

MARCELO LUIZ DE LAIA

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE ANÁLOGOS DE GENES DE RESISTÊNCIA
E DESENVOLVIMENTO DE UM MARCADOR SCAR LIGADO AO GENE *Ppr1* EM
*Eucalyptus grandis***

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001**

MARCELO LUIZ DE LAIA

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE ANÁLOGOS DE GENES DE RESISTÊNCIA
E DESENVOLVIMENTO DE UM MARCADOR SCAR LIGADO AO GENE *Ppr1* EM
*Eucalyptus grandis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, para obtenção do Título de "Magister Scientiae".

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001**

MARCELO LUIZ DE LAIA

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE ANÁLOGOS DE GENES DE RESISTÊNCIA E
DESENVOLVIMENTO DE UM MARCADOR SCAR LIGADO AO GENE *Ppr1* EM *Eucalyptus*
grandis

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, para obtenção do Título de "Magister Scientiae".

APROVADA: 18 de outubro de 2001

Prof. Sergio Hermínio Brommonschenkel
(Conselheiro)

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Prof. Elizabeth Pacheco Batista Fontes

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

Aos meus filhos Inael e Marcella,
À minha esposa Janaina,

Dedico

Aos meus pais Geraldo e Maria,
Aos meus irmãos,

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Energia que move o Mundo e que, de alguma maneira, me movimenta e me faz movimentar.

Ao departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À Companhia Suzano de Papel e Celulose, pelo financiamento parcial deste projeto e, principalmente, por me ter dado a oportunidade de poder sonhar.

Ao professor Acelino Couto Alfenas pela amizade, confiança, incentivos e pela orientação, não somente no campo científico, mas, principalmente, no auxílio para entender os percalços da vida.

Aos professores Sérgio Hermínio Brommonschenkel, Everaldo Gonçalves de Barros, Elizabeth Pacheco Batista Fontes, Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, pelas colaborações e sugestões durante a execução e redação deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno e aos demais colegas do Departamento de Fitopatologia da UFV pela agradável convivência e pelo constante estímulo. Dentre estes, destaco o Gaus, o Douglas, o Davi, o Júlio e o Luis Artur, pois suas “dicas” foram imprescindíveis à finalização deste estudo e ao meu aprendizado.

À Márcia por sempre estar com um sorriso largo, solícita e disposta a ajudar.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Fitopatologia da UFV, pelo apoio e pelos ensinamentos.

Enfim, aos inconformados que buscam um mundo onde as diferenças sejam vibrantes emanções da igualdade. Aos Pós-Graduandos que sabem que o mundo é muito maior que suas teses, que fazem de sua Pós-Graduação um tempo de luta por um mundo verdadeiramente democrático. Contudo, apenas aos que fazem do seu dia a dia uma reafirmação de suas idéias, aos que não negam, com a prática diária, os seus ideais.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE ANÁLOGOS DE GENES DE RESISTÊNCIA EM <i>Eucalyptus</i>	5
1 INTRODUÇÃO.....	5
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.1 Material vegetal.....	8
2.2 Obtenção do material genético	8
2.3 Amplificação de análogos de genes de resistência	10
2.4 Clonagem dos análogos de genes de resistência.....	12
2.5 Seqüenciamento e análise dos plasmídeos recombinantes.....	12
2.6 Análise de RFLP.....	13
2.6.1 Preparo da sonda	13
2.6.2 Southern blotting.....	13
3 RESULTADOS	15
3.1 Amplificação de análogos de genes de resistência	15
3.2 Clonagem e caracterização dos RGAs	16
4 DISCUSSÃO.....	25
CAPÍTULO II IDENTIFICAÇÃO DE MARCADOR SCAR ("SEQUENCE CHARACTERIZED AMPLIFIED REGION") LIGADO AO GENE <i>Ppr1</i> EM <i>Eucalyptus grandis</i>	27
1 INTRODUÇÃO.....	27
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1 Material vegetal.....	29
2.2 Extração de DNA e reação de RAPD	29
2.3 Clonagem e seqüenciamento do fragmento RAPD de 917 pb.....	29
2.4 Desenho dos oligonucleotídeos SCAR e amplificação via PCR.....	30
3 RESULTADOS	32
4 DISCUSSÃO.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMO

Laia, Marcelo Luiz de. M.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2001.
Clonagem e caracterização de análogos de genes de resistência e desenvolvimento de um marcador SCAR ligado ao gene *Ppr1* em *Eucalyptus grandis*. Orientador: Acelino Couto Alfenas. Conselheiros: Sergio Hermínio Brommonschenkel e Everaldo Gonçalves de Barros.

A maioria dos genes de resistência (genes R) clonados codifica proteínas que têm domínios conservados. Estas proteínas são classificadas em classes ou subclasses de acordo com a presença ou ausência desses domínios. Domínios do tipo LRR (*Leucine rich repeat*) e NBS (*Nucleotide binding site*) são os mais freqüentes em produtos dos genes R de mono e dicotiledôneas. A presença desses domínios conservados permite o uso da técnica de PCR com vistas ao isolamento e à clonagem de seqüências análogas a genes de resistência (RGA – *Resistance Gene Analog*), mediante o uso de oligonucleotídeos degenerados específicos para regiões conservadas. Associado a mapeamento genético, essa abordagem pode facilitar a clonagem e caracterização de novos genes R. Visando à clonagem e caracterização do gene *Ppr1*, que confere resistência a ferrugem em *E. grandis*, procurou-se neste trabalho identificar RGA's que cossegregassem com este gene. Seqüências análogas a genes R foram amplificadas a partir do DNA isolado de uma matriz de *E. grandis* resistente à ferrugem, com o uso de oligonucleotídeos degenerados que anelam a seqüências que codificam domínios conservados de proteínas de resistência. Os fragmentos amplificados (~600 pb) foram clonados no vetor pGEMT-Easy, transformados em *E. coli* e seqüenciados. Utilizando-se como critérios o tamanho, o rendimento e a qualidade do DNA, 13 clones, dentre noventa obtidos, foram selecionados (ML 5, ML 21, ML 23, ML 25, ML 27, ML 28, ML 29, ML 31, ML 32, ML 33, ML 34, ML 35 e ML 38) para seqüenciamento. Os clones foram comparados entre si e com outros genes de resistência já caracterizados, com base nas suas seqüências de aminoácidos deduzidas. A análise com o algoritmo Blastx revelou que os clones ML27 e ML34 são similares ao gene *N* de *Nicotiana glutinosa* e *RPS5* de *Arabidopsis thaliana*, respectivamente. Além disso, o clone ML27 também foi similar a um homólogo do gene *N* presente em *Pinus radiata*. Os clones ML28, ML21, ML23, ML29 e ML38 não mostraram similaridade significativa com seqüências depositadas em bancos de dados e o clone ML05 possui NBS similar a de um provável transportador ABC de *arabidopsis*. Embora estes clones tenham revelado vários locos RFLP polimórficos entre progenitores da população estudada, nenhum desses polimorfismos cossegregou com

o gene *Ppr1*. Uma segunda fase do trabalho consistiu no desenvolvimento de marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) a partir do marcador RAPD AT9₉₁₇. Para tal, o DNA da matriz G21 (*E. grandis*) foi amplificado com o oligonucleotídeo AT9 e o fragmento de 917pb foi purificado do gel, clonado em vetor apropriado e multiplicado em *E. coli* DH5 α . A partir da seqüência de nucleotídeos deste fragmento, desenharam-se quatro oligonucleotídeos no sentido direto e três no sentido reverso. Os oligonucleotídeos foram combinados entre si a fim de identificar um par que gerasse polimorfismo entre o genótipo resistente (G21) e o genótipo suscetível (G38). Não foi possível obter polimorfismo a partir da amplificação, mas após clivagem do produto da PCR com a enzima de restrição *Cfo* I, obteve-se uma banda de aproximadamente 800 pb que cossegregou com o fenótipo de resistência. Todavia, esta banda não cossegregou com o fenótipo de resistência em outras famílias oriundas do mesmo genitor G21.

ABSTRACT

Laia, Marcelo Luiz de. M.S., Universidade Federal de Viçosa, October 2001. **Cloning and characterization of *Eucalyptus* resistance gene analogs and development of a SCAR marker linked to *Ppr1* gene in *Eucalyptus grandis*.** Advisor: Acelino Couto Alfenas. Committee members: Sergio Hermínio Brommonschenkel and Everaldo Gonçalves de Barros.

The majority of cloned resistance genes (R) codes for proteins which have conserved LRR (Leucine Rich Repeat) and NBS (Nucleotide Binding Site) domains. The presence of these conserved domains allows the use of the specific degenerated primers for these conserved regions and PCR technique to amplify resistance gene analogue sequences (RGAs). Associated to genetic mapping, this approach may facilitate the cloning and characterization of new R genes. Aiming to clone and characterize the *Ppr1* gene, which confers resistance to rust in *Eucalyptus grandis*, this work sought to identify RGAs that would cosegregate with this gene. Degenerated oligonucleotides were used to amplify RGAs from a rust -resistant *E. grandis* clone G21. The amplified fragments (~600 bp) were cloned into the vector pGEMT-EASY, transformed into *E. coli*. Using DNA size, yield and quality criteria, 13 clones, among the 90 obtained, were selected (ML 5, ML 21, ML 23, ML 25, ML 27, ML 28, ML 29, ML 31, ML 32, ML 33, ML 34, ML 35 and ML 38) for sequencing. The clones were compared to each other and to other resistance genes already characterized, based on their deduced amino acid sequences. The Blastx searches revealed that clones ML27 and ML34 are similar to the *N* (*Nicotiana glutinosa*) and *RPS5* (*Arabidopsis thaliana*) genes, respectively. Besides, clone ML27 was also similar to a homologue of the *N* gene present in *Pinus radiata*. Clones ML28, ML21, ML23, ML29 and ML38 did not show significant similarity with sequences in the Genbank and clone ML05 has a NBS similar to a putative Arabidopsis ABC transporter. Southern analyses using these clones revealed several polymorphic RFLP loci in the progenitors of the *Ppr1* mapping population. However, none of them co-segregated with the *Ppr1* gene. The other objective of this work was to develop SCARs (Sequence Characterized Amplified Region) markers from the RAPD AT9 marker. G21 DNA was amplified with the primer AT9 and the 917pb band obtained was gel-purified and cloned into pGEMT-EASY

vector. Based on the nucleotide sequence of this fragment were designed four primers that align in the forward and three in the reverse orientation. Several combinations of forward and reverse primers were tested in order to obtain a pair that could amplify the expected fragment of 917 bp and generate polymorphism between the resistant (G21) and susceptible (G38) genotypes, respectively. It was not possible to obtain polymorphism directly from the amplification; however, after cleavage of the PCR product with the restriction enzyme *CfoI*, a band of approximately 800 bp was obtained, which co-segregated with the resistance phenotype in the mapping population. However, this band did not co-segregate with the resistance phenotype in other families originated from the same G21 progenitor.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, o gênero *Eucalyptus* (Myrtaceae) é o mais utilizado para reflorestamento em áreas tropical e subtropical. Nativo da Austrália e ilhas adjacentes, como Papua, Nova Guiné, Indonésia, Filipinas e Tasmânia (Boland *et al.*, 1984), foi trazido para o Brasil no início do século passado para suprir a necessidade de dormentes para a Companhia Paulista de Estrada de Ferro - FEPASA (Souza, 1992). Engloba mais de 700 espécies entre árvores e arbustos (Boland *et al.*, 1984), das quais aproximadamente 30 têm importância comercial para o Brasil como fonte de matéria prima para a indústria de celulose e carvão. Em 1992, o setor de papel e celulose contribuiu com 1,4% do PIB e as exportações chegaram a aproximadamente 5 bilhões de dólares (ABRACAVE, 1992). O Brasil é o sétimo maior produtor de celulose do mundo e o 11^o maior fabricantes de papel (Valverde, 2000).

Até a década de 70, o eucalipto era considerado uma cultura praticamente livre de doenças. Todavia, com o avanço das áreas reflorestadas para regiões mais quentes e úmidas, com o plantio de espécies mais suscetíveis e com a utilização repetitiva de uma mesma área para plantio, houve 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 para o estabelecimento de novos plantios e a condução de brotações de algumas espécies e procedências de *Eucalyptus* (Ruiz *et al.*, 1987; Ferreira, 1989). Recentemente, três novas doenças de impacto econômico, a murcha-de-ceratocistis, causada por *Ceratocystis fimbriata* (Laia *et al.* 1999), a mancha e a seca de ponteiros de origem bacteriana, causada por espécies de *Erwinia*, *Xanthomonas* e *Pantoea* (Gonçalves *et al.*, 2001) e *Sporothrix eucalypt* (Alfenas *et al.*, 2001) têm sido registradas em várias regiões eucaliptocultoras brasileiras.

A ferrugem do eucalipto incide tanto em mudas no viveiro quanto em plantios novos de até dois anos de idade e em brotações novas após a colheita (Alfenas *et al.* 1989). O patógeno é um parasita biotrófico que infecta folhas jovens e terminais de ramos, causando deformações, morte, perda de dominância apical e redução no crescimento (Alfenas *et al.*, 1989). O ataque de ferrugem em brotações de genótipos

suscetíveis é, freqüentemente, muito severo, levando-as à morte, exigindo a reforma de vários povoamentos após o corte raso (Ruiz *et al.*, 1987). A seleção de espécies, procedências, progênies ou clones resistentes de *Eucalyptus* constitui a estratégia mais eficiente no controle da doença (Alfenas *et al.*, 1997).

O fungo *Puccinia psidii* Winter é nativo da América do Sul e encontra-se amplamente distribuído nas Américas do Sul e Central e nas ilhas do Caribe (Laudon e Waterston, 1965), havendo 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 plantas pertencentes a outras espécies de Myrtaceae, tais como goiabeira, jameiro, jabuticabeira, araçazeiro, pitangueira e jamelãozeiro, dentre outras (Alfenas *et al.*, 1989). Até o presente, o patógeno não foi encontrado na Austrália, ou seja, parece não existir no centro de origem do *Eucalyptus* (Joffily, 1944). No Brasil, provavelmente houve uma especialização do patógeno proveniente de alguma espécie de planta da família Myrtaceae com capacidade de infectar também espécies de *Eucalyptus*. Há, contudo, variabilidade entre populações do patógeno originário de diferentes hospedeiros (Castro *et al.*, 1983).

Embora não tenha havido co-evolução no patossistema *Eucalyptus* - *P. psidii*, uma ampla variabilidade genética quanto à resistência é encontrada nas várias espécies de *Eucalyptus* (Carvalho, 1992; Castro *et al.*, 1983; Dianese *et al.*, 1984; Passador, 1994). Estudos de herança e mapeamento genético da resistência à ferrugem em *Eucalyptus* foram pioneiramente desenvolvidos por Junghans *et al.* (1999). Dentre dez progênies de irmãos-completos de *E. grandis* obtidas a partir de cruzamentos controlados entre genitores suscetíveis e resistentes, encontraram-se quatro progênies suscetíveis (S), três resistentes (R) e três que segregaram na razão de 1:1. Estes resultados sugeriram que, no material estudado, a resistência à ferrugem era dominante e controlada por um gene de efeito principal, *Ppr1*. Após análise de cossegregação entre resistência e marcadores RAPD, os autores encontraram seis marcadores ligados ao gene/loco de resistência (R), delimitando uma janela genética de 11,2 cM, sendo que um dos marcadores (AT9₉₁₇) exibiu completa ligação com a resistência num total de 994 plantas analisadas, indicando que este marcador situa-se a, no máximo, 0,452 cM de *Ppr1* ($p < 0,05$). Considerando que para o eucalipto 1 cM equivale a, aproximadamente, 595 kpb, (Grattapaglia & Bradshaw, 1994), o marcador AT9₉₁₇ está a, no máximo, 258.384 pb de *Ppr1*. Apesar de ser possível identificar um clone contendo AT9₉₁₇ e o gene *Ppr1* em uma biblioteca de grandes fragmentos (BAC), isto não é uma tarefa fácil, uma vez que não se pode determinar em qual lado do gene AT9₉₁₇ se encontra, além da possibilidade deste marcador estar amplamente distribuído

no genoma. Desta maneira, a fim de facilitar a clonagem posicional de *Ppr1*, faz-se necessário a identificação de novos marcadores flanqueando o gene *Ppr1*.

