

DAVI THEODORO JUNGHANS

QUANTIFICAÇÃO DA SEVERIDADE, HERANÇA DA RESISTÊNCIA E  
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES RAPD LIGADOS À RESISTÊNCIA À  
FERRUGEM (*Puccinia psidii*) EM *Eucalyptus grandis*

Tese apresentada a  
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  
2000

A Deus, sempre presente na minha vida.

À Tatiana, minha esposa e companheira.

A meus filhos Esther e Filipe, motivos de alegria constante.

Aos meus pais e irmãos.

Aos meus irmãos em Cristo.

## AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização dos cursos de graduação, mestrado e doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante o doutorado.

À Companhia Suzano de Papel e Celulose, nas pessoas dos engenheiros Shinitiro Oda e Eduardo José de Mello, pelo financiamento parcial e pela cessão do material genético de *Eucalyptus grandis* utilizado nesta tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao CNPq, pelos recursos e bolsas concedidos para realização desta pesquisa.

Ao professor Acelino Couto Alfenas, pela orientação, amizade e confiança em mim depositada no desenvolvimento deste trabalho, pioneiro na área de Patologia Florestal no Brasil.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pela amizade, pelas sugestões e pelo aconselhamento.

Aos membros da banca examinadora e ao pesquisador Dário Grattapaglia, pelas sugestões.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Florestal e Genética de Interação Planta-Patógeno, pela convivência e amizade, em especial a Adélica Xavier, Adriana Cheavegatti, Douglas Lau, Danival Freitas, Eduardo Campinhos, Elene Yamazaki (Miki), Elisa Alves, Gaus Silvestre Lima, Julio Cezar Oliveira, Luiz Artur do Valle, Marcelo Luiz de Laia, Ricardo Rodrigues e Rodrigo Serpa Leite.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia (DFP), pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do DFP, que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial a João Bosco (Nozinho) e Renildo, bem como às auxiliares Micheline e Márcia.

## BIOGRAFIA

DAVI THEODORO JUNGHANS, filho de Theodoro Kurt Junghans e Marília Junghans, nasceu em Curitiba, Paraná, em 11 de abril de 1967.

Seu ensino fundamental foi realizado de 1974 a 1981, na Escola Estadual de Primeiro Grau “Antonino Messina”, e o ensino secundário, de 1982 a 1984, no Colégio Técnico Agrícola “Benedito Storani”, ambos em Jundiaí, São Paulo.

Em 1985, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em Agronomia em agosto de 1990.

Em 25 de novembro de 1991, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na UFV, defendendo a tese intitulada “Diversidade genética de isolados do fungo *Pisolithus tinctorius* por marcadores RAPD”, em 1º de agosto de 1994.

De novembro de 1994 a fevereiro de 1996, foi bolsista DTI do CNPq, desenvolvendo pesquisas com o fungo *Cylindrocladium* spp., no Laboratório de Patologia Florestal e Genética de Interação Planta-Patógeno/BIOAGRO, do Departamento de Fitopatologia da UFV.

Em março de 1996, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Fitopatologia na UFV, submetendo-se à defesa de tese em 21 de julho de 2000.

Em dezembro de 1998, foi contratado, como pesquisador, pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, no Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia.

## CONTEÚDO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
CAPÍTULO 1 .....	4
1. INTRODUÇÃO .....	4
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	5
2.1. Avaliação da severidade.....	5
2.2. Comprovação das classes de severidade .....	6
3. RESULTADOS .....	7
3.1. Avaliação da severidade .....	7
3.2. Comprovação das classes de severidade .....	8
4. DISCUSSÃO .....	10
CAPÍTULO 2 .....	13
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
2.1. Herança da resistência .....	14
2.2. Resistência de <i>Eucalyptus grandis</i> G21 a diferentes isolados de <i>Puccinia psidii</i> .....	15
3. RESULTADOS .....	15
3.1. Herança da resistência.....	15
3.2. Resistência de <i>Eucalyptus grandis</i> G21 a diferentes isolados de <i>Puccinia psidii</i> .....	18
4. DISCUSSÃO .....	18
CAPÍTULO 3 .....	25
1. INTRODUÇÃO .....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	27
2.1. Material vegetal .....	27
2.2. Extração de DNA total e ensaio RAPD.....	27
2.3. Identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à ferrugem .....	28
2.4. Construção de grupos de ligação com marcadores RAPD.....	29
3. RESULTADOS .....	30
3.1. Identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à ferrugem .....	30
3.2. Construção de grupos de ligação com marcadores RAPD.....	32
4. DISCUSSÃO .....	35
CONCLUSÕES GERAIS.....	37
BIBLIOGRAFIA.....	38

## RESUMO

JUNGHANS, Davi Theodoro, D.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2000. **Quantificação da severidade, herança da resistência e identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis*.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Conselheiros: Sérgio Hermínio Brommonschenkel e Dário Grattapaglia.

Utilizando o tamanho das pústulas e o número de soros como critérios para avaliar a severidade, estabeleceu-se a seguinte escala de notas para quantificação da ferrugem em mudas inoculadas de *Eucalyptus*: S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade, com necrose ou “fleck”; S1 = pústulas puntiformes, < 0,8 mm de diâmetro, com uma ou duas uredínias; S2 = pústulas medianas, de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro, com aproximadamente 12 uredínias; e S3 = pústulas grandes, > 1,6 mm de diâmetro, com 20 ou mais uredínias. Aferiu-se a utilidade dessa escala utilizando marcadores RAPD, geneticamente ligados a um gene de resistência à ferrugem, em uma progênie de *E. grandis*. Plantas das classes S0 e S1 apresentaram os referidos marcadores e foram consideradas resistentes. Plantas das classes S2 e S3 não apresentaram aqueles marcadores e foram consideradas suscetíveis. O erro na classificação entre plantas resistentes e suscetíveis foi apenas de 8%, o que se deveu à proximidade dos limites superior e inferior no tamanho das pústulas das classes S1 e S2, respectivamente. O uso dessa escala permitiu a seleção de grande número de materiais resistentes à ferrugem com relativas rapidez, facilidade e precisão. Mediante a inoculação artificial e a avaliação da severidade entre os 12 e 24 dias após a inoculação em famílias de irmãos-completos de *E. grandis*, identificou-se, no clone G21, um gene de efeito principal na resistência à ferrugem, aqui denominado *Ppr1* (*Puccinia psidii* resistance, gene 1). A inclusão de plantas da classe S1 entre as plantas resistentes indicou que, além de *Ppr1*, outros genes de efeito secundário podem atuar na resistência à ferrugem. Esse foi o primeiro caso de identificação de um gene de resistência à ferrugem em *Eucalyptus* e um dos poucos genes de efeito principal em patossistema não co-evoluído. Utilizando

uma progênie de *E. grandis*, constituída de 994 indivíduos segregantes para resistência à ferrugem, identificaram-se seis marcadores RAPD ligados ao gene *Ppr1*. O marcador AT9/917 apresentou completa co-segregação com o gene *Ppr1* em todas as plantas segregantes avaliadas, indicando localizar-se a uma distância genética máxima estimada de 0,462 cM de *Ppr1*. Esse marcador foi clonado e seqüenciado, não revelando homologia significativa com seqüências depositadas em bancos de dados. No entanto, esse marcador poderá ser utilizado na clonagem posicional de *Ppr1*.

## ABSTRACT

JUNGHANS, Davi Theodoro, D.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2000.

**Rust (*Puccinia psidii*) severity evaluation, inheritance of resistance and identification of RAPD markers linked to resistance in *Eucalyptus grandis*.** Adviser: Acelino Couto Alfenas. Committee members: Sérgio Hermínio Brommonschenkel and Dario Grattapaglia.

Based on the number of sorus and pustule size, a rating scale was developed for evaluation of rust severity in inoculated seedlings of *Eucalyptus* as follow: S0 = immunity or hypersensitive reaction, with necrosis or fleck; S1 = small pustules, < 0,8 mm diameter, with one or two uredinia; S2 = medium sized pustules, from 0,8 to 1,6 mm diameter, with approximately 12 uredinia and S3 = large pustules, > 1,6 mm diameter, with 20 or more uredinia. Plants belonging to S0 and S1 classes were considered resistant and those belonging to S2 and S3 classes, susceptible. The error in the classification of resistant and susceptible plants was of only 8%. The error is due to similarities in pustule size among plants at the upper limit in the S1 class with plants at the lower limit in the S2 class. The use of this scale allows the screening of rust resistant genotypes. The segregation ratio of resistant to susceptible plants in artificially inoculated *E. grandis* full-sib progenies suggested that rust resistance is controlled by a major gene, designated *Ppr1* (after *Puccinia psidii* resistance, gene 1). Inclusion of plants belonging to S1 class suggests that, besides *Ppr1*, other genes of minor effect can be involved in rust resistance. This is the first case of a resistance gene identified in *Eucalyptus* and one of the few of single inheritance in non-coevolved pathosystems. Using a full-sib progeny of 994 individuals of *E. grandis*, six RAPD markers linked to the *Ppr1* gene were identified. The AT9/917 marker was tightly linked to *Ppr1* gene, although sequence does not reveal homology with previously characterized resistance genes in other plant species. This marker can be used as a starting point to positional cloning of *Ppr1*.

## INTRODUÇÃO GERAL

O eucalipto é a espécie florestal de maior importância econômica do mundo. Estimativas do ano de 1985 indicaram que a área cultivada mundialmente era superior a seis milhões de hectares (Eldridge et al., 1994), sendo certamente muito maior atualmente. Cerca de 40% da área plantada com *Eucalyptus* no mundo encontra-se no Brasil (Eldridge et al., 1994). A colheita do eucalipto para industrialização ocorre aos sete anos, num regime que permite até três rotações sucessivas e econômicas, com ciclo de 21 anos. Plantios clonais de híbridos de *Eucalyptus* atingem a produtividade de 45 m<sup>3</sup>/ha/ano (Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000).

Somente no Brasil são plantados cerca de 150 mil hectares de eucalipto, anualmente. A área plantada com essa essência florestal no país aumentou de aproximadamente 2,5 milhões de hectares em 1985 (Eldridge et al., 1994) para mais de 3,5 milhões em 1990 (Ferreira & Santos, 1997). O aumento da área cultivada tem demonstrado claramente o interesse do setor florestal por essa espécie.

Em relação ao mercado interno, o setor de base florestal brasileiro gera receitas da ordem de US\$20 bilhões, oferecendo 700 mil empregos diretos e 2 milhões indiretos. Contribuiu, em 1999, com US\$2 bilhões em impostos e participou com 4% no PIB nacional. Nesse cenário, o Brasil exportou cerca de US\$3,5 bilhões no ano de 1999, sendo a celulose de eucalipto o produto de base florestal com participação mais expressiva no mercado mundial, com 5,2% dos negócios internacionais (Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000).

A indústria baseada na utilização de recursos florestais é igualmente expressiva, sendo o Brasil o sétimo maior produtor de celulose do mundo e o 11<sup>o</sup> colocado entre os países fabricantes de papel (Valverde, 2000). Para o plantio anual de cerca de 150 mil hectares são produzidas em torno de 300 milhões de mudas, a maioria de origem clonal por estaquia, para atender à crescente demanda de madeira para serraria, carvão vegetal, celulose e papel (Valverde, DEF/UFV, informação pessoal).

Até a década de 70, o eucalipto era considerado essência florestal praticamente livre de doenças. Todavia, o avanço das áreas reflorestadas para regiões mais quentes e úmidas, o plantio de espécies mais suscetíveis e a utilização repetitiva de uma mesma área para plantio criaram condições

favoráveis à ocorrência de doenças. Dentre elas, a ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter, e o cancro, causado por *Cryphonectria cubensis* (Bruner) Hodges, são as mais limitantes do estabelecimento de novos plantios e da condução de brotações de algumas espécies e procedências de *Eucalyptus* (Ruiz et al., 1987; Ferreira, 1989).

A ferrugem do eucalipto foi relatada pela primeira vez no Brasil, em 1929 (Gonçalves, 1929), e formalmente descrita em 1944 (Joffily, 1944). Atualmente, constitui uma das mais importantes doenças do *Eucalyptus* no país. Incide tanto em mudas no viveiro quanto em plantas jovens no campo até os estádios fenológicos A e B (Ferreira, 1989), aproximadamente nos dois primeiros anos de plantio, em brotações após o corte raso e em jardins e minijardins clonais. A ferrugem constitui um dos fatores limitantes do estabelecimento de *E. cloeziana* F. Muell. e da condução da rebrota após o corte raso no sudeste da Bahia (Ruiz et al., 1989c). Em 1987, cerca de 122 ha de *E. cloeziana* foram praticamente dizimados em Teixeira de Freitas - BA em razão do ataque de *P. psidii* (Ruiz et al., 1987). Nas regiões do Vale do Rio Doce, cerrado e Zona da Mata de Minas Gerais, nordeste do Espírito Santo e sudeste da Bahia, de 1979 a 1980, ocorreram ataques severos da ferrugem em *E. cloeziana* e em *E. grandis*, com procedência da África do Sul (A.S.). Em Ipatinga, MG, mais de 300 hectares de *E. grandis* - A.S., com seis meses de idade, foram dizimados pela doença (Ferreira, 1983).

*Puccinia psidii* é nativo da América do Sul e encontra-se amplamente distribuído nas Américas do Sul e Central e nas ilhas do Caribe (Laudon & Waterston, 1965; Di Stefano et al., 1998), havendo ainda relatos da sua presença na Jamaica (Maclachlan, 1938) e na Flórida - EUA (Marlatt & Kimbrough, 1979; Rayachhetry et al., 1997). Além do eucalipto, o patógeno infecta outras espécies de Myrtaceae, como goiabeira, jambeiro, jabuticabeira, araçazeiro, pitangueira e jamelãozeiro, dentre outras. Nesses hospedeiros, além de tecidos vegetativos meristemáticos, o fungo infecta flores e frutos em desenvolvimento, podendo ocasionar perdas significativas (Alfenas et al., 1989). Provavelmente a ferrugem em eucalipto seja causada por isolados do patógeno provenientes das mirtáceas nativas, com capacidade de infectar também espécies de *Eucalyptus* (Castro et al., 1983).

*Puccinia psidii* ainda não foi encontrado na Austrália, centro de origem do *Eucalyptus* (Coutinho et al., 1998). Naquele país só há, no momento, relatos

de duas ferrugens em Myrtaceae, sendo uma das quais causada por *Puccinia cygnorum* Shivas & Walker em *Kunzea ericifolia* (Sm) Rchb. ex Heynh, uma espécie arbustiva utilizada em arranjos florais (Shivas & Walker, 1994).

O controle da ferrugem pode ser feito por meio de aplicação de fungicidas, colheita de materiais suscetíveis em épocas desfavoráveis à doença (escape pela época) e plantio de materiais resistentes. Em materiais suscetíveis de alto valor comercial, pode-se aplicar triadimenol a 0,5 g ou 0,5 mL i.a./L, a cada 20 dias, nas brotações após o corte raso e em jardins clonais (Alfenas et al., 1993). O plantio de genótipos de *Eucalyptus* de rápido crescimento é também uma medida preconizada (Ferreira, 1983). Todavia, a utilização da resistência genética é a medida de controle mais indicada, por ser de menor custo, facilmente exequível e por reduzir o impacto de fungicidas no ambiente (Alfenas et al., 1989).

