

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

Análise da herança da resistência a *Puccinia psidii* Winter em progênies de híbridos inter-específicos de eucalipto e mapeamento genético de um loco de resistência à ferrugem

Juliana Erika de Carvalho Teixeira

**Tese apresentada para obtenção de título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2009**

Juliana Erika de Carvalho Teixeira
Engenheiro Agrônomo

Análise da herança da resistência a *Puccinia psidii* Winter em progênies de híbridos inter-específicos de eucalipto e mapeamento genético de um loco de resistência à ferrugem

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

Tese apresentada para obtenção de título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2009**

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

Teixeira, Juliana Erika de Carvalho

Análise da herança da resistência a *Puccinia psidii* Winter em progênies de híbridos inter-específicos de eucalipto e mapeamento genético de um loco de resistência à ferrugem / Juliana Erika de Carvalho Teixeira. - - Piracicaba, 2009.

58 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Eucalipto 2. Ferrugem (doença de planta) 3. Herança genética 4. Mapeamento genético 5. Marcador molecular 6. Resistência genética vegetal 7. Seleção Genética I.
Título

CDD 634.9734
T266a

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

*Quando perdemos alguém que amamos perdemos o chão, tudo fica cinza.
Mas com tempo entendemos que eles não se foram, estão sempre presentes em nossa vida, nos ensinamentos aprendidos, nas experiências compartilhadas, nas lembranças e na certeza de que um dia iremos nos reencontrar novamente!*

Dedico

Ao meu pai, Júlio César Teixeira, presença cada vez mais constante em minha vida, por sempre ter me incentivado, principalmente a seguir sua profissão e ensinado que com disciplina, persistência, objetivos definidos e muito trabalho vc consegue realizar seus sonhos!

Ofereço

*A minha mãe, Marília de Carvalho Teixeira, por me ensinar os verdadeiros valores do ser humano: dignidade e respeito pelos outros e ser tudo em minha vida!
Aos meus irmãos Tarses e Junior, pelos quais sempre busco me melhorar!*

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP, particularmente ao programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, aos professores, funcionários e colegas.

A CAPES e CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante o curso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, pela oportunidade e confiança para desenvolver este trabalho, amizade e excelente orientação, me auxiliando em todos os momentos: nos experimentos de campo, genotipagens no lab e em Brasília, discussões da tese, etc... Sempre incentivando e acreditando em mim. Muito obrigada professor!

A Votorantim Celulose e Papel – VCP pela oportunidade, apoio técnico e financeiro necessários para desenvolver este projeto.

Ao Eng. César A. V. Bonine, por acreditar e confiar no meu trabalho, me dando oportunidade de continuar a desenvolvê-lo junto com sua equipe na VCP.

Ao Donizete C. Dias e sua equipe: Juninho, Adilson, Rodrigo, Eliezer e Lúcia, que me ajudaram muito e permitiram que os experimentos de campo fossem tão bem conduzidos.

A Eng. Celina Ferraz do Valle, pelo carinho e amizade que tem por mim, pelos conselhos e ensinamentos que muito ajudam na minha formação profissional e pessoal.

Aos demais colegas da VCP que muito contribuíram para este trabalho, principalmente Elida e Fernanda, por lidarem com minha ausência durante minhas idas para Piracicaba, continuando sempre a desempenharem um excelente trabalho e por se tornarem minhas queridas amigas.

As melhores estagiárias do mundo, Fernanda e Cynthia, por me ajudarem nos experimentos de campo e nas genotipagens, sempre dedicadas, competentes e cuidadosas. Aos demais estagiários que tive e colegas, especialmente Rapha e Lara, que contribuíram para este trabalho e me ajudaram a aprender muito.

Ao Dr. Dário Grattapaglia, pelas sugestões e colaboração nas genotipagem e a Eva Mamani, por me ensinar e ajudar nas genotipagens com microssatélites.

Ao colega Bruno Lima, pela excelente parceria e ajuda nas etapas finais desta tese, principalmente nas análises de mapeamento.

As queridas amigas Márcia e Fátima, pelo carinho e apoio, me incentivando nos momentos mais necessários. Ao Eddie, meu anjo, pelo carinho e conselhos, muito importantes para mim.

A minha afilhada Carol e a minha “sobrinha” Maria Luísa pela amizade e ajuda em muitos momentos da tese.