A análise estrutural da maioria dos genes de resistência a doenças de plantas, clonados até o presente, revelou a presença de domínios comuns nos produtos codificados, indicando que o mecanismo de defesa das plantas é conservado. Com base na presença destes domínios, os genes R são agrupados em quatro classes (Quadro 1).

Quadro 1. Classes de genes de resistência a doenças de plantas

Classe	Gene R	Planta	Domínio Conservado	Referência
1	<i>Pto</i>	Tomate	Proteína cinase	Martin <i>et al.</i> 1993
	<i>Cf-9</i>	Tomate		Jones <i>et al.</i> 1994
2	<i>Cf-2</i>	Tomate	LRR-TM	Dixon <i>et al.</i> 1996
	<i>Cf-4</i>	Tomate		Dixon <i>et al.</i> 1998
	<i>Hs1</i>	Beterraba		Jones <i>et al.</i> 1995
3	<i>Xa21</i>	Arroz	LRR-Proteína Cinase	Song <i>et al.</i> 1995
4a	<i>N</i>	Tabaco	TIR-NBS-LRR	Whitham <i>et al.</i> 1994
	<i>L⁶</i>	Linho		Lawrence <i>et al.</i> 1995
4b	<i>RPS2</i>	Arabidopsis	CC-NBS-LRR	Bent <i>et al.</i> 1994
	<i>I₂</i>	Tomate		Ori <i>et al.</i> 1997

Domínio conservado refere-se ao domínio presente na proteína deduzida dos genes correspondentes: LRR (repetição rica em leucina), TM (domínio transmembrana), CC (*coiled coils*), NBS (sítio de ligação de nucleotídeos), TIR (região homóloga a Toll/Interleukin-1 Resistance).

A grande maioria dos genes R codifica proteínas com domínios do tipo NBS-LRR (*Nucleotide Binding Site - Leucine Rich Repeat*) (Hammond-Kosack e Jones, 1997). Estas proteínas contêm pelo menos três domínios discerníveis: uma região NBS na extremidade N terminal e uma região LRR. Na região N terminal existe, além do NBS, uma segunda região variável que pode ser um domínio CC (*coiled coils*) encontrado tanto em proteínas de resistência de dicotiledôneas quanto de monocotiledôneas (Pan *et al.*, 2000) ou um domínio TIR (*Toll* ou *human interleukin receptor-like*) encontrado somente nas proteínas de dicotiledôneas (Whitham *et al.*, 1994; Hammond-Kosack e Jones, 1997).

Os domínios NBS-LRR conservados entre diferentes produtos dos genes de resistência possibilitam o uso da técnica de PCR para o isolamento e a clonagem de genes análogos de resistência (RGA – *resistance gene analog*), utilizando oligonucleotídeos degenerados específicos para estas regiões conservadas. Estratégias

baseadas em oligonucleotídeos degenerados têm sido utilizadas, com sucesso, na clonagem de genes análogos de resistência com sítios NBS-LRR em batata, soja, cevada, arroz e *Arabidopsis* (Leister *et al.* 1996; Leister *et al.* 1998; Kanazin *et al.*, 1996; Yu *et al.* 1996; Aarts *et al.*, 1998; Speelman *et al.*, 1998). Alguns destes RGAs encontraram-se associados a locos de resistência conhecidos, o que demonstra o potencial da estratégia baseada na PCR como uma metodologia auxiliar na clonagem posicional de outros genes de resistência com domínios NBS-LRR (Kanazin, *et al.*, 1996).

A identificação de RGAs em *E. grandis*, ligados à resistência a ferrugem, poderá facilitar a clonagem posicional de *Ppr1*. Além disso, é possível que algum desses RGAs sejam o próprio *Ppr1*.

Além de possibilitar a clonagem posicional do gene *Ppr1*, os trabalhos pioneiros de Junghans (2001) abriram caminho para a realização de seleção assistida por marcadores em *Eucalyptus*. O marcador AT9₉₁₇, que está completamente ligado ao gene *Ppr1*, pode ser utilizado para selecionar genótipos resistentes a ferrugem precocemente.

Portanto, supondo-se que o gene *Ppr1* possui domínio conservado do tipo NBS e que a identificação de um RGA ligado a este gene e ao marcador AT9₉₁₇ seja o próprio *Ppr1*, objetivou-se, neste trabalho: 1) amplificar, clonar e caracterizar RGA's em *E. grandis*, 2) inferir sobre a organização genômica de membros representativos dos RGA's clonados, e 3) verificar se algum dos RGA's e/ou seus homólogos cossegregam com *Ppr1*. Além disso, desenvolveram-se oligonucleotídeos específicos para a seqüência correspondente ao marcador AT9₉₁₇ (Junghans, 2001) com o intuito de obter um marcador do tipo SCAR (Paran e Michelmore, 1993).

CAPÍTULO I
CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE ANÁLOGOS DE GENES DE RESISTÊNCIA
EM *Eucalyptus*

1 INTRODUÇÃO

Enquanto nos animais o processo de defesa do organismo consiste de células especializadas que transitam no organismo pelo sistema circulatório, nas plantas o processo de defesa ocorre no nível celular. A ativação dos mecanismos de defesa vegetal, que ocorre como consequência da interação específica entre genes de avirulência do patógeno e genes de resistência da planta hospedeira provoca a morte celular localizada e restringe o patógeno no sítio de infecção (Creusot *et al.*, 1999).

Os genes de resistência a patógenos possuem domínios comuns e são classificados em classes ou subclasses de acordo com a presença ou não de domínios conservados (Baker *et al.*, 1997). A primeira classe possui apenas um representante, o gene *Pto* que confere resistência do tomateiro a *Pseudomonas syringe* pv *tomato*, e codifica uma proteína cinase do tipo serina/treonina (Martin *et al.*, 1993).

Uma segunda classe de genes codifica proteínas com domínio LRR. Os produtos dos genes *Cf-9*, *Cf-2* e *Cf-4* de tomate que conferem resistência a *Cladosporium fulvum* e *Hs1* de *Beta vulgaris* que confere resistência a nematóide, contêm um domínio LRR (*Leucine Rich Repeat*) na porção amino-terminal e um motivo transmembrânico carboxi-terminal, sugerindo tratar-se de receptores extracitoplasmáticos (Jones *et al.*, 1994; Dixon *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1997; Dixon *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 1997).

Uma outra subclasse de genes de resistência, cujas proteínas codificadas caracterizam-se por possuírem somente um domínio LRR, é representada pelo gene *Xa21* de arroz, que confere resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *orizae* (Song *et al.*, 1995). Este gene une as características da classe LRR extracitoplasmática e da classe cinase de genes de resistência. O produto deste gene contém um domínio LRR amino-terminal e um domínio cinase carboxi-terminal, separados por um domínio transmembrânico. Assim, *Xa21* apresenta as características de um receptor, com um domínio LRR receptor extracitoplasmático e um domínio cinase citoplásmico (Song *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1997).

A maioria dos genes de resistência clonados até o presente codifica proteínas classificadas como NBS-LRR ("Nucleotide Binding Site - Leucine Rich Repeat") (Ellis e Jones, 1998). Estas proteínas possuem pelo menos três domínios conservados: uma região NBS na extremidade N terminal e uma região LRR. Na região N terminal existe, além do NBS, uma segunda região variável que pode ser um domínio CC ("coiled coils") (Pan *et al.*, 2000) ou um domínio homólogo ao domínio *Toll* de *Drosophila* e *IL-1R* de mamífero, denominado TIR (Whitham *et al.*, 1994; Hammond-Kosack e Jones, 1997). O domínio CC está envolvido na interação proteína-proteína e é encontrado em proteínas codificadas por genes presentes tanto em mono quanto em dicotiledôneas, como por exemplo, *RPS2*, *Cre3*, *RPM1*, *I2C*, *Prf*, *Xa1*, *RPP8*, *RPS5*, *Mi* e *RGC2* que conferem resistência a diversos patógenos. O domínio TIR, encontrado somente em proteínas de monocotiledôneas, parece estar envolvido na rota de transdução de sinais. Os genes *L⁶*, *N*, *RPP5*, *M* e *RPP1* incluem-se nesta subclasse (Pan *et al.*, 2000).

Como nenhum domínio transmembrânico foi caracterizado nestas proteínas, supõe-se que estejam localizadas no citoplasma. Recentes estudos sugerem que as regiões NBS e TIR sejam responsáveis pela sinalização e que a região LRR esteja envolvida no reconhecimento do patógeno (Dodds *et al.*, 2001). Segundo Dodds *et al.* (2001), a região LRR pode interagir com a proteína de avirulência ou com um complexo de proteínas formado pela proteína de avirulência do patógeno e outras proteínas do hospedeiro.

Vários tipos de domínios NBS são encontrados em diferentes proteínas (Traut, 1994; Li *et al.*, 1997), que regulam a atividade de proteases que podem iniciar a apoptose celular. Em plantas, os mecanismos de defesa incluem um processo semelhante a apoptose celular de animais denominado resposta de hipersensibilidade (Pan *et al.*, 2000).

A presença dos domínios NBS-LRR conservados nos produtos de diferentes genes de resistência possibilitam o uso da técnica de PCR com vistas ao isolamento e à clonagem de genes análogos de resistência (RGA – *resistance gene analog*), mediante o uso de oligonucleotídeos degenerados específicos para estas regiões conservadas. Estratégias baseadas em oligonucleotídeos degenerados têm sido utilizadas, com sucesso, na clonagem de genes análogos de resistência NBS-LRR em batata (*Solanum tuberosum* L.) (Leister *et al.* 1996) e soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (Kanazin *et al.*, 1996; Yu *et al.* 1996). Alguns destes RGAs são mapeados próximos a locos que contêm genes de resistência nessas plantas, o que demonstra o potencial da estratégia baseada em PCR para a clonagem de outros genes de resistência com domínios NBS-

LRR. Apesar disso, até o presente não há estudos que demonstrem a existência de RGA's em espécies arbóreas.

No gênero *Eucalyptus* existem poucos estudos sobre resistência à ferrugem (Ferreira & Silva, 1982; Dianese *et al.*, 1984; Dianese *et al.*, 1986; Passador, 1994; Carvalho *et al.*, 1998). A maioria desses trabalhos buscou identificar espécies, progênies e procedências resistentes. Recentemente, Junghans (2001) determinou o modo da herança a ferrugem e mapeou um gene de resistência a *P. psidii* em *E. grandis* genótipo G21. Estes resultados sugeriram que, no material estudado, a resistência à ferrugem é dominante e controlada por um gene de efeito principal, denominado *Ppr1*. A análise de cossegregação entre a resistência e marcadores RAPD identificou um marcador (AT9₉₁₇) completamente ligado ao gene *Ppr1* num total de 994 plantas analisadas. Cálculos matemáticos indicam que AT9₉₁₇ está localizado a, no máximo, 258.384 pb de *Ppr1*. O tamanho médio de insertos possíveis de serem clonados em uma biblioteca de grandes fragmentos (BAC) é de 150.000 pb, podendo chegar a 300.000 pb (Shizuya *et al.*, 1992). Portanto, apesar de ser possível utilizar o marcador AT9₉₁₇ para identificar um clone BAC contendo o gene *Ppr1*, a obtenção de outros marcadores completamente ligados ao gene poderiam facilitar a clonagem posicional deste gene, já que os outros dois marcadores que flanqueiam *Ppr1* estão a 1,9 e 2,9 cM de distância (Junghans, 2001).

Este trabalho teve por objetivos: 1) amplificar, clonar e caracterizar RGA's em *E. grandis*; 2) inferir sobre a organização genômica de membros representativos dos RGA's clonados, e 3) verificar se algum dos RGA's e/ou seus homólogos cossegregam com *Ppr1*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Utilizaram-se duas matrizes (genitores) de *Eucalyptus grandis*, uma resistente (G21) à ferrugem e outra suscetível (G38) e 41 indivíduos F₁, advindos do cruzamento entre estes dois genitores, com eventos de recombinação entre os marcadores AC8₁₁₈₀ e AV10₇₆₅ (Junghans, 2001). Estes indivíduos fazem parte da mesma família usada no estudo da herança e de mapeamento do gene *Ppr1* utilizada por Junghans (2001).

A genealogia das matrizes genitoras e o mapa de ligação são encontrados, respectivamente, nas Figuras 1 e 2.

2.2 Obtenção do material genético

Folhas jovens em expansão, frescas ou armazenadas a -80°C, foram empregadas para extração de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Para isso, 250 mg de cada amostra foram macerados, com o auxílio de um pistilo de plástico resistente, em tubo de microcentrífuga contendo N₂ líquido. Ao macerado obtido, foram adicionados 700 µL do tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,4M, EDTA 20mM, Tris-HCl 100mM pH 8,0, polyvinylpyrrolidone 1% e β-mercaptoetanol 0,2%, sendo este último adicionado imediatamente antes do uso). A amostra foi mantida por 30 min em banho-maria a 65°C e a seguir, adicionaram-se 600 µL de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1) a cada tubo, mantendo-os sob leve agitação durante 5 min para obtenção de uma emulsão homogênea. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm (microcentrífuga *Eppendorf* 5415C) por 5 min. A fase superior foi transferida para outro tubo sobre a qual se adicionou 1/10 do volume de uma solução, contendo CTAB 10% e NaCl 1,4M. A amostra foi agitada por 5 min para obtenção de uma solução homogênea. Repetiu-se a extração com CIA e a fase superior aquosa foi transferida para um novo tubo. Seguiu-se a adição de 2/3 do volume transferido de isopropanol frio (-20°C). Após incubação a -20°C por 2 h, as amostras foram centrifugadas a 7500 rpm (microcentrífuga *Eppendorf* 5415C) durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes em 1,0 mL de etanol 70%. Após secagem em capela de fluxo laminar, o precipitado foi ressuspensão em 100

μL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM), contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de RNase, seguindo-se incubação por 60 min a 37°C. A quantidade e qualidade do DNA de cada amostra foram avaliadas após eletroforese em gel de agarose 0,8%, comparando-as com padrões de quantidades conhecidas de DNA.