É possível selecionar espécies, procedências, progênies ou clones de *Eucalyptus* resistentes para plantios comerciais ou para serem usados nos programas de melhoramento genético, a partir de infecções naturais no campo, em áreas onde a enfermidade é severa, ou preferencialmente por meio de inoculações artificiais do patógeno em mudas, em condições controladas (Carvalho, 1992). Embora a seleção de materiais resistentes ocorra com sucesso nas empresas florestais, nada se conhece sobre a herança da resistência no patossistema *P. psidii* - *Eucalyptus*, fundamental para determinar as estratégias de cruzamentos em programas de melhoramento.

Nessa tese, determinou-se o modelo de herança e foi identificado um gene de efeito principal na resistência à ferrugem em *E. grandis*. A tese encontra-se dividida em três capítulos. No Capítulo 1, estabeleceu-se uma escala de notas para quantificação da severidade da ferrugem em *Eucalyptus*. No Capítulo 2, estudou-se a herança da resistência à ferrugem, mediante a análise de segregação da resistência em progênies de *E. grandis*, inoculadas com um isolado monopustular de *P. psidii*. No Capítulo 3, identificaram-se marcadores RAPD ligados ao gene de efeito principal na resistência de *E. grandis* à ferrugem.

# CAPÍTULO 1 - ESCALA DE NOTAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA FERRUGEM EM *Eucalyptus*

## 1. INTRODUÇÃO

A ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) é uma das doenças mais severas na cultura do eucalipto no Brasil, com potencial de causar perdas em outras áreas tropicais e subtropicais do mundo que possuam florestas naturais ou plantadas de *Eucalyptus* (Coutinho et al., 1998). O controle da doença pode ser feito por meio de fungicidas, colheita de árvores para aproveitamento da rebrota em época desfavorável à ferrugem e utilização de plantas resistentes, sendo esta última medida a mais indicada por seu menor custo, exequibilidade e menor impacto no ambiente graças à redução do uso de fungicidas (Alfenas et al., 1989).

A identificação de fontes de resistência à ferrugem em *Eucalyptus* tem sido feita a partir de infecções naturais, em áreas onde a enfermidade é severa ou, preferencialmente, mediante inoculação artificial, em condições controladas (Carvalho et al., 1998). Para avaliação da resistência à ferrugem sob infecção natural, tem-se utilizado o índice de ferrugem, que considera a percentagem média de plantas doentes e o número médio de pústulas em 100 folhas de cada árvore (Dianese et al., 1984) ou o percentual de folhas (PFF) e ramos (PRF) com ferrugem (Ruiz et al., 1989c). No entanto, para avaliação da resistência à ferrugem em plantas inoculadas artificialmente, têm-se utilizado o número de soros totais (urediniais, teliais e mistos) em 2,4 cm<sup>2</sup> de área foliar (Ruiz et al., 1989a); os componentes de resistência, como período latente médio, frequência de infecção, intensidade de infecção, produção de urediniosporos, período infeccioso e período latente (Castro, 1983; Coelho, 1988); e a distribuição e o tamanho de pústulas no limbo foliar (Ferreira & Silva, 1982).

As metodologias utilizadas na avaliação da resistência sob infecção natural têm considerado a incidência e não a severidade, como recomendado para ferrugens (Kranz, 1988), e estão sujeitas a variações de ambiente e do patógeno, o que pode levar a conclusões conflitantes, como a classificação de um mesmo genótipo ora como medianamente suscetível, ora como resistente (Dianese et al., 1984; Dianese et al., 1986).

Dentre as metodologias usadas para avaliar a resistência em plantas inoculadas artificialmente, a contagem do número de soros e a análise dos componentes de resistência apresentam as seguintes desvantagens: a) são inviáveis quando se avalia grande número de amostras; b) necessitam de equipamentos de microscopia, que nem sempre estão disponíveis; e c) morosidade na análise. Já a distribuição e o tamanho das pústulas são critérios exeqüíveis, mas as condições de ambiente e de inoculação descritas por Ferreira & Silva (1982) são diferentes daquelas otimizadas para infecção da ferrugem do eucalipto (Ruiz et al., 1989a); acrescenta-se que não há relação entre tamanho de pústulas e sua distribuição na folha. A distribuição de pústulas na folha relaciona-se com a distribuição de esporos do patógeno, enquanto tamanho da pústula se relaciona com a suscetibilidade do hospedeiro e com a agressividade do patógeno.

Portanto, não existe, atualmente, metodologia padronizada e de fácil aplicação para avaliar a resistência à ferrugem em *Eucalyptus*. Diante da necessidade de analisar a severidade em grande número de plantas, desenvolveu-se uma escala simples e precisa de notas para avaliação da resistência à ferrugem em plantas artificialmente inoculadas, considerando a classe de severidade de acordo com o tamanho da pústula e o número de uredínias/pústula.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Avaliação da severidade**

Foram utilizados clones, progênies de meios-irmãos e progênies de irmãos-completos de *E. grandis* da Companhia Suzano de Papel e Celulose.

Usou-se um isolado monopustular de *P. psidii*, UFV-2, obtido em área de plantio de *Eucalyptus* em Itapetininga, SP. Esse isolado foi mantido em mudas de jambeiro (*Syzygium jambos* (L.) Alston), mediante reinoculações periódicas a cada 15-20 dias. Os esporos coletados em mudas de jambeiro, aos 12 dias após a inoculação (d.a.i.), foram dispersos em água + Tween 80 a 0,05% em tubos de ensaio, com o auxílio de um agitador magnético tipo Vortex. A suspensão foi ajustada para  $2 \times 10^4$  esporos/mL e atomizada homogeneamente nas superfícies abaxial e adaxial das terceiras e quartas

folhas apicais das mudas de *Eucalyptus*, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acoplado a um compressor elétrico ajustado a 0,6-0,8 kgf/cm<sup>2</sup> de pressão. Após a inoculação, as mudas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 24 horas no escuro, a 25 °C, sendo posteriormente mantidas a 22 °C com fotoperíodo de 12 horas (Ruiz et al., 1989a; Ruiz et al., 1989b) e intensidade luminosa de 40 μmoles fótons/m/s.

Em inoculações prévias, notou-se uma resposta diferencial nas plantas inoculadas, expressa como classes distintas de tamanho das pústulas. Dessa forma, preconizou-se uma escala com quatro graus distintos de severidade: S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade, com necrose ou "fleck"; S1 = pústulas puntiformes; S2 = pústulas de tamanho mediano, com esporulação mais abundante que S1; e S3 = pústulas grandes e esporulação intensa em ambas as faces das folhas, podendo ocorrer em pecíolos e hastes jovens.

Para definir os termos "puntiforme", "mediano" e "grande", avaliou-se, aos 12 d.a.i., o diâmetro de 40 pústulas e foi contado o número de soros urediniais em folhas representando cada classe de severidade, mediante o uso de uma escala métrica acoplada à ocular de uma lupa estereoscópica. A relação entre o valor da escala da ocular e o valor métrico real foi obtida pela determinação do fator de escala, para as ampliações de 25 e 50X usadas nessa mensuração.

## **2.2. Comprovação das classes de severidade**

Determinou-se a classe de severidade de 118 indivíduos da progênie obtida do cruzamento entre os clones G38 (suscetível) e G21 (resistente). Para confirmação dessa avaliação, foram utilizados os marcadores AT9/917, AV10/765, AM6/440, AC8/1180, AE9/750 e K1/1130, derivados da região genômica que contém o gene de efeito principal na resistência (Capítulo 3). O marcador AT9/917 apresentou completa co-segregação com esse gene na progênie G38 x G21, ou seja, todas as plantas com este marcador foram resistentes e todas as sem ele foram suscetíveis (Junghans et al., 1999; Capítulo 3).

A progênie de G38 x G21, composta por 1.000 plantas, foi dividida em quatro lotes para avaliação da severidade, feita sempre na terceira e quarta

folhas apicais de cada muda inoculada. O primeiro lote, com 118 plantas, foi avaliado aos 12 e aos 24 d.a.i., e os três lotes restantes (com 312, 360 e 210 plantas) o foram aos 12 d.a.i.. A avaliação de severidade de cada planta foi, na maioria das plantas, realizada independentemente por dois avaliadores. Quando a classe de severidade de uma mesma planta diferia entre os avaliadores, uma avaliação conjunta era conduzida entre 16 e 18 d.a.i., obtendo-se um resultado comum.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Avaliação da severidade

Definiram-se o tamanho médio das pústulas e o número médio de soros em plantas das classes S1, S2 e S3 de severidade, bem como seus limites superiores e inferiores (Quadro 1).

Quadro 1 – Diâmetro de pústulas e número de soros urediniais nas classes S1 a S3 de severidade da ferrugem do eucalipto

Classe	Diâmetro das Pústulas (mm)			Número de Soros Urediniais		
	Médio	Mínimo	Máximo	Médio	Mínimo	Máximo
S1	0,527 ( $\pm$ 0,19)	0,201	1,007	1,78 ( $\pm$ 0,85)	1	4
S2	1,223 ( $\pm$ 0,37)	0,806	1,813	9,92 ( $\pm$ 4,52)	3	22
S3	2,146 ( $\pm$ 0,52)	1,271	3,875	28,19 ( $\pm$ 7,74)	16	42

Considerando o diâmetro e o número de soros de cada pústula, definiu-se a seguinte escala de notas (Figura 1): S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade (HR), com necrose ou “fleck”; S1 = pústulas puntiformes, < 0,8 mm de diâmetro, com uma ou duas uredínias; S2 = pústulas medianas, de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro, com aproximadamente 12 uredínias; e S3 = pústulas grandes, > 1,6 mm de diâmetro, com 20 ou mais uredínias, podendo ocorrer em pecíolos e hastes jovens.



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

### 3.2. Comprovação das classes de severidade

Das 118 plantas do primeiro lote, avaliadas inicialmente aos 12 d.a.i., 59 foram resistentes (S0 ou S1). Duas das plantas classificadas como S1 não apresentaram o marcador RAPD AT9/917, enquanto entre as 59 consideradas suscetíveis (S2 ou S3) três classificadas como S2 apresentaram o referido marcador. Essas plantas não puderam ser reinoculadas, pois, no período entre a primeira inoculação e a avaliação da presença/ausência do marcador AT9/917, algumas dessas plantas foram perdidas.

Duas hipóteses podem justificar a avaliação errônea dessas cinco plantas: recombinação entre o gene de resistência e o marcador RAPD ou erro na avaliação da resistência. Para dirimir essa dúvida, avaliou-se a presença dos outros cinco marcadores ligados ao gene de resistência (Capítulo 3) em todas as 118 plantas desta progênie. Entre as 59 plantas resistentes (S0 ou S1), 57 apresentaram todos ou a maioria dos outros cinco marcadores, e as duas plantas S1 que não apresentaram AT9/917 também não o fizeram com relação aos demais marcadores. Entre as 59 plantas suscetíveis, 56 não apresentaram a maioria dos cinco marcadores, enquanto que as três plantas S2 que apresentaram o marcador AT9/917 também exibiram os demais marcadores ligados à resistência à ferrugem.

Como não foram encontradas plantas da classe S0 com ausência dos marcadores, nem plantas S3 com os marcadores RAPD derivados da região que contém o gene de resistência, concluiu-se que os erros no uso da escala de severidade foram decorrentes da classificação errônea de algumas plantas nas classes S1 e S2, e não da recombinação genética.

Na avaliação das 118 plantas aos 24 d.a.i., classificaram-se 61 como resistentes e 57 como suscetíveis. Ao confrontar os dados desta segunda avaliação com a presença dos seis marcadores associados ao gene de resistência, constatou-se que apenas uma planta tinha sido avaliada erroneamente. Portanto, ao menos para esta progênie, 24 d.a.i. parece ser a melhor data de avaliação da resistência, utilizando-se a escala proposta.

Comparando a avaliação das 118 plantas efetuada aos 12 e aos 24 d.a.i., observaram-se mudanças entre classes de severidade em uma mesma planta, com tendência de aumento na severidade da doença sem, contudo, alterar significativamente a proporção de plantas resistentes e suscetíveis, com 59R:59S aos 12 d.a.i. e 61R:57S aos 24 d.a.i. (Quadro 2). Em algumas plantas ocorreu redução da severidade em razão do início de ressecamento de pústulas, com o desaparecimento da esporulação. Todavia, a maioria das plantas permaneceu na mesma classe de severidade.

Quadro 2 – Dinâmica da severidade da ferrugem do eucalipto em plantas da progênie G38 x G21, avaliadas aos 12 e aos 24 dias após a inoculação (d.a.i.)

Número de Plantas/Classe de Severidade aos 12 d.a.i.	Número de Plantas/Classe de Severidade aos 24 d.a.i.
46 S0	36 S0 9 S1 1 S2
13 S1	1 S0 11 S1 1 S2
25 S2	4 S1 13 S2 8 S3
34 S3	4 S2 30 S3

Entre as 882 plantas avaliadas nos lotes 2, 3 e 4, 210 diferiram na severidade entre dois avaliadores, 91 das quais foram classificadas como S1

por um avaliador e como S2 por outro, isto é, eram plantas avaliadas como resistentes por um avaliador e suscetíveis por outro. Dessas 91 plantas, 71 foram reavaliadas quanto à severidade aos 16-18 d.a.i. Confrontando as classes de severidade com a presença dos marcadores RAPD nessas 882 plantas, observou-se que 45 plantas S1 foram avaliadas erroneamente como S2 e 34 plantas S2 o foram como S1.

Considerando as 1.000 plantas avaliadas e confrontando-se com a presença dos marcadores RAPD geneticamente ligados ao gene de resistência, pode-se afirmar que o erro no uso da escala de severidade foi de 8%.

#### 4. DISCUSSÃO

A seleção de material resistente à ferrugem do eucalipto a partir de inoculações artificiais em mudas em condições controladas apresenta vantagens em relação à infecção natural. Entre elas, podem-se citar: a) a possibilidade de utilizar isolados do patógeno oriundos de diferentes regiões, b) o controle da idade e concentração e origem do inóculo, c) o controle do estágio de crescimento do hospedeiro e das folhas a serem avaliadas e d) a possibilidade de realizar avaliações em qualquer época do ano, independentemente de períodos favoráveis à doença. Particularmente na ferrugem do eucalipto, isolados de *P. psidii* podem ser facilmente mantidos em mudas de jambeiro, com abundante produção de uredíniosporos disponíveis para inoculação.

Com base na presença e no tamanho de pústulas, propôs-se uma escala de notas com quatro classes de severidade (S0, S1, S2 e S3) para avaliar a resistência à ferrugem em clones, procedências ou progênies de *Eucalyptus*. Neste trabalho, consideraram-se as classes S0 e S1 como resistentes e S2 e S3 como suscetíveis. Essa escala é aplicável em plantas inoculadas artificialmente, nas condições otimizadas por Ruiz et al. (1989a), e adota critérios simples e de fácil adaptação na seleção de materiais resistentes.