As queridas amigas Cynthia, Aninha, Fátima e Carol, por me hospedarem em suas casas durante minhas vindas a Piracicaba.

A Dona Regina, pelo carinho, amizade, exemplo de luta e perseverança, por me acolher como uma filha, enfim, por tudo que me ensinou e fez por mim e pelo qual não tenho palavras para expressar meu agradecimento. A Ilka por ser uma irmã querida do coração.

As *amigaslavras*, que mesmo com a distância estão sempre presentes, fazendo com que nossa amizade se fortaleça cada vez mais. A Aninha que por estar mais perto pôde me ajudar a superar os momentos difíceis e comemorar os momentos de alegria!! Muito obrigada Aninha!

A Alessandra A. Souza e Magnólia A. Campos, por continuarem me apoiando e incentivando, em tudo na minha vida e serem meus exemplos profissionais. Lê, quando eu crescer eu quero ser igual a você!!

Aos meus tios Sérgio e Val, por serem meus melhores amigos e pelo enorme carinho que tem por esta filha que ama muito vocês!!

A toda a minha família, por me apoiarem e torcerem por mim, principalmente ao Renato, pela força que me deu na conclusão desta tese!

Aos amigos e demais colegas que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal nos últimos 4 anos.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Material e Métodos	17
2.1.1 Material Vegetal	17
2.1.2 Avaliação da resistência à <i>P. psidii</i>	18
2.1.3 Herança da resistência	20
2.1.4 Mapeamento de loco de resistência	20
2.1.4.1 Genotipagem com Marcadores Moleculares	20
2.1.4.2 Confirmação da paternidade dos indivíduos F1 da progênie V2 x V1	26
2.1.4.3 Análise de agrupamentos segregantes com marcadores AFLP e RGA	26
2.1.4.4 Genotipagem seletiva com marcadores microssatélites pertencentes ao grupo de ligação	27
2.1.4.5 Análise de co-segregação	27
2.2 Resultados e Discussão	29
2.2.1 Herança da resistência a <i>Puccinia psidii</i> em progênies de híbridos inter-específicos de eucalipto avaliados sob condições naturais de infecção	29
2.2.2 Mapeamento genético de um loco de resistência à ferrugem do eucalipto usando marcadores moleculares	36
2.2.2.1 Análise de paternidade	36
2.2.2.2 Análise de agrupamentos segregantes	36
2.2.2.3 Análise de co-segregação entre resistência fenotípica e marcadores moleculares	43
3 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50

RESUMO

Análise da herança da resistência a *Puccinia psidii* Winter em progênies de híbridos inter-específicos de eucalipto e mapeamento genético de um loco de resistência à ferrugem

Amplamente disseminada pelo país, causando prejuízos em viveiros e plantios comerciais, a ferrugem do eucalipto, causada pelo fungo *Puccinia psidii*, é atualmente uma das mais preocupantes doenças em eucalipto. A seleção de genótipos resistentes é facilitada quando informações sobre o controle genético da resistência e estratégias eficientes de seleção, como a seleção assistida por marcadores, estão disponíveis. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de compreender melhor o controle da resistência à ferrugem sob condições de campo e identificar marcadores moleculares ligados a genes de resistência a este patógeno. A herança da resistência foi estudada em quatorze progênies, obtidas a partir de cruzamentos e auto-cruzamentos controlados entre quatro clones híbridos inter-específicos de *E. grandis* x *E. urophylla*, contrastantes para a resistência. Os resultados indicaram a existência de um loco de grande efeito fenotípico e multialélico. Marcadores AFLP e RGA ligados ao loco de resistência foram identificados em uma progênie segregante por meio da análise de segregantes agrupados. O loco de resistência foi localizado no grupo de ligação 3, próximo ao marcador Embra 181. Um marcador AFLP(E12M32_165) e um RGA (*AluI*/NBS3_600) foram identificados a 4,3 e 6,8 cM do loco de resistência, respectivamente, em repulsão com o alelo de resistência. O marcador *AluI*/NBS3_600, apresenta grande potencial de uso na seleção assistida por marcadores, especialmente no viveiro antes dos genótipos serem testados em campo, minimizando assim os custos envolvidos nas instalações de áreas experimentais.

