**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Mapeamento de locos de resistência quantitativa a *Puccinia psidii* Winter em
uma progênie de irmãos completos de eucalipto**

Bruno Marco de Lima

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Agronomia (Genética
e Melhoramento de Plantas)

**Piracicaba
2009**

Bruno Marco de Lima
Engenheiro Florestal

Mapeamento de locos de resistência quantitativa a *Puccinia psidii* Winter em uma progênie de irmãos completos de eucalipto

Orientador:
Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Lima, Bruno Marco de

Mapeamento de locos de resistência quantitativa a *Puccinia psidii* Winter em uma progênie de irmãos completos de eucalipto / Bruno Marco de Lima. - - Piracicaba, 2009. 63 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009. Bibliografia.

1. Eucalipto 2. Ferrugem - Doença de planta 3. Genética quantitativa 4. Mapeamento genético 5. Marcador molecular 6. Resistência genética vegetal I. Título

CDD 634.9734
L732m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais

Pelo amor e apoio incondicional, sempre que precisei, ensinando que a maior herança que se pode ter é o conhecimento.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela estrutura e qualidade de ensino oferecida.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de estudos durante meu mestrado.

Ao Departamento de Genética, pela excelência no desenvolvimento da genética e do melhoramento de plantas no Brasil, alicerçado por seus funcionários e professores.

Ao Departamento de Fitopatologia, seus professores e funcionários. Aos amigos da pós-graduação em Fitopatologia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, por ter me trazido ao mundo da pesquisa, quando eu menos esperava e por despertar em mim a sede pela ciência. Por seus conselhos, ensinamentos e orientações, essenciais para meu desenvolvimento científico e pessoal.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular: Gicka, Leandro, Rapha, Carol, Thayne, Jerônimo, Ferchu, Fernanda, Lara, Mariana, Pastora, Raphael e Bianca.

Em especial à Rapha, ao Leandro e a Gicka que sempre foram parceiros, para o bom e para o ruim e a Pastora, pelo sentimento maternal.

Ao Dr. Dario Grattapaglia, pela oportunidade de realizar etapas dessa dissertação em seu laboratório e aconselhamento metodológico. A Dra. Danielle Paiva, também da EMBRAPA-CENARGEN, por auxiliar na etapa de genotipagem, com seu conhecimento e amizade, e a Laís e Leo pela ajuda na bancada.

A Juliana Teixeira, da Fibria, pela colaboração e amizade, fazendo a interface empresa-academia.

Ao Rodrigo Gazaffi, pela essencial colaboração nas etapas de mapeamento de QTLs e conhecimentos futebolísticos, juntamente com o Prof. Dr. Antonio Augusto Franco Garcia, que muito me ensinou.

Aos amigos da vida Chuck, Palmilha, K-ju e Zélão, pela parceria e risadas desde a época de 1/2 até hoje. As amigas Kika e Lalinha, irmãs desde sempre.

Aos meus irmãos, Carla e Kleber, que sempre ajudaram o irmão bolsista da família e sempre apoiaram meus estudos. A minha tia Claudia, ao Paraíba, ao Cabeça e a Ju pelas risadas. A minha avó, pelo amor.

Ao meu pai, Devair, por sua inteligência e perseverança, sempre me apoiando nos estudos, e a minha mãe, Cleide, pelo carinho e amor, que só uma mãe pode oferecer quando mais precisamos.

A Maria Marta, por sempre ter uma palavra de apoio quando me sentia perdido, pelas ajudas durante minha dissertação e simplesmente por ter surgido em minha vida.

Em fim, a todos que de alguma maneira fizeram parte de minha vida e contribuíram para que eu chegasse até aqui.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Mapas de ligação e mapeamento de caracteres quantitativos.....	15
2.2 Ferrugem do eucalipto e herança genética da resistência.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Material vegetal	25
3.2 Avaliação da resistência a <i>P. psidii</i>	25
3.3 Análise do experimento	27
3.4 Coleta de material vegetal e extração de DNA.....	27
3.5 Genotipagem com marcadores moleculares	28
3.5.1 Marcadores microsatélites	28
3.5.2 Marcadores TRAP.....	30
3.5.3 Marcadores AFLP	31
3.6 Construção do mapa genético.....	33
3.7 Mapeamento de QTLs	35
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Confirmação da paternidade.....	37
4.2 Avaliação da resistência	37
4.3 Genotipagem da população S ₁ com marcadores moleculares	39
4.3.1 Marcadores microsatélites	39
4.3.2 Marcadores TRAP.....	40

4.3.3 Marcadores AFLP.....	41
4.4 Construção do mapa genético	42
4.5 Mapeamento dos QTLs.....	47
4.5.1 Mapeamento por intervalos (IM).....	47
4.5.2 Mapeamento por intervalos compostos (CIM).....	47
5 DISCUSSÃO.....	51
5.1 Genotipagem e mapa de ligação	51
5.2 Mapeamento de QTLs.....	52
6 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	59

RESUMO

Mapeamento de locos de resistência quantitativa a *Puccinia psidii* Winter em uma progênie de irmãos completos de eucalipto

No Brasil, a ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii* Winter, se destaca como a mais importante doença da cultura do eucalipto, principalmente na região Sudeste do país. O uso de genótipos resistentes é o principal método de controle da doença, o que torna essencial o conhecimento das bases genéticas da resistência para a seleção de genótipos resistentes. Neste estudo, uma progênie F_1 de 90 irmãos completos foi utilizada para identificar marcadores ligados a genes de resistência a este patógeno. A severidade da doença foi avaliada em quatro épocas ao longo de uma epidemia por meio de escala diagramática e os dados foram utilizados para o cálculo da área sob a curva de progresso da doença (AUDPC) para cada indivíduo. O delineamento experimental foi de blocos incompletos em dois ambientes e os valores de AUDPC foram analisados por meio de modelos mistos, excluindo-se a variação ambiental. Um mapa genético foi construído com base em marcadores microssatélites, AFLP e TRAP através de uma análise multiponto. O mapeamento de QTL seguiu duas abordagens: mapeamento por intervalos (IM) e mapeamento por intervalos compostos (CIM). No mapa de ligação foram posicionados 117 marcadores microssatélites, 10 TRAP e 33 AFLP, distribuídos por 11 grupos de ligação, totalizando 1075 cM com distância média de 6,7 cM entre marcadores. A análise de IM identificou um QTL ($LOD=7,7$) no grupo de ligação 3, representando 28,5% da variação em AUDPC na progênie observada. Já a análise CIM detectou dois QTL, ambos no grupo de ligação 3. A posição do primeiro QTL coincidiu com aquela do QTL identificado na análise por IM, porém com maior valor de LOD (10,3), explicando 39,5% da variação em AUDPC. O segundo QTL ($LOD=3,4$), cujo valor probabilístico máximo distou 39,0 cM do primeiro QTL, explicou 6,9% da variação fenotípica. Os alelos de resistência nos dois QTL se encontram em repulsão, com efeito aditivo negativo ($\alpha=-0,60$) e ausência de dominância no primeiro QTL e efeito aditivo positivo ($\alpha=0,29$) e dominância completa ($\delta=-0,23$) no segundo QTL. Os marcadores ligados aos dois QTLs têm potencial utilização na seleção assistida, com conseqüente aumento na eficiência durante a seleção de genótipos resistentes.

Palavras-chave: Ferrugem do eucalipto; Resistência genética, QTL; Mapeamento genético; Marcador molecular

ABSTRACT

Mapping of quantitative resistance loci against *Puccinia psidii* Winter in a full-sib progeny of *Eucalyptus*

In Brazil, the eucalyptus rust, caused by *Puccinia psidii* Winter, stands out as the most important disease of eucalypts, mainly in southeastern Brazil. The use of resistant genotypes is the main control method, which makes the understanding of the genetic basis of resistance essential to the selection of resistant genotypes. In this study, an F₁ progeny of 90 plants was used to identify markers linked to resistance genes to this pathogen. Four disease severity assessments were conducted during an epidemic with a diagrammatic scale and the data were used to calculate the area under the disease progress curve (AUDPC) for each plant. The experimental design consisted of incomplete blocks in two environments. AUDPC values were analyzed using mixed models, excluding the environmental variation between locations. A genetic map was constructed based on microsatellite, AFLP and TRAP markers based on a multipoint analysis. QTL mapping was done based on two approaches: interval mapping (IM) and composite interval mapping (CIM). The linkage map consisted of 117 microsatellite, 10 AFLP and 33 TRAP markers, placed over 11 linkage groups, totalizing 1075 cM with an average distance of 6.7 cM between markers. IM analysis identified a QTL (LOD = 7.7) on linkage group 3, accounting for 28.5% of the phenotypic variation in AUDPC. The CIM analysis detected two QTL, both on linkage group 3. The position of the first QTL coincided with that of the QTL identified in the IM analysis, but with a higher LOD (10.3), accounting for 39.5% of the variation. The second QTL (LOD = 3.4), whose maximum probability value was placed 39.0 cM away from the first QTL, accounted for 6.9% of the phenotypic variation. The resistance alleles in the two QTL are linked in repulsion with negative additive effect ($\alpha = -0.60$) and lack of dominance in the first QTL and positive additive effects ($\alpha = 0.29$) and complete dominance ($\delta = -0.23$) in the second. The markers linked to the two QTL have potential use in assisted selection, thus increasing the efficiency of selection of resistant genotypes.

Keywords: Eucalyptus rust; Resistance; QTL; Genetic mapping; Molecular marker

1 INTRODUÇÃO

As florestas plantadas têm um papel de destaque na economia global, sendo que o eucalipto, pertencente ao gênero *Eucalyptus*, representa 8% das florestas plantadas no mundo, enquanto o gênero *Pinus* representa 32%. O Brasil, que possui grande extensão territorial e vocação silvicultural, é o 9º país em área plantada com florestas, sendo que as maiores áreas se encontram, em ordem decrescente, na China, Índia, Estados Unidos, Rússia, Japão, Suécia, Polônia e Sudão (FAO, 2007). Diferente do contexto mundial, no entanto, no Brasil o gênero *Eucalyptus* é o mais plantado, com cerca de 3,8 milhões de hectares, restando 1,8 milhões de hectares plantados com espécies do gênero *Pinus* e 425 mil hectares com outras espécies (ABRAF, 2008).

O eucalipto se destaca no setor florestal na produção de celulose de fibra curta, utilizado na produção de papeis mais finos. A produção brasileira de celulose vem crescendo a uma taxa de 6,5% ao ano, desde 1998, alcançando em 2007 uma produção de 11,8 milhões de toneladas. Existe uma grande participação do setor em nossa pauta de exportações, haja vista que em 2007 o país exportou cerca de US\$ 6,1 bilhões, de um total de US\$160,6 bilhões de exportações (ABRAF, 2008). Esses dados reforçam a importância do setor e sua relevância para nossa economia.

O gênero *Eucalyptus*, de origem australiana para a maioria das espécies, encontrou no país condições ideais para seu desenvolvimento. Os primeiros plantios comerciais datam da segunda metade do século XIX. Entretanto, foi a partir do início do século passado que a cultura experimentou incrementos em produtividade devidos tanto ao melhoramento genético, iniciado por Edmundo Navarro de Andrade em 1904 (FERREIRA; SANTOS, 1997), como ao desenvolvimento de práticas silviculturais voltadas para áreas tropicais. Entretanto, um dos problemas que ainda prejudica os atuais plantios são as doenças e, dentre elas, destaca-se a ferrugem, principalmente nos estados de São Paulo e Bahia (KRUGNER; AUER, 2005).

