NPK na porcentagem de área foliar lesionada (AFL) e da desfolha (D) causada por *C. pteridis* em *E. grandis*, inoculado sob condições controladas. Desta forma, em um programa de manejo que inclua a nutrição mineral no controle da mancha-de-pteridis em eucalipto, causada por *C. pteridis*, é fundamental estabelecer o equilíbrio entre os nutrientes expressos nas folhas das plantas. Assim, o manejo da adubação, principalmente da potássica, de forma adequada e equilibrada em plantios clonais de eucalipto pode contribuir para a redução da incidência e da severidade da mancha-de-pteridis, minimizando as perdas em volume de madeira devido a desfolhas consecutivas causadas por *C. pteridis*.

Tabela 1. Doses dos nutrientes, nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) para cada tratamento (matriz experimental Pan Plueba III modificado), os teores de N, P e K nas folhas completamente expandidas de cada tratamento no momento da inoculação com *Cylindrocladium pteridis* (LPF59) e as relações entre os nutrientes N/K e P/K presentes na folha

Tratamento	Solo			Folha				
	N	P	K	N	P	K	N/K	P/K
	mg.dm ⁻³ de solo			dag/kg de folha				
T1	55	82,5	55	1,04	0,07	0,68	1,53	0,10
T2	55	82,5	143	0,98	0,08	1,04	0,94	0,08
T3	55	214,5	55	0,92	0,13	0,64	1,44	0,20
T4	55	214,5	143	1,15	0,14	0,92	1,25	0,15
T5	143	82,5	55	1,57	0,09	0,56	2,80	0,16
T6	143	82,5	143	1,29	0,10	1,08	1,19	0,09
T7	143	214,5	55	1,37	0,13	0,56	2,45	0,23
T8	143	214,5	143	1,20	0,06	0,52	2,31	0,12
T9	0	82,5	55	1,12	0,17	0,72	1,56	0,24
T10	198	214,5	143	1,51	0,06	0,60	2,52	0,10
T11	55	0	55	1,20	0,08	0,76	1,58	0,11
T12	143	297	143	1,32	0,14	0,96	1,38	0,15
T13	55	82,5	0	1,15	0,16	0,64	1,80	0,25
T14	143	214,5	198	1,34	0,11	1,24	1,08	0,09
T15	99	148,5	99	1,29	0,12	0,96	1,34	0,13
T16 (Testemunha)	0	0	0	0,56	0,10	0,44	1,27	0,23