Palavras-chave: Ferrugem do eucalipto; Resistência; Marcadores moleculares; Mapeamento genético

ABSTRACT

Inheritance analysis of the resistance to *Puccinia psidii* in Eucalyptus interspecific hybrid progeny and genetic mapping of one locus resistance to rust

Widely disseminated all over the country, damaging nurseries and plantation areas, eucalyptus rust, caused by the fungus *Puccinia psidii*, is currently the most concerning eucalyptus disease. The selection of resistant genotypes is facilitated when information about the genetic control of resistance and quick selection strategies such as marker assisted selection, are available. This objective of this study was to better understand the control of rust resistance under field conditions and identify molecular markers linked to resistance genes. The mode of inheritance was analyzed in fourteen progenies obtained from controlled crosses and self-crosses between four interspecific hybrid clones of *E. grandis* x *E. urophylla* with contrasting phenotypes regarding rust resistance. The results suggested the existence of a single multiallelic locus with major phenotypic effects. However, this locus appears to be complex, multiallelic, and organized in clusters of resistance genes with interaction between the clusters. Some of these alleles may confer resistance to many pathogen isolates/races or even to other genetically related pathogens found near the geographic origin of eucalyptus. Using the strategy of bulked segregant analysis, AFLP and RGA linked markers to resistance were identified in one of the progenies. The resistance locus was located in linkage group 3, next to the Embra 181 marker locus. One AFLP (E12M32_165) and one RGA marker (*AluI*/NBS3_600) were located at 4.3 and 6.8 cM from the resistance locus, respectively, in repulsion phase with the resistance allele. The *AluI*/NBS3_600 marker has potential to be used in marker assisted selection, especially in the initial steps of selection in the nursery before field tests, thus minimizing the costs of field trials.

Key words: Eucalyptus rust; Resistance; Molecular markers; Genetic mapping

1 INTRODUÇÃO

Representando 8% das florestas implantadas no mundo, o gênero *Eucalyptus* se destaca, junto com o gênero *Pinus*, por sua utilização industrial (SBS, 2006). Nativo da Austrália e algumas ilhas na Oceania, o eucalipto é cultivado em vários países tropicais, principalmente na América do Sul, África e Ásia (GIT FORESTRY CONSULTING, 2008). Por possuir ótimas condições climáticas, o eucalipto se adaptou muito bem ao Brasil. Aliado à excelente tecnologia florestal aqui desenvolvida, a eucaliptocultura despontou como um dos principais negócios da economia brasileira nos últimos anos. De 2005 a 2007, plantios de eucalipto aumentaram 10,1%, atingindo cerca de 3,5 milhões de hectares em 2007. Os estados de Minas Gerais, São Paulo e Bahia concentram 65% desta área.

Apesar de ser uma árvore bastante versátil e possuir inúmeras aplicações industriais, entre as quais se destacam a produção de madeira para carvão, serraria, chapas de fibra e produção de óleos essenciais, a maior parte da produção de madeira de eucalipto (72%) é destinada à produção de celulose e papel (ABRAF, 2008). O Brasil é atualmente o sétimo maior produtor mundial de celulose e o primeiro produtor de celulose de fibra curta, que é a especialidade da maioria das empresas florestais do país. A produção brasileira de celulose vem crescendo a uma taxa de 6,5% ao ano desde 1997 e alcançou, em 2007, uma produção de 11,8 milhões de toneladas (ABRAF, 2008). Em 2006, as exportações de celulose foram de US\$ 7,71 bilhões, representando 5,6% do total das exportações do país (ABRAF, 2007).

Não obstante o aumento da área plantada e da produtividade das florestas nos últimos anos, estes fatores ainda não são suficientes para atender a demanda crescente de madeira dos diferentes segmentos do setor produtivo. Este fato aliado aos preços atrativos de alguns produtos florestais e às vantagens comparativas e competitivas da silvicultura do país decorrentes da pesquisa e desenvolvimento florestal, têm sido os fatores preponderantes na decisão empresarial pela expansão de novas unidades industriais e ampliação da capacidade produtiva das existentes (ABRAF, 2008).

Um dos problemas da eucaliptocultura brasileira que pode ameaçar sua expansão é a ocorrência da doença denominada ferrugem. Há muitos anos a ferrugem causa danos significativos e a cada ano vem atingindo novas áreas. Levantamentos efetuados nas regiões do Vale do Paraíba e sul do estado de São Paulo revelaram incidências de até 35% de árvores doentes

em plantios de *Eucalyptus grandis*, com idade em torno de 6 meses. Plantas infectadas apresentaram reduções médias entre 25-35% em altura e diâmetro, quando comparadas com plantas sadias (SILVEIRA et al., 1998 apud SILVEIRA; HIGASHI, 2003).