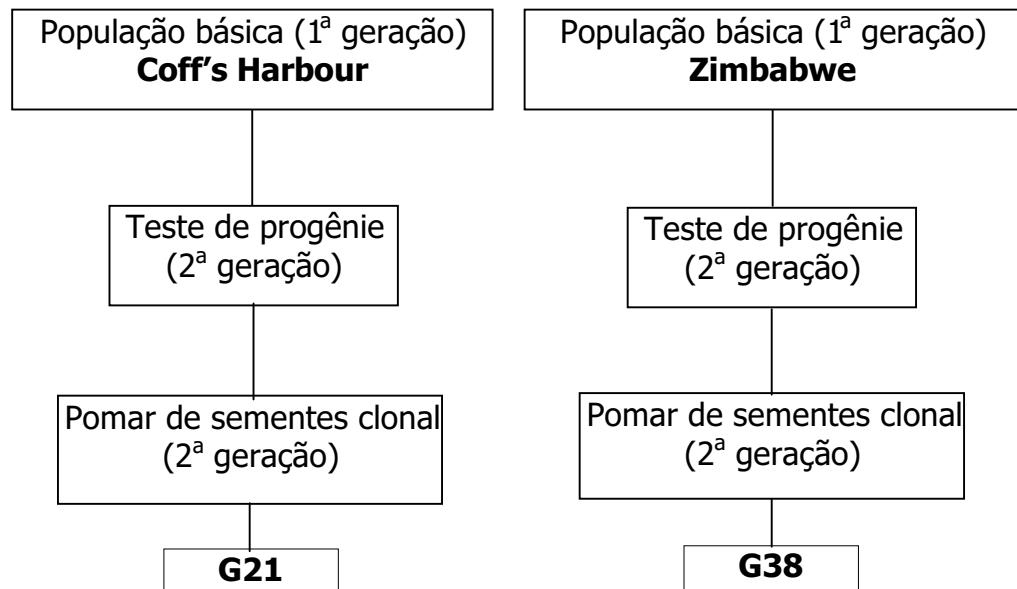


Figura 1. Genealogia das matrizes genitoras de *Eucalyptus grandis*. G21 (matriz resistente à ferrugem); G38 (matriz suscetível à ferrugem).

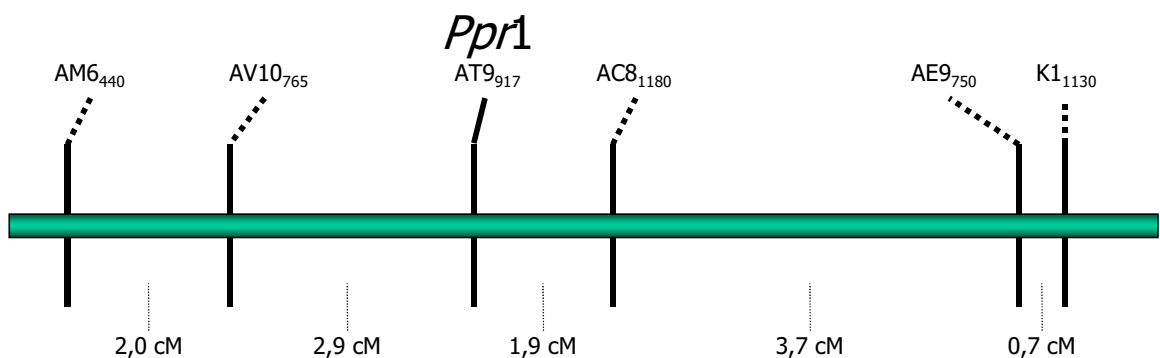


Figura 2. Grupo de ligação contendo marcadores RAPD em acoplamento com o gene *Ppr1*, que confere resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis*, construídos a partir dos dados de cossegregação entre marcadores RAPD e a resistência à ferrugem em 994 indivíduos derivados da progênie oriunda do cruzamento G38 x G21 (Junghans, 2001).

2.3 Amplificação de análogos de genes de resistência

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (Quadro 1) degenerados para regiões conservadas (Figura 3) de genes de resistência para amplificar o DNA do genitor G21 de *E. grandis* (resistente à ferrugem).

As reações de amplificação foram conduzidas de acordo com o protocolo descrito por Collins *et al.* (1998), com modificações: o volume de cada reação foi de 25 μ L, contendo 30 ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada um dos dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,25 μ M de cada oligonucleotídeo, MgCl₂ 2,0 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3 a 25°C) e uma unidade de *Taq* DNA polimerase. Como controle da ausência de contaminação, o DNA molde foi substituído por H₂O bi-destilada estéril.

Quadro 1. Relação de oligonucleotídeos testados para amplificar genes análogos de resistência (RGAs) via PCR (Collins *et al.*, 1998)

Motivos de aminoácidos conservados	Nome do oligonucleotídeo	Seqüência do oligonucleotídeo (5' - 3')
GVGKTT (P-loop)	P-loop1	AAGAATTCGGNGTNGGNAACAAC
	P-loop2	AAGAATTCGGNGTNGGNAAACTAC
	P-loop3	AAGAATTCGGNGTNGGNAAAACCAC
	P-loop4	AAGAATTCGGNGTNGGNAAACGAC
	P-loop5	AAGAATTCGGNGTNGGNAAGACAAC
	P-loop6	AAGAATTCGGNGTNGGNAAGACTAC
L(I/V/L)VLDDV (kinase-2)	Kinase-2D	CTACTGNTNCTNGACGACGT
GLPLAL (HD)	GLPL1	AACTCGAGAGNGCNAGNGGNAAGCC
	GLPL2	AACTCGAGAGNGCNAGNGGNAAGACC
	GLPL3	AACTCGAGAGNGCNAGNGGNAAGTCC
	GLPL4	AACTCGAGAGNGCNAGNGGNAAGCCC
	GLPL5	AACTCGAGAANGCCAANGGCAATCC
	GLPL6	AACTCGAGAANGCCAANGGCAAACC
KQCFAFCSI	CFA1	CAA/GT/AAIGCG/AAAG/ACAC/TTGTTT
	CFA2	CAA/GT/AAIGCG/AAAG/ACAC/TTGCTT
	CFA3	ATAGAA/GCAA/GT/AAIGCG/AAAACA
	CFA4	ATAGAA/GCAA/GT/AAIGCG/AAAGCA
WMAxG(F/I)V	WMA1	AT/CA/GAANCCNTNAGCCATCCA
	WMA2	AT/CA/GAANCCNTNTGCCATCCA
	WMA3	AT/CA/GAANCCNTNCGCCATCCA
	WMA4	AT/CA/GAANCCNTNGGCCATCCA
MHD	MHD1	CGACAGTCNATCATGCAT
	MHD2	CGACAGTCNATCGTGCAT
	MHD3	CGACAGTCNGTCATGCAT
	MHD4	CGACAGTCNGTCGTGCAT

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 200 µL, utilizando termociclador modelo PTC-100 (MJ Research Inc.) programado para 2 min a 95°C para desnaturação inicial, seguido por 40 ciclos de 30 s cada a 95°C, 30 s a 40°C e 2 min a 72°C e uma extensão final de 10 min a 72°C. Em seguida, a temperatura foi mantida a 4°C até a retirada das amostras.

A fim de confirmar a amplificação, para posterior purificação do fragmento de interesse (~600 pb), as amostras foram submetidas à eletroforese, em gel de agarose 1,4 % em tampão TBE (Sambrook *et al.*, 1989), contendo 0,2 µM de brometo de etídio. Uma amostra padrão de DNA de tamanho conhecido foi utilizada para identificar o fragmento de interesse. Após a eletroforese, as imagens dos géis foram fotodocumentadas e armazenadas eletronicamente.

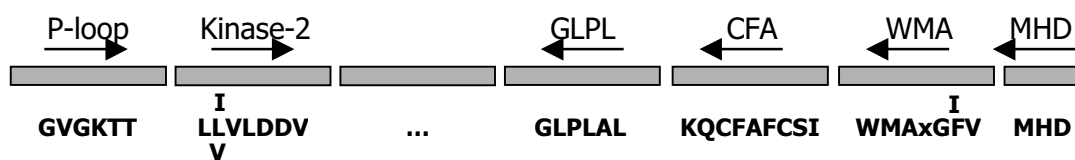


Figura 3. Regiões conservadas nas proteínas codificadas pelos genes de resistência *L⁶*, *N*, *RPP5*, *RPM1*, *RPS2* e *I2C-1*. Estes motivos foram utilizados para síntese dos oligonucleotídeos por tradução reversa (Quadro 1). As setas indicam a orientação do oligonucleotídeo. Os aminoácidos acima ou abaixo da seqüência são possíveis nos diferentes motivos (Collins *et al.*, 1998).

2.4 Clonagem dos análogos de genes de resistência

Os fragmentos de DNA amplificados com tamanhos próximos de 600 pb foram purificados do gel de agarose, utilizando-se o kit "Concert™ Rapid Gel Extraction System" (Life Technologies), e clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega), de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Os fragmentos clonados foram usados para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , utilizando-se o método de transformação por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). As células transformadas foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina (0,1 μ g/mL), IPTG (200 mg/mL) e X-GAL (20 mg/mL) e incubadas a 37°C por 12 h. Colônias contendo plasmídeos recombinantes foram identificadas pela coloração branca, transferidas para tubos contendo 3 mL de meio LB com ampicilina (0,1 μ g/mL) e incubadas a 37°C por 12 h, sob agitação constante (250 rpm). O DNA plasmidial foi isolado pelo método da lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) e quantificado. Em seguida, o DNA foi amplificado via PCR utilizando-se os oligonucleotídeos M13 R e M13 F (GIBCO BRL), ou clivado com a enzima *EcoRI*, que possuem sítio de anelamento/clivagem flanqueando o sítio de clonagem do vetor, para confirmar a presença do inserto de interesse. Procurou-se identificar clones com inserto de tamanho próximo a 600 pb por ser este o tamanho médio do fragmento amplificado por estes oligonucleotídeos (Aarts, *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 1998).

2.5 Seqüenciamento e análise dos plasmídeos recombinantes

As seqüências de nucleotídeos dos insertos foram determinadas em seqüenciador automático Perkin-Elmer modelo ABI 310, utilizando-se o kit "Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing" (Amersham), segundo instruções do fabricante. Foram utilizados os oligonucleotídeos M13 R e/ou M13 F que possuem sítio de anelamento no plasmídeo pGEM-T Easy.

As seqüências de nucleotídeos obtidas e as seqüências deduzidas de aminoácidos foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W e submetidas à análise filogenética, utilizando o programa MEGA versão 2.1 (Kumar *et al.*, 1993).

Finalmente, as seqüências foram comparadas com seqüências depositadas no GENBANK utilizando o algoritmo BLASTX (Altschul *et al.*, 1997), a fim de verificar semelhanças com outros genes já identificados.

2.6 Análise de RFLP

2.6.1 Preparo da sonda

Os plasmídeos recombinantes selecionados no item 2.5 foram submetidos à reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos M13 R e M13 F sob as seguintes condições de reação: 2,5 µL de tampão 10x (Tris-HCl 100 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM), 3,0 µL de dNTP's a 2,5 mM de cada um dos deoxinucleotídeos (dGTP, dCTP, dATP, dTTP), 0,6 µL do oligonucleotídeo M13 R a 10 µM, 0,6 µL do oligonucleotídeo M13 F a 10 µM, 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (1 unidade), 30-50 ng de DNA e água esterilizada bi-destilada suficiente para 25 µL por 1 min a 94°C seguido por 30 ciclos constituído por 30 s a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C. Ao término dos ciclos, procedeu-se a um período de 7 minutos a 72°C e em seguida as amostras foram mantidas a 4°C até a retirada do termociclador.

Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1,4% em tampão TBE contendo 0,2 µM de brometo de etídio. Uma amostra padrão de DNA de tamanho conhecido foi utilizada para identificar o fragmento de interesse. Após 90 min. do início da eletroforese sob 90 V, as imagens do gel foram fotodocumentadas e armazenadas eletronicamente. Em seguida, o fragmento de interesse foi purificado do gel de agarose utilizando-se o kit "Concert™ Rapid Gel Extraction System" (Life Technologies), de acordo com instruções do fabricante, e quantificado. Aproximadamente 25 a 50 ng foram marcados com ³²P utilizando o kit Random Primers DNA Labeling System (Life Technologies™) e hibridizados com as membranas obtidas no passo 2.6.2 conforme procedimentos sugeridos pelo fabricante (Life Technologies™ e Amersham Pharmacia).

2.6.2 Southern blotting

O DNA genômico dos genitores e indivíduos recombinantes da progênie foi clivado com as enzimas de restrição *EcoRI*, *DraI*, *HindIII*, *HaeIII* e *EcoRV*, de acordo com procedimento recomendado pelo fabricante (GIBCO BRL). Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 1% em tampão TBE por 12 h a 35 V e a imagem do gel fotodocumentada. Em seguida, o gel foi submetido a uma depuração em

solução de HCl 0,25 M, sob leve agitação, por 10 min e procedido a transferência do DNA para a membrana de acordo com instruções do fabricante (Amersham Pharmacia).

As membranas foram colocadas em contato com filme de Raio-X em suportes apropriados, armazenadas a -80°C por 3 a 10 dias dependendo da intensidade do sinal radioativo. Após exposição ao filme, este foi revelado utilizando o kit GBX (Kodak) e analisado visualmente sob transiluminador de luz branca.

3 RESULTADOS

3.1 Amplificação de análogos de genes de resistência

Os oligonucleotídeos testados (Quadro 1) produziram diferentes padrões de amplificação (Figura 4), sendo que alguns pares de oligonucleotídeos não levaram à amplificação do DNA genômico de *Eucalyptus*.

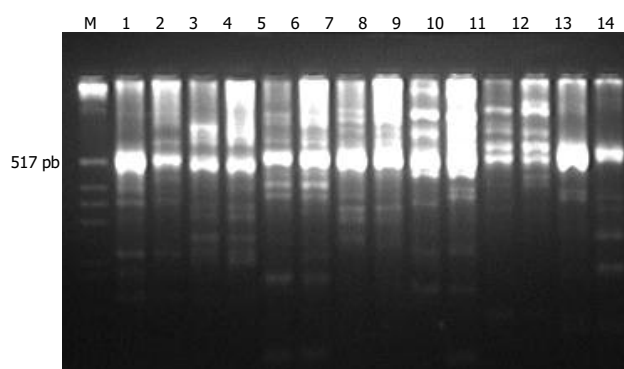


Figura 4. Análise eletroforética do produto da amplificação do DNA da matriz G21 com diferentes pares de oligonucleotídeos. 1 = P-loop1 x GLPL1; 2 = P-loop2 x GLPL2; 3 = P-loop3 x GLPL3; 4 = P-loop4 x GLPL4; 5 = P-loop5 x GLPL5; 6 = P-loop6 x GLPL6; 7 = P-loop1 x GLPL3; 8 = P-loop2 x GLPL3; 9 = Kinase2D x MHD1; 10 = Kinase2D x MHD2; 11 = Kinase2D x MHD3; 12 = Kinase2D x MHD4; 13 = P-loop1 x GLPL6; 14 = P-loop2 x GLPL6. "M" = 1 Kb DNA Ladder.

Após testar todas as combinações de oligonucleotídeos possíveis, os pares P-loop1xGLPL1, P-loop2xGLPL4, P-loop3xGLPL3, P-loop4xGLPL4, P-loop5xGLPL5, P-loop5xGLPL1 e P-loop6xGLPL4 foram utilizados para amplificar o DNA do parental resistente a ferrugem do eucalipto por produzirem um produto de amplificação com o tamanho esperado (600 pb).

3.2 Clonagem e caracterização dos RGAs

Dentre os 90 clones recombinantes obtidos, 38 foram usados para a extração do DNA plasmidial. Destes, 13 foram tomados ao acaso (ML 05, ML 21, ML 23, ML 25, ML 27, ML 28, ML 29, ML 31, ML 32, ML 33, ML 34, ML 35 e ML 38) para seqüenciamento. A clivagem dos plasmídeos recombinantes com a enzima de restrição *EcoRI* confirmou a clonagem de fragmentos de tamanho esperado (Figura 5).

As seqüências de nucleotídeos revelaram que os clones possuem uma identidade de 32 a 96% entre si (Quadro 2).