A ferrugem é uma doença com ampla distribuição no Brasil, causando danos consideráveis. O agente causal, *Puccinia psidii* Winter, é um patógeno de mirtáceas, nativas ou introduzidas. Pode ocorrer em plantas de viveiros, jardins clonais ou em plantações jovens e rebrotas, com até cerca de um ano de idade. Árvores altamente suscetíveis têm seu crescimento prejudicado, comprometendo a produção de biomassa. A doença pode ser identificada através de

sinais do patógeno, na forma de grande esporulação uredíniospórica, pulverulenta e de coloração amarela sobre os órgãos afetados. Causa deformações, necroses, hipertrofias, minicancros e morte meristemática em genótipos suscetíveis (ALFENAS et al., 2004).

Puccinia psidii é a única ferrugem que infecta o eucalipto relatada até o momento. Sua distribuição está concentrada no continente americano, em países como Brasil, Argentina, Colômbia, Equador, Paraguai, Uruguai, Venezuela, Cuba, Republica Dominicana, Jamaica, Porto Rico, Trinidad e Sul da Florida nos EUA (COUTINHO et al., 1998). É, atualmente, uma das mais preocupantes doenças do eucalipto no mundo, tornando necessária a prevenção da entrada desse fungo em regiões onde não há ocorrência, como a Austrália. Seu controle mais eficiente é através da utilização de genótipos resistentes ou com rápido crescimento inicial (“arranque”), neste último caso para que as plantas fiquem um menor tempo expostas ao ataque do fungo em campo (KRÜGNER; AUER, 2005; ALFENAS et al., 2004).

Na literatura, são encontrados diversos trabalhos sobre resistência genética à ferrugem em eucalipto (CARVALHO et al., 1998; PASSADOR, 1996; TAKAHASHI, 2002; FERREIRA; SILVA, 1982). Entretanto, estes trabalhos abordaram, especialmente, a seleção de procedências e progênies avaliadas por meio de inoculações artificiais ou sob condições de infecção natural. Existem poucos estudos sobre a herança da resistência (JUNGHANS et al., 2003; ZAMPROGNO, 2005, TEIXEIRA, 2009) e não há um consenso sobre seu tipo de herança. Tampouco há uma metodologia alternativa aos métodos de seleção atualmente empregados para avaliar a resistência de genótipos que reduza as dificuldades oriundas das operações de manutenção do inóculo e inoculação ou a necessidade de condições ambientais favoráveis, no caso de avaliações feitas sob condições naturais de infecção. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou identificar regiões genômicas que contenham locos de resistência quantitativa a partir de dados de segregação de uma progênie resultante da auto-fecundação de um clone híbrido inter-específico (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) resistente ao patógeno com vistas ao desenvolvimento de marcadores que possam ser utilizados em programas de seleção assistida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mapas de ligação e mapeamento de caracteres quantitativos

A perspectiva do uso de marcadores genéticos ligados a características quantitativas no melhoramento data de mais de oitenta anos, quando Sax (1923) relacionou características de pigmentação de sementes de feijão com sua forma e peso. Já os marcadores moleculares surgiram bem mais tarde, no início da década de 1980, com os marcadores isoenzimáticos. Segundo revisão de Melchinger (1990) sobre o uso de marcadores moleculares no melhoramento para a resistência a doenças do tipo oligogênica, nota-se que, até aquele momento, os principais marcadores utilizados eram os isoenzimáticos e os RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e poucos trabalhos haviam sido feitos na busca de genes de resistência a doenças.

Já com a revolução causada pela PCR (*polymerase chain reaction*), novos marcadores foram criados, devido à facilidade de amplificar segmentos de DNA de regiões genômicas específicas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Um desses marcadores inicialmente desenvolvidos com base na PCR é o RAPD (*random amplified polymorphic DNA*). A quantidade de marcadores gerados por essa técnica é geralmente muito alta, contudo sua reprodutibilidade é seu grande limitante. Outro marcador é o AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), que também gera grande número de marcadores, porém com melhor reprodutibilidade. Contudo, as técnicas supracitadas têm o limitante de gerarem marcadores dominantes, menos informativos, incapazes de distinguir informações de indivíduos heterozigotos de uma classe de homozigotos. Marcadores microssatélites ou SSR (*simple sequence repeat*) suprem esta deficiência, já que são codominantes. Esses se baseiam na amplificação de regiões do genoma que possuem repetições de pequenas sequências de 1 a 4 nucleotídeos, normalmente, e que apresentam satisfatório nível de polimorfismo, a depender da espécie vegetal considerada (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Mais recentemente, uma nova classe de marcadores, denominada TRAP (*target region amplification polymorphism*) foi desenvolvida com base em PCR, com o objetivo de direcionar o desenvolvimento de marcadores voltados para locos específicos ou famílias gênicas. Esta técnica, proposta por Li e Quiros (2001) e modificada por Hu e Vick (2003), apresenta bons resultados como fonte de marcadores aplicados à confecção de mapas genéticos (MIKLAS et al., 2006; LIU

et al., 2005). Marcadores TRAP são gerados com base em um par de iniciadores: um arbitrário e um fixo. As sequências dos iniciadores fixos são concebidas com base em sequências conhecidas de regiões genômicas de interesse, como os domínios conservados LRR (*leucine-rich repeats*) e NBS (*nucleotide binding site*), no caso de genes de defesa de plantas à patógenos. Os iniciadores fixos são comumente desenhados com base em sequências de ESTs (*expressed sequence tags*) homólogas a sequências de genes conhecidos disponíveis em bancos de dados.

Uma maneira de identificar genes de interesse se faz através do uso de mapas genéticos. A base teórica da construção de mapas genéticos foi lançada com os estudos de Thomas Hunt Morgan e colaboradores, que observaram distorções da segunda lei de Mendel. Morgan assim definiu a permuta entre cromossomos homólogos ou *crossing-over*, como causa das distorções, que variariam de acordo com a distância entre os genes no cromossomo (CARNEIRO E VIEIRA, 2002). É justamente esse o conceito utilizado para a construção dos mapas genéticos, em que o percentual de permuta entre locos (marcadores), observado através da segregação dos mesmos em uma progênie, é usado para estimar a distância genética entre eles. Ainda segundo Carneiro e Vieira (2002), a construção desses mapas se baseia na segregação de centenas de marcadores e por isso necessita de programas com funções de mapeamento específicas.

A obtenção de mapas genéticos usualmente se faz a partir da obtenção de linhagens endogâmicas contrastantes e o mapeamento em F_2 . Entretanto, em muitas espécies importantes como o maracujá, a cana-de-açúcar e o eucalipto, esse o mapeamento em F_2 é impossível, diante de problemas de depressão por endogamia, autoincompatibilidade e dioicismo, além do tempo para a obtenção de gerações. Algumas estratégias foram criadas para solucionar o mapeamento nessas espécies, conhecidas com *outcrossing species*, em que a fase de ligação dos marcadores é desconhecida sendo que a mais importante foi o duplo pseudo-cruzamento teste (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994). Outras estratégias também foram criadas e estudadas para os casos de F_1 segregantes (MALIEPAARD; JANSSEN; OOIJEN, 1997), como a utilizada pelo programa JoinMap (STAM, 1993). Wu et al. (2002) também propuseram abordagens para obtenção das fases de ligação e frações de recombinação entre marcadores com diversos tipos de segregação, que foi implementado pelo programa OneMap (MARGARIDO; SOUZA; GARCIA, 2008).

Atualmente, a obtenção de mapas genéticos se tornou rotineira, existindo mapas para a maioria das espécies vegetais de importância econômica. Um dos principais usos dos mapas

genéticos é o mapeamento de QTLs (*quantitative trait loci*). Características poligênicas são de difícil mapeamento, entretanto são as de maior importância econômica, pois controlam características essenciais como produção, altura e teor de metabólitos em uma planta (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). O termo QTL foi introduzido por Tanksley (1993) e sua detecção segue diversas metodologias sempre tendo por princípio a correlação entre os marcadores moleculares e a característica quantitativa. O mapeamento de QTLs é a combinação entre mapas genéticos e análises de genética quantitativa (LIU, 1998). Logo, um QTL pode ser definido como uma entidade estatística que associa variações quantitativas em um caráter a variações em regiões genômicas definidas por meio de marcadores. Essas associações podem ser entre uma única marca e o caráter (marcas individuais), ou por intervalos entre marcas (mapeamento por intervalo ou ainda por intervalo composto), dentre outros (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

Figura 1 – Correlação entre um marcador A e um possível QTL no loco Q, com uma fração de recombinação r entre os locos. Esquema adotado no mapeamento de QTLs por marcas individuais (Adaptado: Liu, 1998)

O mapeamento de QTLs cria a possibilidade de acompanhar a segregação de genes responsáveis por caracteres quantitativos em nível individual. O método de análise mais simples é a análise de marcas individuais (EDWARDS; STUBER; WENDEL, 1987). Por meio desta análise, um marcador A é relacionado com um loco Q (possível QTL), como demonstrado na figura 1. Essas correlações podem ser definidas através de análise de variância ou do teste-t. Há ainda métodos mais sofisticados para as análises por marcas individuais, como regressões lineares e estimativas de máxima verossimilhança. Contudo, a análise por marcas individuais apresenta desvantagens e limitações, contrapondo-se à sua simplicidade. A precisão na posição de QTLs e estimativas acuradas de seus efeitos não podem ser obtidas. A posição do QTL também não pode ser precisamente determinada, devido a não independência dos testes de hipóteses para marcadores ligados, o que confunde o efeito do QTL e sua posição (LIU, 1998).

Como já comentado, outra maneira de realizar análises de QTLs é através do mapeamento por intervalos ou IM (*interval mapping*), idealizado por Lander e Botstein (1989). Este tipo de abordagem se baseia na frequência de recombinações de um par de marcadores adjacentes e um suposto QTL localizado entre estes dois marcadores, em que fica definida a probabilidade de existir um QTL numa dada posição do intervalo (LIU, 1998). A figura 2 exemplifica esse tipo de análise, em que há uma fração de recombinação entre dois marcadores ligados (A e B) e um suposto QTL (Q) no intervalo com frações de recombinação r_1 entre o QTL e o marcador A e r_2 entre o QTL e o marcador B. As abordagens de mapeamento por intervalos podem ser classificadas de acordo com os métodos utilizados na estimação dos parâmetros, podendo estes serem baseados em máxima verossimilhança, regressão ou pela combinação de ambos. O mapeamento por intervalos simples também apresenta alguns problemas, apesar de ser o método mais utilizado. O poder estatístico é relativamente baixo, possivelmente devido a QTLs ligados, interações entre QTLs e informações limitadas sobre o modelo. O número de QTLs não fica claro, assim como suas posições não podem muitas vezes ser exatas. Esses problemas são explicados em parte pela não independência dos diferentes intervalos quando existe mais de um QTL (LIU, 1998).

Figura 2 – Suposto QTL (Q) flanqueado por dois marcadores (A e B) e suas respectivas frações de recombinação (r) (Adaptado: Liu, 1998)

O mapeamento por intervalos compostos ou CIM (*composite interval mapping*), proposto por Zeng (1994), combina mapeamento por intervalos simples e regressão linear múltipla e acaba resolvendo alguns problemas existentes no mapeamento por marcas individuais e no mapeamento por intervalos simples. Por se concentrar em uma região genômica por vez, a busca por QTLs é reduzida a uma busca unidimensional e as estimativas da localização dos QTLs e seus efeitos ficam sem viés. A resolução da localização dos QTLs usando-se métodos condicionados a marcadores ligados são muito maiores que nas técnicas anteriores. Logo, a mais importante característica desse tipo de mapeamento é que os marcadores podem ser utilizados

como delimitadores para deixar mais clara a posição dos QTLs, através de um adensamento, que pode ser feita por uma abordagem de agrupamentos segregantes (LIU, 1998).

Especificamente para espécies de eucalipto, há vários trabalhos na literatura relativos ao uso de marcadores voltados para a elaboração de mapas genéticos, mapeamento de genes e mapeamento de QTLs para várias características. Uma metodologia de trabalho utilizada na construção de mapas genéticos no caso desta espécie é a análise de marcadores considerando um esquema de duplo pseudo cruzamento-teste. Desenvolvida por Grattapaglia e Sederoff (1994), a técnica tornou possível o mapeamento em progênie F_1 de genitores heterozigóticos através da análise de marcadores em cada um dos genitores separadamente e do cálculo dos mapas de ligação para cada um dos genitores.