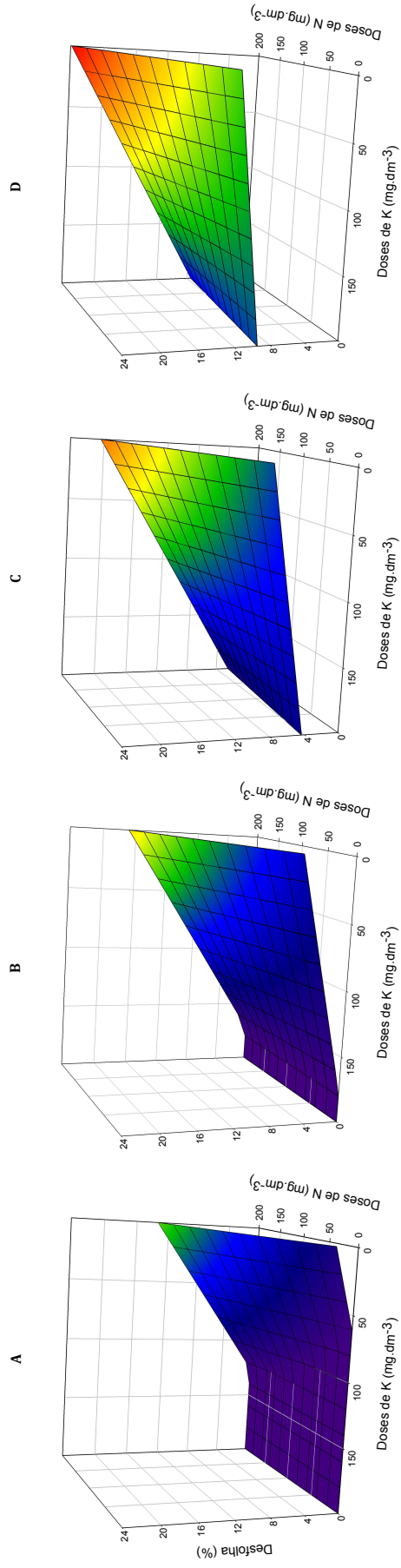


Figura 1. Porcentagem de desfolha (D) do clone 6021, de *Eucalyptus grandis* (híbrido de Rio Claro – SP) causada por *Cylindrocladum pteridis* em solo tratado com diferentes doses de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K). A – Dose de $P=0 \text{ mg.dm}^{-3}$; B – Dose de $P=100 \text{ mg.dm}^{-3}$; C - Dose de $P=200 \text{ mg.dm}^{-3}$; D - Dose de $P=300 \text{ mg.dm}^{-3}$; Equação: $D=2,56 + 0,054^{**} N + 0,035^{**} P - 0,042^{**} K - 0,00032^{*} N K + 0,00008^{*} P K$; $R^2=0,80$. Valores de β seguidos por $^{\circ}$, ** , *** foram significativos a 10, 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