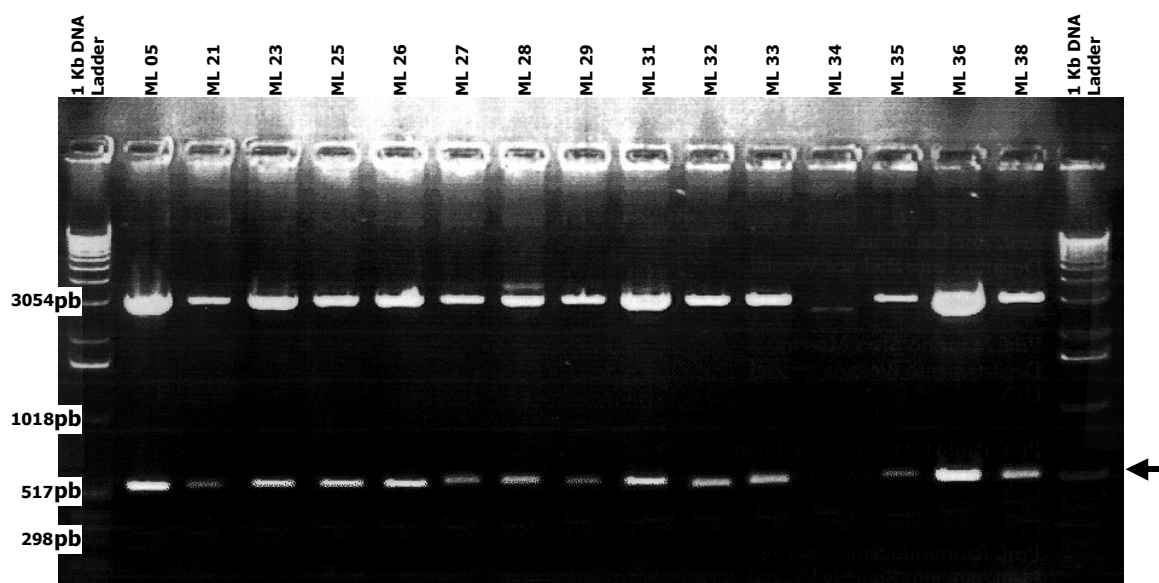


Figura 5. Análise eletroforética do produto da clivagem do DNA plasmidial dos clones recombinantes com a enzima de restrição *EcoRI*. A seta indica o inserto dos clones.

Quadro 2. Identidade (%) ao nível de seqüência de nucleotídeos entre os RGA's de *Eucalyptus grandis*. pb = pares de bases

Clone	pb													
ML 5	474													
ML 21	435	38												
ML 23	505	37	37											
ML 25	500	40	34	40										
ML 27	575	44	38	35	47									
ML 28	470	37	39	34	42	58								
ML 29	422	38	36	36	43	53	89							
ML 31	575	41	34	36	44	55	39	42						
ML 32	474	32	40	32	35	35	42	42	35					
ML 33	587	36	35	34	74	56	45	39	56	37				
ML 34	483	36	40	33	41	39	43	42	38	94	34			
ML 35	564	41	34	39	43	47	38	41	96	38	55	40		
ML 38	540	36	39	34	95	46	40	43	41	39	66	35	41	
		ML 5	ML 21	ML 23	ML 25	ML 27	ML 28	ML 29	ML 31	ML 32	ML 33	ML 34	ML 35	ML 38
Máximo		44	40	40	95	58	89	89	96	94	74	94	96	95
Mínimo		32	34	32	34	35	34	36	34	32	34	33	34	34
Desvio Padrão		3,13	2,34	2,39	17,91	8,17	14,94	14,45	17,13	16,80	13,77	16,40	16,58	17,47

O dendrograma obtido a partir da seqüência de nucleotídeos (Figura 6) indica que o clone ML23 é o mais distinto do grupo e que os clones ML31 e ML35 são os mais próximos entre si, além de caracterizar a presença de quatro grupos de clones RGA's (Quadro 3).

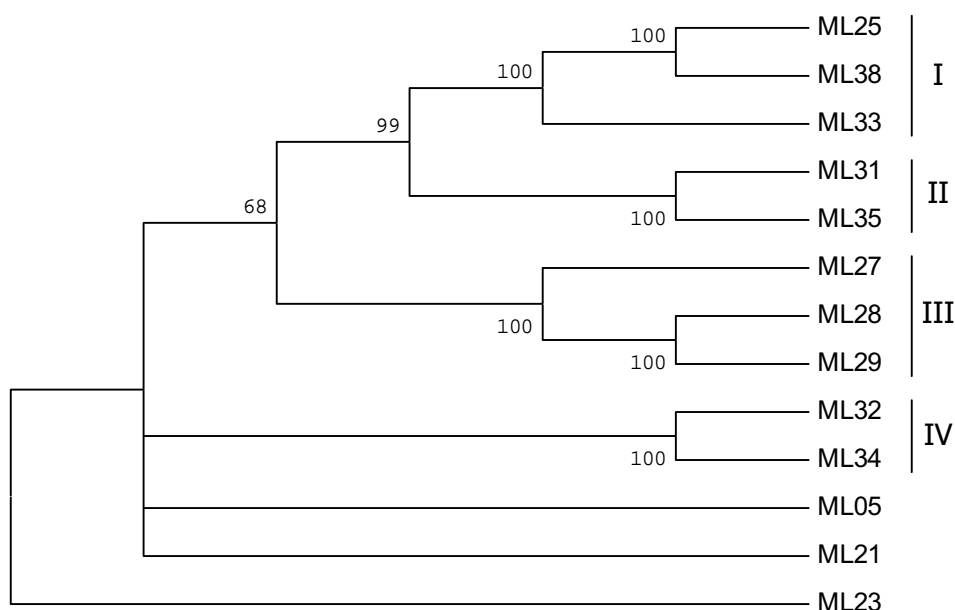


Figura 6. Agrupamento de RGA's de *Eucalyptus grandis* matriz G21 de acordo com as suas seqüências de nucleotídeos. Os valores nos vértices informam a porcentagem com que o ramo aparece no teste "Bootstrap". I = Grupo 1; II = Grupo 2; III = Grupo 3; IV = Grupo 4.

Quadro 3. RGA's de *E. grandis* resistente à ferrugem agrupados de acordo com a figura 5.

Grupo	RGA's
I	ML25, ML38, ML33
II	ML31, ML35
III	ML27, ML28, ML29
IV	ML32, ML34

O dendrograma conhecido a partir da comparação das seqüências deduzidas de aminoácidos apresentou cinco grupos de RGA's não unitários (Figura 7). Os clones ML27 e ML33 agruparam-se juntamente com os clones ML35 e ML31, diferentemente do encontrado quando comparados ao nível de nucleotídeos (Figura 6). Os clones ML21 e ML23 destaca-se como sendo o mais distinto do grupo. Observa-se, também, que os RGA's ML35, ML31, ML27 e ML33 são semelhantes aos genes de resistência *N*, *L*⁶ e *M*. Estes genes possuem um domínio TIR na região N-terminal após o NBS.

A comparação, por meio de alinhamento, das seqüências de aminoácidos dos RGA's com seqüências de aminoácidos de genes de resistência a doenças já caracterizados, demonstrou similaridade entre domínios conservados presentes nestes

genes e entre os domínios conservados presentes na maioria dos RGA's (Quadro 4). Quando submetidos à análise com o algoritmo Blastx (Quadro 5), os RGA's de *Eucalyptus* foram similares a seqüências de aminoácidos depositadas no GenBank. O RGA ML05 possui homologia com a proteína provável transportador ABC de *Arabidopsis* e o ML25 foi similar às proteínas provável OB8 de feijão e LM12 de soja, relacionadas com proteínas de resistência a doenças.

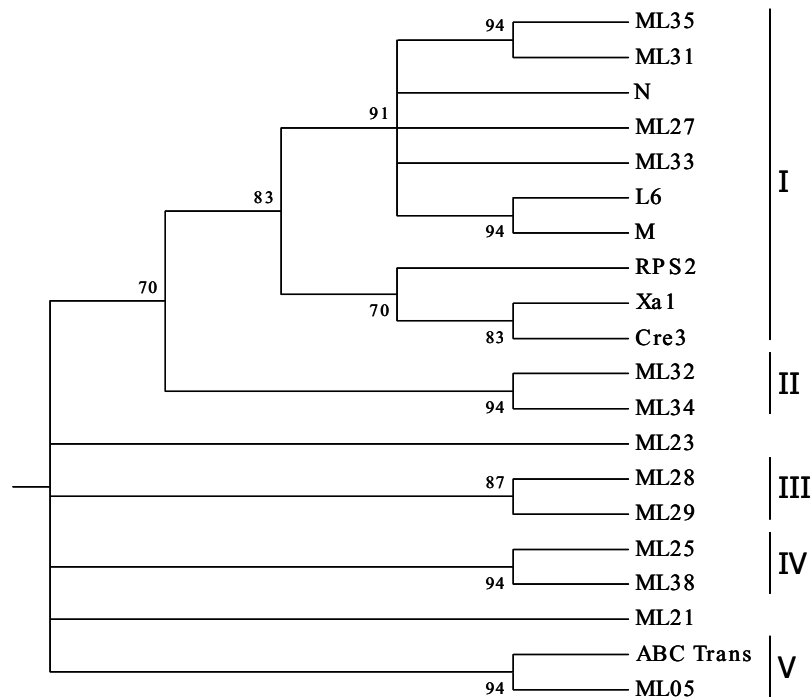


Figura 7. Relacionamento em nível de seqüências de aminoácidos entre os clones recombinantes obtidos de *Eucalyptus grandis* resistente à ferrugem do eucalipto. Os valores nos vértices informam a porcentagem em que o ramo aparece no teste "Bootstrap". N = gene que confere resistência a TMV em tabaco; L⁶ = gene que confere resistência a *Melampsora lini* em linho; M = gene que confere resistência a *Melampsora lini* em linho; RPS2 = gene que confere resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em arabidopsis; Xa1 = gene que confere resistência a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em arroz; Cre3 = gene que confere resistência a *Heterodera avenae* em trigo; ABC Trans = ABC transporter de *Arabidopsis thaliana*. I = grupo 1; II = grupo 2; III = grupo 3; IV = grupo 4; V = grupo 5.

A análise com o algoritmo Blastx revelou que os clones ML27 e ML34 são similares aos genes *N* (*Nicotiana glutinosa*) e *RPS5* (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente, destacando-se dos demais. Além disso, o clone ML27 também foi similar a um homólogo do gene *N* presente em *Pinus radiata*.

A diferença de seqüência entre os grupos de RGA's foi confirmada pelos diferentes padrões de hibridização revelados pela análise Southern Blotting, utilizando-se como sonda um clone (ML27, ML33, ML34 e ML35) representativo de cada grupo (Figura 8). Essa análise também revelou que os análogos caracterizados são membros de famílias multigênicas.

Uma vez que a análise Southern revelou a existência de polimorfismos genéticos entre os parentais da população utilizada para mapear *Ppr1*, escolheram-se quatro combinações RGA/enzima (ML27/*Dra*I, ML33/*Dra*I, ML34/*Eco*RV, ML35/*Hae*III) e procedeu-se a análise de hibridização nos 41 indivíduos F₁ com eventos de recombinação entre os marcadores AC8₁₁₈₀ e AV10₇₆₅ visando determinar se algum dos RGAs seria mapeado próximo a *Ppr1*.

Apesar de altamente polimórficos, não se encontrou nenhuma banda polimórfica que cossegregasse com o fenótipo de resistência à ferrugem (Figura 9).

Quadro 4. Sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências de nucleotídeos dos clones RGA's similares a domínios conservados, presentes em genes de resistência a doenças de plantas. P-Loop = GxxxxGK(T/S); cinase 2A = L(I/L/V)VLDDV; cinase 3A e domínio hidrofóbico (HD) = GLPL(A/T)L; *N* = gene que confere resistência a TMV em tabaco; *L*⁶ = gene que confere resistência a *Melampsora lini* em linho; *M* = gene que confere resistência a *Melampsora lini* em linho; *RPS2* = gene que confere resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em arabidopsis; *Xa1* = gene que confere resistência a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em arroz; *Cre3* = gene que confere resistência a *Heterodera avenae* em trigo; *P2* = gene que confere resistência a *Melampsora lini* em linho; *Rp1-D* = gene que confere resistência a *Puccinia sorghi* em milho; Yr10 = Proteína relacionada a resistência à ferrugem em *Triticum aestivum* (GenBank AAG42167).

Clone/Gene	P1	P-loop	Cinase 2a	Cinase 3a	HD	P2
Xa1	-	... GGIGKTTLAQ ...	-KKFLIVLDDVWE ...	GNMIILTTRI ...	GNPLAAKT ...	-
Rp1-D	-	... GGMGKSTLAQ ...	-QKFLVLDDVWF ...	GSKVLVTSRS ...	QCPLAAKV ...	-
P2	-	... GGVGKTTLAE ...	-SRVFVLDNVET ...	GSRIIITTRN ...	GNPLALKI ...	-
Yr10	-	... GGLGKTTLAN ...	-KRYFILIDDIWD ...	GSRVIATR- ...	GVPLAIIT ...	-
Xa1	-	... GGIGKTTLAQ ...	-KKFLIVLDDVWE ...	GNMIILTTRI ...	GNPLAAKT ...	-
RPS2	-	... GGVGKTTLMQ ...	-KRFLLLDDVWE ...	KCKVMFTTRS ...	GLPLALIT ...	-
Cre3	-	... -GSGKSTLAQ ...	-KRFLVLDDVWC ...	GSKILVTRS ...	GSPLAART ...	-
L ⁶	-	... GGIGKTTAK ...	-FKILVLDDVD- ...	QSRFIITSRS ...	GLPLTLKV ...	-
N	-	... GGVGKTTIAR ...	-KKVLIVLDDIDN ...	GSRIIITTRD ...	GLPLALKV ...	-
M	-	... GGIGKTTAK ...	-SKILVLDDVD- ...	GTRFIITSRN ...	GLPLTLKV ...	-
ML21	P-loop4	... FGVGKTTLST ...	NHYWIWSLFFIK ...	DAKQTLILQF ...	GLPLALSS ...	GLPL4
ML32	P-loop5	... FGVGKTTIMM ...	DRICVLILDDVWE ...	CCQMHTREN ...	GLPLAFSS ...	GLPL5
ML34	P-loop5	... FGVGKTTIMM ...	-KNCVLILDDAWE ...	CLPDALSREN ...	GLPLALSS ...	GLPL1
ML35	P-loop1	... -PQ-GDEFRA ...	-KRVLVLDDVND ...	GSKIIITTRD ...	GLPLALSS ...	GLPL1
ML27	P-loop3	... RPRNSTWIKN ...	-KKVLILLDDIDH ...	GSIIIIITRY ...	GLPLALSS ...	GLPL3
ML05	P-loop4	... FGVGKTDLMD ...	YSAWLRLLAKDVN-	RSDTIFFIHF ...	GLPLALSS ...	GLPL4
ML33	P-loop1	... EFGVAKTTLA ...	-KKVLIIILDDVDE ...	GSRIIITTRD ...	GLPLALSS ...	GLPL1
ML28	P-loop6	... FGVGKTTVDT ...	CHPLVLIISFIRI ...	SPIISVCLRH ...	GLPLALSS ...	GLPL4
ML25	P-loop1	... FGVGKTTIGR ...	CYTMTWMKRSRWK ...	HY-----NNQ ...	GLPLALSS ...	GLPL1
ML31	P-loop1	... RPRNSTVIKN ...	-KRVLVLDDVND ...	GSKIIITTRD ...	GLPLALSS ...	GLPL1
ML38	P-loop1	... FGVGKTTIGR ...	CYTMTWMKRSRWK ...	EVGIIITTRD ...	GLPLALSS ...	GLPL1
ML23	P-loop1	... ILISLNYLLF ...	-PTLAWANKDELN ...	RTNCQWSNSS ...	GLPLALSS ...	GLPL1
ML29	P-loop2	... FGVGKTTVDT ...	VIIKVLSIANARL ...	SGIGNVIGYS ...	GLPLALSS ...	GLPL4