O fungo *Puccinia psidii* Winter, causador da doença, é um fungo biotrófico, nativo da América do Sul e capaz de infectar inúmeras espécies de mirtáceas, nativas ou exóticas (COUTINHO et al., 1998). A primeira descrição deste fungo no Brasil ocorreu em mudas de goiabeira (MACLACHLAM, 1934). Em eucalipto foi relatado primeiramente em *Eucalyptus citriodora*, hoje *Corymbia citriodora* (Hook.) Hill & Johnson, em 1944 (COUTINHO et al., 1998). A primeira epidemia relevante de *P. psidii* em eucalipto ocorreu em 1973 no Espírito Santo, aonde cerca de 400.000 mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden oriundas de sementes vindas da África do Sul foram refugadas em decorrência da doença (FERREIRA, 1983). Daí em diante, observou-se várias epidemias, principalmente no Estado de São Paulo (SILVEIRA et al., 1998 apud SILVEIRA; HIGASHI, 2003). Existem relatos deste fungo causando doença em várias mirtáceas na Argentina, Colômbia, Equador, Paraguai, Uruguai, Venezuela, América Central (LAUNDON; WATERSTON, 1965 apud COUTINHO et al., 1998) e Flórida (MARLATT; KIMBROUGH, 1979). Em eucalipto, já foi relatada em *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. nitens*, *E. phaeotricha*, *C. citriodora*, *E. cloeziana*, *E. obliqua*, *E. pilularis*, *E. saligna* (COUTINHO et al., 1998) e mais recentemente em *E. globulus* (TELECHEA, et al., 2003). A ferrugem é considerada uma doença quarentenária de alto risco de introdução na Austrália e África do Sul, em vista da ampla gama de possíveis hospedeiros da família Myrtaceae presente nestes países (GLEN et al., 2007).

Provavelmente, a ferrugem do eucalipto teve origem em genótipos que infectavam mirtáceas nativas (CASTRO et al., 1983), haja vista que estudos de inoculação cruzada com isolados monopustulares oriundos de *Eucalyptus* spp., *Psidium guajava* e *Syzygium jambos* apóiam esta hipótese. Coelho (1988) reporta que há três grupos fisiológicos de *P. psidii*: grupo 1 – infecta *Eucalyptus* spp. e *S. jambos*, grupo 2 – infecta *Eucalyptus* spp. e *P. guajava* e grupo 3 – infecta somente *P. guajava*, indicando que há considerável variabilidade fisiológica dentro de *Puccinia psidii*. A ocorrência de raças ou *formae specialis*, comum em outras espécies do gênero, ainda não foi relatada, no entanto, além dos estudos de inoculação cruzada, a quebra de resistência em clones de eucalipto tem sido observada em vários plantios de empresas privadas, sugerindo

que deve existir especialização fisiológica entre populações do fungo (Edson Luiz Furtado, comunicação pessoal).

Puccinia psidii pode ser facilmente identificada através de seu sinal, na forma de esporulação urediniospórica intensa, pulverulenta e de coloração amarela em órgãos jovens da planta, como primórdios foliares, pecíolos, terminais de galhos ou caules ainda em desenvolvimento. Em folhas mais novas, a esporulação ocorre em ambas as faces do limbo, embora com maior intensidade na face abaxial. A doença ocorre em viveiros, principalmente nos jardins clonais e em campo, em plantações jovens com até cerca de um ano de idade ou em rebrotas. Sob condições ambientais favoráveis, o fungo infecta a parte aérea de mudas e de plantas jovens no campo, até o estágio fenológico B, que corresponde a cerca de 2 m de altura. (FERREIRA, 1983). O ataque do fungo pode atrasar o desenvolvimento da planta, acarretar a perda de sua dominância apical e matar brotações após o corte raso. Em materiais altamente suscetíveis, as pústulas podem coalescer e recobrir a superfície das brotações, causando deformações, perda da dominância apical, diminuição do crescimento e, eventualmente, a morte da planta (FERREIRA, 1983; ALFENAS et al., 2004).