Por se tratar de uma análise não-destrutiva, essa escala permite a avaliação dos materiais em datas sucessivas, conferindo maior acurácia na discriminação de materiais sob avaliação. Essa característica é particularmente útil na avaliação de materiais com período latente médio mais prolongado, uma

vez que, em estudos da interação genótipo/isolado, variações no período latente de 6,2 a 12,8 dias têm sido encontradas (Castro et al., 1985; Ruiz et al., 1989a). A utilização da escala de notas é sugerida na seleção de material resistente para fins científicos, para plantio comercial ou para emprego em programa de melhoramento vegetal. No presente trabalho, avaliou-se grande número de plantas, o que inviabilizou a determinação do período latente. No entanto, na avaliação da resistência à ferrugem em pequeno número de plantas, sugere-se que o período latente também seja determinado, adicionalmente à escala de severidade, em face da grande variação daquela característica (Castro et al., 1983; Castro et al., 1985; Ruiz et al., 1989a).

Na escolha de um método para quantificar uma doença, devem-se considerar alguns fatores, como tempo, praticabilidade, custo e acurácia. Comparando-se com o método de avaliação proposto por Ruiz et al. (1989a), a presente escala de notas permite avaliação mais rápida, por não depender de equipamentos de microscopia, e não incorre no erro de avaliar áreas preestabelecidas do limbo foliar, que pode resultar em imprecisões quando há distribuição irregular de pústulas no limbo. Na presente escala de notas, diferente do método descrito por Ferreira & Silva (1982), consideram-se apenas o tamanho da pústula e o número de uredínias/pústula, desconsiderando sua distribuição, uma vez que a resistência de materiais avaliados deve refletir a capacidade de restringir o crescimento do patógeno no órgão inoculado. O número ou a distribuição de pústulas, no entanto, relaciona-se com a distribuição de esporos do patógeno durante a inoculação.

A avaliação visual da severidade pode ser influenciada pela estrutura da planta e pelo tamanho e tipo da lesão (Forbes & Jeger, 1987). A escala proposta neste trabalho não considera a estrutura da planta nem o tipo de lesão, pois avalia apenas a severidade na terceira e quarta folhas inoculadas, o que deve reduzir o percentual de erro associado ao uso de escalas de severidade. Segundo Slopek (1989), o treinamento de avaliadores, e não a escala de doenças, aumenta a acurácia nas determinações visuais de severidade. Assim, sugere-se o treinamento prévio dos avaliadores anteriormente à avaliação da severidade da ferrugem do eucalipto.

Confrontando a classe de severidade com a presença ou ausência de marcadores RAPD ligados ao gene de resistência, verificou-se um erro de 8% na classificação entre plantas resistentes e suscetíveis, com tendência a

superestimar a severidade, como observado em outras doenças (Kranz, 1988). Esse erro é similar ao encontrado na validação da escala desenvolvida para ferrugem do feijoeiro (Godoy et al., 1997) e decorre da proximidade do limite de tamanhos superior e inferior das classes S1 e S2, respectivamente.

As estimativas de erro no uso de escalas de notas e escalas diagramáticas recaem sobre o avaliador e não sobre a escala *per sí*. A validação da escala de notas proposta neste trabalho foi possível pela disponibilidade de marcadores moleculares ligados ao gene de resistência. Deve-se ressaltar que uma mesma população foi utilizada na validação de escala e na análise molecular. Essa validação, entretanto, não seria possível em populações onde a resistência e a presença de marcadores segregassem independentemente.

O ressecamento de pústulas constatado em algumas plantas entre 12 e 24 d.a.i. e a expressão tardia de sintomas de ferrugem (Quadro 2 do Capítulo 2) podem induzir a erros na avaliação de resistência em experimentos em condições controladas. Assim, sugere-se que a avaliação da resistência à ferrugem em espécies, procedências, clones ou progênies de *Eucalyptus* seja conduzida em duas ou três avaliações, entre os 12 e 24 d.a.i., verificando para cada material genético avaliado a data de melhor expressão da resistência.

## CAPÍTULO 2 - HERANÇA DA RESISTÊNCIA À FERRUGEM EM *Eucalyptus grandis*

### 1. INTRODUÇÃO

A ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii* Winter, foi observada pela primeira vez no Brasil em 1929 (Gonçalves, 1929) e formalmente descrita por Joffily (1944) em plantas de *E. citriodora* Hook. Em contraste com a maioria das ferrugens em espécies florestais de clima temperado, a ferrugem do eucalipto é autóica. Atualmente, constitui uma das mais importantes doenças de *Eucalyptus* no país e incide em mudas no viveiro e em plantas jovens no campo nos estádios fenológicos A e B (Ferreira, 1989), aproximadamente até os dois anos de idade, em brotações após o corte raso (Ruiz et al., 1987) e em jardins e minijardins clonais.

A seleção de espécies, procedências, progênies ou clones resistentes de *Eucalyptus* constitui a estratégia mais eficiente no controle da doença (Carvalho, 1992). Entre as espécies mais suscetíveis, encontram-se *E. grandis* Hill ex Maiden, *E. cloeziana* (Dianese et al., 1984; Carvalho et al., 1998), *E. phaeotricha* (Ferreira, 1983), *E. nitens* e *E. globulus* (Xavier et al., 2000); entre as espécies resistentes, destacam-se *E. pilularis* Smith, *E. saligna* Smith, *E. citriodora*, *E. camaldulensis* Dehnh., *E. tereticornis* Smith, *E. urophylla* S.T. Blake, *E. maculata* Hook., *E. paniculata* Smith, *E. robusta* Smith, *E. propinqua*, *E. microcorys* F. Muell., *E. pellita* F. Muell. e *E. torelliana* F. Muell. (Ferreira, 1989). Há, contudo, ampla variabilidade genética quanto à resistência entre procedências e progênies de uma mesma espécie (Alfenas et al., 1997).

*Eucalyptus grandis* é uma das espécies mais plantadas no Brasil, em virtude da qualidade de sua madeira para a indústria de papel e celulose, aliada ao seu rápido crescimento e alto rendimento volumétrico. Grande variabilidade na resistência à ferrugem tem sido observada entre procedências de *E. grandis*, em condições de infecção natural e sob inoculação artificial (Ferreira & Silva, 1982).

A maioria dos estudos relativos à resistência a doenças em *Eucalyptus* limita-se a identificar espécies, procedências ou clones resistentes (Cahill et al., 1992; Conradie et al., 1992; Carnagie et al., 1998; van Zyl & Wingfield, 1999), sendo poucos e recentes os trabalhos visando determinar a base genética da resistência a pragas (Soria & Borralho, 1997) ou a doenças (Dungey et al.,

1997). Embora a seleção de materiais resistentes seja feita nas empresas florestais, até o presente não se determinou o padrão de herança da resistência no patossistema *Eucalyptus-P. psidii*, cujo conhecimento pode contribuir para determinar as estratégias de melhoramento genético visando à obtenção de materiais resistentes à ferrugem. Assim, neste trabalho foi estabelecido o modo de herança da resistência à ferrugem em *E. grandis*, utilizando-se famílias de irmãos-completos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Herança da resistência

Empregaram-se 10 progênies de irmãos-completos, com 115 a 120 indivíduos em cada progênie. Todas as progênies foram resultantes de cruzamentos controlados entre genitores suscetíveis e genitores resistentes, geneticamente divergentes entre si. Em uma das progênies segregantes (G38 x G21, com 118 indivíduos), acrescentaram-se 882 indivíduos adicionais, perfazendo um total de 1.000 plantas avaliadas.

Utilizou-se nas inoculações o isolado monopustular UFV-2 de *P. psidii*, obtido em área de plantio de *Eucalyptus* da Cia. Suzano de Papel e Celulose, em Itapetininga, SP. Esse isolado foi mantido em mudas de jambeiro (*Syzygium jambos* (L.) Alston), mediante reinoculações periódicas a cada 15-20 dias. Os uredíniosporos coletados em mudas de jambeiro, aos 12 dias após a inoculação (d.a.i.), foram dispersos em água + Tween 80 a 0,05% em tubos de ensaio, com o auxílio de um agitador magnético tipo Vortex. Uma suspensão de esporos a  $2 \times 10^4$  uredíniosporos/mL foi atomizada homogeneamente nas superfícies abaxial e adaxial das terceiras e quartas folhas apicais das mudas de *Eucalyptus*, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acoplado a um compressor elétrico ajustado a 0,6-0,8 kgf/cm<sup>2</sup> de pressão. Após a inoculação, as mudas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 24 horas no escuro, a 25 °C, sendo posteriormente mantidas a 22 °C sob fotoperíodo de 12 horas (Ruiz et al., 1989a; Ruiz et al., 1989b) e intensidade luminosa de 40 µmoles ftons/m/s.

Avaliou-se a severidade da ferrugem aos 12 d.a.i., mediante o uso da seguinte escala de notas (Capítulo 1): S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade, com necrose ou "fleck"; S1 = pústulas puntiformes, < 0,8 mm de diâmetro, com uma ou duas uredínias; S2 = pústulas medianas,

de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro, com aproximadamente 12 uredínias; e S3 = pústulas grandes, > 1,6 mm de diâmetro, com 20 ou mais uredínias. As progênes segregantes foram reavaliadas entre os 14 e 16 d.a.i. e novamente aos 24 d.a.i.

O teste  $\chi^2$  foi utilizado para testar a hipótese de herança mendeliana da resistência à ferrugem.

## **2.2. Resistência de *Eucalyptus grandis* G21 a diferentes isolados de *Puccinia psidii***

Avaliou-se a resistência do genitor masculino G21, cuja progênie melhor se ajustou ao modelo genético de herança mendeliana simples, a 21 isolados monopustulares do patógeno, obtidos de diferentes hospedeiros e regiões geográficas do Brasil; cada isolado foi inoculado em cinco mudas do clone G21. As condições de inoculação e avaliação foram previamente descritas (item 2.1.).

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 – Herança da resistência**

Entre as 10 progênes estudadas, quatro foram suscetíveis, três foram resistentes e três segregaram quanto à resistência à ferrugem (Quadro 1). Em duas progênes suscetíveis, algumas plantas (4,2%) foram avaliadas como resistentes, da classe S1. Enquanto que algumas plantas nas progênes resistentes (3,5%) foram classificadas como suscetíveis, 11 das quais pertenciam à classe S2. É possível que essas plantas tenham sido avaliadas erroneamente, em função da proximidade dos limites superior e inferior das classes S1 e S2, respectivamente. Todavia, não foi possível reinoculá-las em condições controladas para confirmar seu nível de resistência, pois as progênes suscetíveis foram eliminadas e as resistentes, transplantadas no nível de campo, em Itapetininga, S.P. (Capítulo 1).

As três progênes resistentes têm em comum o genitor G26. Comparando os resultados obtidos nas progênes 1 e 2 com os das progênes 6 e 7, observou-se que os genitores G38 e G38ss não transmitiram alelos de resistência a suas progênes (Quadro 1). Portanto, a resistência nas progênes 5, 6 e 7 é oriunda do clone G26 e o(s) alelo(s) de resistência neste clone parece(m) estar em homozigose e ter modo de ação dominante. A

comprovação dessa hipótese poderá ser feita, determinando-se o padrão de segregação da resistência em progênies oriundas do retrocruzamento de plantas F1 desses cruzamentos com os respectivos genitores suscetíveis.

Quadro 1 – Segregação da resistência à ferrugem em progênies de irmãos-completos de *Eucalyptus grandis* inoculadas com o isolado monopustular UFV-2 de *Puccinia psidii* e avaliadas aos 12 d.a.i.

Progênie	Nº Plantas/Classe de Severidade (S0:S1:S2:S3)	R:S*	Proporção Esperada**	$\chi^2$	Valor P
1 (G38 x G15)	0:0:34:81	0:115	0:1		
2 (G38ss x G15)	0:0:34:85	0:119	0:1		
3 (G38 x G33)	0:4:44:71	4:115	0:1		
4 (G38 x G45)	0:6:38:73	6:111	0:1		
5 (G9 x G26)	108:11:1:0	119:1	1:0		
6 (G38 x G26)	96:20:3:0	116:3	1:0		
7 (G38ss x G26)	98:12:7:1	110:8	1:0		
8 (G9 x G35)	50:22:35:9	72:44	1:1	6,76	0,009
9 (G38 x G21)	46:13:25:34	59:59	1:1	0,0	1,000
10 (G38ss x G21)	25:21:27:46	46:73	1:1	6,13	0,013

\* Foram consideradas resistentes as mudas que mostraram, aos 12 d.a.i., severidade das classes S0 ou S1. Mudas com severidade S2 ou S3 foram consideradas suscetíveis à ferrugem.

\*\* Considerando a resistência como monogênica e dominante.

Na progênie 9, constatou-se a segregação de 1:1 (R:S) (Quadro 1), em três datas de avaliação (Quadro 2). A segregação na progênie 8 também se ajustou ao modelo de herança mendeliana simples, porém apenas na segunda e terceira avaliações, possivelmente em função do maior período latente da doença nessa progênie do que nas progênies 9 e 10.

Verificou-se aumento na severidade ao longo das avaliações, principalmente entre as classes de severidade S0 e S1 ou entre S2 e S3, sem alterar significativamente a proporção entre plantas resistentes e suscetíveis, dependendo da progênie (Quadro 2).

A segregação da resistência à ferrugem nas progênies 8 e 9 ajustou-se ao modelo genético de herança monogênica (Quadros 2 e 3), indicando que a resistência à ferrugem é uma característica que possui herança mendeliana simples, de caráter dominante. Essa resistência é herdada dos clones G35 e G21, uma vez que a contribuição dos clones G9 e G38 na resistência em outros cruzamentos foi praticamente nula (Quadro 1). Todavia, não foi possível

concluir se a resistência desses clones é determinada pelo mesmo gene ou por genes distintos. Testes de alelismo, em progênies obtidas entre clones suscetíveis com indivíduos resistentes, obtidos do cruzamento entre os clones G21 e G35, devem ser feitos para elucidar essa dúvida. O modelo de segregação da resistência na progênie 9 foi confirmado pela avaliação de um número maior de indivíduos segregantes (Quadro 3).