Quadro 5. Genes de resistência a doenças e/ou seqüências de aminoácidos encontrados no GeneBank com significativa homologia aos clones recombinantes

Clone	Similaridade	Identidade ¹	Homologia ¹	Valor E ²
ML5	Provável ABC transporter (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	77/128 (60)	90/128 (70)	5e-36
ML25	Provável proteína de resistência à doença OB8 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	29/44 (65)	35/44 (78)	4e-10
ML25	Proteína de resistência LM12 (<i>Glycine Max</i>)	27/42 (64)	29/42 (68)	2e-08
ML27	Proteína de resistência à doença 334 – batata (fragmento)	57/126 (45)	85/126 (67)	3e-22
ML27	Proteína de resistência homóloga ao gene N – <i>Monterey pine</i> (fragmento); região entre o domínio cinase-2 e P-loop (<i>Pinus radiata</i>)	56/132 (42)	76/132 (57)	4e-19
ML27	Proteína de resistência LM5 (<i>Glycine Max</i>)	56/142 (39)	89/142 (62)	5e-19
ML27	Proteína de resistência ao TMV – (<i>Nicotiana glutinosa</i>)	58/139 (41)	88/139 (62)	7e-19
ML27	Proteína de resistência (<i>Vigna unguiculata</i>)	55/137 (40)	86/137 (62)	2e-18
ML31	Provável gene de resistência (<i>Cucumis melo</i>)	64/151 (42)	89/151 (58)	2e-24
ML31	Proteína de resistência (<i>Vigna unguiculata</i>)	64/151 (42)	89/151 (58)	8e-22
ML31	Proteína de resistência LM5 (<i>Glycine Max</i>)	62/151 (41)	88/151 (58)	2e-21
ML31	Proteína de resistência (<i>Vigna unguiculata</i>)	65/150 (43)	87/150 (57)	2e-20
ML32	Candidato à proteína de resistência (<i>Lactuca sativa</i>)	35/76 (46)	48/76 (63)	3e-09
ML32	Similar a proteína de resistência RPS2 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	22/42 (52)	33/42 (78)	2e-06
ML33	Provável gene de resistência (<i>Cucumis melo</i>)	50/105 (47)	74/105 (69)	1e-28
ML34	Proteína de resistência (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	48/114 (42)	76/114 (66)	5e-16
ML34	Proteína de resistência a <i>Pseudomonas syringae</i> 5 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	43/114 (37)	72/114 (62)	3e-14
ML35	Similar a proteína de resistência KNBS3 (<i>Glycine max</i>)	58/135 (42)	85/135 (62)	7e-23

1 = coincidências/número total de aminoácidos analisados e entre "()" indica a porcentagem

2 = probabilidade de a similaridade ter ocorrido por acaso

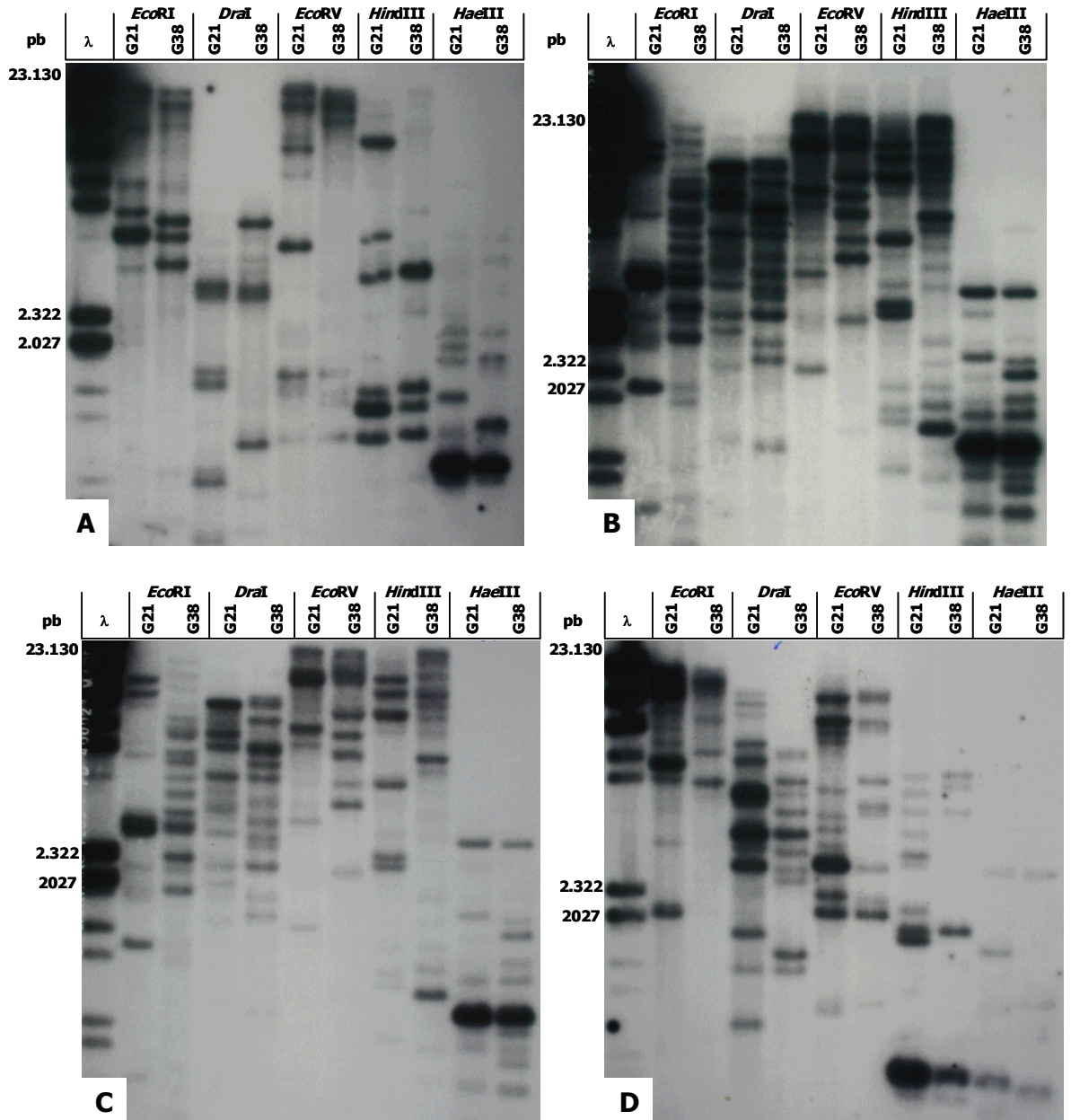


Figura 8. RFLPs entre os parentais resistente (G21) e suscetível (G38) à ferrugem do eucalipto revelado pela hibridização com as sondas RGA's: A - ML27, B - ML34, C - ML35 e D - ML33. O DNA genômico foi clivado com as enzimas de restrição *EcoRI*, *DraI*, *EcoRV*, *HindIII* e *HaeIII*. λ = DNA do fago Lambda clivado com a enzima de restrição *HindIII*. pb = pares de base.

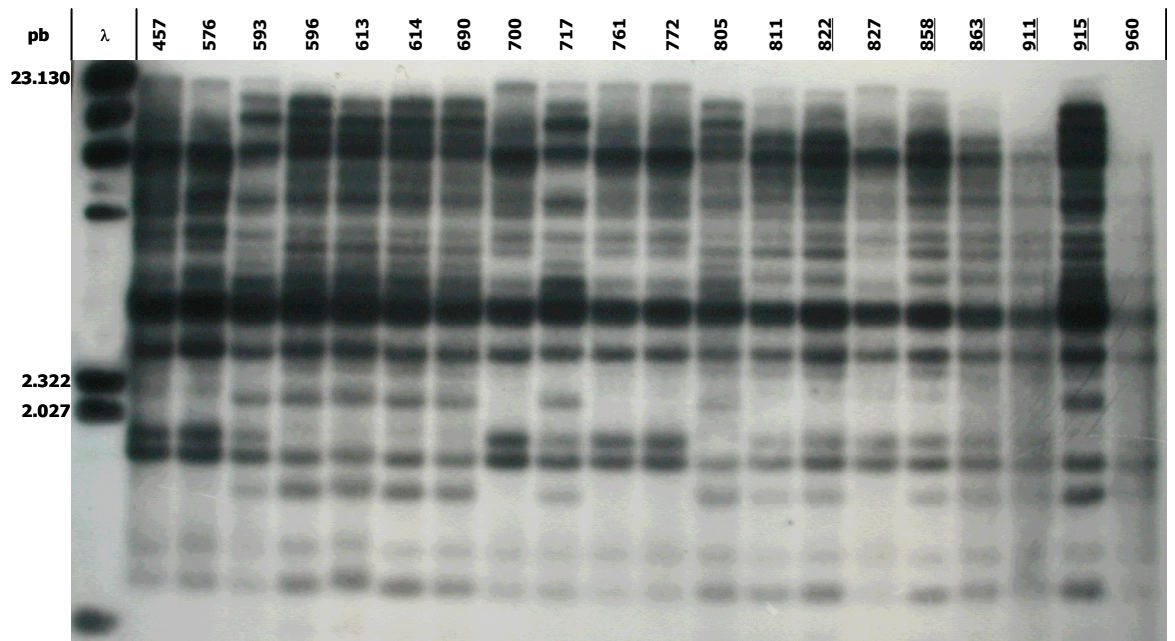
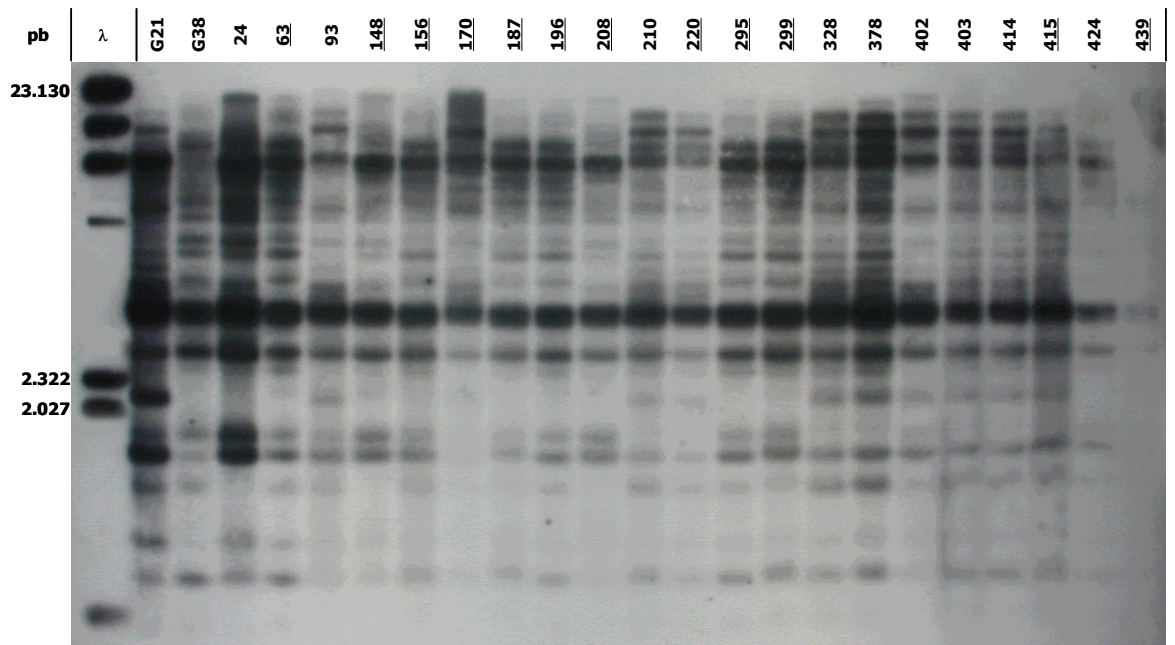


Figura 9. Análise de segregação dos RFLPs detectados com a sonda RGA ML34. O DNA genômico foi clivado com a enzima de restrição *Eco* RI. G21 e G38, parental resistente e suscetível, respectivamente, à ferrugem do eucalipto. λ = DNA do fago Lambda clivado com a enzima de restrição *Hind* III. pb = pares de base. Sublinhado = resistente à ferrugem do eucalipto; não sublinhado = suscetível à ferrugem do eucalipto.

4 DISCUSSÃO

Utilizando oligonucleotídeos degenerados específicos para regiões conservadas do tipo NBS, foi possível amplificar e caracterizar RGA's em *Eucalyptus grandis* (G21). Esses RGA's pertencem a famílias multigênicas, como já observado em outros estudos (Spielmeyer *et al.*, 1998; Kanazin *et al.*, 1996). As seqüências de aminoácidos deduzidas a partir destes RGA's foram similares às codificadas por genes de resistência a doenças já caracterizados, o que demonstra que os oligonucleotídeos utilizados podem amplificar um grande número de seqüências RGA's independentemente de serem da espécie vegetal para a qual foram inicialmente desenhados.

Como os RGA's normalmente são membros de famílias multigênicas é essencial estabelecer a relação entre os locos RGA e o loco contendo o gene interesse, para que se possa inferir a sua possível relação com o gene que se pretende clonar ou utilizar este RGA no melhoramento assistido.

Em *Eucalyptus*, embora tenham sido observados vários locos RFLP polimórficos entre os genótipos contrastantes, nenhum deles cossegregou com o gene *Ppr1* na população estudada, indicando que nenhum deles está ligado ao loco que contém *Ppr1*. Analogamente ao encontrado neste trabalho, Spielmeyer *et al.* (1998), ao utilizarem a mesma estratégia em trigo, não conseguiram identificar RGA's ligados a genes R. Estes autores deduziram que tal insucesso deveu-se ao baixo número de plantas utilizado e à pequena quantidade de genes R mapeados nesta cultura. Em *Eucalyptus*, é possível que o baixo número de RGAs utilizado, aliado ao fato de que somente um gene encontra-se mapeado neste gênero, pode ter contribuído para o insucesso do presente estudo. Em contraste, outros pesquisadores obtiveram êxito ao utilizarem oligonucleotídeos degenerados para mapear genes de resistência em plantas. Feuillet *et al.* (1997) clonaram um gene de resistência (Lr10) utilizando a técnica de análise de RGA's e Collins *et al.* (1998) encontraram dois RGA's ligados aos genes *Rp1* e *Rp3* em milho. Além disso, esses autores conseguiram mapear um RGA ligado ao gene *Hm1* e mais de 20 QTLs que conferem resistência a doenças e pragas. Em *Arabidopsis thaliana*, Aarts *et al.* (1998) mapearam oito locos RGA, sendo que seis apresentaram-se estreitamente ligados aos genes *RPS5*, *RPP4* e *RPP5*. Diferentemente

do patossistema *E. grandis*-*P. psidii*, o alto número de genes de resistência mapeados em milho e arabidopsis e a grande quantidade de RGA's analisados nestes estudos podem ter favorecido a obtenção de tais resultados.