Um dos primeiros mapas de ligação da espécie foi relatado por Brondani et al. (1998) no qual foram desenvolvidos iniciadores para 20 locos microssatélites (chamados EMBRA) e estes foram mapeados em conjunto com marcadores RAPD previamente mapeados. Esse primeiro mapa deu início aos mapas desenvolvidos com marcadores codominantes e mais informativos (BRONDANI; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2002). Também foram feitos mapas com marcadores AFLP (MARQUES et al., 1998; MYBURG et al., 2003). Finalmente, Brondani et al. (2006) relataram um primeiro mapa de referência apenas com marcadores microssatélites. Foram desenvolvidos por Brondani et al. (2006) 230 marcadores SSR para o gênero *Eucalyptus*, que foram agrupados em 11 grupos de ligação, número que coincide com o número haplóide da espécie.

Alguns genes também foram mapeados em eucalipto. Gion et al. (2000) mapearam genes candidatos presentes na rota da biossíntese da lignina. Por meio da técnica SSCP (*single-strand conformation polymorphism*) foram realizadas as amplificações de genes candidatos, com iniciadores desenhados a partir de sequências disponíveis. Assim posicionaram esses diferentes genes em cinco grupos de ligação do eucalipto em mapas elaborados com marcadores RAPD. Técnicas similares também foram utilizadas para posicionar genes envolvidos na formação da madeira, fibras e caracteres florais (THAMARUS et al., 2002). Essa informação pode ser útil em um possível mapeamento de QTLs de caracteres ligados a essa rota metabólica. Além disso, um gene para resistência a ferrugem foi mapeado por Junghans et al. (2003), conforme discussão adiante.

Os caracteres quantitativos são, em geral, os que apresentam maior importância econômica. No caso do eucalipto, estes compreendem produção de celulose, volume e qualidade de madeira (GRATTAPAGLIA et al., 1996; THAMARUS et al., 2004; ROCHA, et al. 2007), florescimento (MISSIAGIA; PIACEZZI; GRATTAPAGLIA, 2005), além de resistência a doenças (ROSADO, 2007). Nesse contexto, o mapeamento de locos de caracteres quantitativos (QTLs) se faz necessário, sendo de extrema importância no entendimento da herança dos caracteres mais complexos.

2.2 Ferrugem do eucalipto e herança genética da resistência

Por ser um gênero de relativa recente introdução no continente sul americano, poucos patógenos aí presentes se adaptaram ao eucalipto de modo a se tornarem limitantes ao seu cultivo em escala comercial. A primeira doença de destaque foi o cancro, causado pelo fungo *Chrysosporthe cubensis*, na década de 1960. Na década seguinte, iniciaram-se trabalhos de seleção inter e intra progênies, objetivando a resistência genética ao patógeno, quando também se iniciaram os trabalhos de clonagem para multiplicar genótipos resistentes (FERREIRA e SANTOS, 1997). Outro patógeno que logo se adaptou ao eucalipto foi *Puccinia psidii* Winter, agente causal da ferrugem. Este, entretanto, não tem seu total controle até os dias de hoje. O fungo, já presente na América do Sul quando o eucalipto foi introduzido, é um patógeno de diversas espécies da família Myrtaceae, tendo sido primeiramente relatado em *Eucalyptus citriodora* em 1912 (COUTINHO et al., 1998). Já na década de 1980, Ferreira (1983) caracterizou a doença, descrevendo-a como de ocorrência comum em viveiros e campo, afetando plantas de até dois anos de idade.

Os sintomas da ferrugem surgem 2 a 4 dias após a inoculação com urediniósporos. Após 10 a 12 dias, as lesões pustulares, de coloração amarela intensa, já são visíveis, principalmente na face abaxial das folhas. Outros tecidos também são atingidos, como pecíolos e partes tenras do caule. Geralmente o fungo não mata seu hospedeiro, mas isto pode acontecer em genótipos extremamente suscetíveis. A planta se recupera, porém passa a emitir intensa brotação (FERREIRA, 1983), o que é indesejável do ponto de vista silvicultural, além de retardar o crescimento das plantas. Por isso seu controle se faz necessário, principalmente através do desenvolvimento de genótipos resistentes.

O primeiro estudo sobre a herança da resistência a este patógeno foi realizado por Junghans (2003). Neste trabalho, o autor estudou 11 cruzamentos entre três indivíduos resistentes e três com diferentes níveis de suscetibilidade, além de progênies resultantes de autofecundações. A inoculação do patógeno se deu de forma artificial, através de suspensão de urediniósporos. A avaliação da severidade da doença foi realizada 12 dias após a inoculação, utilizando uma escala com quatro notas (S0, S1, S2 e S3) proposta por Junghans, Alfenas e Maffia (2003). Plantas avaliadas como S0 e S1 foram consideradas resistentes e plantas S2 e S3 suscetíveis. Foi identificado um genitor possivelmente homozigoto para um gene de efeito principal, denominado *Ppr1*. Contudo, nos demais cruzamentos observaram-se algumas distorções de segregação ao modelo proposto, de um loco com dois alelos, sugerindo que haveria outro gene, dominante, porém de penetrância incompleta e/ou expressão dependente do *background* genético. No mesmo trabalho, o autor ainda encontrou um marcador RAPD ligado a *Ppr1* a 0,462 cM.

Zamprogo (2005) também observou desvios na segregação monogênica esperada em uma progênie de aproximadamente 130 indivíduos e inferiu sobre a possibilidade de existirem raças de *Puccinia psidii*, o que tornaria o estudo da resistência genética a esta doença ainda mais complexo. De acordo com o autor, a resistência a ferrugem seria um caráter de herança monogênica, governada por um alelo recessivo, diferente do apresentado por Junghans (2003). Neste caso foram feitos dois tipos de avaliação fenotípica: na primeira, as plantas foram inoculadas artificialmente em câmara e a resistência foi avaliada por meio de uma escala de severidade com quatro notas. Já na segunda avaliação, realizada em campo, as plantas foram avaliadas com uma escala de três notas, sem inoculação artificial. Plantas que apresentaram resultados consistentes nas duas avaliações foram analisadas através de agrupamentos segregantes, que resultou na identificação de um marcador RAPD ligado ao gene a uma distância de 20 cM.

Os resultados contraditórios destes trabalhos podem ser explicados em parte devido a um *background* genético, como já destacado por Junghans (2003). Outra razão para a existência dessas discrepâncias pode dever-se ao fato de que as análises fenotípicas não levaram em consideração o caráter quantitativo da resistência. Desta forma, Rosado (2007) estudou a herança em oito progênies oriundas de cruzamentos e autofecundações de clones com níveis de resistência conhecidos, em progênies de 11 a 141 indivíduos. As inoculações foram feitas em câmara, através de suspensão de urediniósporos e a avaliação ocorreu 20 dias após a inoculação,

pela escala de severidade de Junghans, Alfenas e Maffia (2003). Foram propostas então duas hipóteses: herança monogênica dominante e herança oligogênica de dois genes complementares de efeito principal. Porém cada uma das hipóteses se ajustou a certos cruzamentos e a outros não. Também foram mapeados possíveis QTLs que estariam regendo o caráter, através da amplificação de locos microssatélites do grupo de ligação 3 de eucalipto. Este grupo foi enfatizado devido ao fato do marcador *Ppr1* ter sido posicionado neste grupo. Segundo Rosado (2007), foi detectado um QTL próximo ao loco microssatélite EMBRA125, explicando 42% da variação fenotípica. Contudo, o restante da variação não foi explicado, indicando a possibilidade da existência de outros genes não detectados. A não detecção, por sua vez, pode ser devida ao tipo de análise empregada, que foi o mapeamento por intervalos simples, que tem baixo poder de detecção de QTLs ligados, ou ainda devida ao uso de uma escala de notas com pouco poder de discriminação fenotípica.

Ainda na tentativa de entender a herança da resistência à ferrugem, Alves (2008) estudou 10 progênies interespecíficas de *Eucalyptus* spp., com 20 indivíduos cada. As plantas também foram inoculadas com suspensão de urediniósporos, em câmara, e avaliadas 20 dias após, utilizando a escala de notas de Junghans, Alfenas e Maffia (2003). O autor propôs um modelo com dois locos, sugerindo epistasia dupla recessiva, diferentemente do que havia sido proposto pelos trabalhos anteriores (JUNGHANS et al., 2003; ZAMPROGNO, 2005; ROSADO, 2007). Ainda foi feito o mapeamento do gene/QTL de resistência a ferrugem em uma progênie de 188 indivíduos oriunda de um cruzamento entre um genitor híbrido de *E. dunnii* x *E. grandis* e outro genitor *E. urophylla* x *E. globulus*. Para tal, foram analisados marcadores microssatélites previamente mapeados no grupo de ligação 3, grupo em que foi mapeado o gene *Ppr1*. O gene de resistência foi localizado entre os marcadores EMBRA239 e EMBRA286, em intervalo de 14,6 cM. Tratando os dados de severidade da doença como quantitativos, foi identificado um QTL entre os marcadores EMBRA286 e EMBRA122, correspondendo a 71% da variação fenotípica. Os resultados do gene de resistência e do QTL corroboram com a hipótese da existência de um gene de resistência, com efeito principal, no grupo de ligação 3, e os desvios na segregação esperada para esse modelo, que equivaleria ao efeito de *background* genético citado por Junghans et al. (2003), corresponderia ao efeito epistático de um segundo loco ainda não mapeado.

Por fim, Teixeira et al. (2009) também analisaram uma série de cruzamentos entre híbridos interespecíficos de eucalipto a fim de estudar a herança do caráter. Foram utilizadas 14

progênies, plantadas em dois locais, totalizando 120 plantas por progênie. Desta vez as avaliações se deram no campo, após infecções naturais com o patógeno. As avaliações da resistência seguiram o mesmo modelo de quatro notas realizado nos trabalhos anteriores, contudo foram realizadas 4 avaliações, aos 90, 120, 150 e 180 dias após o plantio das mudas. A nota mais alta obtida nessas avaliações é a que foi considerada. De acordo com as segregações observadas, os autores propuseram um modelo monogênico e multialélico, diferente dos trabalhos anteriores. Segundo a hipótese, esse loco, denominado *Ppr3*, possuiria três alelos, seguindo uma série alélica de dominância. No entanto, foram observadas variações dentro de classes fenotípicas, evidenciando a presença de outros locos de menor efeito. O gene *Ppr3* também foi mapeado no grupo de ligação 3, próximo (6,8cM) a um marcador do tipo RGA (*resistance gene analog*) (TEIXEIRA, 2009).

Do exposto acima, nota-se que todos os trabalhos detectaram um gene de efeito principal no grupo de ligação 3 e que provavelmente se trata do mesmo gene. No entanto, todos estes artigos também citam a possibilidade de existência de ao menos outro gene, de efeito menor, embora a localização genética deste ainda permaneça desconhecida. Desta forma, o presente trabalho buscou identificar esse gene de efeito principal, além de investigar outras possíveis regiões, através de uma fenotipagem mais adequada ao caráter quantitativo da resistência a este patógeno e do uso de uma estratégia de mapeamento (por intervalos compostos) de maior poder estatístico na identificação de QTLs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

A progênie utilizada neste estudo foi desenvolvida pelo programa de melhoramento do Setor Florestal da empresa Votorantim Celulose e Papel (VCP), atual Fibria. Trata-se de uma população S_1 segregante inicialmente constituída por 120 indivíduos provenientes da autofecundação de um clone híbrido interespecífico entre *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, heterozigoto para um loco de resistência a ferrugem (TEIXEIRA et al., 2009) e altamente resistente a ferrugem (denominado VCP-R). Sob condições de campo, o clone apresenta reação do tipo S0, segundo a escala proposta por Junghans, Alfenas e Maffia (2003), caracterizada por plantas que apresentam imunidade ou reação semelhante à de hipersensibilidade.