Quadro 2 – Segregação da resistência à ferrugem em três progênies de *Eucalyptus grandis*, inoculadas com o isolado monopustular UFV-2 de *Puccinia psidii* sob condições controladas e avaliadas em três datas após a inoculação

Progênie	Data da Avaliação	Nº Plantas/Classe de Severidade (S0:S1:S2:S3)	R:S	Proporção Esperada	$\chi^2$	Valor P
8 (G9 x G35)	12 d.a.i.	50:22:35:9	72:44		6,76	0,009
	16 d.a.i.	43:20:19:34	63:53	1:1	0,86	0,353
	24 d.a.i.	50:12:11:43	62:54		0,55	0,458
9 (G38 x G21)	12 d.a.i.	46:13:25:34	59:59		0,0	1,000
	14 d.a.i.	32:23:23:40	55:63	1:1	0,54	0,461
	24 d.a.i.	37:24:19:38	61:57		0,13	0,713
10 (G38ss x G21)	12 d.a.i.	25:21:27:46	46:73		6,13	0,013
	15 d.a.i.	22:24:24:49	46:73	1:1	6,13	0,013
	24 d.a.i.	23:23:21:52	46:73		6,13	0,013

Quadro 3 – Segregação da resistência à ferrugem na progênie G38 x G21 de *Eucalyptus grandis*, inoculada com isolado monopustular UFV-2 de *Puccinia psidii* e avaliada aos 12 e reavaliada aos 24 d.a.i.

Progênie	Nº Plantas/Classe de Severidade (S0:S1:S2:S3)	R:S	Proporção Esperada	$\chi^2$	Valor P
9 (G38 x G21)	269:212:165:354	481:519	1:1	1,444	0,229

Em contraste com o que foi observado na progênie 9, a segregação da resistência derivada do clone G21 não se ajustou ao modelo monogênico descrito anteriormente na progênie 10, pois apresentou número de indivíduos suscetíveis maior do que o esperado. Esse resultado foi observado nas três datas de avaliação (Quadro 2).

### 3.2. Resistência de *Eucalyptus grandis* G21 a diferentes isolados de *Puccinia psidii*

O clone G21 foi resistente a todos os 21 isolados de *P. psidii* testados (Quadro 4). Na maioria dos casos, a resistência manifestou-se sob a forma de uma reação de hipersensibilidade, com desenvolvimento de pontos cloróticos (“fleck”) aos 12 d.a.i., que evoluíram para pontos necróticos aos 22-24 d.a.i. Para dois isolados testados, a resposta do clone G21 foi de imunidade, isto é, ausência completa de sintomas macroscópicos.

Quadro 4 – Resistência do clone G21 de *Eucalyptus grandis* a isolados monopustulares de *Puccinia psidii* obtidos de diferentes hospedeiros e origens geográficas

Isolado	Hospedeiro	Origem	Classe de Severidade
1	Eucalipto	Guaíba, RS (Riocell)	S0 (“fleck”)
UFV-2	Eucalipto	Itapetininga, SP (Suzano)	S0 (“fleck”)
16	Eucalipto	Guaíba, RS (Riocell)	S0 (“fleck”)
21	Eucalipto	Aracruz, ES (Aracruz)	S0 (“fleck”)
36	Eucalipto	Ipatinga, MG (Cenibra)	S0 (“fleck”)
38	Eucalipto	Ipatinga, MG (Cenibra)	S0 (“fleck”)
39	Eucalipto	Ipatinga, MG (Cenibra)	S0 (“fleck”)
7116	Eucalipto	Ipatinga, MG (Cenibra)	S0 (“fleck”)
8	Goiaba	Luís Antônio, SP (Votorantin)	S0 (“fleck”)
32	Goiaba	Santa Maria de Jetibá, RS	S0 (“fleck”)
40	Goiaba	Guanhães, MG (Cenibra)	S0 (“fleck”)
42	Goiaba	Belo Oriente, MG (Cenibra)	S0 (“fleck”)
15	Goiaba	Passo Fundo, RS	S0 (“fleck”)
3	Jabuticaba	Lençóis Paulista, SP (Duratex)	S0 (“fleck”)
5	Jambo	Viçosa, MG	S0 (“fleck”)
7	Jambo	Mogi-Guaçu, SP (Champion)	S0 (imunidade)
17	Jambo	Porto Alegre, RS	S0 (imunidade)
31	Jambo	Brasília, DF	S0 (“fleck”)
13	Jambolão	Guaíba, RS (Riocell)	S0 (“fleck”)
19	Pitanga	Passo Fundo, RS	S0 (“fleck”)
20	Cereja	Porto Alegre, RS	S0 (“fleck”)

## 4. DISCUSSÃO

As famílias de irmãos-completos avaliadas foram derivadas de cruzamentos entre genitores classificados como resistentes ou suscetíveis, com base em resultados de inoculações artificiais de progênies de meios-irmãos em condições de casa de vegetação em nível de empresa. Todavia, a

correta determinação dos genótipos dos genitores foi inferida a partir dos resultados da inoculação em condições controladas e otimizadas para avaliar a resistência à ferrugem (Ruiz et al., 1989a). A ausência de segregação das progênes de irmãos-completos indicou que três clones, G15, G33 e G45, haviam sido classificados erroneamente como resistentes. É possível que fatores como utilização de baixa concentração de inóculo e falta de controle das condições ambientes necessárias à infecção tenham contribuído para a classificação equivocada desses clones.

A classificação prévia dos clones G26, G35 e G21 como resistentes à ferrugem foi confirmada pela ocorrência de grande número de indivíduos resistentes nas progênes de cruzamentos com os clones G9, G38 e G38ss, comprovadamente suscetíveis à ferrugem. A ausência de segregação da resistência em três progênes derivadas de cruzamentos que incluem o clone G26 evidenciou que o(s) alelo(s) responsável(is) pela resistência encontra(m)-se em homozigose nesse clone. A identificação de genótipos resistentes homozigotos, tal como o clone G26, tem grande impacto e aplicação imediata nos programas de melhoramento genético com vistas à produção de sementes, uma vez que geram progênes resistentes, mesmo em pomares de polinização aberta, independentemente da origem do pólen.

Inicialmente, quando se consideraram resistentes apenas plantas com severidade S0, isto é, com ausência completa de esporulação do patógeno, os dados obtidos nas progênes 8, 9 e 10 não se ajustaram a nenhum modelo genético de segregação simples, para um ou dois genes. Todavia, quando as plantas da classe S1 (pústulas puntiformes com reduzida esporulação) foram agrupadas com as plantas da classe S0, houve melhor ajuste dos dados ao modelo de herança mendeliana simples nas progênes 8 e 9.

Verificou-se que grande parte das plantas da classe S1 apresentou, anteriormente à primeira avaliação, o sintoma de "fleck" (pontos cloróticos) nos locais de infecção, que evoluíram posteriormente a pústulas diminutas. O desenvolvimento de "fleck" foi também observado em plantas da classe S0, bem como no clone genitor G21. No entanto, os pontos cloróticos nessas plantas evoluíram à necrose localizada, como típica resposta de hipersensibilidade (HR). O desenvolvimento de "fleck" parece ser uma característica comum em plantas que herdaram resistência do genitor G21.

O “fleck” necrótico também foi utilizado na separação entre plantas híbridas de *Populus deltoides* e *P. trichocarpa*, inoculadas com *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae*. Considerou-se a presença de “fleck” mesmo em plantas com pequena formação de uredínias. A separação entre plantas “fleck”+ e “fleck”- permitiu estabelecer que a resistência àquele patógeno é governada por um gene de efeito principal, oriundo de *P. trichocarpa*, denominado *Mmd1* (Newcombe et al., 1996). Em espécies de plantas mais bem estudadas, o “fleck” necrótico como resposta à infecção por fungos causadores de ferrugem está associado à presença de genes de efeito principal, sendo avaliado como característica qualitativa (Littlefield, 1981).

Embora se tenha obtido segregação que se ajusta à proporção mendeliana, a variação fenotípica da resposta de resistência indica que a resistência à ferrugem é conferida por genes de efeito principal, com penetrância dependente de genes de efeito secundário. Nessa situação, plantas com o gene de efeito principal e uma combinação favorável de genes de efeito secundário apresentariam fenótipo tipo S0, enquanto plantas com o gene de efeito principal e uma combinação menos favorável de genes de efeito secundário apresentariam resistência da classe S1. Pelo mesmo raciocínio, plantas sem o gene de efeito principal na resistência, mas com combinação favorável de genes de efeito secundário, poderiam apresentar um fenótipo tipo S2. Algumas dessas plantas, por conterem genes que retardam o início ou a manifestação da doença, podem ter sido classificadas erroneamente como resistentes, como verificado entre a primeira e a segunda avaliação na progênie 8. A existência desses genes de efeito secundário é substanciada pelas variações no período latente médio da ferrugem observadas neste e em outros trabalhos (Castro et al., 1985; Ruiz et al., 1989a) em razão da combinação genótipo do hospedeiro/isolado do patógeno, das condições ambientes e da metodologia de avaliação. Esta hipótese poderá ser comprovada por meio da identificação de marcadores moleculares geneticamente próximos a esse gene principal, por meio da técnica de BSA (Michelmore et al., 1991). A presença dos marcadores em plantas das classes S0 e S1 e a ausência em plantas das classes S2 e S3 permitirão determinar a existência desse gene principal, que confere resistência à ferrugem.

Nesse trabalho, as avaliações das progênies 9 e 10 aos 12, 14 a 16 e aos 24 d.a.i. não apresentaram diferenças na proporção entre plantas

resistentes e suscetíveis, enquanto na progênie 8 a proporção que se ajustou ao modelo monogênico foi obtida somente a partir da segunda avaliação, aos 16 d.a.i. O grande número de plantas utilizadas neste estudo impediu que componentes de resistência, como período latente médio, período infeccioso e frequência de infecção, fossem mensurados em cada planta avaliada.

Em contraste com o que foi observado na progênie 9, a segregação da resistência à ferrugem na progênie 10 não suportou a hipótese de que a resistência do clone G21 seja atribuída a um gene de efeito principal em heterozigose, apesar de ambas as progênies compartilharem o mesmo genitor masculino, sendo idênticos também o isolado utilizado e as condições de inoculação. É possível que a reduzida penetrância do gene principal na progênie 10 seja devida ao "background" genético do clone G38ss. Efeitos similares foram observados em progênes de *Pinus monticola* inoculadas com *Cronartium ribicola* (Kinloch et al., 1999) e também na resistência à ferrugem causada por três raças de *Melampsora larici-populina* em famílias híbridas de *Populus deltoides* e *P. trichocarpa* (Lefrève et al., 1998).

Efeitos de "background" genético na expressão de genes de resistência são bem documentados em espécies agronômicas. Por exemplo, o gene *Lr2b*, que confere resistência à ferrugem do trigo (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*), derivado da cultivar Prelude, foi parcialmente dominante em cruzamentos desta cultivar com a linhagem Thatcher e completamente dominante em cruzamentos com a linhagem Red Bobs. Já o gene *Lr2c* de Prelude comportou-se como recessivo em cruzamentos com Thatcher e dominante em cruzamentos com Red Bobs (Kolmer, 1996). Efeitos similares foram relatados para o gene *Le22a* no mesmo patossistema (Pretorius et al., 1990).

O efeito de "background" genético tem sido explicado pela existência de genes supressores e modificadores com efeito sobre genes de resistência (Williams et al., 1992; Kolmer, 1996; Ren et al., 1996). Assim, esse efeito do "background" do clone G38ss poderia ser comprovado, avaliando-se a resistência de progênes oriundas de novos cruzamentos entre o clone G21 e clones suscetíveis, distintos de G38ss, bem como entre o clone G38ss e outros clones resistentes. Uma vez que os dados de segregação em grande número de indivíduos da progênie 9 suportam a hipótese de segregação monogênica, propôs-se a denominação *Ppr1* para esse gene de resistência derivado de

G21. Testes de alelismo deverão ser feitos para certificar se a resistência do clone G35 é controlada pelo mesmo gene de G21.

Locos de resistência a patógenos em espécies florestais têm apresentado dois padrões de resposta: resistência isolado-específico ou raça-específica, tal como o gene *Fr1* em *P. taeda*, que confere resistência à ferrugem fusiforme (*Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*; Wilcox et al., 1996), ou de amplo espectro, como o gene *Mer* em *Populus*, que confere resistência a diversas raças de *Melampsora larici-populina* (Cervera et al., 1996). Apesar de a resposta de resistência do clone G21 a diferentes isolados de *P. psidii* indicar que a resistência à ferrugem em *E. grandis* seja isolado não-específico, somente a inoculação de progênies segregantes com outros isolados poderá determinar se a resistência aos diferentes isolados é conferida pelo mesmo gene que confere resistência ao isolado monopustular ou por outros genes de resistência presentes em G21.

As interações em que a resistência é conferida por genes simples normalmente são interpretadas por uma relação do tipo gene-a-gene, na qual o produto de um gene de avirulência do patógeno (elicitador) é reconhecido pelo produto do gene de resistência do hospedeiro (receptor), que desencadeia uma resposta de resistência na planta (Flor, 1971). Esse tipo de relação normalmente resulta de uma relação de co-evolução entre patógeno e hospedeiro, que resulta num alto grau de especialização da maioria dos patógenos (Tobias, 1996). É interessante notar, entretanto, que essa premissa parece não ser válida no patossistema *P. psidii* - *Eucalyptus*. Espécies de *Eucalyptus*, originárias da Austrália e ilhas vizinhas, foram introduzidas para plantios comerciais no Brasil apenas no final do século passado (Andrade, 1961), enquanto *P. psidii* é nativo da América do Sul, onde incide sobre espécies de Myrtaceae nativas e exóticas. Até o momento, a presença do patógeno não foi constatada no centro de origem do *Eucalyptus* (Coutinho et al., 1998).

Analogamente ao verificado no patossistema *P. psidii* – *Eucalyptus*, resistência monogênica sem co-evolução patógeno-hospedeiro tem sido relatada em espécies florestais, como *Pinus* e *Populus*. No entanto, a resistência nesses casos pode ser conferida por genes de resistência a patógenos similares, encontrados no local de origem do hospedeiro em questão.

Por exemplo, a resistência monogênica a *C. ribicola* identificada em *P. lambertiana* (Devey et al., 1995) parece ser o primeiro caso em patossistema não co-evoluído, em que o hospedeiro é nativo dos EUA e o patógeno foi introduzido naquele país no início do século 20 (Stewart, 1906; Mielke, 1943). No entanto, há um histórico de co-evolução entre *Pinus* e *Cronartium* que remonta aos seus ancestrais, no norte da Ásia Central (Leppik, 1970). Dessa forma, o gene de resistência em *P. lambertiana* pode ter sido selecionado a partir de espécies de *Pinus* pertencentes ao mesmo subgênero, como *P. monophyla* Torr. & Frem. e *P. edulis* Engelm. Essa hipótese é corroborada pelas maiores frequências alélicas desse gene em populações naturais de *P. lambertiana* geograficamente próximas a populações de *P. monophyla* (Kinloch, 1992).

A resistência conferida pelo gene *Mmd1* de *Populus trichocarpa* Torr. and Gray à ferrugem, causada por *Melampsora medusae* Thuem. f. sp. *deltoidae*, é um caso semelhante, pois, apesar de o patógeno não ser encontrado no noroeste dos EUA, área de ocorrência natural daquele hospedeiro, uma espécie congênica de ferrugem, *M. occidentalis* Jacks., normalmente ataca *P. trichocarpa* (Newcombe et al., 1996). É possível, portanto, que o gene *Mmd1* seja membro de um loco que confere resistência a *M. occidentalis*.