Estudos envolvendo um maior número de RGA's podem aumentar as chances de se mapear um loco RFLP sobre o loco que contém *Ppr1*, além de permitir inferências sobre a presença ou não de domínios NBS neste gene. Todavia, como domínios NBS são encontrados em muitas famílias de proteínas, incluindo os grupos ATPases, fatores de elongação e proteínas G (Saraste *et al.*, 1990), é possível deparar com dificuldades além das já comentadas, necessitando utilizar todos os meios para se selecionar RGA's com alta probabilidade de pertencer a genes R. É possível que o uso de um maior número de RGA's como sonda possibilite encontrar um que cossegue com o gene *Ppr1* e, mesmo que não se consiga obter um RGA ligado ao gene *Ppr1*, a construção de um mapa genético a partir de sondas NBS pode ser útil, uma vez que se pode mapear e/ou caracterizar outros genes de interesse neste genótipo de *Eucalyptus grandis*, além de *Ppr1*.

Todavia, a identificação de genes candidatos de resistência, por meio de RFLP usando seqüências RGA pode ter limitações, uma vez que polimorfismos entre genótipos contrastantes podem ser causados por mutações em pseudogenes. Neste caso, as seqüências mapeadas não são de fato genes de resistência, mas podem ser úteis para se saturar uma região próxima ao gene de interesse como auxílio na sua subsequente clonagem posicional.

CAPÍTULO II

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADOR SCAR ("SEQUENCE CHARACTERIZED AMPLIFIED REGION") LIGADO AO GENE *Ppr1* EM *Eucalyptus grandis*

1 INTRODUÇÃO

A partir da década de 70, a ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, Winter, passou a ter uma grande importância para a eucaliptocultura nacional. O patógeno é um parasita biotrófico que infecta folhas jovens e terminais de galhos, causando deformações, morte, perda de dominância apical e redução no crescimento (Alfenas *et al.*, 1989). O ataque de ferrugem em brotações de genótipos suscetíveis é, freqüentemente, muito severo, exigindo a reforma de vários povoamentos após o corte raso (Ruiz *et al.*, 1987). O fungo *P. psidii* é nativo da América do Sul e encontra-se amplamente distribuído nas Américas do Sul e Central e nas ilhas do Caribe (Di Stefano *et al.*, 1998), havendo relatos da sua presença na Jamaica (Maclachlan, 1938) e na Flórida-EUA (Marlatt & Kimbrough, 1979; Rayachhetry *et al.*, 1997).

O controle desta doença tem sido realizado com sucesso mediante plantio de genótipos resistentes, obtidos a partir de seleção intra e interespecífica. Já para o controle em viveiros, têm-se usado aplicações quinzenais de triadimenol (Alfenas *et al.*, 1989).

A seleção de matrizes superiores para plantios comerciais ou para serem utilizadas nos programas de melhoramento genético é baseada no crescimento volumétrico, forma do fuste, qualidade da madeira e resistência a doenças. Sob condições de infecção natural pode-se selecionar material suscetível como sendo resistente, devido ao escape à doença. Portanto, uma ferramenta de auxílio à seleção que independesse da ocorrência de infecção seria de grande utilidade.

Estudos de herança e mapeamento genético da resistência à ferrugem em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden foram efetuados por Junghans *et al.* (1999). Os autores encontraram que a resistência à ferrugem nesta espécie é dominante e controlada por um gene (*Ppr1*) de efeito principal. Após análise de cossegregação entre resistência e marcadores RAPD, encontraram seis marcadores ligados ao gene *Ppr1*, sendo que um deles (AT9₉₁₇) exibiu completa cossegregação com este gene em

994 plantas analisadas. O marcador AT9₉₁₇ foi clonado e seqüenciado, porém não apresentou homologia com nenhuma seqüência gênica depositada em banco de dados (Junghans, 2001).

Marcadores moleculares têm sido utilizados como ferramenta auxiliar no melhoramento de plantas, como por exemplo, no mapeamento genético de características de interesse e na seleção assistida (Haymes *et al.*, 2000). Marcadores RAPD são úteis em análises genéticas e caracterização de genomas de espécies cultivadas. No entanto, os resultados obtidos com marcadores RAPD nem sempre são reprodutíveis o que pode impossibilitar seu uso na seleção assistida (Junghans, 2001). Para aumentar sua especificidade, estes marcadores podem ser convertidos em marcadores SCAR (região amplificada de seqüência caracterizada – *Sequence Characterized Amplified Region*) (Paran e Michelmore, 1993). Desta forma, este trabalho teve por objetivo converter o marcador RAPD AT9₉₁₇ em um marcador do tipo SCAR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Quarenta e um indivíduos F_1 com eventos de recombinação entre os marcadores AC8₁₁₈₀ e AV10₇₆₅, que flanqueiam o gene *Ppr1*, advindos do cruzamento entre uma matriz de *Eucalyptus grandis* resistente (G21) e outra suscetível (G38) à ferrugem (Junghans *et al.*, 1999; Junghans, 2001) foram utilizados neste estudo.

Uma vez que um marcador SCAR fosse encontrado para a família G21xG38, o DNA de seis genitores de *Eucalyptus*, G26, G38ss, G3, G4, G22 e G28, seria testado a fim de validar o marcador para a seleção assistida.

2.2 Extração de DNA e reação de RAPD

O DNA total foi extraído de folhas jovens de acordo com a metodologia descrita no capítulo anterior (item 2.2).

Em seguida, as amostras de DNA foram amplificadas utilizando o oligonucleotídeo AT9, de acordo com a metodologia estabelecida por Ferreira & Grattapaglia (1995).

2.3 Clonagem e seqüenciamento do fragmento RAPD de 917 pb

Uma vez que Junghans (2001) não verificou se na banda de 917 pb continha mais de um tipo de seqüência de DNA, procedeu-se a uma nova clonagem. Para tal, a banda de DNA de 917 pb ligado ao gene *Ppr1* foi purificado a partir do gel de agarose utilizando-se o kit *Concert™ Rapid Gel Extraction System* (Life Technologies) e clonada no vetor pGEM-T Easy (Promega), de acordo com as recomendações dos fabricantes. Os fragmentos clonados foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , utilizando-se o método de transformação por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). As células transformadas foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina (0,1 μ g/mL), IPTG (200 mg/mL) e X-GAL (20 mg/mL) e incubadas a 37°C por 12 h. Colônias contendo plasmídeos recombinantes identificadas pela coloração branca, foram transferidas para tubos contendo 3 mL de meio LB com ampicilina (0,1 μ g/mL) e incubadas a 37°C, por 12 h, sob agitação constante (250 rpm). O DNA plasmidial foi

isolado pelo método da lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) e quantificado. Em seguida, para confirmar a transformação, o DNA plasmidial foi amplificado via PCR utilizando os oligonucleotídeos M13 R e M13 F (Life Technologies) ou clivado com a enzima *Eco* RI, que possuem sítio de anelamento/clivagem nas extremidades do sítio de clonagem do vetor.

A seqüência de nucleotídeos do inserto foi determinada em seqüenciador automático Perkin-Elmer modelo ABI 310, utilizando-se o kit *Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham), segundo instruções do fabricante.

2.4 Desenho dos oligonucleotídeos SCAR e amplificação via PCR

A seqüência de nucleotídeos de 917 pb foi utilizada como molde para a obtenção dos oligonucleotídeos SCAR mais longos que aqueles utilizados nas reações de RAPD. O programa de computador DNAMAN foi utilizado para determinar a seqüência dos oligonucleotídeos considerando a quantidade de bases, o T_m (*melting temperature*) e a porcentagem dos nucleotídeos C e G. Sete oligonucleotídeos (Quadro 1), sendo quatro no sentido direto e três no sentido reverso, foram testados, perfazendo 12 combinações (Quadro 2). Os oligonucleotídeos AT99151L e AT9915914R possuem dez e nove nucleotídeos do oligonucleotídeo RAPD AT9, respectivamente.

Quadro 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no desenvolvimento do teste SCAR

Oligonucleotídeo	Seqüência (5'-3')	Pb	Sentido
AT9 R	TAGCGTCATCAGTAGGTCACCAGG	24	Reverso
AT9 F	CGAGATTTTGTGGAAGCGAAGCATTG	26	Direto
SCAT9 L	CCCTCACGTACGAAGTGGTT	20	Direto
SCAT9 R	GCGTCATCAGTAGGTCACCA	20	Reverso
AT9 915 1 L	CCGTTAGCGTGAGTAGATGTAGAG	24	Direto
AT9 915 914 R	CGTTAGCGTCATCAGTAGGTCA	22	Reverso
AT9 915 71 L	GAAGCGAAGCATTGCATGTC	20	Direto

Quadro 2. Pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados no desenvolvimento do teste SCAR

Par	Combinação	Par	Combinação	Par	Combinação
P1	AT9R/AT9F	P5	SCAT9R/AT9F	P9	AT9915914R/AT9F
P2	AT9R/SCAT9L	P6	SCAT9R/SCAT9L	P10	AT9915914R/SCAT9L
P3	AT9R/AT99151L	P7	SCAT9R/AT99151L	P11	AT9915914R/AT9 9151L
P4	AT9R/AT991571L	P8	SCAT9R/AT991571L	P12	AT9915914R/AT991571L

Os oligonucleotídeos SCAR foram combinados entre si formando 12 pares e utilizados para amplificar o DNA genômico das matrizes de *E. grandis* resistente (G21) e suscetível (G38) à ferrugem. As reações de PCR foram padronizadas para 25 µL, contendo 30 ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada um dos dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,25 µM de cada oligonucleotídeo, 2,0 mM MgCl₂, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C) e uma unidade de *Taq* DNA polimerase. Em seguida, as reações foram submetidas ao processo de amplificação em termociclador modelo PTC-100 (MJ Research Inc.) programado para 3 min a 94°C para desnaturação inicial, seguido por 40 ciclos, cada um constituído de 30 s a 94°C, 1 min a 58°C e 1 min a 72°C e uma extensão final de 5 min a 72°C. A temperatura foi mantida a 4°C até a retirada das amostras.

A confirmação e análise da amplificação foram realizadas por meio de observação visual das imagens dos géis, após a eletroforese das amostras em gel de agarose 1,4 % em tampão TBE (Sambrook *et al.*, 1989), contendo 0,2 µM de brometo de etídio. Uma amostra padrão de DNA de tamanho conhecido foi utilizada para identificar o fragmento de interesse.

Os oligonucleotídeos que apresentaram polimorfismos entre os genótipos resistente e suscetível foram testados na progênie descrita no item 2.1. Além disso, o DNA genômico de outros genótipos de *Eucalyptus* resistente e suscetível à ferrugem foi amplificado com estes oligonucleotídeos.

3 RESULTADOS

Nove clones recombinantes foram obtidos. Desde que todos apresentaram o mesmo padrão de restrição para quatro enzimas, apenas um foi seqüenciado e comparado com a seqüência anteriormente obtida por Junghans (2001). Não houve diferenças significativas entre as duas seqüências: a obtida por Junghans (2001) e a obtida neste trabalho. A partir desta seqüência de 917 pb, correspondente ao marcador RAPD AT9, sete oligonucleotídeos foram obtidos, sendo quatro no sentido direto e três no sentido reverso (Figura 1).

Os oligonucleotídeos SCAR foram combinados e 12 pares de oligonucleotídeos foram testados nos parentais G21 (resistente) e G38 (suscetível) de *E. grandis*. Nas amplificações a 56°C, observou-se que seis combinações não resultaram em padrões de bandas esperados nem no controle positivo (Figura 2). Com o aumento da temperatura de anelamento para 58°C (Figura 3), observaram-se que aquelas reações com padrões de amplificação distintos do esperado continuaram inconsistente ou deixaram de produzir bandas. Por outro lado, observou-se que algumas combinações de oligonucleotídeos apresentaram como produto da PCR apenas uma banda na região de 917 pb. No entanto, nenhuma das combinações de oligonucleotídeos possíveis, em todas as temperaturas de anelamento testadas, revelou polimorfismos entre o genótipo suscetível e o resistente.

O par de oligonucleotídeos SCAR AT99151L e AT9915914R, que apresentou um padrão de amplificação com tamanho esperado foi selecionado e utilizado na amplificação do DNA dos parentais. O produto da PCR foi, então, clivado com enzimas de restrição para verificar a presença de polimorfismos entre os dois genitores (Figura 4). As enzimas *Hinf*I, *Taq*I, *Hae*III, *Cfo*I e *Pst*I evidenciaram a existência de varias bandas polimórficas entre os parentais R e S, na região amplificada. Para verificar se, de fato, esses marcadores eram ligados a *Ppr1*, a segregação dos mesmos foi avaliada nos indivíduos com eventos de recombinação entre os marcadores AC8₁₁₈₀ e AV10₇₆₅ (Junghans *et al.*, 1999 e Junghans, 2001), que flanqueiam *Ppr1*.

1 CCGTTAGCGTGAGTAGATGTAGAGAAAGTGAAATGATAACTTAGTTATGTTGTGATTTTCG
 AT9 915 1 L

61 AGATTTTGTGGAAGCGAAGCATTGCATGTCATTTTCGTGGCTTATATAGTCTGGCATGTG
 AT9 915 71 L
 AT9 F

121 AGTTTCGTGTGTTTCGTTTCGCCCTCACGTACGAAGTGGTTGATTATAAATTGAGGATGGAT
 SCAT9 L

181 ATTGCATGTGGCTTAGGACTTCTGGTTTTGGTGTGTTTTGAGCAAACGGCCTCGTGTGGT
 241 GCAAGTTTTTCATGAGTTCGTGTACTGTGGTTTGGATTTCCAAAAC TGAAATTGCTAGGC
 301 CTTATCTGTTTGTAAATTTTGTGGAGCTTGCTGTGATTTCGAATTTGATGATAATTTCTTC
 361 ATGAAAGTGTGCAAGGCATCTTGATGTATAACATACTTTAATTTTTAAATTTTTCTGAGG
 421 TGGTATGGTTGGTACGAAAAGCTTAGTCATTTACCGTGTCTGATCTGCCTACTGCAGTAA
 481 GAACGTAAACCCAATTGTCTTTCTCAATTTTTATAAAATTTTCCTTTTGATTTTGGACT
 541 TGCTTCTTCATAAAAGCTGTAGAGGACATTCCGATTTATAACATATCCAAATTTCAAAGT
 601 TTTTTGACATGTTTAGGGCTGCGAGATGAGTATATCGGTTGCTCTGTTCCAGTGAACCAG
 661 ATTCTTCTTTATTTTGTACGATTTGCTGCTCTTTATAACGAATTGTTTTGGACTTAGTTTC
 721 CTCATGAAATTTTTTTGTTAAGGTCTTCTTTATAATATATATAAATTTTAAGAATTTTCG
 781 AGTTCATTCACCATGGTTTTAGCTTTGATTCCTTGACTACGAAATCTGTTTCGTTTCTG
 841 CCTTTGATCCAAATTGCATTAATTTCTTTAGGAAGGTGATGGAATCTTGCCTGGTGACCT

901 ACTGATGACGCTAACGG
 SCAT9 R
 AT9 R
 AT9 915 914 R

Figura 1. Seqüência de nucleotídeos do fragmento de 917 pb ligado ao gene *Ppr1* e localização dos oligonucleotídeos iniciadores SCAR. O sítio de anelamento do oligonucleotídeo AT9 está sublinhado.