Quatro clones comerciais com diferentes níveis de resistência à ferrugem, incluindo o clone VCP-R foram utilizados como controles (clones V1, VCP-R, V3 e V4) para efeito de obtenção das estimativas de variação ambiental entre experimentos.

3.2 Avaliação da resistência a *P. psidii*

As 120 plantas foram avaliadas em dois locais (60 plantas/local) instalados em novembro de 2005 em áreas notórias pela ocorrência natural de epidemias de ferrugem (TEIXEIRA, 2009). Estas áreas estão localizadas nos municípios de Santa Branca e Itapetininga, ambas no Estado de São Paulo. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos incompletos. Em cada local foram instalados seis blocos de cinco linhas, nos quais foram dispostas 10 plantas dos quatro clones controle e 10 plantas da progênie. Em cada bloco, a ordem das linhas dos controles e da progênie foi disposta ao acaso. Segundo este delineamento, cada indivíduo da progênie é considerado um tratamento. Plantas de um clone altamente suscetível foram usadas como bordadura em ambos os locais com a finalidade de garantir a multiplicação do inóculo.

Figura 3 - Escala de severidade de ferrugem em eucalipto, adaptado de Takahashi (2002)

Quatro avaliações da severidade da doença foram realizadas aos 90, 120, 150 e 180 dias após o plantio. A avaliação foi baseada em uma escala de notas que representa a severidade da doença, proposta por Takahashi (2002) e adaptada por melhoristas do setor florestal da empresa VCP (figura 3). Os níveis da escala são:

- a) **Nota 0:** planta com ausência de esporulação ou planta com lesões necróticas, semelhantes a reações de hipersensibilidade;
- b) **Nota 1:** planta com poucas pústulas com esporulação normal, geralmente espaçadas ou ocasionalmente abundantes nos limbos de folhas novas;
- c) **Nota 2:** planta com pústulas com esporulação normal, porém abundantes nos limbos foliares, folhas novas e pecíolos de folhas mais novas;
- d) **Nota 3:** planta com pústulas com esporulação intensa no limbo foliar de folhas novas, pecíolos de folhas novas, nos terminais de galhos e haste principal, comprometendo a dominância apical e estrutura foliar da planta.

Os valores das sucessivas avaliações foram utilizadas para cálculo da área sob a curva de progresso da doença (AUDPC ou *area under disease progress curve*) para cada planta. Esta variável é utilizada em estudos epidemiológicos (LONG; LEE; TEBEEST, 2000) e tem grande utilidade no estudo da resistência quantitativa a doenças por representar a integral de tecido doente ao longo do tempo (JEGER; VILJANEN-ROLLINSON, 2001; QI et al., 1998; MARDI et al., 2005). A AUDPC é estimada através da fórmula abaixo (CAMPBELL; MADDEN, 1990) e se baseia no cálculo da área de trapézios (eq.1):

$$\text{AUDPC} = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) \cdot (t_{i+1} - t_i) \quad (1)$$

em que n é o número de avaliações e y é a severidade da doença no tempo t . A AUDPC de cada genótipo foi padronizada dividindo-se seu valor pelo tempo total de duração da avaliação da epidemia, que foi de 180 dias.

3.3 Análise do experimento

A técnica de análise de modelos mistos (PINHEIRO; BATES, 2000) foi aplicada aos dados de AUDPC visando estimar a variação entre experimentos. Através dessa análise são excluídos os efeitos de blocos e locais, permanecendo apenas a variância genética entre cada indivíduo. A exclusão de efeitos ambientais baseou-se em dados dos clones controle (testemunhas).

Essa análise foi realizada através da rotina *proc mixed* do programa SAS. Os efeitos das quatro testemunhas, dos locais e da interação entre locais e testemunhas foram considerados efeitos fixos e os efeitos de blocos (dentro de locais), das testemunhas (dentro de cada combinação de bloco e local) e dos genótipos (indivíduos da progênie dentro de cada combinação de bloco e local) como efeitos aleatórios. Foi possível assim a obtenção de BLUPs (*best linear unbiased predictors*), que nada mais são do que as médias ajustadas ao modelo proposto.

3.4 Coleta de material vegetal e extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens e sadias de acordo com o método CTAB (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Folhas cortadas, sem as nervuras, foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Após transferência de aproximadamente 0,3g do macerado para tubos de polipropileno de 1,5 mL, foram adicionados 700 µL de tampão de extração (10% CTAB; Tris 100mM pH 8,0; EDTA 20mM pH 8,0; NaCl 0,7M; polivinil pyrrolidone; 2% β-mercaptoetanol). Os tubos foram mantidos por 40 minutos em banho quente (65°C), sob agitação a cada 10 minutos, para completa homogeneização.

Após o resfriamento, 600µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foram adicionados ao extrato e homogeneizados por 3 min. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e homogeneizado com 50 µL de CTAB 10% (10% CTAB; 0,7M NaCl), após o que 600 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foram novamente adicionados. A suspensão foi então novamente centrifugada por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo e adicionado de 400 µL de isopropanol gelado, permanecendo por no mínimo 4 horas à -20 °C em repouso e, posteriormente, centrifugado por 15 minutos à 12.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em etanol 70% e em seguida em etanol 95%. O precipitado foi seco em estufa por 30 minutos a 37 °C e a seguir foi dissolvido em 40 µL de TE (10mM Tris e 1mM EDTA) contendo 10 µg/µL de RNase para a digestão eliminação de RNA contaminante após incubação por 30 minutos em estufa a 37°C.

A verificação da integridade do DNA foi realizada em gel de agarose 1% (Invitrogen) adicionado de 0,5% Sybr Safe (Invitrogen), após eletroforese nas condições de 3V/cm por 1 hora a 25°C em tampão TBE 0,5X (2,7g tris base, 1,375g ácido bórico e 0,232 g EDTA q.s.p 1 litro). Amostras de DNA foram quantificadas em aparelho NanoDrop (Thermo Scientific).

3.5 Genotipagem com marcadores moleculares

3.5.1 Marcadores microssatélites

Esta etapa do trabalho foi realizada em parceria com o laboratório de Genética Vegetal, sob orientação do Dr. Dario Grattapaglia, na EMBRAPA-CENARGEN (Brasília, DF). As reações para amplificação dos locos microssatélites seguiram o esquema multiplex, onde foram utilizados locos previamente localizados em grupos de ligação descritos por Brondani et al. (2006) e pelo projeto Genolyptus, que possuem o acrônimo EMBRA (GRATTAPAGLIA et al., 2005), e pelo CSIRO (*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*), que possuem os acrônimos Eg e En.

Para que locos microssatélites sejam informativos, estes têm que estar em heterozigose no único genitor, visto que se trata de uma progênie autofecundada. Portanto, *a priori*, o genitor foi genotipado com 240 marcadores para identificar marcadores em tal condição. Para isso foram

testados conjuntos de iniciadores, com até seis locos por reação (reações multiplex) no genitor e em mais seis indivíduos da progênie. Após análise no programa Genotyper, os locos em heterozigose foram selecionados para que estes fossem analisados em toda a progênie.

Na montagem de cada reação multiplex foram selecionados locos que possuíam fragmentos de tamanhos diferentes, além de iniciadores marcados com diferentes fluorescências (6-FAM, HEX e NED). As reações foram realizadas com o kit PCR Multiplex (Qiagen) utilizando-se 2 ng de DNA genômico, 2,5 µL de PCR Master Mix (kit), 0,5 µL de Q solution (kit), 1,0 µM de cada iniciador, completando-se a reação com água Milli-Q autoclavada para 5 µL. Em seguida as reações foram levadas ao termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), com programa: 95°C por 15 minutos, 35 ciclos com 95°C por 30 segundos, 57°C por 90 segundos, 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 30 minutos a 60°C, seguindo o programa indicado pelo próprio kit. Em seguida, foram adicionados 20 µL de água Milli-Q autoclavada a cada reação. Uma alíquota de 1 µL de reação diluída foi utilizada para análise, adicionando-se 8 µL de HiDi Formamide (Applied Biosystems), 0,35 µL de marcador de peso molecular ROX size standard desenvolvido por Brondani e Grattapaglia (2001) e 0,65 µL de água Milli-Q autoclavada. Cada uma das amostras foi então desnaturada a 95°C por 5 minutos e então levada a análise em seqüenciador automático ABI 3700 DNA analyser (Applied Biosystems).

3.5.1.1 Confirmação da paternidade da progênie S₁

A confirmação da paternidade dos indivíduos da progênie foi realizada através da genotipagem dos 120 indivíduos com seis marcadores microsatélites EMBRA e análise nos programas GenScan Analysis e Genotyper (PE Applied Biosystems).

3.5.1.2 Genotipagem da progênie S₁

Após a análise de paternidade, toda a progênie foi genotipada com os marcadores microsatélites que se apresentaram em heterozigose. Os programas GeneScan Analysis e Genotyper (Applied Biosystems) também foram utilizados na genotipagem da progênie. Em

adição a estes marcadores, a progênie também foi genotipada com marcadores TRAP e AFLP, conforme descrito a seguir.

3.5.2 Marcadores TRAP

Os iniciadores arbitrários foram desenhados de acordo com Li e Quiros (2001). As sequências dos iniciadores fixos (tabela 1) foram elaboradas com base em domínios de proteínas codificadas por genes de resistência, como LRR (*leucine-rich repeats*), NBS (*nucleotide-binding site*), TIR (*toll/interleukin-1 receptor*) e kinase e também em domínios de alguns fatores de transcrição, como MYB e WRKY (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997; EULGEM et al., 2001), desenhados no Laboratório de Genética Molecular (L.E.A. Camargo, dados não publicados).

Tabela 1 - Iniciadores sintetizados para a realização dos marcadores TRAP

Iniciador	Tipo	Sequência
TRAP1 ¹	Arbitrário	5' GACTGCGTACGAATTAAT 3'
TRAP2 ¹	Arbitrário	5' GACTGCGTACGAATTTGC 3'
TRAP3 ¹	Arbitrário	5' GACTGCGTACGAATTGAC 3'
NBS ²	Fixo	5' GAAACGGATCTCCTGTCATC 3'
TIR ²	Fixo	5' CTACGCTTCCTCAGAGTGGT 3'
WRKY ²	Fixo	5' ATGGAAGCAAGAGGTCGAG 3'
MYB1 ²	Fixo	5' ACGACAAGCTCATTGCCTAC 3'
MYB2 ²	Fixo	5' CAACAATGAGGAAGCCAAGT 3'
LRR ²	Fixo	5' GATTCCTCCAGAGATTGGTG 3'

¹Iniciadores desenhados por Li e Quiros (2001); ²Iniciadores desenhados a partir de sequências depositadas em banco de sequências (L.E.A. Camargo, dados não publicados).

As reações foram realizadas com 20 ng de DNA genômico, a concentração de 1x do kit PCR Master Mix (Promega), 0,5 µM de iniciador arbitrário, 0,8 µM de iniciador fixo e o volume completado para 15 µL com água Milli-Q autoclavada. As reações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), com programa: 94°C por 3 minutos, 5 ciclos a 94°C por 50 segundos, 35°C por 50 segundos e 72°C por 1 minuto, 35 ciclos

a 94°C por 50 segundos, 50°C por 50 segundos e 72°C por 1 minuto, encerrando com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A cada reação foram adicionados 5 µL de tampão de carregamento (10 mL de formamida, 200 µL de EDTA 0,5M pH8,0, 10mg de azul de bromofenol e 10 mg de xilene cianol), sendo desnaturadas por 5 minutos a 94°C. Os produtos de PCR foram resolvidos em eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% com 0,5 mm de espessura em cuba vertical Sequigen GT (Bio-Rad) 38 x 50 cm. A eletroforese foi realizada por 4 horas a uma potência de 80W. A revelação dos géis foi realizada pelo método do nitrato de prata através do protocolo proposto por Creste; Tullman Neto e Figueira (2001).