Analogamente, Newcombe & Bradshaw (1996) encontraram três regiões genômicas (QTL's) em *Populus deltoides* que conferem resistência à mancha foliar de *Septoria populicola* Peck. Apesar de *P. deltoides* ser natural do leste norte-americano, onde não existe *S. populicola*, nessa mesma região é encontrado *S. musiva*, causador da mancha foliar em *P. deltoides*.

Outros exemplos ocorrem em híbridos de *P. trichocarpa* com *P. deltoides* (Villar et al., 1996) e *P. deltoides* com *P. nigra* L. (Cervera et al., 1996), resistentes a *Melampsora larici-populina* Kleb., patógeno de ocorrência restrita à Europa e Ásia. Apesar de a resistência conferida pelo gene *Mer* ser oriunda de *P. deltoides*, nativo dos EUA, esta espécie é atacada por *M. medusae* f. sp. *medusae*, outra espécie causadora de ferrugem.

Dessa forma, uma explicação plausível sobre a origem da resistência à ferrugem conferida por um gene de efeito principal nos clones 21 e 35 de *E. grandis* é de que a mesma seja originária de um loco que confere resistência a outro patógeno no centro de origem do *Eucalyptus*. Genes de resistência a

patógenos geneticamente não-relacionados podem estar fisicamente próximos, como verificado entre genes de resistência a nematóides e vírus (Roupe van der Voort et al., 1999) ou a nematóides e fungos (Meksem et al., 1999). Rearranjos no DNA, como duplicação e recombinação mitótica desigual, criam famílias multigênicas e possibilitam a recombinação intra e intergênica, o que permite a evolução dos genes de resistência em plantas (Richter & Ronald, 2000; Ellis et al., 2000). Alta taxa de recombinação intragênica, associada a erros de pareamento, que provocam “crossing-overs” desiguais, é responsável pela origem de novas especificidades no loco *rp1*, que confere resistência a *Puccinia sorghi* em milho (Ritcher et al., 1995), e no loco *Cf-4/9* do tomateiro, que confere resistência a *Cladosporium fulvum* (Parniske et al., 1997).

Adicionalmente, resultados recentes indicaram que um mesmo gene de resistência pode conferir resistência a diferentes espécies de organismos. Por exemplo, o gene *Mi*, que confere resistência a *Meloidogyne incognita* e a outras espécies de nematóides da galha em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), também confere resistência ao afídeo da batateira (Rossi et al., 1998). Embora exequível, a comprovação de qual hipótese alternativa explica a origem da resistência à ferrugem em *Eucalyptus* irá requerer grande esforço de mapeamento de genes de resistência a diferentes patógenos e estudos de comparação de seqüências entre eles.

A resistência de amplo espectro do clone genitor G21 é de extrema importância para o melhoramento de *E. grandis* no Brasil, onde a eucaliptocultura tem sido estabelecida predominantemente a partir de plantios clonais de grandes extensões. Entretanto, novas fontes de resistência devem ser avaliadas e incorporadas aos programas de melhoramento de *Eucalyptus*. O plantio em larga escala de uma única fonte de resistência ao patógeno não é uma estratégia adequada de manejo dessa doença em face do possível surgimento/seleção de isolados virulentos (McIntosh et al., 1995; McIntosh & Brown, 1997; Pinon et al., 1987; Steenackers et al., 1994), bem como da existência de especialização fisiológica em *P. psidii* (Ferreira, 1983; Castro et al., 1985; Coelho, 1988). A identificação e o mapeamento de novos genes de resistência em *E. grandis* permitirão determinar se a organização dos genes R em espécies florestais segue o padrão de agrupamento (“cluster”) encontrado em espécies agrícolas (Crute & Pink, 1996).

## CAPÍTULO 3

### MARCADOR RAPD FORTEMENTE LIGADO A UM GENE DE EFEITO PRINCIPAL NA RESISTÊNCIA À FERRUGEM (*Puccinia psidii*) EM *Eucalyptus grandis*

#### 1. INTRODUÇÃO

A ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, incide em mudas no viveiro e em plantas jovens no campo, nos estádios fenológicos A e B (Ferreira, 1989), em brotações após o corte raso e em jardins e minijardins clonais. Segundo Alfenas et al. (1989), o ataque de ferrugem em brotações é freqüente e muito severo, causando deformações, morte, perda de dominância apical e redução no crescimento.

Há, até o presente, poucos estudos sobre a resistência de *Eucalyptus* à ferrugem. Em geral, esses trabalhos restringem-se à identificação e à seleção de espécies e procedências resistentes (Ferreira & Silva, 1982; Dianese et al., 1984; Dianese et al., 1986; Passador, 1994; Carvalho et al., 1998). Resultados obtidos no patossistema *P. psidii* - *E. grandis*, clone 21, indicaram que a resistência à ferrugem é conferida por um gene dominante, de efeito principal, denominado *Ppr1* (Capítulo 2).

Em outras doenças florestais, a base genética da resistência a fitopatógenos, outrora considerada poligênica ou mesmo indeterminada, quando estudada em detalhes tem se mostrado de herança simples (Kinloch et al., 1970; Wilcox et al., 1996; Villar et al., 1996; Newcombe et al., 1996). A identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência permite a seleção de materiais resistentes mesmo na ausência do patógeno e nos casos em que a diagnose necessite de avaliação em condições controladas (Benet et al., 1995).

Em espécies florestais, mapas genéticos são construídos pela análise de co-segregação dos marcadores genéticos nos produtos da meiose, normalmente em progênies de meios-irmãos ou irmãos-completos. Marcadores localizados em diferentes cromossomos devem segregar independentemente, mas os marcadores localizados no mesmo cromossomo são transmitidos

conjuntamente, a menos que essa ligação seja quebrada por recombinação (O'Malley & Whetten, 1997).

Em espécies alógamas, como as de *Eucalyptus*, são encontrados altos níveis de heterozigose na maioria dos locos, o que permite a identificação de vários marcadores polimórficos úteis na construção de mapas. Nessas espécies, o cruzamento entre duas árvores pode ser facilmente realizado, e a progênie F1 é geneticamente heterogênea, segregando na proporção de 1:2:1 ou 3:1, quando ambos os genitores forem heterozigotos e os marcadores forem co-dominantes e dominantes, respectivamente, ou segregando a 1:1 se um deles for heterozigoto e o outro homozigoto, independentemente do tipo de marcador.

Dois métodos podem ser utilizados para agilizar a identificação de marcadores ligados a um gene ou a uma região genômica: a análise em linhagens quase isogênicas (NIL's - "near isogenic lines") ou a análise de populações segregantes com fenótipos contrastantes, pela técnica de BSA ("Bulked Segregant Analysis" - Michelmore et al., 1991). A utilização de NIL's no melhoramento florestal é inviável, pois requer vários retrocruzamentos, um processo lento e que levaria à depressão endogâmica (Hardner & Potts, 1995). A técnica de BSA apresenta a vantagem de agrupar indivíduos contrastantes para o fenótipo de interesse, podendo ser realizada quase que instantaneamente para qualquer população segregante e para qualquer região do genoma para a qual exista um marcador.

A combinação de marcadores RAPD com a técnica de BSA é aplicável na identificação de genes de interesse em espécies lenhosas que não possuem mapa genético disponível e nas quais os "pedigrees" são raros. Nessas espécies, dentre outras vantagens, a identificação de marcadores ligados a genes de resistência permite a seleção de indivíduos resistentes nas fases iniciais da avaliação de germoplasmas (Benet et al., 1995).

Vários genes de resistência em plantas têm sido clonados recentemente por técnicas como "transposon tagging" ou pela clonagem posicional (Martin et al., 1993; Bent et al., 1994; Jones et al., 1994). A identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência é a premissa para a técnica de clonagem posicional, uma vez que esses marcadores são utilizados como ponto de partida para a clonagem da região genômica contendo o gene de interesse (Tanksley et al., 1995).

Este trabalho teve como objetivo identificar marcadores RAPD ligados ao gene *Ppr1*, que confere resistência à ferrugem (*P. psidii*) em *Eucalyptus grandis*, mediante o uso da técnica de BSA.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

Na primeira etapa, utilizou-se uma progênie composta por 117 indivíduos de *E. grandis*, derivados do cruzamento controlado entre o clone G38, homocigoto suscetível à ferrugem (rr), e o clone G21, heterocigoto resistente (Rr), ambos oriundos do Programa de Melhoramento Genético da Cia. Suzano de Papel e Celulose, em Itapetininga, São Paulo. Numa etapa posterior, outros 877 indivíduos foram adicionados àquela progênie, totalizando 994 indivíduos. A resistência à ferrugem nessa progênie foi avaliada em condições controladas, utilizando-se o isolado monopustular UFV-2 de *P. psidii*. Resultados da inoculação nessa progênie evidenciaram que a resistência à ferrugem apresentou caráter dominante, e a segregação mendeliana da resistência ajustou-se, com alta probabilidade, ao modelo de herança monogênica (Capítulo 2).

A seleção eficiente de marcadores RAPD geneticamente próximos ao loco-alvo requer nível adequado de polimorfismo entre os genitores e a análise de grande número de marcadores (Giovannoni et al., 1991). A progênie utilizada neste trabalho foi selecionada a partir de 36 progênies disponíveis entre seis clones suscetíveis (receptor de pólen) e seis resistentes (doadores de pólen). Em estudo preliminar, mostrou-se que os clones parentais eram altamente polimórficos, com distância genética média de 45,4% (Junghans et al., 1998), evidenciando a possibilidade de encontrar marcadores ligados ao gene *Ppr1*.

### 2.2. Extração de DNA total e ensaio RAPD

Folhas jovens, coletadas em mudas antes da inoculação com o patógeno, foram acondicionadas em papel alumínio e armazenadas a - 80 °C até a extração do DNA. Para extração desse DNA, seguiu-se o protocolo de

Ferreira & Grattapaglia (1995), com as seguintes modificações: macerou-se o tecido vegetal em N<sub>2</sub> líquido e ao macerado obtido adicionaram-se 800 a 850 µL do tampão de extração (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Para remoção de proteínas, carboidratos e lipídios, procedeu-se a duas extrações com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O DNA presente na fase aquosa foi precipitado com dois volumes de etanol 100% gelado, lavado duas vezes com etanol 70%, secado em capela de fluxo laminar ou em dessecador acoplado a uma bomba de vácuo, ressuspenso em TE (Tris-HCl, pH 8,0 10 mM e EDTA 1 mM) e ajustado para uma concentração de 2,5 ng/µL, antes de sua utilização em ensaios de RAPD.

As reações de amplificação foram conduzidas de acordo com o protocolo de Williams et al. (1990), com as seguintes modificações: cada reação foi efetuada num volume de 13 µL, contendo tampão de enzima; 0,4 µM do oligonucleotídeo iniciador (“primer”); 7,5 ng de DNA genômico; e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase. As reações foram realizadas em termocicladores modelo PTC-100 (MJ Research Inc). O programa de amplificação contou com as seguintes etapas: desnaturação a 94 °C por um minuto, anelamento a 35 °C por um minuto e polimerização a 72 °C por dois minutos. As etapas foram repetidas por 40 ciclos. A seguir, as amostras foram submetidas a uma etapa final de polimerização a 72 °C por cinco minutos e, finalmente, mantidas a 4 °C até sua retirada do termociclador.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo 0,2 µM de brometo de etídio, por quatro a cinco horas a 100 V e visualizados sob luz UV em um transiluminador. As imagens dos géis foram armazenadas em sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene).

### **2.3. Identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à ferrugem**

A estratégia para identificar marcadores RAPD ligados à resistência à ferrugem foi essencialmente a descrita por Harkins et al. (1998), empregando-se a metodologia de BSA (“Bulked Segregant Analysis” - Michelmore et al., 1991) nos 117 indivíduos iniciais da progênie 9.

O DNA de 10 indivíduos resistentes e 10 suscetíveis foi extraído e misturado equimolarmente, de modo a se obter dois “bulks” de DNA, um de

plantas resistentes (R) e outro de plantas suscetíveis (S). Na composição do “bulk” de DNA de plantas resistentes, utilizaram-se apenas plantas da classe S0, sem evidência de pústulas, com abundância de “fleck” ou HR necrótica. No “bulk” de DNA de plantas suscetíveis empregaram-se apenas plantas da classe S3 de severidade (Capítulo 1).

Foram usados 980 “primers” da “Operon Technologies” (Kits OPA-01 a OPZ-20, com 520 “primers” e Kits OPAA-01 a OPAX-20, com 460 “primers”) na amplificação dos dois “bulks” de DNA. Numa segunda etapa, os “primers” que revelaram polimorfismo entre os dois “bulks” foram utilizados na amplificação do DNA de cada um dos 20 indivíduos que originaram os “bulks” de DNA R e S. Numa terceira etapa, os “primers” que geraram marcadores co-segregantes com a resistência à ferrugem foram utilizados na amplificação dos demais 97 indivíduos iniciais da progênie. No mapeamento genético dos demais 877 indivíduos da progênie, utilizaram-se apenas os “primers” que geraram marcadores em acoplamento e com forte ligação genética com o gene de resistência à ferrugem na etapa anterior. A denominação dos marcadores foi feita com base no “primer” utilizado na sua amplificação, seguido pelo tamanho do fragmento polimórfico.

O marcador AT9/917, por apresentar forte ligação com a resistência à ferrugem, foi clonado e seqüenciado, sendo comparado com seqüências depositadas no GeneBank, utilizando-se o programa BLAST N e BLAST X (Altschul et al., 1990).

#### **2.4. Construção de grupos de ligação com marcadores RAPD**

A análise de ligação entre a resistência à ferrugem e a presença de marcadores RAPD foi realizada com o auxílio do programa Mapmaker<sup>®</sup> versão 2 (Lander, 1987) para Macintosh, utilizando um LOD score = 3,0 e um valor  $\theta = 0,4$  como limite para agrupamento de marcadores. As distâncias de mapa em centiMorgans entre os marcadores RAPD e o gene de resistência à ferrugem foram calculadas a partir da freqüência de recombinação, utilizando-se a função de mapeamento de Kosambi (Kosambi, 1944).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à ferrugem

Entre os 980 “primers” testados quanto ao polimorfismo entre os “bulks” R e S, 45 (4,6%) não resultaram em produtos de amplificação, 868 (88,6%) geraram apenas bandas monomórficas nos dois “bulks” e 67 (6,8%) geraram pelo menos uma banda polimórfica entre os dois “bulks” de DNA’s (Figura 1).