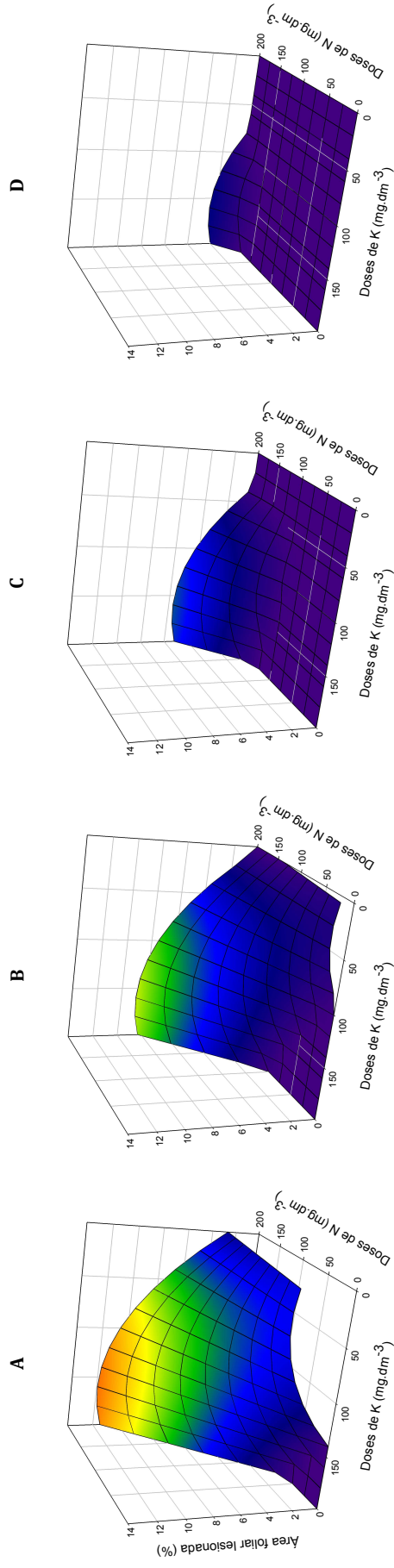


Figura 2. Porcentagem de área foliar lesionada (AFL) do clone 6021, de *Eucalyptus grandis* (híbrido de Rio Claro – SP), causada por *Cylindrocladium pteridis* em solo tratado com diferentes doses de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K). A – Dose de $P=0$ $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$; B – Dose de $P=100$ $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$; C - Dose de $P=200$ $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$; D - Dose de $P=300$ $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$; Equação: $\text{AFL}=4,202 - 0,0075^\circ \text{N} - 0,0316 \text{P} + 0,0194 \text{K} - 0,000353^\circ \text{K}^2 + 0,000474^\circ \text{N K}$; $\text{R}^2=0,93$. Valores de β seguidos por $^\circ$, * foram significativos a 10 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel S, Ticconi CA, Delatorre CA (2002) Phosphate sensing in higher plants. *Physiol Plant* 115 (1):1-8.
- Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press.
- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2009) *Clonagem e doenças do eucalipto*. 2^o ed. Editora UFV, Viçosa. 500p.
- Alvarez V. VH (1991) Avaliação da fertilidade do solo: superfícies de resposta - modelos aproximativos para expressar a relação fator-resposta.
- Anglberger H, Halmschlager E (2003) The severity of *Sirococcus* shoot blight in mature Norway spruce stands with regard to tree nutrition, topography and stand age. *Forest Ecology and Management* 177 (1-3):221-230.
- Biggs AR, El-Kholi MM, El-Neshawy S, Nickerson R (1997) Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. *Plant Disease* 81:399-403
- Blodgett JT, Herms DA, Bonello P (2005) Effects of fertilization on red pine defense chemistry and resistance to *Sphaeropsis sapinea*. *Forest Ecology and Management* 208 (1-3):373-382.
- Carnegie AJ, Ades PK (2001) Added phosphorus is associated with reduced severity of *Mycosphaerella cryptica* in *Eucalyptus globulus*. *Australian Forestry* 30:203-208
- El-Hajj Z, Kavanagh K, Rose C, Kanaan-Atallah Z (2004) Nitrogen and carbon dynamics of a foliar biotrophic fungal parasite in fertilized Douglas-fir. *New Phytologist* 163 (1):139-147.
- Ferreira FA (1989) *Patologia Florestal: Principais doenças florestais no Brasil*. SIF, Viçosa-MG. 570p.
- Ferreira FA, Alfenas AC, Moreira AM, Demuner NL (1995) Mancha-de-pteridis doença foliar de eucalipto em áreas tropicais brasileiras. *Fitopatologia brasileira* 20:107-110.
- Ferreira FA, Milani D (2002) *Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil*. Editora International Paper, Mogi Guaçu-SP. 98p.
- Fromm J (2010) Wood formation of trees in relation to potassium and calcium nutrition. *Tree Physiol* 30 (9):1140-1147
- Ghorbani R, Wilcockson S, Koocheki A, Leifert C (2008) Soil management for sustainable crop disease control: a review. *Environmental Chemistry Letters* 6 (3):149-162.
- Graça RN, Alfenas AC, Maffia LA, Titon M, Alfenas RF, Lau D, Rocabado JMA (2009) Factors influencing infection of eucalyptus by *Cylindrocladium pteridis*. *Plant Pathology* 58 (5):971-981.
- Guest D, Bompeix G (1990) The complex mode of action of phosphonates. *Australasian Plant Pathology* 19 (4):113-115.
- Guest DI, Grant BR (1991) The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews* (66):159-187

- Hardy GESt.J, Barrett S, Shearer BL (2001) The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology* 30:133-139
- Jackson, Burgess, Colquhoun, Hardy (2000) Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* 49 (1):147-154.
- Laclau J-P, Almeida JCR, Gonçalves JLM, Saint-André L, Ventura M, Ranger J, Moreira RM, Nouvellon Y (2009) Influence of nitrogen and potassium fertilization on leaf lifespan and allocation of above-ground growth in *Eucalyptus* plantations. *Tree Physiology* 29 (1):111-124.
- Leite RA (1984) Uso de matrizes experimentais e de modelos estatísticos no estudo de equilíbrio fósforo-enxofre na cultura da soja em amostras de dois latossolos de Minas Gerais. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 87p.
- Leser C, Treutter D (2005) Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. *Physiol Plantarum* 123 (1):49-56.
- Lima LMD, Pozza EA, Torres HN, Pozza AAA, Salgado M, Pfenning LH (2010) Relação nitrogênio/potássio com mancha de *Phoma* e nutrição de mudas de cafeeiro em solução nutritiva. *Tropical Plant Pathology* 35:223-228
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2° ed. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- May-De-Mio LL, Tutida I, Motta ACV, Dolinski MA, Serrat BM, Monteguti D (2008) Doses de aplicação de nitrogênio e potássio em relação à podridão parda e sarna em ameixeira 'Reubennel' na região de Araucária, Paraná. *Tropical Plant Pathology* 33:35-40.
- McCarren KL, McComb JA, Shearer BL, Hardy GESJ (2009) Phosphite impact on the *in vitro* production and viability of selfed oospores by *Phytophthora cinnamomi*. *Forest Pathology* 39 (2):124-132.
- Morais FIO (1998) Respostas do cacauzeiro à aplicação de N, P e K em dois solos da amazônia brasileira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 22:63-69
- Nam MH, Jeong SK, Lee YS, Choi JM, Kim HG (2006) Effects of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium nutrition on strawberry anthracnose. *Plant Pathology* 55 (2):246-249.
- Nemestothy GS, Guest DI (1990) Phytoalexin accumulation, phenylalanine ammonia lyase activity and ethylene biosynthesis in fosetyl-Al treated resistant and susceptible tobacco cultivars infected with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37 (3):207-219.
- Nojosa GBA, Resende MLV, Barguil BM, Moraes SRG, Vilas Boas CH (2009) Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de *Phoma*. *Summa Phytopathologica* 35:60-62.
- Panicker S, Gangadharan K (1999) Controlling downy mildew of maize caused by *Peronosclerospora sorghi* by foliar sprays of phosphonic acid compounds. *Crop Protection, Amsterdã*, 18 (2):115-118