3.5.3 Marcadores AFLP

Marcadores AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) foram utilizados visando saturar o mapa genético de modo a aumentar o poder na detecção de QTLs. A metodologia seguiu a proposta por Vos et al. (1995) com as enzimas *MseI* + *EcoRI* e diferentes combinações de iniciadores, de acordo com as previamente utilizadas por Teixeira (2009), que apresentaram alto grau de polimorfismo. O DNA (20 ng) foi digerido em uma reação de 20 µL contendo 2U de cada uma das enzimas, concentração de 1x do tampão One Phor All (OPA, Amersham), concentração de 1x de BSA (New England) em q.s.p. 20 µL de reação. Em seguida, a reação foi incubada por 3 horas em estufa a 37°C. Ao final desse período, uma alíquota de 2 µL foi analisada em gel de agarose 0,8% em eletroforese por 3 horas em tampão de TBE 1x (2,5V/cm), corado com SybrSafe (Invitrogen) a 0,5% e visualizado através de fotodocumentador em luz UV. As enzimas foram inativadas através de incubação por 15 minutos a 70°C.

Os adaptadores para cada uma das enzimas foram preparados de acordo com as sequências dos adaptadores apresentadas na tabela 2. Para a enzima *EcoRI* foram utilizados 5 µM do iniciador *EcoRI* F, 5 µM do iniciador *EcoRI* R, 0,5x do tampão One Phor All (OPA, Amersham), completados para 200 µL com água Milli-Q autoclavada. Da mesma forma, para a enzima *MseI* foram utilizados 50 µM do iniciador *MseI* F, 50 µM do iniciador *MseI* R e 0,5x do tampão One Phor All (OPA, Amersham), completados para 200 µL com água Milli-Q autoclavada. Para a hibridização dos adaptadores, foi utilizado o termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com 10 minutos a 65°C, 10 minutos a 37°C e 10 minutos a 25°C. Então foi realizada a reação de ligação dos adaptadores nos fragmentos de DNA digerido,

através da reação com 1x do tampão T4 ligase, 0,5 μ M do adaptador *EcoRI*, 5 μ M do adaptador *MseI*, 0,42U da enzima T4 ligase (Fermentas) e água Milli-Q autoclavada q.s.p. 4,0 μ L, que foi adicionado em cada uma das amostras de DNA digerido. A reação de ligação dos adaptadores foi incubada a 22°C por 3 horas em banho-maria. Após esse período, as enzimas foram inativadas por tratamento térmico a 70°C por 15 minutos.

A pré-amplificação, realizada com a utilização de iniciadores para cada uma das enzimas com apenas um nucleotídeo seletivo na extremidade 3', foi feita para cada indivíduo em uma reação contendo 1x de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de dNTPs, 0,25 μ M de um de iniciador para a enzima *EcoRI*, 0,25 μ M de um de iniciador para a enzima *MseI*, 1,5U de *Taq* DNA polimerase e 1,0 μ L de DNA digerido e ligado, em reação completada por água Milli-Q autoclavada para 10 μ L. As reações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com a seguinte programação: 94°C por 2 minutos, 26 ciclos de 94° por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizando com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Após a reação 40 μ L de água Milli-Q autoclavada, foram adicionados a cada uma das amostras.

Tabela 2 - Adaptadores das enzimas *EcoRI* e *MseI* e iniciadores das reações de pré-amplificação (um nucleotídeo seletivo) e amplificação seletiva (três nucleotídeos seletivos) para gerar marcadores AFLP

Enzima		Sequências
<i>EcoRI</i>	Adaptador	5' CTCGTAGACTGCTACC 3' 5' AATTGGTACGCAGTCTAC 3'
	Iniciador da pré-amplificação N: T ou A	5' GACTGCGTACCAATTCN 3'
	Iniciadores da amplificação seletiva NNN: AAC, ACC, ACT, ACA, TGC	5' GACTGCGTACCAATTCNNN 3'
<i>MseI</i>	Adaptador	5' GACGATGAGTCCTGAG 3' 5' TACTCAGGAAGTCAT 3'
	Iniciador da pré-amplificação N: C ou G	5' GATGAGTCCTGAGTAAN 3'
	Iniciadores da amplificação seletiva NNN: CAT, GAA, GGG, GAT, GCC	5' GATGAGTCCTGAGTAANNN 3'

A amplificação seletiva foi realizada com iniciadores com três nucleotídeos seletivos (tabela 2), utilizando como base as reações de pré-amplificação, que possuíam o mesmo nucleotídeo seletivo. Foi utilizado a concentração de 1x de tampão da enzima *Taq* DNA

polimerase, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de dNTPs, 0,25 μ M de um iniciador com três nucleotídeos seletivos e sítio para a enzima *EcoRI*, 0,30 μ M de um iniciador com três nucleotídeos seletivos e sítio para a enzima *MseI*, 1 μ L de da reação de pré-amplificação, completando com água Milli-Q estéril para 10 μ L de reação. A reação foi levada ao termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com a seguinte programação: 94°C por 2 minutos, 13 ciclos de 94° por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, 23 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Após, 5 μ L de tampão de carregamento foram adicionados a cada amostra (10 mL de formamida, 200 μ L de EDTA 0,5M pH8,0, 10mg de azul de bromofenol e 10 mg de xilene cianol) as quais foram desnaturadas por 5 minutos a 94°C e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% com 0,5 mm de espessura em cuba vertical Sequigen GT (Bio-Rad) 38 x 50 cm. A eletroforese foi realizada por 4 horas a uma potencia de 80W. Os géis foram revelados pelo método do nitrato de prata através do protocolo proposto por Creste; Tullman Neto e Figueira (2001).

3.6 Construção do mapa genético

Testes de χ^2 , corrigidos pelo método de Bonferroni foram utilizados para testar o padrão de segregação esperado para cada tipo de marcador no caso de uma progênie autofecundada (SSR, 1:2:1; TRAP e AFLP, 3:1). Para a correção por Bonferroni foi definido o valor de $\alpha - 0,05$ para cada teste, tornando possível o cálculo de um novo α^* para os múltiplos testes (eq. 2).

$$\alpha^* = \frac{\alpha}{m} \quad (2)$$

em que α é o valor definido para os testes individuais, definido como 0,05, e m é o número de testes realizados, que é igual ao número de marcadores analisados, seja dominante ou codominante.

Não foi possível a utilização da estratégia do duplo *pseudo-testcross* (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994) comumente utilizado no mapeamento de F_1

segregantes, visto que se trata de uma progênie autofecundada, não sendo possível gerar um mapa para cada um dos genitores. Também não foi possível a utilização de programas como o MAPMAKER (LANDER et al., 1987), já que neles há necessidade de conhecimento das fases de ligação entre marcadores, informação que não pode ser obtida diretamente no presente caso. Por isso, foi utilizado o programa OneMap (MARGARIDO; SOUZA; GARCIA, 2008), desenvolvido para análises de mapas de ligação em espécies com progênes F_1 segregantes, gerando um mapa integrado.

Outra vantagem da utilização deste programa é que podem ser utilizados marcadores com diferentes tipos de segregação (como 3:1 e 1:2:1). O programa baseia-se em algoritmos propostos por Wu et al. (2002), que estima simultaneamente as distâncias e as fases de ligação dos marcadores. O agrupamento das marcas é realizado através de testes de dois pontos entre marcas com conversão pelo algoritmo EM (*expectation maximization algorithm*) para o cálculo das frações de recombinação. A ordenação das marcas se dá através de abordagem multiponto com verossimilhança pelo modelo markoviano oculto (LHMM ou *likelihood hidden Markov model*).

Para a construção do mapa de ligação foi gerada uma matriz de dados contendo a informação dos genótipos dos marcadores de cada planta (SSR, AFLP e TRAP), em formato texto, para que fosse realizada a análise no programa OneMap (MARGARIDO; SOUZA; GARCIA, 2008). O tipo de segregação de cada tipo de marcador foi informado, de acordo com o proposto por Wu et al. (2002): marcadores microssatélite foram denominados de B3.2 ($ab \times ab$) e os marcadores AFLP e TRAP, dominantes, foram denominados de C.8 ($ao \times ao$). Os alelos foram denominados a ou b e os alelos nulos de o . Detalhes sobre a montagem da matriz podem ser encontradas em Margarido; Souza e Garcia (2008) e no tutorial do programa encontrado na página da internet (<http://www.r-project.org/>).

Como em todo programa para construção de mapas genéticos, duas etapas são necessárias: o agrupamento das marcas e sua ordenação dentro dos grupos. Em cada uma das etapas foi utilizado uma estatística LOD particular. Deste modo, para o agrupamento das marcas foi utilizado um LOD 5,5 e uma fração de recombinação de 0,5. Em seguida, cada um dos grupos de ligação formados foi analisado separadamente, para que pudessem ser ordenados. A ordenação utilizou LOD 3 utilizando a função de mapeamento de Kosambi, posicionando os marcadores através do método multiponto. Para cada um dos grupos foram analisadas diversas combinações

de marcadores, procurando um mapa com maior valor de verossimilhança, através do algoritmo TRY.

3.7 Mapeamento de QTLs

Os dados de BLUPs foram utilizados para o mapeamento de QTLs, segundo metodologia de Gazaffi (2009), que propõe o mapeamento com base em informação de F_1 segregantes com misturas de tipos de segregação. Algumas adaptações tiveram de ser implementadas ao modelo de mapeamento de QTLs diante do tipo de progênie estudada, que apesar de ser uma progênie F_1 se comporta como uma F_2 , pois é oriunda da autofecundação de um indivíduo heterozigótico. A principal adaptação se deu nos contrastes utilizados para a obtenção dos efeitos dos QTLs para cada um dos locos.

$$\text{Para } F_1, \text{ temos } \begin{matrix} aa \\ ab \\ ba \\ bb \end{matrix} \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 \\ -1 & 1 & -1 \\ -1 & -1 & 1 \end{bmatrix} \begin{matrix} \alpha_{p1} & \alpha_{p2} & \delta \end{matrix} \text{ e para } F_2, \text{ temos } \begin{matrix} aa \\ ab \\ ba \\ bb \end{matrix} \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & -1 \\ -1 & -1 & 1 \end{bmatrix} \begin{matrix} \alpha_{p1} & \alpha_{p2} & \delta \end{matrix}.$$

No caso em estudo, não é possível a distinção entre os genótipos heterozigóticos em relação à fase de ligação de seus locos marcadores, visto que há apenas um genitor autofecundado. Portanto, foram necessárias adaptações nos parâmetros propostos por Gazaffi (2009). Cada uma das linhas das matrizes representa um dos possíveis genótipos e nas colunas temos os valores dos contrastes para α_{p1} , α_{p2} e δ , que indicam os efeitos aditivos dos alelos dos genitores 1 e 2 e o efeito de dominância, respectivamente. Nota-se que no caso de F_2 efeitos aditivos para os indivíduos heterozigotos é zero, já que é impossível a distinção entre os dois genótipos heterozigóticos, pelo desconhecimento da fase de ligação dos marcadores. Essas alterações foram propostas por Gazaffi¹ e se adaptam bem ao caso de progênies F_2 (em fase de elaboração). O método realiza uma busca por QTLs e, na sequência, os caracteriza, indicando

¹GAZAFFI, R. (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”). Mapeamento de QTLs utilizando mapeamento por intervalos compostos e mapa genético integrado.

qual o alelo favorável ao caráter, sua fase de ligação e a proporção da variância fenotípica explicada pelo mesmo através do valor de R^2 .

Duas metodologias foram usadas no mapeamento de QTL: mapeamento por intervalos (IM, LANDER; BOTSTEIN, 1989) e mapeamento por intervalos compostos (CIM, ZENG, 1994). Em ambos os casos os valores de LOD foram calculados a cada 1 cM, com genótipos dos intervalos determinados pelo método de probabilidades multiponto.