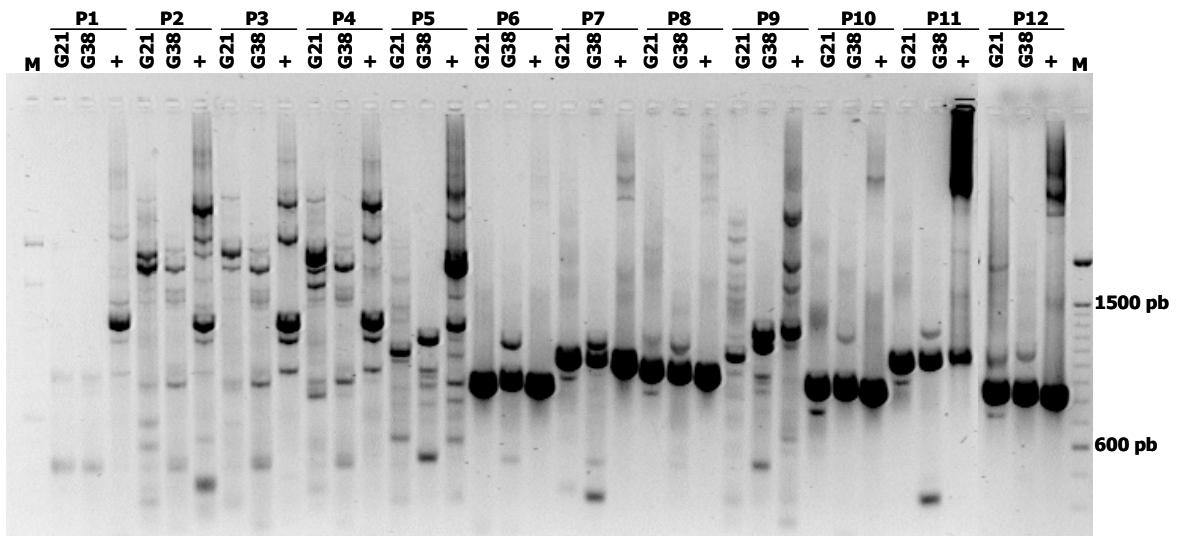


Figura 2. Padrões de amplificação resultantes da PCR em função do par de oligonucleotídeos SCAR utilizado na reação e da temperatura de anelamento (56°C). P1 a P12 = pares de oligonucleotídeos (Quadro 2). M = 100 pb DNA Ladder; G21 = Genótipo resistente; G38 = Genótipo suscetível; + = controle positivo (DNA plasmidial contendo a seqüência de 917 pb). pb = pares de base.

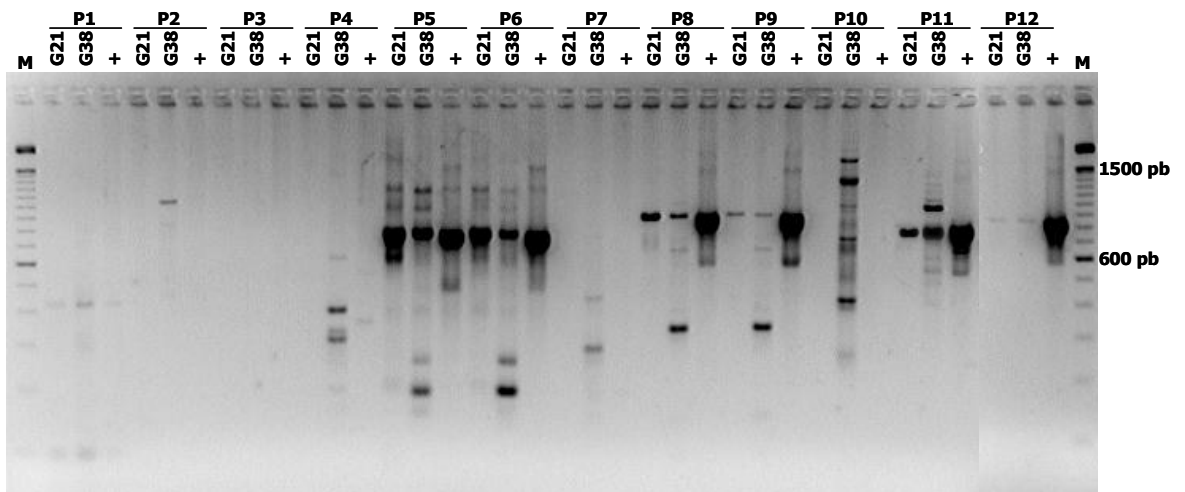


Figura 3. Padrões de amplificação resultante da PCR em função do par de oligonucleotídeos SCAR utilizado na reação e da temperatura de anelamento (58°C). P1 a P12 = pares de oligonucleotídeos (Quadro 2). M = 100 pb DNA Ladder; G21 = Genótipo resistente; G38 = Genótipo suscetível; + = controle positivo (DNA plasmidial contendo a seqüência de 917 pb). pb = pares de bases.

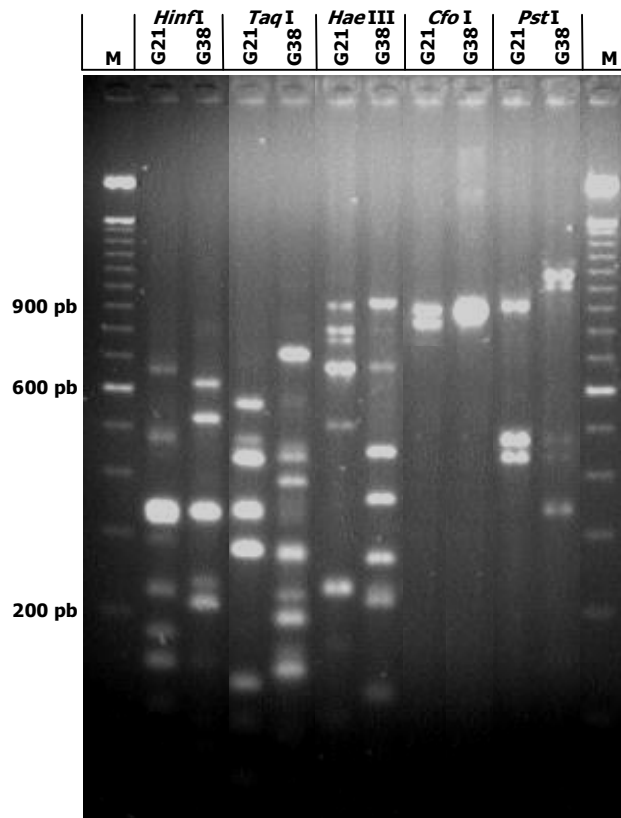


Figura 4. Padrões de clivagem do produto da amplificação realizada com os oligonucleotídeos SCAR AT99151L e AT9915914R. M = 100 pb DNA Ladder; G21, genótipo resistente; G38, genótipo suscetível. pb = pares de bases.

A maioria das bandas polimórficas não cossegregou com *Ppr1*. Entretanto, os produtos da clivagem das amplificações com a enzima *CfoI* apresentaram uma banda, de menor intensidade, de aproximadamente 800 pb, que cossegregou com o gene *Ppr1* (Figura 5), exceto para quatro indivíduos, plantas 196, 414, 915 e 960 (Quadro 2). O marcador AT9₉₁₇ comportou-se igualmente ao marcador SCAR_{*CfoI*} em todos os indivíduos com a exceção do 915 (Quadro 2).

A amplificação do DNA dos seis genitores, G26, G38ss, G3, G4, G22 e G28, com o par de oligonucleotídeos AT99151L e AT9915914R não revelou banda polimórfica entre os genótipos resistentes e suscetíveis à ferrugem. A banda polimórfica observada após a clivagem do produto da PCR da família G21xG38 com a enzima *CfoI*, não foi detectada nestes seis genitores.

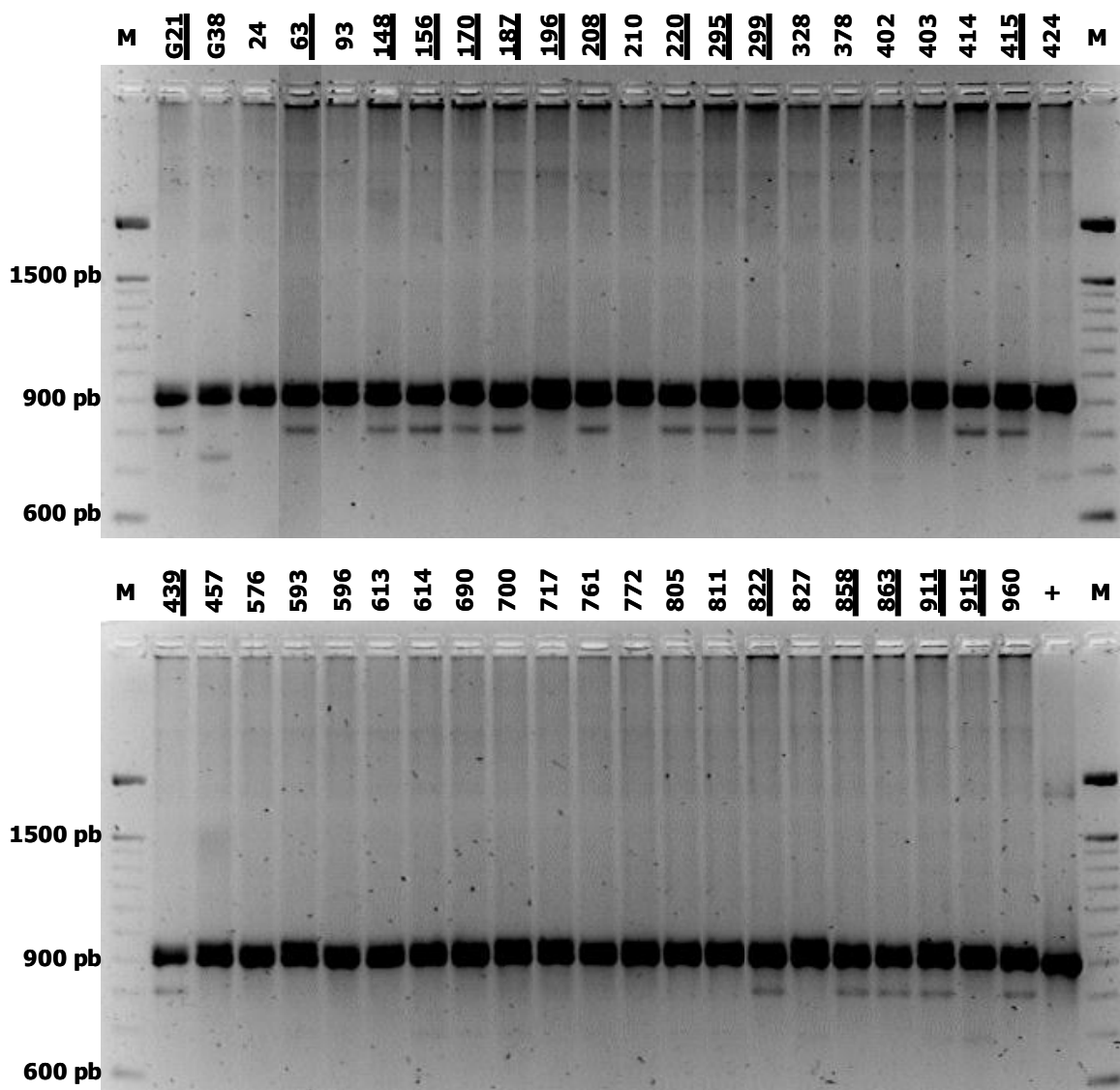


Figura 5. Segregação do polimorfismo detectado pelo par de oligonucleotídeo iniciador SCAR AT99151L/AT9915914R após clivagem com a enzima de restrição *CfoI*, em indivíduos contendo eventos de recombinação próximo a *Ppr1*. pb = pares de base. M = 100 pb DNA Ladder. Sublinhado = resistente à ferrugem do eucalipto. Não sublinhado = suscetível à ferrugem do eucalipto. + = controle positivo (DNA plasmidial contendo a seqüência de 917 pb)

Quadro 2. Indivíduos contendo cromossomos recombinantes para a região genômica que contém o gene *Ppr1* e respectivos fenótipos quanto à resistência à ferrugem¹ e fenótipos de marcadores RAPD² e SCAR ligados ao gene. (Junghans, 2001)

Planta	K1	AE9	AC8	<i>Ppr1</i>	AT9 ₉₁₇	SCAR _{cfp1}	AV10	AM6
G21	+	+	+	R (S0)	+	+	+	+
G38	-	-	-	S (S3)	-	-	-	-
24	-	-	-	S (S2)	-	-	+	+
63	-	-	-	R (S0)	+	+	+	+
93	+	+	+	S (S2)	-	-	-	-
148	+	+	+	R (S0)	+	+	-	-
156	+	+	+	R (S1)	+	+	-	-
170	-	-	-	R (S0)	+	+	+	+
187	-	-	-	R (S0)	+	+	+	+
196	+	+	+	R (S1)	-	-	-	+
208	+	+	+	R (S1)	+	+	-	-
210	-	-	-	S (S3)	-	-	+	+
220	+	+	+	R (S1)	+	+	-	-
295	-	-	-	R (S0)	+	+	+	+
299	+	+	+	R (S0)	+	+	-	-
328	+	+	+	S (S3)	-	-	-	-
378	-	-	-	S (S3)	-	-	+	+
402	-	-	-	S (S3)	-	-	+	+
403	-	-	-	S (S3)	-	-	+	+
414	+	+	+	S (S3)	+	+	-	-
415	+	+	+	R (S0)	+	+	-	-
424	+	+	+	S (S3)	-	-	-	-
439	+	+	+	R (S1)	+	+	-	-
457	-	-	-	S (S3)	-	-	+	+
576	+	+	+	S (S3)	-	-	-	-
593	-	-	-	S (S2)	-	-	+	-
596	-	-	-	S (S3)	-	-	-	-
613	-	-	-	S (S2)	-	-	+	+
614	-	-	-	S (S2)	-	-	+	+
690	+	+	+	S (S3)	-	-	-	-
700	-	-	-	S (S3)	-	-	+	+
717	-	-	-	S (S3)	-	-	+	+
761	-	-	-	S (S3)	-	-	+	+
772	+	+	+	S (S3)	-	-	-	-
805	-	-	-	S (S3)	-	-	+	+
811	+	+	+	S (S2)	-	-	-	-
822	+	+	+	R (S0)	+	+	-	-
827	-	-	-	S (S2)	-	-	+	+
858	+	+	+	R (S0)	+	+	-	-
863	+	+	+	R (S0)	+	+	-	-
911	-	-	-	R (S0)	+	+	+	+
915	+	+	+	R (S0)	+	-	-	-
960	-	-	-	S (S2)	+	+	+	+

1 – R = resistente; S = suscetível; S0 e S1 = indivíduo resistente; S2 e S3 = indivíduo suscetível.

2 – + = presença do marcador ligado ao gene em acoplamento; - = ausência do marcador.

3 – em verde está representada a região do cromossomo que contém o loco *Ppr1* herdada do genótipo G21.

4 DISCUSSÃO

Marcadores genéticos representam uma excelente ferramenta no melhoramento de plantas uma vez que a presença de genes pode ser detectada em qualquer estágio do desenvolvimento da planta. Para superar as desvantagens associadas aos marcadores RAPD, estes têm sido convertidos em marcadores altamente específicos, denominados SCAR (Paran e Michelmore, 1993). Estes marcadores têm sido utilizados em genotipagem, seleção assistida por marcadores e mapeamento genético de alta resolução (Kaplan *et al.*, 1996; Paran e Michelmore, 1993; Xu *et al.*, 1995).