- Pilbeam R, Howard K, Shearer B, Hardy G (2011) Phosphite stimulated histological responses of *Eucalyptus marginata* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Trees - Structure and Function* 25 (6):1121-1131.
- Pozza AAA, Prieto Martinez HE, Caixeta SL, Cardoso AA, Zambolim L, Pozza EA (2001) Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36:53-60
- Ros B, Mohler V, Wenzel G, Thummler F (2008) *Phytophthora infestans*-triggered response of growth- and defense-related genes in potato cultivars with different levels of resistance under the influence of nitrogen availability. *Physiol Plant* 133 (2):386-396.
- Saur E, Nambiar EK, Fife DN (2000) Foliar nutrient retranslocation in *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiol* 20 (16):1105-1112
- Shearer BL, Fairman RG, Grant MJ (2006) Effective concentration of phosphite in controlling *Phytophthora cinnamomi* following stem injection of *Banksia* species and *Eucalyptus marginata*. *Forest Pathology* 36 (2):119-135.
- SIGMAPLOT (1999) Exact Graphy for Exact Science. Version 8.0 ed.
- Silva AG, Alfnas AC, Barros NF, Sartório RC, Fonseca S Influência de nutrientes e de Aminon-25 na severidade da mancha foliar de eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis*. In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Brasília, 2005. Anais do XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Sociedade Brasileira de Fitopatologia, pp s7-s425.
- Snoeijs SS, Pérez-García A, Joosten MHAI, De Wit PJGM (2000) The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 106:493-506.
- StatSoft I (2004) STATISTICA (data analysis software system). 7 ed.
- Suddaby T, Alhussaen K, Daniel R, Guest D (2008) Phosphonate alters the defence responses of *Lambertia* species challenged by *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany* 56 (6):550-556.
- Tavernier V, Cadiou S, Pageau K, Lauge R, Reisdorf-Cren M, Langin T, Masclaux-Daubresse C (2007) The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *J Exp Bot* 58 (12):3351-3360.
- Vale FXR, Fernandes Filho EI, Liberato JR (2003) QUANT. A software plant disease severity assessment. 8th International Congress of Plant Pathology. Christchurch New Zealand.
- Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* (157):423-447.
- Walters DR, Bingham IJ (2007) Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *Ann Appl Biol* 151:307-324.
- Wilkinson CJ, Holmes JM, Dell B, Tynan KM, McComb JA, Shearer BL, Colquhoun IJ, Hardy GESJ (2001) Effect of phosphite on in planta zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* 50 (5):587-593.

- Xu H, Heath MC (1998) Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell* 10 (4):585-598
- Xu L, Niu J, Li C, Zhang F (2009) Growth, nitrogen uptake and flow in maize plants affected by root growth restriction. *J Integr Plant Biol* 51 (7):689-697.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que:

1. Foram detectados cinco QTLs, Rd-1, Rd-2, Rd-3, Rd-4 e Rd-5 associados à resistência a mancha-de-pteridis em *Eucalyptus* spp., pela análise de intervalo composto;
2. Pela análise de intervalo simples, 18 marcadores microssatélites foram significativos na família EU11 x EC06;
3. O QTL, Rd-2, localizado no grupo de ligação 1 (LG1), foi validado em duas famílias de irmãos completos distintas;
4. Ganhos imediatos quanto a resistência à mancha-de-pteridis podem ser obtidos com a propagação clonal dos indivíduos resistentes selecionados dentro das famílias;
5. Altas doses de K reduziram significativamente a D e a AFL;
6. Foi observado sinergismo entre N K e P K, evidenciando o efeito importante do K tanto individualizado quanto nas interações, com ambos os nutrientes, na redução da desfolha;
7. O manejo da adubação, principalmente da potássica, de forma adequada e equilibrada em plantios clonais de eucalipto é indicado para reduzir a incidência e a severidade da mancha-de-pteridis.