O mapeamento por intervalos compostos foi conduzido utilizando a metodologia de Gazaffi (2009). Foram definidos cofatores, utilizando o critério AIC (*Akaike's information criterion*), sendo então realizada uma regressão linear múltipla na busca de marcadores associados aos fenótipos (cofatores). A presença de um QTL foi testada através de razão de verossimilhanças (LRT). Uma janela (*window size*) de 12 cM foi utilizada para cada um dos lados do intervalo estudado, à procura por associações. O mapeamento por intervalos seguiu a mesma metodologia proposta por Gazaffi (2009), porém sem a adição de cofatores ao modelo.

Foram considerados QTLs com LOD superior a 3,0. Os valores dos efeitos aditivos e de dominância só foram considerados significativos à 5% de probabilidade, o que corresponde a valores de LOD maiores que 1,2.

4 RESULTADOS

4.1 Confirmação da paternidade

Dos 120 indivíduos da progênie, seis morreram e foram descartados do estudo. O restante foi analisado para comprovar a paternidade por meio da genotipagem com cinco marcadores microssatélites (EMBRA012, EMBRA350, EMBRA122, EMBRA219, EMBRA648), resultando na identificação de 24 indivíduos com pelo menos um alelo oriundo de outros genitores ou ainda que não possuísse nenhum dos alelos do clone VCP-R. Com isso, restaram 90 indivíduos irmãos-completos dos quais 51 foram avaliados para resistência à ferrugem em Santa Branca e 39 em Itapetininga. Um exemplo de contaminação genética revelada na análise pode ser visualizado na figura 4:

Figura 4 – Exemplo de genotipagem de indivíduos da progênie S_1 . As linhas verticais indicam os alelos do genitor e da progênie e círculos indicam indivíduos que apresentam alelos oriundos de outros genitores

4.2 Avaliação da resistência

As avaliações da doença tiveram início aos 90 dias após o plantio. Houve uma maior severidade média da doença em Santa Branca/SP, a julgar pelas AUDPC médias das quatro testemunhas (tabela 3), em que a testemunha VCP-R corresponde ao genitor da progênie. Também na progênie a severidade média foi maior em Santa Branca, com média de AUDPC de 44,7, valor máximo de 150,0, mínimo de 0,0 e desvio padrão de 35,8. Já em Itapetininga, a média de AUDPC foi 35,0, com valor máximo de 120,0 e mínimo de 0,0 e desvio padrão 37,4. A AUDPC média nas duas localidades foi de 40,5, com desvio padrão 36,6.

Tabela 3 – Valores médios de AUDPC para testemunhas, considerando-se os locais dos experimentos

Testemunhas	AUDPC		Resistência a ferrugem
	Santa Branca/SP	Itapetininga/S	
V1	152,1	152,5	Suscetível
VCP-R	55,9	17,5	Resistente
V3	63,3	33,4	Resistente
V4	130,6	102,2	Suscetível
Média	99,9	78,2	

A análise por modelos mistos possibilitou estimar a variância ambiental entre locais e blocos e normalizar os valores de AUDPC, excluindo-se efeitos ambientais, resultando nos valores de BLUPs para cada indivíduo. Foram utilizados apenas os desvios em torno da média dos BLUPs para as etapas subseqüentes, que representa a variância genética do caráter AUDPC.

Quando observados os dados de AUDPC não transformados (figuras 5a e 5b) foi possível verificar uma distribuição não contínua, caracterizada pela formação de um platô nos valores mais baixos.

A distribuição dos dados transformados pode ser vista nas figuras 5c e 5d, sendo de fácil visualização a distribuição contínua dos valores de AUDPC, sem qualquer tipo de viés aparente. Foi possível verificar também a ausência de um platô de indivíduos totalmente resistentes. Nessa distribuição, 62,2% das observações se encontram dentro de um intervalo de uma vez o desvio padrão, acima e abaixo da média. Já quando consideradas duas vezes o desvio padrão, 95,6% das observações se encontram nesse intervalo.

Figura 5 – Distribuição dos valores de AUDPC seguindo a ordem em que estão distribuídas no experimento (a) e quando organizadas em ordem crescente (b), mostrando a característica discreta da variável. Distribuição dos dados de BLUPs seguindo a ordem em que estão distribuídas no experimento (c) e quando organizadas em ordem crescente (d), que se mostra distribuição contínua

4.3 Genotipagem da população S_1 com marcadores moleculares

4.3.1 Marcadores microssatélites

O primeiro passo na genotipagem dos indivíduos da população S_1 foi um *screening* para identificar locos em heterozigose no genitor. Foram genotipados 240 locos microssatélite distribuídos em todos os grupos de ligação (figura 6).

Figura 6 – Exemplo de varredura (*screening*) dos locos microssatélites para procura de genitores em heterozigose

Em alguns casos (30/240) não houve amplificação e estes locos foram descartados das análises. Outros 89 não foram informativos, pois estavam em homozigose no genitor ou apresentaram padrões alélicos de difícil diferenciação. Ao final 121 locos foram usados na genotipagem da população. Esses locos serviram de referência para que os demais marcadores fossem posicionados no mapa genético.

4.3.2 Marcadores TRAP

Nem todas as combinações disponíveis foram utilizadas, apenas as que, após uma pré análise com poucos indivíduos (dados não apresentados), resultaram na amplificação de fragmentos de clara resolução em gel de poliacrilamida. As combinações que geraram marcadores deste tipo foram: TRAP3+NBS, TRAP2+TIR, TRAP2+WRKY, TRAP3+MYB1, TRAP3+MYB2 e TRAP3+LRR como mostra a tabela 4. Foram obtidos 20 marcadores polimórficos, no total das seis combinações testadas. Fragmentos amplificados com a combinação TRAP3+MYB2 podem ser visualizados na figura 7a.

Tabela 4 - Combinações de iniciadores utilizados e número de marcadores TRAP polimórficos obtidos em cada uma delas

Combinação	N. de marcadores obtidos
TRAP3+NBS	6
TRAP2+TIR	4
TRAP2+WRKY	1
TRAP3+MYB1	2
TRAP3+MYB2	5
TRAP3+LRR	2
Total	20

4.3.3 Marcadores AFLP

Foram utilizadas seis combinações de iniciadores com três nucleotídeos seletivos cada (TEIXEIRA, 2009) para a combinação *EcoRI* + *MseI* que geraram 38 marcadores polimórficos no genitor dentre os analisados (tabela 5). Fragmentos gerados pela combinação E08M18 podem ser visualizados na figura 7b, com marcadores polimórficos indicados pelas setas.

Figura 7 – Fragmentos amplificados pela técnica TRAP (a) e AFLP (b) no genitor (V2) e em indivíduos da população segregante. Marcadores indicados por setas foram incorporados ao mapa genético

Tabela 5 - Combinações de iniciadores utilizadas e número de marcadores AFLP polimórficos obtidos em cada uma delas

Combinação	N. de marcadores
E10M21	5
E16M26	5
E10M30	11
E12M32	5
E20M09	7
E08M18	5
Total	38

4.4 Construção do mapa genético

A construção do mapa genético utilizou 121 marcadores microssatélites, segregando na proporção de 1:2:1, 20 marcadores TRAP e 38 marcadores AFLP, estes segregando na proporção de 3:1, perfazendo um total de 179 marcadores. O padrão de segregação de cada marcador foi analisado através do teste de χ^2 , com um valor de , segundo correção de

Bonferroni. Esse passo foi realizado para uma verificação da segregação dos marcadores, apesar de que todos os marcadores foram utilizados durante o mapeamento, como defendido por alguns autores (XU, 2008). Entre os marcadores que apresentaram desvios de segregação, foram encontrados 22 marcadores microssatélite, 3 marcadores TRAP e 1 marcador AFLP, representando 14,5% do total de marcadores (figura 8). Caso não fosse realizada a correção, a segregação de aproximadamente 60% dos marcadores seria considerada desviante.

Figura 8 – Análise de segregação dos marcadores indicando os p-valores de cada um dos 179 marcadores. A linha azul é o limiar para 5% de significância e a linha vermelha indica a significância após correção por Bonferroni

Tabela 6 – Marcadores genotipados e ligados ao mapa de ligação, de acordo com o tipo de marcador

Tipo de marcador	Número de marcas genotipadas	Número de marcas posicionadas no mapa
SSR	121	117
TRAP	20	10
AFLP	38	33
Total	179	160

A análise de ligação dos marcadores no programa OneMap (MARGARIDO; SOUZA; GARCIA, 2008) resultou em um mapa com 11 grupos de ligação contendo 160 marcadores

(figura 9), o que corresponde ao número de cromossomos . O restante (19) não foi alocado a nenhum dos grupos (tabela 6).

A identidade dos grupos de ligação seguiu a de Brondani et al. (2006), tomando-se como referência locos microssatélites utilizados em comum. O comprimento total do mapa foi de 1075 cM com densidade média de 6,7 cM entre marcadores, como mostra a tabela 7:

Tabela 7 – Resumo do mapa genético do híbrido interespecífico *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, indicando o número de marcadores em cada um dos grupos de ligação (GL), o comprimento de cada grupo e a distância média entre marcadores em cada um dos grupos (função de mapeamento de Kosambi e distâncias em centiMorgans)

Grupo de Ligação	Marcadores	Tamanho do grupo (cM)	Distância média (cM)
GL 01	12	90,5	7,5
GL 02	13	104,1	8,0
GL 03	14	91,0	6,5
GL 04	14	79,8	5,7
GL 05	20	79,8	4,0
GL 06	28	135,9	4,9
GL 07	9	60,7	6,7
GL 08	10	124,1	12,4
GL 09	12	88,6	7,4
GL 10	13	110,5	8,5
GL 11	15	110,0	7,3
Total	160	1075,0	6,7

Figura 8a - Mapa genético do híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Em preto, marcadores microssatélite, em vermelho, marcadores AFLP e em verde, marcadores TRAP. Distâncias em centiMorgan e função de mapeamento de Kosambi

Figura 8b - Mapa genético do híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Em preto, marcadores microsatélite, em vermelho, marcadores AFLP e em verde, marcadores TRAP. Distâncias em centiMorgan e função de mapeamento de Kosambi

4.5 Mapeamento de QTLs

4.5.1 Mapeamento por intervalos (IM)

O mapeamento por intervalos identificou um QTL no grupo de ligação 3 com LOD = 7,7 (figura 9) e grande efeito sobre a variação fenotípica, chegando a explicar 28,54% do total (tabela 8). Os efeitos aditivos e de dominância também foram estimados, entretanto somente o efeito aditivo negativo mostrou-se significativo em nível de 5% de probabilidade, apresentando valor de LOD = 6,9. O QTL apresentou valor máximo de LOD (7,7) a 1,6 cM do loco Embra049 e a 5,8 cM do loco E08M18_250.

Tabela 8 – QTL mapeado pelo mapeamento por intervalos (IM)

	G.L.	Marcadores flanqueadores	Posição (cM)	LOD	Efeitos				R ²
					Aditivo	LOD	Dominância	LOD	
QTL	3	Embra049/ E08M18_250	23,0	7,7	-0,48	6,9*	0,15	0,53 ^{ns}	28,54%

4.5.2 Mapeamento por intervalos compostos (CIM)

O mapeamento por intervalos compostos identificou dois QTL com LOD superior a 3,0, ambos localizados no grupo de ligação 3 (figura 9). O primeiro QTL, denominado QTL₁, se encontra no mesmo intervalo do QTL identificado pela análise IM, na região dos marcadores TRAP3MYB2190, Embra049 e E08M18_250. O valor máximo observado de LOD foi localizado na posição 21,4 cM, com LOD 10,3, distante 1,6 cM do marcador mais próximo, Embra049, assim como no IM. Como no caso da análise anterior, apresentou efeito aditivo significativo (LOD 9,6) e também com sinal negativo. Este loco apresentou grande efeito sobre a variação fenotípica, chegando a representar 39,54% da variação. O efeito de dominância não se mostrou significativo, com LOD inferior a 1,2.