Com base na seqüência de nucleotídeos do marcador RAPD AT9₉₁₇ ligado a este gene, diferentes pares de oligonucleotídeos capazes de amplificar o fragmento seqüenciado foram desenhados. Todavia, somente algumas das combinações de oligonucleotídeos testadas produziram ampliações do tamanho esperado. Estas ampliações ocorreram tanto no genótipo R quanto no S indicando que o polimorfismo original obtido com o oligonucleotídeo AT9 deve ser decorrente de uma ou poucas bases não pareadas corretamente (*mismatches*) no sitio de anelamento do oligonucleotídeo, analogamente ao encontrado por Xu *et al.* (2001) em tomate.

A clivagem do produto de amplificação revelou um marcador (SCAR_{Crô1}) ligado a *Ppr1*. Somente em quatro casos, a presença do marcador SCAR_{Crô1}, ou a sua ausência, não correlacionou com o fenótipo de resistência, ou com o fenótipo de suscetibilidade, respectivamente. No primeiro caso (planta 196) os resultados levam a supor que tenha havido um erro de classificação fenotípica da resistência, uma vez que o fenótipo S1, considerado resistente, pode ser confundido com o fenótipo S2, suscetível. Além disso, enquanto a distância entre *Ppr1* e o marcador AV10 é de 0,9 cM, a distância entre o marcador AC8 e o gene *Ppr1* é de 3,4 cM indicando ser mais fácil haver uma recombinação entre *Ppr1* e AC8 que entre *Ppr1* e o marcador AV10. Já para a planta 414 estar devidamente caracterizada quanto ao fenótipo de resistência e quanto ao seu genótipo, seria necessária a ocorrência de três recombinações: uma entre o marcador RAPD AC8 e o gene *Ppr1*; outra entre o gene *Ppr1* e os marcadores RAPD AT9₉₁₇ e SCAR_{Crô1} e uma terceira recombinação entre o marcador SCAR_{Crô1} e o marcador

RAPD AV10. Apesar dessa possibilidade existir, sua probabilidade é baixíssima. Portanto, neste caso é mais provável que tenha ocorrido um erro na avaliação da resistência ou na tabulação dos dados. O terceiro caso de recombinação entre o marcador SCAR_{CfoI} e *Ppr1* foi detectado na planta 915. Neste caso, há uma possível recombinação entre o marcador RAPD AT9₉₁₇ e o SCAR_{CfoI}. Isso permite supor que o marcador RAPD AT9₉₁₇ está entre o gene *Ppr1* e o marcador SCAR_{CfoI}. Somente com os resultados obtidos por Junghans (2001) não é possível localizar o marcador AT9₉₁₇ quanto à sua posição relativa ao gene *Ppr1*. O último caso de possível recombinação entre o marcador SCAR_{CfoI} e *Ppr1* ocorreu na planta 960. Assim como na planta 196, estes resultados podem ser consequência de um erro de fenotipagem, uma vez que a classe S1, considerada resistente, pode ser confundida com a classe S2 que é considerada suscetível, ou vice-versa. Além disso, enquanto a distância entre o gene e o marcador AV10, que está além dos marcadores SCAR_{CfoI} e AT9₉₁₇, é de 0,9 cM, a distância entre o marcador AC8 e o gene *Ppr1* é de 3,4 cM indicando ser mais fácil haver uma recombinação entre *Ppr1* e AC8 que entre *Ppr1* e o marcador AV10.

Apesar de não ter sido realizado um teste de ligação, pode-se supor que os marcadores RAPD AT9₉₁₇ e SCAR_{CfoI} estão muito próximos entre si e que o primeiro está entre *Ppr1* e SCAR_{CfoI}. Este fato pode ser muito útil na clonagem posicional do gene *Ppr1*, pois o marcador SCAR_{CfoI} pode dar a direção do caminharmento cromossômico visando a clonagem de *Ppr1*. Por outro lado, o marcador RAPD AT9₉₁₇ não foi capaz de diferenciar indivíduos resistentes de suscetíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarts, M.G.M; te Lintel Hekkert, B; Holub, E.B; Beynon, J.L; Stiekema, W.J; Pereira, A. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant-microbe Interact. 11:251-258. 1998.
- Alfenas, A.C., Demuner, N.L., Barbosa, M.M. A ferrugem e as opções de controle. Correio Agrícola, 1:18-20. 1989.
- Alfenas, A.C., Valle, L.A.C., Xavier, A.A., Brommonschenkel, S.H., Grattapaglia, D., Silva, C.C., Bertolucci, F.L., Penchel, R. *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. 1997.
- Alfenas, A.C., Zauza, E.A.V., Rosa, O.P.P., Assis, T.F. *Sporothrix eucalypti*, um novo patógeno do eucalipto no Brasil. Fitopatologia Brasileira, 26:221. 2001.
- Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. 1997.
- Baker, B; Zambryski, P; Staskawicz, B; Dinesh-Kumar, S.P. Signalling in plant-microbe interactions. Science 276:726-733. 1997.
- Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., Staskawicz, B.J. *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Science, 265:1856-1860. 1994.
- Bent, A.F; Kunkel, B.N; Dahlbeck, D; Brown, K.L; Schmidt, R; Giraudat, J; Leung, J; Staskawicz, B.J. *RPS2* of *Arabidopsis-thaliana* - a leucine-rich repeat class of plant-disease resistance genes. Science. 265: 1856-1860. 1994.
- Boland, D.J., Brooker, M.I.H., Chippendale, G.M., Hall, N., Kleinig, D.A. E Turner, H.D. Forest Tree of Australia, 4o ed., CSIRO, Australia, 1984.
- Cai, D.G; Kleine, M; Kifle, S; Harloff, H.J; Sandal, N.N; *et al.*, Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. Science 275:832-834. 1997.
- Carvalho, A.O. Progresso da ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) do eucalipto no sudeste da Bahia e resistência de *Eucalyptus* à doença. Viçosa, MG: UFV. 64p. (Tese MS). 1992.
- Carvalho, A.O., Alfenas, A.C., Maffia, L.A., Carmo, M.G.F. Resistência de espécies, progênies e procedências de *Eucalyptus* à ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter. Pesq. Agropec. Bras. 33:139-147. 1998.
- Castro, H.A., Krugner, T.L., Ideriha, C.H.F, Capello, M.S.C, Marchi, A.B. Inoculação cruzada de *Eucalyptus*, goiaba (*Psidium guajava*) e jambeiro (*Syzygium jambos*) com *Puccinia psidii*. Fitopatologia Brasileira, 8:491-497. 1983.

- Collins, N.C., Webb, C.A., Seah, S., Ellis, J.G., Hulbert, S.H., Pryor, A. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:968-978. 1998.
- Creusot, F; Macadré, C; Cana, EF; Riou, C; Geffroy, V; Sévignac, M; Dron, M; Langin, T. Cloning and molecular characterization of three members of the NBS-LRR subfamily located in the vicinity of the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris*. *Genome* 42:254-264. 1999.
- Di Stefano, J.F., Fournier, L.A., Carranza, J., Marin, W., Mora, A. Invasive potential of *Syzygium jambos* (Myrtaceae) in forest fragments: the case of Ciudad Colon, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 46:567-573. 1998.
- Dianese, J.C., Haridasan, N., Moraes, T.S.A. Screening *Eucalyptus* for rust resistance en Bahia. *Trop. Pest Manag.* 32:292-295. 1986.
- Dianese, J.C., Moraes, T.S.A, Silva, A.R. Response of *Eucalyptus* to field infection by *Puccinia psidii*. *Plant Disease*, 68:314-316. 1984.
- Dixon, M.S., Jones, D.A., Keddie, J.S., Thomas, C.M., The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich-repeat proteins. *Cell*, 84:451-459. 1996.
- Dixon, M.S; Hatzixanthis, K; Jones, D.A; Harrison, K; Jones, J.D.G. The tomato Cf-5 disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. *Plant Cell* 10:1915-1925. 1998.
- Dodds, P.N; Lawrence, G.J; Ellis, J.G. Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat β -Strand/ β -Turn motif determine the difference between the *P* and *P2* rust resistance specificities in flax. *The Plant Cell* 13:163-178. 2001.
- Ellis, J; Jones, D. Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:288-293. 1998.
- Ferreira, F.A. & Silva, A.R.C. Comportamento de procedências de *Eucalyptus grandis* e de *E. saligna* à ferrugem (*Puccinia psidii*). *Fitopatologia Brasileira*, 7:23-27. 1982.
- Ferreira, F.A. Ferrugem do eucalipto. **In:** Patologia Florestal. Principais Doenças Florestais no Brasil. Viçosa, MG, Sociedade de Investigações Florestais, pp 129-152. 1989.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. EMBRAPA-CENARGEN. pp. 220. 1995.
- Feuillet, C; Schachermayr, G; Keller, B. Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encode at the *Lr10* disease resistance locus of wheat. *The Plant Journal* 11:45-52. 1997.
- Gonçalves, R.C; Alfenas, A.C.; Oliveira, J.R; Silva, I.T.; Oda, S; Assis, T.F; Tonon, A. Mancha foliar e seca de ponteiros do eucalipto, causada por fitobactérias, no Brasil e na Argentina. *Fitopatol. Bras.* 26(suplemento) 294. 2001.
- Grattapaglia, D. & Bradshaw, H.D. Nuclear DNA content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. *Canadian Journal of Forest Research*, 24:1074-1078. 1994.
- Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.G. Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 48:575-607. 1997.
- Haymes, K.M; Van de Weg, W.E; Arens P; Maas, JL; Vosman, B; Den Nijs, APM. Development of SCAR markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene and their assessment in European and North American strawberry genotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125:330-339. 2000

- Joffily, J. Ferrugem do eucalipto. *Bragantia*, 4:475-487. 1944.
- Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J., Jones, J.D.G. Isolation of the tomato *Cj-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*, 266:789-795. 1994.
- Junghans, D.T. Quantificação da severidade, herança da resistência e identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis*. Viçosa, MG: UFV. 44p. (Tese DS). 2000.
- Junghans, D.T., Alfenas, A.C., Brommonschenkel, S.H., *et al.*, Inheritance and genetic mapping of rust (*Puccinia psidii*) resistance in *Eucalyptus grandis*. *Fitopatol. Bras.* 24(suplemento) 294. 1999.
- Kanazin, V., Marek, L.F., Shoemaker, R.C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:11746-11750. 1996.
- Kaplan, D.T; Vanderspool, M.C; Garrett, C; Chang, S; Opperman, CH. Molecular polymorphisms associated with host range in the highly conserved genomes of burrowing nematodes, *Raopholus* spp. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 9:32-38. 1996.
- Kumar, S; Tamura, K; Nei, M. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis, version 1.0 (University Park, PA: Pennsylvania state University). 1993.
- Laia, M.L.; Alfenas, A C. & Harrington, T. C. Isolation, detection in soil, and inoculation of *Ceratocystis fimbriata*, causal agent of wilting, die-back and canker in *Eucalyptus*. 12th Biennial Conference. Canberra, Australia, p. 77. 1999.
- Laudon, G.F. & Waterston, J.M. *Puccinia psidii*. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, nº 56. 1965.
- Lawrence, G.J., Finnegan, E.J., Ayliffe, M.A., Ellis, J.G. The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. *Plant Cell*, 7:1195-1206. 1995.
- Leister, D., Ballvora, A., Salamini, F., Gebhardt, C. A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide applications in plants. *Nature Genet.* 14:421-429. 1996.
- Leister, D; Kurth; Laurie, D.A; Yano, M; Sasaki, T; *et al.* Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:370-375. 1998.
- Li, P; Nijhawan, D; Budihardjo, I; Srinivasula, S.M; Ahmad, M; *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489. 1997
- MacLachlan, J.D. A rust of the pimento tree in Jamaica, B.W.I. *Phytopathology*, 28:157-170. 1938.
- Marlatt, R.B & Kimbrough, J.W. *Puccinia psidii* on *Pimenta dioica* in South Florida. *Plant Disease Reporter*, 63:510-512. 1979.
- Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D., Tanksley, S.D. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262:1432-1436. 1993.
- Ori, N; Eshed, Y; Paran, I; Presting, G; Aviv, D; Tanksley, S; Zamir, D; Fluhr, R. The I2C family from the wilt disease resistance locus I2 belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell.* 9:521-532. 1997.

- Pan, Q; Liu, Y; Budai-Hadrian, O; Sela, Marianne; Carmel-Goren, Lea; Zamir, D; Fluhr, R. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and arabidopsis. *Genetics* 155:309-322. 2000.
- Paran, I; Michelmore, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance gene in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993. 1993
- Passador, G.C. Resistência à ferrugem e análise de isoenzimas em procedências e progênies de *Eucalyptus*. Viçosa, MG: UFV. 69p (Tese MS). 1994.
- Rayachhetry, M.B., Elliott, M.T., Van, T.K. Natural epiphytotic of the rust *Puccinia psidii* in *Malaleuca quinquenervia* in Florida. *Plant Disease*, 81:831.1997.
- Ruiz, R.A.R, Alfenas, A.C., Barbosa, M.M. Influência da temperatura e umidade relativa sobre o desenvolvimento da ferrugem do eucalipto causada por *Puccinia psidii* em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira*, 12:137. 1987.
- Sambrook, L; Fritsch, E.F; Maniatis, T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold spring Harbor, NY. 1989.
- Saraste, M; Sibbald, P.R; Wittinghofer, A. The P-loop: A common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 15:430-434. 1990.
- Shizuya H., Birren B., Kim U-J., Mancino V., Slepak T., Tachiri Y., Simon M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8794-8797. 1992.
- Song, W.Y., Pi, L.Y., Wang, G.L., Gardner, J., Holsten, T., Ronald, P.C. Evolution of the rice *Xa21* disease resistance gene family. *Plant Cell*, 9:1279-1287. 1997.
- Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kin, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C., Ronald, P.C. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 270:1804-1806. 1995.
- Souza, A. J.; Implantação e manutenção de reflorestamento com Eucalipto ; In: Reflorestamento no Brasil, NOVAES, Adalberto Brito de , *et al.* ; UESB - Vitória da Conquista, Ba.;1992.
- Speelman, E; Bouchez, D; Holub, EB; Beynon, JL. Disease resistance gene homologs correlate with disease resistance loci of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 14:467-474. 1998.
- Spielmeyer, W; Huang, L; Bariana, H; Laroche, A; Gill, B.S; Lagudah, E.S. NBS-LRR sequence family is associated with leaf and stripe rust resistance on the end of homoeologous chromosome group 1S of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 101:1139-1144. 2000.
- Thomas, C.M., Jones, D.A., Parniske, M., Harrison, K., Balint-Kurti, P.J., Hatzixanthis, K., Jones, J.D.G. Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in *Cf-4* and *Cf-9*. *Plant Cell*, 9:2209-2224. 1997.
- Traut, W. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. *Eur. J. Biochem.* 222:9-19. 1994.
- Valverde, S.R. A contribuição do setor florestal para o desenvolvimento socio-econômico: uma aplicação de modelos de equilíbrio multissetoriais. Viçosa, MG. UFV. 105p (Tese DS). 2000.
- Whitham, S., McCormick, S., Baker, B. The *N* gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:8776-8781.

- Xu, H. Wislon, D.J; Arulsekar, S; Bakalinsky, A.T. Sequence-specific polymerase chain-reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprinting grape (*Vitis*) rootstocks. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120:714-720. 1995.
- Xu, J; Narabu, T; Mizukubo, T; Hibi, T. A molecular marker correlated with selected virulence against the tomato resistance gene *Mi* in *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria*. Phytopathology 91:377-382. 2001.
- Yu, Y.G., Buss, G.R., Saghai Maroof, M.A. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:11751-11756. 1996.