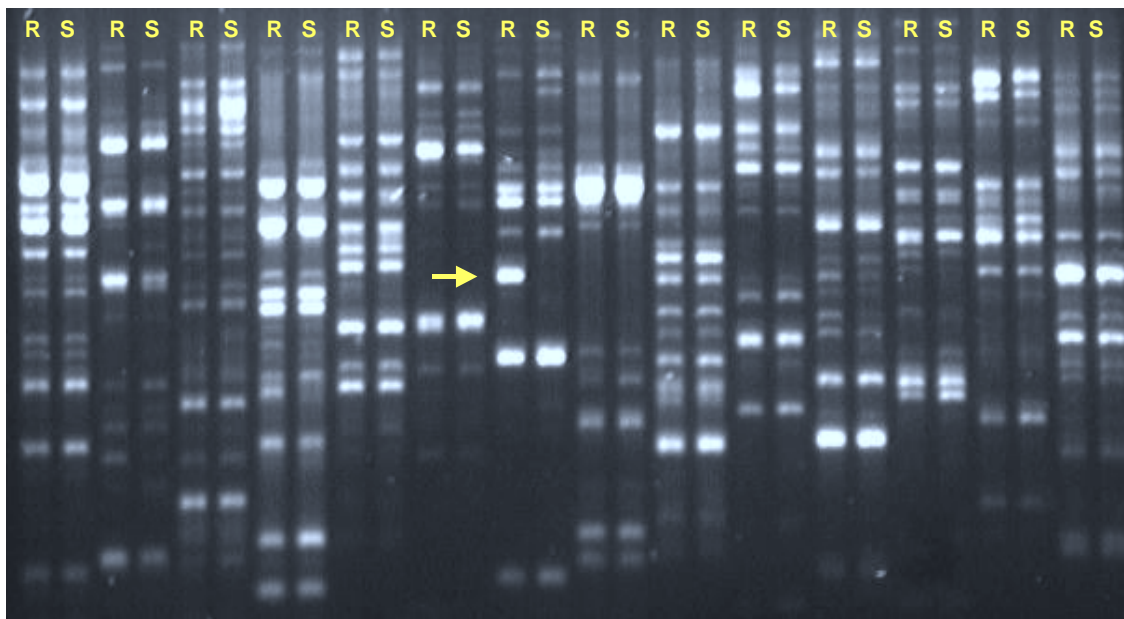


Figura 1 – Amplificação típica de DNA dos “bulks” R e S. Cada duas colunas representam a amplificação dos “bulks” de DNA de plantas resistentes (R) e suscetíveis (S) à ferrugem com um mesmo “primer”. A seta indica a presença de uma banda polimórfica.

Na segunda etapa, entre os 67 “primers” avaliados com o DNA dos indivíduos que originaram os “bulks”, apenas 20 geraram bandas polimórficas co-segregantes com a resistência (Figura 2), mas apenas 13 foram utilizados nos 117 indivíduos iniciais da progênie, por revelarem cinco ou menos indivíduos recombinantes nas 20 plantas utilizadas na composição dos “bulks” (Quadro 1 e Figura 3). Desses 13 “primers”, oito geraram marcadores ligados em acoplamento ao gene *Ppr1*, quais sejam: E-6/1195, K-1/1130, AC-8/1180, AE-9/750, AK-20/500, AM-6/440, AV-10/765 e AT-9/917. Outros cinco “primers” geraram marcadores ligados em repulsão ao gene *Ppr1*: D-4/650, M-7/1010, AA-14/880, AH-11/400 e AR-19/1095.

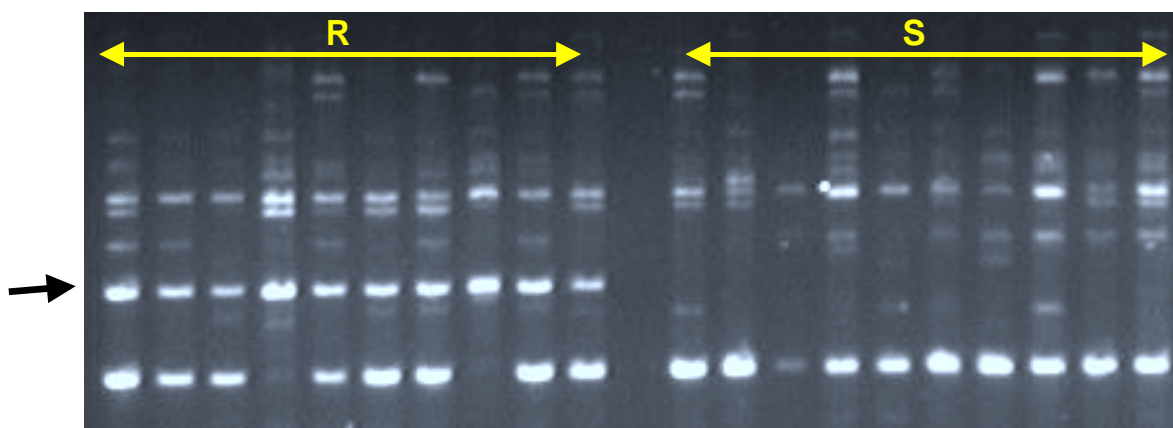


Figura 2 – Amplificação de DNA dos “bulks” abertos. O DNA de 10 indivíduos resistentes (R) e de 10 suscetíveis (S) à ferrugem foram amplificados com o “primer” AT-9. A seta indica a banda marcadora AT9/917, que co-segrega com o fenótipo de resistência.

Quadro 1 – Denominação e seqüências de “primers” que geraram marcadores ligados ao gene *Ppr1*, com o respectivo número de recombinantes nas 20 plantas que constituíram os “bulks” de plantas resistentes e suscetíveis

“Primer”	Seqüência (5'-3')	Tipo de Marcador	Proporção de Plantas Recombinantes
AT-9	CCGTTAGCGT	CIS	0/20
AV-10	ACCCCTGGCA	CIS	1/20
K-1	CATTGAGCC	CIS	1/20
AC-8	TTTGGGTGCC	CIS	1/19
AE-9	TGCCACGAGG	CIS	1/19
AM-6	CTCGGGATGT	CIS	2/20
E-6	AAGACCCCTC	CIS	2/19
AK-20	TGATGGCGTC	CIS	5/20
D-4	TCTGGTGAGG	TRANS	1/20
AH-11	TTCCGCTGAGA	TRANS	1/20
AR-19	CTGATCGCGG	TRANS	1/19
AA-14	AACGGGCCAA	TRANS	2/19
M-7	CCGTGACTCA	TRANS	3/20

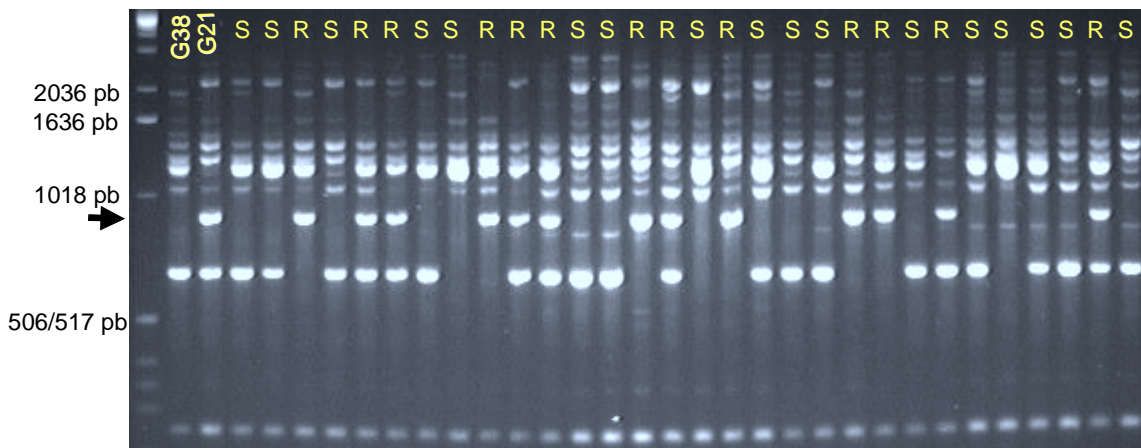


Figura 3 - Amplificação de DNA com o “primer” AT-9 em parte da progênie oriunda do cruzamento G38 x G21. A seta indica a presença da banda AT9/917, que co-segrega com o fenótipo de resistência à ferrugem do eucalipto. R = resistente e S = suscetível.

### 3.2. Construção de grupos de ligação com marcadores RAPD

A partir da análise de co-segregação entre a presença dos 13 marcadores selecionados com a resistência à ferrugem nos 117 indivíduos iniciais da progênie, obteve-se um único grupo de ligação, com oito marcadores em acoplamento e cinco em repulsão com o gene *Ppr1* (Figura 4).

Os 13 marcadores constituem uma janela genética de 77,1 cM. Os seis marcadores em acoplamento mais próximos ao gene *Ppr1* (K1/1130 a AV10/765 e AM6/440) perfazem um intervalo de apenas 5,2 cM.

No mapeamento genético de toda a progênie, apenas os seis “primers” que geraram marcadores com forte ligação genética com o gene de resistência à ferrugem na etapa anterior foram utilizados na amplificação do DNA dos demais 877 indivíduos. A partir da análise de co-segregação entre a presença dos seis marcadores com a resistência à ferrugem nos 994 indivíduos da progênie, obteve-se um grupo de ligação contendo o gene *Ppr1*, perfazendo uma janela genética de 11,2 cM (Figura 5).

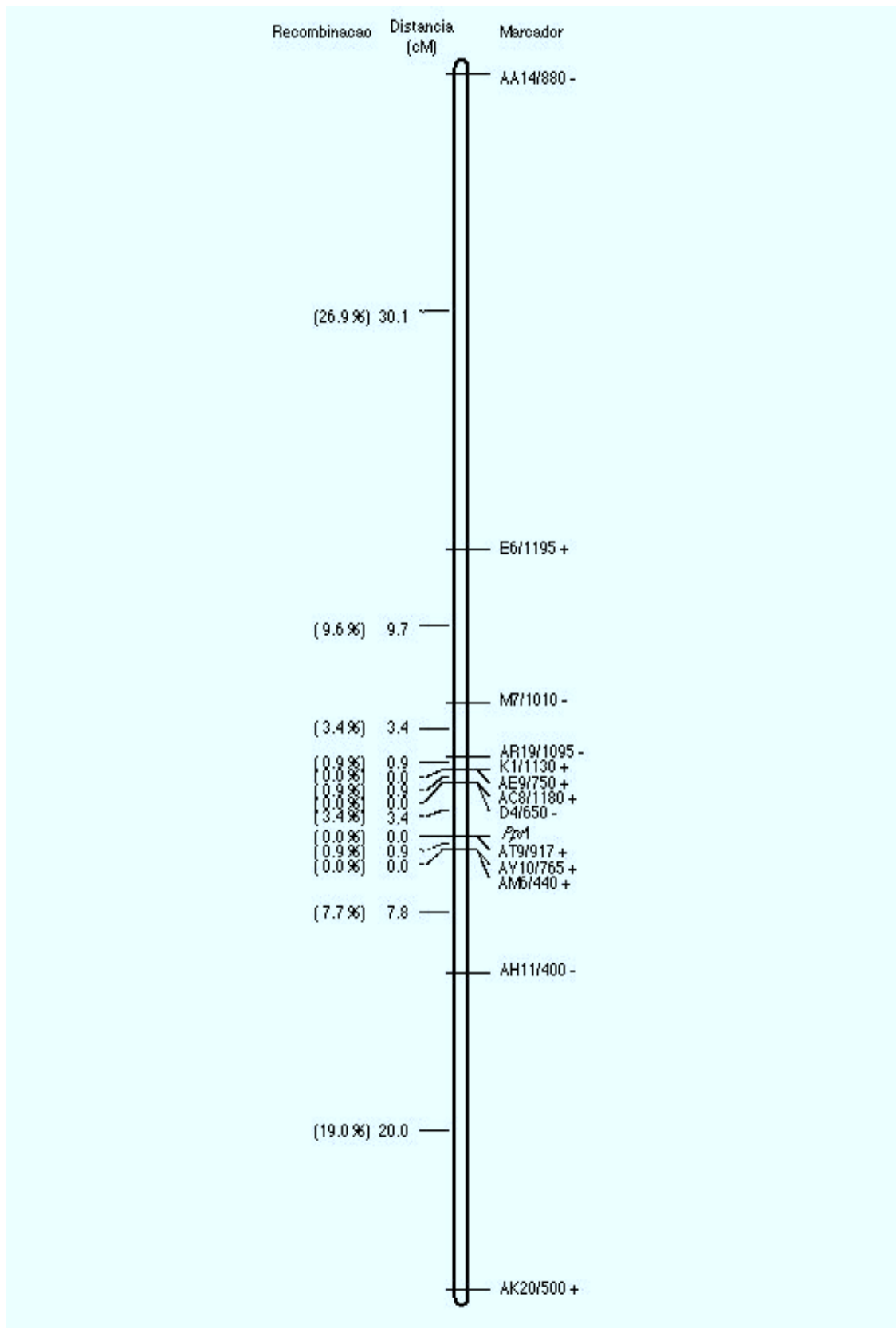


Figura 4 – Grupo de ligação contendo marcadores RAPD em acoplamento (+) e em repulsão (-) com o gene *Ppr1*, que confere resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis*, construídos a partir dos dados de co-segregação entre marcadores RAPD e a resistência à ferrugem em 117 indivíduos derivados da progênie oriunda do cruzamento G38 x G21.

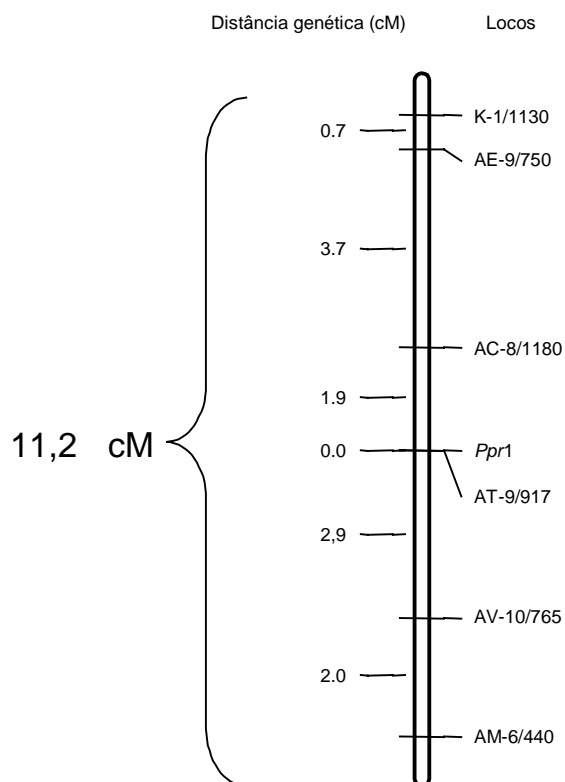


Figura 5 - Grupo de ligação de marcadores RAPD em acoplamento com o gene *Ppr1*, que confere resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis*, construído a partir dos dados de co-segregação entre marcadores RAPD e a resistência à ferrugem em 994 indivíduos da progênie oriunda do cruzamento G38 x G21.

Em geral, o grupo de ligação obtido a partir dos dados de todos os indivíduos da progênie apresentou aumento nas distâncias genéticas entre todos os marcadores, em comparação com o grupo obtido com os 117 indivíduos iniciais, além da separação entre os marcadores K1/1130 e AE9/750. Exceções são feitas entre o marcador AC8/1180 e o gene *Ppr1*, com redução na distância genética e entre o marcador AT9/917 e o gene *Ppr1*, que permaneceram fortemente ligados. Nesse caso, não ocorreu quebra de ligação entre o marcador e o gene de resistência à ferrugem em nenhum dos 994 indivíduos avaliados. Todas as plantas avaliadas como resistentes apresentaram a banda marcadora AT9/917, enquanto todas as plantas suscetíveis não exibiram o referido marcador.