Figura 9 – Mapeamento de QTLs de resistência a ferrugem do eucalipto, sendo dispostos graficamente os valores de LOD. A direita, gráfico representando os QTLs, em verde o mapeamento por intervalos (IM) e em vermelho o mapeamento por intervalos compostos. Setas indicam QTLs encontrados no grupo de ligação 3, considerando LOD=3 como limiar. Distâncias em centimorgans

O segundo loco, denominado QTL₂, apresentou valor máximo de LOD na posição 62,0 cM do grupo de ligação, situado a 3,1 cM do marcador E08M18_300, com LOD 3,4 (tabela 8). Apresentou efeitos significativos tanto de aditividade como de dominância. Contudo, o efeito

aditivo foi positivo, ao contrário do observado no QTL₁, indicando que estes dois QTLs de resistência estão ligados em repulsão.

Figura 10 – Em detalhe, o mapeamento de QTLs de resistência a ferrugem no grupo de ligação 3 do eucalipto, com valores de LOD dispostos graficamente. À direita, gráfico representando os QTLs, em verde o mapeamento por intervalos (IM) e em vermelho o mapeamento por intervalos compostos

O efeito de dominância, também significativo, apresentou sinal negativo, o que significa que indivíduos heterozigotos para este loco apresentam valores médios de AUDPC inferiores em relação a um dos indivíduos homozigotos. Como ambos os efeitos são significativos e seus valores são iguais, conclui-se que a segregação do QTL segue a proporção de 3:1, com dominância completa. O efeito desse loco sobre a variação fenotípica chegou a 6,88%. O gráfico dos QTLs com maior detalhamento no grupo de ligação 3, pode ser visualizado na figura 10.

Tabela 8 – QTLs mapeados pelo mapeamento por intervalos compostos (CIM)

	G.L.	Marcadores flanqueadores	Posição (cM)	LOD	Efeitos				R ²
					Aditivo	LOD	Dominância	LOD	
QTL ₁	3	Embra049/ E08M18_250	23,0	10,3	-0,60	9,6*	0,17	0,76 ^{ns}	39,54%
QTL ₂	3	E08M18_300/ Embra227	62,0	3,4	0,29	2,7*	-0,23	1,3*	6,88%

5 DISCUSSÃO

5.1 Genotipagem e mapa de ligação

A possibilidade de ocorrerem escapes durante a realização de cruzamentos é possível, visto que o eucalipto é uma planta predominantemente alógama. Esse fato explica a presença de indivíduos contaminantes e indica a necessidade de confirmação da paternidade em trabalhos genéticos que envolvam esta espécie.

Para os marcadores AFLP as combinações geraram 38 locos polimórficos utilizados no mapeamento, sendo que 33 se ligaram aos grupos de ligação. Muitos dos fragmentos apresentaram-se monomórficos. Contudo, essa técnica apresentou um maior número de fragmentos polimórficos se comparado com marcadores gerados pela técnica TRAP. Esta gerou 20 marcas polimórficas, que foram genotipadas e utilizadas no mapeamento. Destas, apenas 10 se integraram ao mapa genético. Três apresentaram desvios na segregação mendeliana esperada de 3:1, sendo que duas marcas (TRAP2WRKY035 e TRAP2TIR015) se agruparam no mesmo grupo de ligação (11) onde também se agrupou a maioria dos marcadores SSR com desvios de segregação. Esse fato indica que os desvios provavelmente não são devidos a problemas de genotipagem, mas sim a algum tipo de seleção pré ou pós-zigótica.

A segregação de marcadores SSR dentro da progênie deveria seguir a proporção esperada de 1:2:1, mas em alguns casos isso não aconteceu, apresentando grandes desvios de segregação. Esses desvios também se concentraram no grupo de ligação 11 e podem estar relacionados a genes letais, que impedem que alguns dos genótipos sobreviva, ainda em fase embrionária ou etapas subsequentes. Este tipo de desvio de segregação aconteceu com maior intensidade em 22 locos microssatélites mapeados, sendo que nove deles foram alocados ao grupo de ligação 11. A presença de um gene letal (ROSADO, 2007) e a depressão por endogamia (LIANG; ZHEN; ZHEN, 2006) podem explicar estes desvios. Em eucalipto, outros trabalhos já haviam relatado distorções parecidas (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994; BYRNE et al., 1995; MYBURG et al, 2003; ROSADO, 2007).

Os marcadores SSR comuns aos mapas publicados e ao gerado neste estudo posicionaram-se nos mesmos grupos de ligação, mostrando concordância (BRONDANI;

BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2002; BRONDANI et al., 2006). A ordem dos marcadores SSR também foi semelhante à relatada em trabalhos anteriores.

5.2 Mapeamento de QTLs

O uso da AUDPC como estimativa quantitativa da resistência resultou na detecção de QTL. Além disto, permitiu transformar variáveis discretas, obtidas pelo uso de escalas de notas de sintomas, em variáveis contínuas, o que dá um maior poder para a detecção de QTLs. O uso desta variável também permitiu a obtenção de estimativas de variâncias entre os dois locais, em conjunto com uma análise de modelos mistos. Esta análise resultou no cálculo de BLUPs, que representam valores de AUDPC corrigidos para os efeitos de blocos e locais. A progênie F_1 de tamanho reduzido ainda seria um fator limitante na detecção de QTLs, se comparado a outros trabalhos de mapeamento com espécies anuais, porém esta limitação foi compensada pela correção através de modelos mistos, em que apenas a variação genética para resistência à ferrugem foi considerada na localização de QTLs.

O mapeamento dos QTL foi realizado em duas abordagens (IM e CIM) diferentes que apresentaram resultados complementares. No mapeamento por intervalos foi detectado apenas um QTL, no grupo de ligação 3. Já no mapeamento por intervalos compostos foram detectados dois, também no grupo de ligação 3. A ausência do segundo QTL na abordagem IM provavelmente se deveu às limitações desse método. Segundo Liu (1998), quando os QTLs estão ligados em fase de associação (efeitos dos QTLs na mesma direção), seus efeitos podem ser confundidos, resultando, na apresentação gráfica do teste estatístico, em apenas uma curva, não sendo possível precisar a posição dos QTLs. Já quando dois QTLs estão ligados em fase de repulsão (efeitos dos QTLs em diferentes direções), o valor máximo do teste estatístico pode se apresentar menor ou mesmo nulo, que provavelmente foi o que ocorreu no caso dos QTL detectados neste estudo.

No CIM foram mapeados dois QTLs, sendo um de maior efeito (QTL_1), representando aproximadamente 39% da variação fenotípica e um segundo QTL (QTL_2), que representou aproximadamente 7% da variação fenotípica observada. O QTL_2 encontra-se em fase de repulsão ao primeiro, apresentando efeito aditivo oposto e ligado ao QTL_1 . Pela primeira vez esse tipo de

abordagem (CIM) foi realizado no mapeamento de QTLs em eucalipto, sendo possível tal observação.

No QTL₁ não foi encontrado efeito de dominância significativo, apenas o efeito aditivo. Já no QTL₂ ficou evidenciado um efeito de dominância. Além disso, o efeito de dominância apresentou valor igual ao efeito aditivo do mesmo loco, evidenciando que o loco apresenta dominância completa, com o QTL₂ segregando 3:1, em que não é possível diferenciar os indivíduos heterozigóticos de uma das classes homozigóticas.

A figura 11 ilustra os posicionamentos dos QTLs, suas constituições alélicas e seus efeitos. Os alelos dos QTLs foram codificados como P_1 e P_2 para o QTL₁ e Q_1 e Q_2 para o QTL₂, sendo que os alelos com índice um (1), segundo a análise, são os responsáveis pelo aumento do caráter (maior suscetibilidade, no caso). Quando o efeito do QTL é positivo (+), o alelo que aumenta o caráter é situado à esquerda (alelos com índice 1) e o que diminui à direita (alelos com índice 2). Quando o efeito do QTL é negativo (-), o alelo que aumenta o caráter está à direita e o que diminui à esquerda.

O modelo da figura indica que os alelos de resistência dos QTLs se encontram ligados em repulsão segundo a configuração $\frac{P_1 Q_1}{P_2 Q_2}$. No QTL₁, o alelo que confere suscetibilidade (P_1) se encontra à direita, visto que o efeito aditivo do QTL é negativo. No QTL₂, que possui efeito aditivo positivo, a situação é oposta (figura 11). Portanto, plantas com os alelos P_2 e Q_2 são as mais resistentes.

Os valores máximos de LOD se encontram em um intervalo flanqueado por um par de marcadores em cada QTL (figura 11). No QTL₁, observa-se que os alelos a e a' dos marcadores Embra049 e E08M18_250 são os que estão ligados com o alelo P_2 de resistência, que diminui a severidade da doença. Já no QTL₂, os alelos a e b dos marcadores E08 M18_300 e Embra227 é que estão ligados com o alelo Q_2 de resistência. Quando os genótipos marcadores das plantas são relacionados graficamente com os valores de AUDPC (figura 11), observa-se uma associação entre baixa AUDPC (BLUPs) e a presença do alelo a no marcador Embra049, que está associado ao alelo P_2 do QTL₁. Porém, quando analisado o marcador mais próximo do QTL₂ (E08M18_300) a correlação entre a presença do alelo a e diminuição da severidade de doença é mais tênue. Esse fato se deve, em parte, aos efeitos confundidos do próprio QTL com os efeitos

do QTL₁. Os efeitos do QTL₂, neste caso, estão subestimados devido ao fato de alelos favoráveis estarem ligados em repulsão e ao maior efeito fenotípico do QTL₁.

Figura 11 – Intervalos do grupo de ligação 3 em que estão presentes os QTLs mapeados para resistência à ferrugem e análise individual dos marcadores mais próximos aos QTL₁ e QTL₂ no CIM. No eixo vertical os valores de BLUPs e no horizontal os genótipos observados para os indivíduos da progênie. Para o QTL₁, os alelos P_1 e P_2 e para o QTL₂, os alelos Q_1 e Q_2 , em fase de repulsão

Na seleção assistida por marcadores o ideal seria o uso concomitante dos marcadores que flanqueiam os dois QTL. O uso de apenas um dos marcadores aumenta as chances de seleção de recombinantes, uma vez que no caso de dois marcadores, isto só ocorreria no caso de dupla recombinação dentro do intervalo, sendo isso menos provável, principalmente no intervalo do QTL₁, que tem apenas 7,4 cM.

Trabalhos anteriores relativos à herança da resistência a *Puccinia psidii* em eucalipto indicaram a presença de um loco de resistência de grande efeito fenotípico, mas não descartaram a presença de outros, de menor efeito (JUNGHANS et al., 2003; ROSADO, 2007; ALVES, 2008; TEIXEIRA, 2008). Junghans (2003) propôs que, além da presença do loco *Ppr1* de efeito principal, haveria outros locos modificadores de efeito secundário. Um modelo de dois locos atuando sob um modelo de epistasia dupla recessiva foi proposto por Alves (2008). Rosado (2007) mapeou um QTL de resistência a ferrugem, contudo este utilizou análises de mapeamento por marcas simples e mapeamento por intervalos simples, que apresentam algumas limitações. Estas limitações ficam mais evidentes no caso de existirem QTLs ligados ou interações entre QTLs (LIU, 1998). Além disso, foram utilizados como dados quantitativos, apenas quatro notas dadas a cada um dos indivíduos em uma avaliação, aumentando a possibilidade de falsos-positivos, já que em uma única avaliação genótipos suscetíveis podem se mostrar resistentes devido a um escape na inoculação. Teixeira et al. (2009) também relatou a possível presença de genes de resistência de efeito secundário. No entanto o autor propôs um modelo monogênico para explicar a resistência, numa série alélica de dominância, com três alelos (A^1 , A^2 e A^3), em que $A^1 > A^2 > A^3$. Segundo o modelo, A^1 e A^3 confeririam resistência, enquanto A^2 conferiria suscetibilidade. Ainda, o genitor da progênie (que foi o mesmo utilizado neste trabalho) possuiria o genótipo A^1A^2 , com o alelo de resistência dominante sobre o alelo de suscetibilidade. Neste caso, o modelo adotado foi o mais parcimonioso, contudo não excluía outras possibilidades, como a de dois locos atuando sobre a resistência. Um modelo considerando um loco de resistência bialélico, que interage epistaticamente com outro loco também se ajusta a esses resultados (TEIXEIRA, 2009). Modelos com mais de um loco controlando a resistência também chegaram a ser propostos (ROSADO, 2007; ALVES, 2008), tentando explicar os desvios de um modelo monogênico. Estes modelos oligogênicos explicam bem a herança da resistência, porém não podiam ser considerados corretos apenas com os dados obtidos até aquele momento. Através do mapeamento dos dois QTLs por CIM essa hipótese se torna a mais válida novamente.

O presente trabalho evidenciou a existência de um segundo gene de resistência a *P. psidii* em adição a um de grande efeito fenotípico já previamente localizado no grupo de ligação 3. A identificação de marcadores ligados a estes genes abre a perspectiva de seleção assistida de genótipos resistentes, o que é desejável no caso desta doença, haja vista as dificuldades técnicas e econômicas da seleção fenotípica de genótipos resistentes. A avaliação da resistência a este

patógeno biotrófico requer grandes áreas e mão-de-obra qualificada, além do tempo entre o plantio e a avaliação da severidade da doença, realizada pelo menos após 3 meses da implantação. Em adição, este estudo abre a perspectiva da clonagem posicional dos genes em questão levando-se em conta a necessidade de saturação do grupo de ligação 3 com mais marcadores. Neste sentido, a futura disponibilização da sequência do genoma do eucalipto facilitará ainda mais este procedimento, tornando possível a geração de genótipos resistentes por meio da engenharia genética. Para o melhoramento do eucalipto, tais fatos são essenciais ao progresso na seleção de genitores e clones superiores.

6 CONCLUSÕES

O uso da variável AUDPC permitiu uma análise quantitativa da severidade da ferrugem no eucalipto em uma progênie de irmãos completos, permitindo distinguir genótipos com diferentes níveis de resistência à doença.

A abordagem multiponto através de cadeia markoviana oculta se mostrou uma ótima alternativa na construção de mapas genéticos de F_1 segregantes já que o agrupamento e ordenamento das marcas foram concordantes com dados previamente analisados através de outras metodologias.

A abordagem de mapeamento por intervalos compostos permitiu detectar dois QTLs, um dos quais já havia sido relatado na literatura e outro nunca antes relatado.

A ligação em repulsão dos alelos favoráveis nos QTLs representaria um problema para o melhoramento. Porém, a distância entre os QTLs e a possibilidade de seleção assistida usando os marcadores identificados neste estudo, facilitará a identificação de genótipos recombinantes superiores.

REFERÊNCIAS

- ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2007. Brasília: ABRAF, 2008. 90 p.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.
- ALVES, A.A. **Herança e mapeamento genético da resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em cruzamentos inter-específicos de *Eucalyptus***. 2008. 58p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg, v. 267, p. 338-347, 2002.
- BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 816-827, 1998.
- BRONDANI, R.P.V.; WILLIAMS, E.R.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. **BMC Plant Biology**, London, v. 6, n. 20, p. 1-16, 2006.
- BYRNE, M.; MURREL, J.C.; ALLEN, B.; MORAN, G.F. An integrated linkage genetic linkage map for *Eucalyptus* using RFLP, RAPD and isozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 91, p. 869-875, 1995.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532p.
- CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n.2, p. 89-100, 2002.
- 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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 139-147, 1998.
- COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, M.J.; ALFENAS, A.C.; CROUS, P.W. Eucalyptus rust: a disease with potential for serious international implications. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 819-825, 1998.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v.19, p. 299-306, 2001.

EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize: I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, Baltimore, v. 116, p. 113-125, 1987.

EULGEM, T.; RUSHTON, P.J.; ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I.E. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends in Plant Science**, London, v. 5, p. 199-206, 2001.

FAO. **State of the World's Forests 2007**, Roma, 2007. 144 p.

FERREIRA, F.A.; SILVA, A.R.C. Comportamento de procedências de *Eucalyptus grandis* e de *E. saligna* à ferrugem (*Puccinia psidii*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, p. 23-27, 1982.

FERREIRA, F.A. Ferrugem do eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v.7, n.2, p. 91-109, 1983.

FERREIRA, M.; SANTOS, P.E.T. Melhoramento genético florestal dos *Eucalyptus* no Brasil: breve histórico e perspectivas. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: Embrapa/CNPQ 1997. v.1, p.14-34.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996, 220p.

GION, J.M.; RECH, P.; GRIMA-PETTENATI, J.; VERHAEGEN, D.; PLOMION, C. Mapping candidate genes in *Eucalyptus* with emphasis on lignifications genes. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 6, p. 441-449, 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; BERTOLUCCI, F.L.G; PENCHEL, R.; SEDEROFF, R.R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers. **Genetics**, Baltimore, v. 144, p. 1205-1214, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; FALCÃO, C.L.; ALONSO, A.; PAPPAS, M.C.R.; LOURENÇO, R.T.; PÁDUA, J.G.; MAMANI, E.M.; PAPPAS JR, G.J. Development and mapping of EST- derived microsatellites in *Eucalyptus*. In: IUFRO TREE BIOTECHNOLOGY CONFERENCE, 2005, Pretoria. **Anais eletrônicos...**Pretoria: IUFRO, 2005. Poster abstract 5.33. 1 CD ROM.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. R. Genetic Linkage Maps Of *Eucalyptus Grandis* And *E. Urophylla*. Using A Pseudo-Testcross Strategy And Rapd Markers. **Genetics**, Baltimore, v. 137, p. 1121-1137, 1994.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 575-607, 1997.

HU, J.; VICK, B.A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 21, p. 289-294, 2003.

JEGER, M.J.; VILJANEN-ROLLINSON, S.L.H. The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 102: p. 32–40, 2001.

JUNGHANS, D. T.; ALFENAS, A.C. BROMMONSCHENKEL, S.H.; ODA, S.; MELLO, E.J.; GRATTAPAGLIA, D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in eucalyptus: mode of inheritance and mapping of major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 108, p. 175-180, 2003.

JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C. MAFFIA, L.A. Escala de notas para a quantificação da ferrugem do eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 184-188 2003.

KRUGNER, T.L.; AUER, C.G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia volume II: Doença das plantas cultivadas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005, p. 319-332.

LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Baltimore, v. 121, p. 185-199, 1989.

LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, E.E.; NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, v.1, p.174-181, 1987.

LI, G.; QUIROS, C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 103, p. 455-461, 2001.

LIANG, S.X.; ZHEN, S.X.; ZHEN, Z.T. Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology**, Cambridge, v. 3, n. 3, p. 163-169, 2006.

LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 611p.

LIU, Z.H.; ANDERSON, J.A.; HU, J.; FRIESEN, T.L.; RASMUSSEN, J.B.; FARIS, J.D. A wheat intervarietal genetic linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait loci. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 111, p. 782–794, 2005.

LONG, D.H.; LEE, F.N.; TEBEEST, D.O. Effect of Nitrogen Fertilization on Disease Progress of Rice Blast on Susceptible and Resistant Cultivars. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 4, p. 403-409, 2000.

MALIEPAARD, C.; JANSSEN, J.; OOIJEN, J.W. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. **Genetical Research**, New York, v. 70, p.237-250, 1997.

MARDI, M.; BUERSTMAYR, H.; GHAREYAZIE, B.; LEMMENS, M.; MOHAMMADI, S.A.; NOLZ, R. QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in wheat using a 'Wangshuibai'-derived population. **Plant Breeding**, Malden, v. 124, p. 329-333, 2005.

MARGARIDO, G.R.A.; SOUZA, A.P.; GARCIA, A.A.F. OneMap: *software* for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas**, Malden, v. 144, p. 78-79, 2007.

MARQUES, C.M.; ARAUJO, J.A.; FERREIRA, J.G.; WHETTEN, R.; O'MALLEY, D.M.; LIU, B.-H.; SEDEROFF, R. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, p.727-737, 1998.

MELCHINGER, A.E. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. **Plant Breeding**, Malden, v.104, p.1-19, 1990.

MIKLAS, P.N.; HU, J.; GRÜNWALD, N.J.; LARSEN, K. Potential Application of TRAP (Targeted Region Amplified Polymorphism) Markers for Mapping and Tagging Disease Resistance Traits in Common Bean. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 910-916, 2006.

MISSIAGIA, A.A.; PIACEZZI, A.L.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic mapping of *Eef1*, a major QTL for early flowering in *Eucalyptus grandis*. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 1, p. 79-84, 2005.

MYBURG, A.A.; GRIFFIN, A.R.; SEDEROFF, R.R.; WHETTEN, R.W. Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F1 hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 107, p. 1028-1042, 2003.

PASSADOR, G.C. **Resistência a ferrugem e análise de isoenzimas em procedências e progênies de *Eucalyptus***. 1994. 69p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, UFV. 1994.

PINHEIRO, J.C.; BATES, D.M. **Mixed-effects models in S and S-PLUS**. Springer-Verlag, New York, 528 p., 2000.

ROCHA, R.B.; BARROS, E.G.; CRUZ, C.D.; ROSADO, A.M.; ARAUJO, E.F. Mapping of QTLs related with wood quality and developmental characteristics in hybrids (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 1, p.13-24, 2007.

ROSADO, T.B. **Mapeamento de gene letal, responsável pela distorção de segregação e detecção de QTL para resistência a ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus* spp.** 2007. 123p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

SAX, K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, Baltimore, v. 8, p. 552-560, 1923.

STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package JoinMap, **The Plant Journal**, Malden, v. 3, p. 739-744, 1993.

TAKAHASHI, S.S. **Ferrugem do eucalipto: índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionados à intensidade da doença no campo.** 2002. 101 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração: Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Campus Botucatu, Botucatu. 2002.

TANSKLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 27, p. 205-234, 1993.

TEIXEIRA, J.E.C. **Análise da herança da resistência a *Puccinia psidii* Winter em progênies de híbridos interespecíficos de eucalipto e mapeamento genético de um loco de resistência à ferrugem.** 2009. 58 p. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.

TEIXEIRA, J.E.C.; GUEDES, F.T.P.; DIAS, D.C.; BONINE, C.A.V.; CAMARGO, L.E.A. Análise da herança da resistência à *Puccinia psidii* Winter em progênies de híbridos interespecíficos de eucalipto avaliadas sob condições naturais de infecção. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, 2009. No prelo.

THAMARUS, K.; GROOM, K.; BRADLEY, A.; RAYMOND, C.A.; SCHIMLECK, L.R.; WILLIAMS, E.R.; MORAN, G.F. Identification of quantitative trait loci for wood and fibre properties in two full-sib pedigrees of *Eucalyptus globulus*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 109, p.856-864, 2004.

THAMARUS, K.A.; GROOM, K.; MURRELL, J.; BYRNE, M.; MORAN, G.F. A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre, and floral traits. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104, p.379-387, 2002.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; POLEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WU, R.; MA, C.X.; PAINTER, I.; ZENG, Z.B. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. **Theoretical Population Biology**, San Diego, v. 61, p. 349-363, 2002.

ZAMPROGNO, K.C. **Utilização de bulked segregant analysis na identificação de marcadores ligados a genes que controlam a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) em *Eucalyptus* sp.** 2005. 62p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração: Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Campus de Botucatu. Botucatu, 2005.

ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v.136, p. 1457-1468, 1994.