O marcador AT9/917 destacou-se no mapeamento de todos os indivíduos da progênie como o mais próximo do gene *Ppr1*. Este marcador foi clonado e seqüenciado, porém a seqüência de nucleotídios não apresentou homologia com nenhuma seqüência depositada em bancos de dados.

## DISCUSSÃO

A combinação entre marcadores RAPD e a técnica de BSA (Michelmore et al., 1991) mostrou-se muito útil na identificação de 13 marcadores RAPD ligados a *Ppr1* de *E. grandis*, clone G21, um gene de efeito principal na resistência à ferrugem (*P. psidii*). Essa metodologia também foi utilizada no mapeamento de genes de resistência em outras espécies florestais, como o gene *Lrd1* na interação *Melampsora medusae* x *Populus deltoides* (Tabor et al., 2000), o gene R em *C. ribicola* ("blister rust") x *P. lambertiana* (Devey et al., 1995) e o gene *Fr1* em *C. quercuum* f. sp. *fusiforme* ("fusiform rust") x *P. taeda* (Wilcox et al., 1996) e na identificação de três marcadores ligados à resistência à mancha foliar no elmo chinês (*Ulmus parvifolia* Jacq.), causada por *Stegophora ulmea* (Schw.:Fries) Sydow & Sydow (Benet et al., 1995).

Apesar de utilizar somente plantas da classe S0 de severidade na composição do "bulk" de DNA, a análise de todos os indivíduos segregantes revelou que as plantas da classe S1 também apresentavam os referidos marcadores. Assim, a análise molecular confirmou a suspeita de que plantas com sintomas iniciais de "fleck", com posterior evolução a pústulas puntiformes, também possuíam o gene de resistência herdado de G21 (Capítulo 2).

Dentre os marcadores identificados, AT9/917 apresentou completa ligação genética com o gene *Ppr1*. Em geral, marcadores RAPD constituem-se de seqüências de DNA repetitivo e disperso no genoma. Esse deve ser o caso do marcador AT9/917, já que este não apresentou homologia com genes de resistência, impossibilitando seu uso na identificação de clones de DNA candidatos a conterem o gene *Ppr1* por meio da hibridização. Todavia, esse marcador RAPD pode ser convertido em um SCAR ("sequence characterized amplified regions", Paran & Michelmore, 1993). Essa abordagem tem sido utilizada para diversas espécies vegetais, principalmente olerícolas (Martin et al., 1993), havendo apenas um relato da sua aplicação em essência florestal, na tentativa de clonagem do loco *Mmd1* de *Populus trichocarpa*, que confere resistência à ferrugem causada por *Melampsora* spp. (Stirling et al., 1999). A conversão do marcador AT9/917 em SCAR também permitirá localizar *Ppr1* no mapa genético de *E. grandis*, avaliar sua presença em outros genótipos de

*E. grandis* e verificar se a resistência encontrada no clone G21 é distinta daquela observada no clone G35 (Capítulo 2).

Com base no tamanho da progênie utilizada neste trabalho, estima-se que a maior distância possível entre o marcador AT9/917 e o gene *Ppr1* é de 0,462 cM (Hanson, 1959). Como em *E. grandis* a distância genética de 1 cM corresponde a uma distância física média de 395 Kb (Grattapaglia & Sederoff, 1994), o marcador AT9/917 pode se localizar a uma distância física máxima de 182,5 Kb do gene *Ppr1*. Essa distância genética está dentro da faixa de tamanho de insertos passíveis de serem clonados em vetor BAC (“bacterial artificial chromosome”), evidenciando ser exequível a clonagem posicional da região genômica que contém *Ppr1* em um BAC ou série de BACs sobrepostos.

A clonagem desse gene possibilitará maior compreensão da base molecular da resistência à ferrugem em *Eucalyptus*, bem como permitirá sua comparação com outros genes de resistência em plantas. Além disso, a partir do estabelecimento de um protocolo de regeneração será possível transferir esse gene, via transformação genética, para clones suscetíveis, visando confirmar sua função biológica na resistência à ferrugem em *Eucalyptus*.

O gênero *Eucalyptus* constitui um sistema modelo para estudos genéticos em essências florestais, em face das seguintes características: o alto nível de polimorfismo dentro de espécies e entre espécies; a obtenção de híbridos interespecíficos férteis, que apresentam grande efeito da heterose; a capacidade de florescimento precoce (Moncur et al., 1994); a facilidade de propagação vegetativa e manipulação com a técnica de cultura de células e tecidos (Yang et al., 1995; Ito et al., 1996) e de regeneração a partir da organogênese (Bandyopadhyay et al., 1999; Lainé & David, 1994; Tibok et al., 1995; Barrueto Cid et al., 1999) ou via embriogênese somática (Watt et al., 1991); e, ainda, a disponibilidade de métodos para transformação de plantas por meio da biolística (Serrano et al., 1996) ou via *Agrobacterium* (Machado et al., 1997).

## CONCLUSÕES GERAIS

A identificação de fontes de resistência à ferrugem em *Eucalyptus* tem sido feita a partir de infecções naturais, em áreas onde a enfermidade é severa, ou sob inoculação artificial. Porém, não há metodologia padrão e de fácil aplicação para avaliar a resistência à ferrugem em grande número de plantas. Assim, desenvolveu-se, com base no tamanho das pústulas e número de uredínias/pústula, a seguinte escala de notas para quantificação da severidade da ferrugem em plantas inoculadas: S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade, com necrose ou “fleck”; S1 = pústulas puntiformes, < 0,8 mm de diâmetro, com uma ou duas uredínias; S2 = pústulas medianas, de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro, com aproximadamente 12 uredínias; e S3 = pústulas grandes, > 1,6 mm de diâmetro, com 20 ou mais uredínias. Plantas com severidade S0 e S1 foram consideradas resistentes e aquelas de severidade das classes S2 e S3, suscetíveis.

No estudo de herança da resistência à ferrugem, 10 progênies de irmãos-completos, oriundas do cruzamento entre clones suscetíveis e resistentes, foram inoculadas com o isolado monopustular UFV-2 de *P. psidii* e avaliadas entre os 12 e 24 dias após a inoculação. Três progênies foram resistentes, quatro foram suscetíveis à ferrugem e três segregaram quanto à resistência. Dessas três últimas, duas segregaram na proporção de 1:1 (R:S) e ajustaram-se ao modelo genético de herança mendeliana monogênica e dominante. O modelo de segregação da resistência em uma das progênies foi confirmado pela avaliação de maior número de indivíduos segregantes. Esse gene de resistência, oriundo do genitor G21, foi designado de *Ppr1* (*Puccinia psidii* resistance).

A presença de *Ppr1* não garante resistência completa, pois entre as plantas com estes genes estavam também aquelas de fenótipo S1, que apresentaram esporulação reduzida do patógeno. É possível que genes de resistência de efeito secundário também contribuam para a resistência dos clones G21 e G35. Essa contribuição foi evidenciada pela variação na severidade da ferrugem entre plantas das progênies avaliadas em diferentes períodos após a inoculação. Plantas portadoras do gene de efeito principal e uma combinação favorável de genes de efeito secundário podem apresentar resistência com fenótipo de resistência típico da classe S0, enquanto plantas

com gene de efeito principal e com combinação desfavorável dos genes de efeito secundário podem apresentar resistência característica da classe S1.

A análise de segregação evidenciou que a resistência do clone G26 encontrava-se em homozigose, enquanto os clones G21 e G35 eram heterozigotos (Rr) para resistência. Testes de alelismo, em progênies obtidas entre um clone suscetível com indivíduos resistentes, oriundos do cruzamento entre os dois clones resistentes e heterozigotos, devem ser feitos para elucidar se a resistência desses clones é determinada pelo mesmo gene.

A resistência do clone G21 foi efetiva contra 21 isolados de *P. psidii* procedentes de diferentes origens geográficas, manifestando-se, na maioria dos casos, na forma de reação de imunidade aparente e hipersensibilidade, com desenvolvimento de pontos cloróticos ("fleck") aos 12 d.a.i. e evoluindo para pontos necróticos aos 22-24 d.a.i.

Utilizando-se a metodologia de BSA em uma progênie segregante com 994 indivíduos, foram identificados e mapeados seis marcadores em acoplamento com o gene *Ppr1*, perfazendo uma janela genética de 11,2 cM. O marcador AT9/917 foi constatado apenas nas plantas resistentes. A seqüência de nucleotídios desse marcador não revelou homologia significativa com genes de resistência em plantas. Tendo em vista a proximidade genética e provavelmente física, esse marcador poderá ser utilizado na clonagem posicional de *Ppr1*.

## BIBLIOGRAFIA

- ALFENAS, A.C., DEMUNER, N.L., BARBOSA, M.M. 1989. A ferrugem e as opções de controle. *Correio Agrícola* 1:18-20.
- ALFENAS, A.C., VALLE, L.A.C., XAVIER, A.A., BROMMONSCHENKEL, S.H., GRATTAPAGLIA, D., SILVA, C.C., BERTOLUCCI, F.L., PENCHEL, R. 1997. *Eucalyptus rust*: genetic variability of elite clones and histological characterization of the resistance reaction. IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypt. Vol. 2, pp. 60-64.
- ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A., MACABEU, A.J., SARTÓRIO, R.C. 1993. Eficiência de triadimenol, oxicarboxin e diniconazole para o controle da ferrugem (*Puccinia psidii*) em brotações de *Eucalyptus cloeziana*, em condições de campo. *Revista Árvore* 17:247-263.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLAR, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410.
- ANDRADE, E.N. 1961. O Eucalipto. Edição Comemorativa (2<sup>a</sup>. ed). São Paulo, SP. 677p.
- BANDYOPADHYAY, S., CANE, K., RASMUSSEN, G., HAMILL, J.D. 1999. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially

- important temperate eucalypt species - *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. Plant Sci. 140:189-198.
- BARRUETO CID, L.P., MACHADO, A.C.M.G., CARVALHEIRA, S.B.R.C., BRASILEIRO, A.C.M. 1999. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56:17-23.
- BENET, H., GURIES, R.P., BOURY, S., SMALLEY, E.B. 1995. Identification of RAPD markers linked to a black leaf spot resistance gene in Chinese elm. Theor. Appl. Genet. 90:1068-1073.
- BENT, A.F., KUNKEL, B.N., DAHLBECK, D., BROWN, K.L., SCHIMIDT, R., GIRAUDAT, J., LEUNG, J., STASKAWICZ, B.J. 1994. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Science 265:1856-1860.
- CAHILL, D.M., BENNETT, I.J., MCCOMB, J.A. 1992. Resistance of micropropagated *Eucalyptus marginata* to *Phytophthora cinnamomi*. Plant Dis. 76:630-632.
- CARNAGIE, A.J., ADES, P.K., KEANE, P.J., SMITH, I.W. 1998. *Mycosphaerella* diseases of juvenile foliage in a eucalypt species and provenance trial in Victoria, Australia. Australian Forestry 61:190-194.
- CARVALHO, A.O. 1992. Progresso da ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) do eucalipto no sudeste da Bahia e resistência de *Eucalyptus* à doença. Viçosa, MG: UFV. 64p. (Tese MS).
- CARVALHO, A.O., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A., CARMO, M.G.F. 1998. Resistência de espécies, progênies e procedências de *Eucalyptus* à ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter. Pesq. Agropec. Bras. 33:139-147.
- CASTRO, H.A. 1983. Padronização de metodologia de inoculação e avaliação da resistência de *Eucalyptus* spp. a ferrugem causada por *Puccinia psidii* Winter. ESALQ. Piracicaba, SP. 116p. (Tese DS).
- CASTRO, H.A., KRUGNER, T.L., BERGAMIN FILHO, A. 1985. Especialização fisiológica no sistema *Eucalyptus grandis* - *Puccinia psidii* Winter. Ciência e Prática Lavras 9:80-92.
- CASTRO, H.A., KRUGNER, T.L., IDERIHA, C.H.F, CAPELLO, M.S.C, MARCHI, A.B. 1983. Inoculação cruzada de *Eucalyptus*, goiaba (*Psidium guajava*) e jameiro (*Syzygium jambos*) com *Puccinia psidii*. Fitopatol. Bras. 8:491-497.
- CERVERA, M.T., GUSMÃO, J., STEENACKERS, M., PELEMAN, J., STORME, V., VANDEN BROECK, A., VAN MONTAGU, M., BOERJAN, W. 1996. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. Theor. Appl. Genet. 93:733-737.
- COELHO, L. 1988. Variabilidade fisiológica de *Puccinia psidii* Winter – Ferrugem do eucalipto. UFV. Viçosa, MG. 68p (Tese MS).
- CONRADIE, E., SWART, W.J., WINGFIELD, M.J. 1992. Susceptibility of *Eucalyptus grandis* to *Cryphonectria cubensis*. Eur. J. For. Path. 22:312-315.
- COUTINHO, T.A., WINGFIELD, M.J., ALFENAS, A.C., CROUS, P.W. 1998. Eucalyptus rust: a disease with the potential for serious international implications. Plant Dis. 82:819-925.
- CRUTE, I.R. & PINK, D.A.C. 1996. Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. The Plant Cell 8:1747-1755.
- DEVEY, M.E., DELFINO-MIX, A., KINLOCH, B.B., NEALE, D.B. 1995. Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to

- white pine blister rust in sugar pine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:2066-2070.
- DI STEFANO, J.F., FOURNIER, L.A., CARRANZA, J., MARIN, W., MORA, A. 1998. Invasive potential of *Syzygium jambos* (Myrtaceae) in forest fragments: the case of Ciudad Colon, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 46:567-573.
- DIANESE, J.C., HARIDASAN, N., MORAES, T.S.A. 1986. Screening *Eucalyptus* for rust resistance en Bahia. Trop. Pest Manag. 32:292-295.
- DIANESE, J.C., MORAES, T.S.A., SILVA, A.R. 1984. Response of *Eucalyptus* to field infection by *Puccinia psidii*. Plant Dis. 68:314-316.
- DUNGEY, H.S., POTTS, B.M., CARNEGIE, A.J., ADES, P.K. 1997. *Mycosphaerella* leaf spot disease: genetic variation in damage to *Eucalyptus nitens*, *Eucalyptus globulus*, and their F1 hybrid. Can. J. For. Res. 27:750-759.
- ELDRIDGE, K.G., DAVIDSON, J., HARDWOOD, C., VAN WYK, G. 1994 Eucalypt domestication and breeding. Oxford: Oxford Science Publications, Clarendon Press,. 288p.
- ELLIS, J., DODDS, P., PRYOR, T. 2000. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. Curr. Opin. Plant Biol. 3:278-284.
- FERREIRA, F.A. 1989. Ferrugem do eucalipto. In: Patologia Florestal. Principais Doenças Florestais no Brasil. Viçosa, MG, Sociedade de Investigações Florestais, pp 129-152.
- FERREIRA, F.A. 1983. Ferrugem do eucalipto. Revista Árvore 7:91-109.
- FERREIRA, F.A. & SILVA, A.R.C. 1982. Comportamento de procedências de *Eucalyptus grandis* e de *E. saligna* à ferrugem (*Puccinia psidii*). Fitopatol. Bras. 7:23-27.
- FERREIRA, M. & SANTOS, P.E.T. 1997. Melhoramento genético florestal dos *Eucalyptus* no Brasil – Breve histórico e perspectivas. In: IUFRO CONGRESS ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador, BA. Proceedings ..., Colombo: EMBRAPA-CNPQ. v.1, p.14-34.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. EMBRAPA-CENARGEN. 220p.
- FLOR, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. Phytopathol. 9:275-296.
- FORBES, G.A. & JEGER, M.J. 1987. Factors affecting the estimation of disease intensity in simulated plant structures. Z. Pflkrankh. Pflschutz 94, 113-120.
- GIOVANNONI, J.J., WING, R.A., GANAL, M.W., TANKSLEY, S.D. 1991. Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping. Nucleic Acids Res. 19:6553-6558.
- GODOY, C.V., CARNEIRO, S.M.T.P.G., IAMAUTI, M.T., PRIA, M.D., AMORIM, L., BERGER, R.D., BERGAMIN FILHO, A. 1997. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. Z. Pflkrankh. Pflschutz 104, 336-345.
- GONÇALVES, S. 1929. Lista preliminar das doenças das plantas do estado do Espírito Santo. Rio de Janeiro. Ministério da Agricultura. pp 1-12.
- GRATTAPAGLIA, D. & SEDEROFF, R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. Genetics, 137:1121-1137.
- HANSON, W.D. 1959. Minimum family sizes for the planning of genetic experiments. Agronomy J. 52:711-715.

- HARDNER, C.M. & POTTS, B.M. 1995. Inbreeding depression and changes in variation after selfing in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus*. *Silvae Genet.* 44:46-54.
- HARKINS, D.M., JOHNSON, G.N., SKAGGS, P.A., DELFINO-MIX, A., DUPPER, G.E., DEVEY, M.E., KINLOCH, B.B., NEALE, D.B. 1998. Saturation mapping of a major gene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. *Theor. Appl. Genet.* 97:1355-1360.
- ITO, K., DOI, K., TATEMACHI, Y., SHIBATA, M. 1996. Plant regeneration of eucalypts from rotation cultures. *Plant Cell Reports* 16:42-54.
- JOFFILY, J. 1944. Ferrugem do eucalipto. *Bragantia* 4:475-487.
- JONES, D.A., THOMAS, C.M., HAMMOND-KOSACK, K.E., BALINT-KURTI, P.J., JONES, J.D.G. 1994. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266:789-793.
- JUNGHANS, D.T., ALFENAS, A.C. BROMMONSCHENKEL, S.H., ODA, S., MELLO, E.J. 1998. Distâncias genéticas entre clones de *Eucalyptus grandis* resistentes e suscetíveis à ferrugem (*Puccinia psidii*) estimadas por meio de marcadores RAPD. In: Anais do V Encontro Mineiro de Geneticistas. Viçosa, MG. SBG/UFV. pp. 74 (Resumo 31).
- JUNGHANS, D.T., ALFENAS, A.C., BROMMONSCHENKEL, S.H., VALLE, L.A.C., ODA, S., MELLO, E.J. 1999. Inheritance and genetic mapping of rust (*Puccinia psidii*) resistance in *Eucalyptus grandis*. *Fitopatol. Bras.* 24 (suppl.):294.
- KINLOCH, B.B. 1992. Distribution and frequency of a gene for resistance to white pine blister rust in natural populations of sugar pine. *Can. J. Bot.* 70:1319-1323.
- KINLOCH, B.B., PARKS, G.K., FOWLER, C.W. 1970. White pine blister rust: simply inherited resistance in sugar pine. *Science* 167:193-195.
- KINLOCH, B.B., SNIEZKO, R.A., BARNES, G.D., GREATHOUSE, T.E. 1999. A major gene for resistance to white pine blister rust in western white pine from the Western Cascade range. *Phytopathology* 89:861-867.
- KOLMER, J.A. 1996. Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:435-455.
- KOSAMBI, D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12:172-175.
- KRANZ, J. 1988. Measuring Plant Disease. In: Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology. J. Kranz & J. Rotem (Eds). Springer-Verlag Heidelberg. pp. 35-50.
- LAINÉ, E. & DAVID, A. 1994. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. *Plant Cell Rep.* 13:473-476.
- LANDER, E.S., GREEN, P., ABRAHAMSON, J., BARLOW, A., DALY, M.J., LINCON, S.E., NEWBURG, L. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.
- LAUDON, G.F. & WATERSTON, J.M. 1965. *Puccinia psidii*. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, nº 56.
- LEPPIK, E.E. 1970. Gene centers of plants as sources of diseases resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 8:323-344.
- LEFRÈVE, F., GOUÉ-MOURIER, M.C., FAIVRE-RAMPANT, P., VILLAR, M. 1998. A single gene cluster controls incompatibility and partial resistance to various *Melampsora larici-populina* races in hybrid poplar. *Phytopathology* 88:156-163.

- LITTLEFIELD, L.J. 1981. Biology of Plant Rusts. Iowa State University Press, Ames, IA.
- MACHADO, L.O.R., ANDRADE, G.M., BARRUETO CID, L.P., PENCHEL, R.M., BRASILEIRO, A.C.M. 1997. *Agrobacterium* strain specificity and shooty tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*). Plant Cell Reports 16:299-303.
- MACLACHLAN, J.D. 1938. A rust of the pimento tree in Jamaica, B.W.I. Phytopathology 28:157-170.
- MARLATT, R.B & KIMBROUGH, J.W. 1979. *Puccinia psidii* on *Pimenta dioica* in South Florida. Plant Dis. Rep. 63:510-512.
- McINTOSH, R.A. & BROWN, G.N. 1997. Anticipatory breeding for resistance to rust diseases in wheat. Annu. Rev. Phytopathol. 35:311-326.
- McINTOSH, R.A, WELLING, C.R., PARK, R.F. 1995. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. Melbourne:CSIRO. 200p.
- MARTIN, G.B., BROMMONSCHENKEL, S.H., CHUNWONGSE, J., FRARY, A., GANAL, M.W., SPIVEY, R., WU, T., EARLE, E.D., TANKSLEY, S.D. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. Science 262:1432-1436.
- MEKSEM, K., DOUBLER, T.W., CHANCHAROENCHAI, K., NJITI, V.N., CHANG, S.J.C., RAO ARELLI, A.P., CREGAN, P.E., GRAY, L.E., GIBSON, P.T., LIGHTFOOT, D.A. 1999. Clustering among loci underlying soybean resistance to *Fusarium solani*, SDS and SCN in near-isogenic lines. Theor. Appl Genet. 99:1131-1142.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I., KESSELI, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9828-9832.
- MIELKE, J.L. 1943. White pine blister rust in western North America. Yale University School of Forest, New Haven. Bull. N<sup>o</sup> 52.
- MONCUR, M.W., RASMUSSEN, G.F., HASAN, O. 1994. Effect of paclobutrazol on flower-bud production in *Eucalyptus nitens* espalier seed orchards. Can. J. For. Res. 24:46-49.
- NEWCOMBE, G & BRADSHAW Jr., H.D. 1996. Quantitative trait loci conferring resistance in hybrid poplar to *Septoria populicola*, the cause of leaf spot. Can. J. For. Res. 26:1943-1950.
- NEWCOMBE, G., BRADSHAW Jr., H.D., CHASTAGNER, G.A., STETTLER, R.F. 1996. A major gene for resistance to *Melampsora medusae* f.sp. *deltoidae* in a hybrid poplar pedigree. Phytopathology 86:87-94.
- O'MALLEY, D.M & WHETTEN, R. 1997. Molecular markers and forest trees. In: DNA markers: protocols, applications and overviews. Caetano-Anollés, G & Gresshoff, P.M. (ed.), John Wiley & Sons, New York.
- PARAN, I. & MICHELMORE, R.W. 1993. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance gene in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85:985-993.
- PARNISKE, M., HAMMOND-KOSACK, K.E., GOLSTEIN, C., THOMAS, C.M., JONES, D.A., HARRISON, K., WULFF, B.B.H., JONES, J.D.G. 1997. Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the *Cf-4-9* locus of tomato. Cell 91:821-832.
- PASSADOR, G.C. 1994. Resistência à ferrugem e análise de isoenzimas em procedências e progênies de *Eucalyptus*. Viçosa, MG: UFV. 69p (Tese MS).

- PINON, J., VAN DAM, B.C., GENETET, I., de KAM, M. 1987. Two pathogenic races of *Melampsora larici-populina* in North Western Europe. Eur. J. For. Pathol. 17:47-53.
- PRETORIUS, Z.A., RIJKENBERG, F.H.J., WILCOXSON, R.D. 1990. Influence of genetic background on the expression of wheat leaf rust resistance gene *Lr22a*. Phytopathology 80:579-584.
- RAYACHHETRY, M.B., ELLIOTT, M.T., VAN, T.K. 1997. Natural epiphytotic of the rust *Puccinia psidii* in *Malaleuca quinquenervia* in Florida. Plant Dis. 81:831.
- REN, S.X., McINTOSH, R.A., SHARP, P.J., THE, T.T. 1996. A storage-protein marker associated with the suppressor of *Pm8* for powdery mildew resistance in wheat. Theor. Appl. Genet. 93:1054-1060.
- RICHTER, T.E. & RONALD, P.C. 2000. The evolution of disease resistance genes. Plant Mol. Biol. 42:195-204.
- ROSSI, M., GOGGIN, F.L., MILLIGAN, S.B., KALOSHIAN, I., ULLMAN, D.E., WILLIAMSON, V.M. 1998. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:9750-9754.
- ROUPPE VAN DER VOORT, J., KANYUKA, K., VAN DER VOSSSEN, E., BENDAHMANE, A., MOOIJMAN, P., KLEIN-LANKHORST, R., STIEKEMA, W., BAULCOMBE, D., BAKKER, J. 1999. Tight physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 into cultivated potato. Mol. Plant-Microbe Interac. 12:197-206.
- RUIZ, R.A.R., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A., ZAMBOLIM, L. 1987. Fungicidas protetores e sistêmicos para o controle da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*. Revista Árvore 11:56-65.
- RUIZ, R.A.R., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A., VALLE, F.X.R. 1989a. Influência de temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. Fitopatol. Bras. 14:55-61.
- RUIZ, R.A.R., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A. 1989b. Influência de temperatura, luz e origem do inóculo sobre a produção de uredíniosporos e teliosporos de *Puccinia psidii*. Fitopatol. Bras. 14:70-73.
- RUIZ, R.A.R., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A., BARBOSA, M.M. 1989c. Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, em condições de campo. Fitopatol. Bras. 14:73-81.
- SERRANO, L., ROCHANGE, F., SEMBLAT, J.J., TEULIÈRES, C., BOUDET, A-M. 1996. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. J. Exp. Bot. 47:285-290.
- SHIVAS, R.G & WALKER, J. 1994. *Puccinia cygnorum* sp. nov. on *Kunzea ericifolia* in Australia. Mycol. Res. 98:22-24.
- SLOPEK, S.W. 1989. An improved method of estimating percent leaf area diseased using a 1 to 5 disease assessment scale. Can. J. Plant Pathol. 11:381-387.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. 2000. Participação do Brasil no mercado internacional (<http://www.sbs.org.br/estatisticas.html>).

- SORIA, F. & BORRALHO, N.M.G. 1997. The genetics of resistance to *Phoracantha semipunctata* attack in *Eucalyptus globulus* in Spain. *Silvae Genet.* 46:365-369.
- STEENACKERS, M., STEENACKERS, v., DELPORTE, T. 1994. A new physiological race of *Melampsora populina* on Belgium. Proc. Int. Poplar Commission and FAO, Working Group on Disease. FAO. Rome.
- STEWART, F.C. 1906. An outbreak of the European currant rust (*Cronartium ribicola* Dietr.). N.Y. Agr. Exp. Sta. Geneva Tech. Bull. 2:61-74.
- STIRLING, B.V., NEWCOMBE, G., BRADSHAW Jr., H.D. 1999. Map-based cloning of *Mmd1*, a poplar leaf rust resistance gene. Plant and Animal Genome VII Conference (<http://www.intl-pag.org/pag/7/abstracts/pag7810.html>).
- TANKSLEY, S.D., GANAL, M.W., MARTIN, G.B. 1995. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends in Genet.* 11:63-68.
- TIBOK, A., BLACKHALL, N.W., POWER, J.B., DAVEY, M.R. 1995. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. *Plant Sci.* 110:139-145.
- TOBIAS, C.M. 1996. A kinase suicide squad in tomato. *Trends Plant Sci.* 1:133-134.
- VALVERDE, S.R. 2000. A contribuição do setor florestal para o desenvolvimento socio-econômico: uma aplicação de modelos de equilíbrio multissetoriais. Viçosa, MG. UFV. 105p (Tese DS).
- VAN ZYL, L.M. & WINGFIELD, M.J. 1999. Wound response of *Eucalyptus* clones after inoculation with *Cryphonectria cubensis*. *Eur. J. For. Pathol.* 29:161-167.
- VILLAR, M., LEFÈVRE, F., BRADSHAW Jr., H.S., TEISSIER, E., du CROS, E.T. 1996. Molecular genetics of rust resistance in poplar (*Melampsora larici-populina* Kleb/*Populus* sp.) by bulked segregant analysis in a 2 x 2 factorial design. *Genetics* 143:531-536.
- WATT, M.P., BLAKEWAY, F., CRESSWELL, C.F., HERMAN, B. 1991. Somatic embryogenesis em *Eucalyptus grandis* hybrids. *South African For. J.* 157:59-65.
- WILCOX, P.L., AMERSON, H.V., KUHLMAN, E.G., LIU, B.H., O'MALLEY, D.M., SEDEROFF, R.R. 1996. Detection of a major gene for resistance to fusiform rust disease in loblolly pine by genomic mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3859-3864.
- WILLIAMS, J.G.K, KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- WILLIAMS, N.D., MILLER, J.D., KLINDWORTH, D.L. 1992. Induced mutations of a genetic suppressor of resistance to wheat stem rust. *Crop Sci.* 32:612-616.
- XAVIER, A.A., MATSUOKA, K., ALFENAS, A.C., SANFUENTES, E.E., JUNGHANS, D.T. 2000. Reação de *Eucalyptus globulus* e *E. nitens* à ferrugem (*Puccinia psidii*). *Fitopatol. Bras.* 25:434.
- YANG, J-C., CHUNG, J-D., CHEN, Z-Z. 1995. Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* X *urophylla* and comparison of growth between micropropagated plantlets and rooted cuttings. *Plant Cell Rep.* 15:170-173.