Devido à ampla variabilidade genética inter e intra-específica, a forma mais empregada de controle do patógeno é a utilização de materiais resistentes ou com rápido crescimento, neste caso para que as plantas fiquem menos tempo expostas ao patógeno, já que acima de 2 a 3 m de altura o microclima não é favorável ao desenvolvimento da doença (ALFENAS et al., 2004; ZAUZA, 2007). Existem fungicidas capazes de controlar o desenvolvimento do fungo, porém, esta é uma medida utilizada apenas em jardins clonais devido aos altos custos (ALFENAS et al., 1989).

Atualmente, a resistência à ferrugem está entre os principais critérios de seleção utilizados nos programas de melhoramento de várias empresas do setor florestal brasileiro, juntamente com um bom crescimento e qualidade da madeira (GRATTAPAGLIA, 2007). Vários trabalhos têm sido realizados visando identificar progênies, procedências e espécies de resistentes (FERREIRA; SILVA, 1982; DIANESE et al., 1984; PASSADOR, 1994; CARVALHO et al., 1998; COUTINHO et al., 1998). De modo geral, os resultados indicam existência de ampla variabilidade genética inter e intra-específica para esta característica. As principais espécies plantadas no Brasil, *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*, possuem ampla variabilidade genética para resistência apesar de serem genericamente consideradas como suscetível e resistente, respectivamente (ALFENAS et al., 1997).

Apesar da seleção de genótipos resistentes ser uma realidade em programas de melhoramento nacionais, a base genética da resistência a ferrugem ainda é pouco conhecida e a identificação de fontes de resistência e o estudo da sua herança são requerimentos primordiais para o sucesso de programas de melhoramento visando a produção de cultivares resistentes. Existem poucos trabalhos relativos à herança da resistência a esta enfermidade em eucalipto. No primeiro trabalho publicado sobre o assunto, Junghans et al., (2003b), trabalhando com várias progênies de irmãos completos de *E. grandis* oriundas do cruzamento entre genitores suscetíveis e resistentes, observaram um padrão de controle monogênico da resistência, baseado em um gene dominante de efeito principal com penetrância incompleta e/ou dependente do background genético. Este gene de efeito principal foi mapeado com marcadores RAPD (“Random Amplified Polimorphic DNA”) e denominado *Ppr1* (*Puccinia psidii* resistance gene 1). No entanto, variações no aspecto e tamanho da pústula de plantas com *Ppr1*, assim como diferentes padrões de segregação dependendo dos genitores envolvidos no cruzamento, indicaram que, além de *Ppr1*, outros genes de efeito secundário ou modificadores também estariam envolvidos. Aparentemente, em alguns genótipos a resistência está associada a uma aparente resposta de hipersensibilidade, uma vez que em materiais resistentes visualiza-se necrose das células localizadas no sítio de penetração do patógeno (JUNGHANS, 2003a; XAVIER, 2002).

Em oposição aos resultados discutidos acima, Rosado (2007) e Alves (2008), trabalhando com diferentes progênie de cruzamentos inter-específicos de *Eucalyptus* spp. encontraram um padrão complexo de herança, com distorções de segregação que não concordam com um controle do tipo monogênico. Porém, fatores como pequeno tamanho das progênies, utilização de híbridos interespecíficos, baixa concentração de inóculo e falta de controle das condições ambientais necessárias à infecção podem contribuir para a avaliação equivocada de clones e colaborar para distorções de segregação (JUNGHANS, 2000; ROSADO, 2007).

A identificação de genótipos resistentes à ferrugem, com boas características silviculturais e qualidade da madeira normalmente é realizada com base em experimentos de campo instalados em locais com histórico de ocorrência natural de epidemias, chamados de “campos de prova de ferrugem”, durante vários anos, ou através de inoculações do patógeno em condições controladas (FERREIRA; SILVA, 1982; CARVALHO et al., 1998). Apesar de serem usadas em rotina por programas de melhoramento, ambas as metodologias oferecem alguns entraves, como a necessidade de uma infra-estrutura apropriada para inoculação e manutenção do inóculo em

plantas vivas ou necessidade de recursos para a instalação de experimentos em campos de prova. Além disso, tem sido observado, por motivos ainda não determinados, que certo genótipo que foi selecionado como resistente à ferrugem pode apresentar a doença quando plantado em locais diferentes dos locais de seleção, ou mesmo após vários anos de plantio no mesmo local (Donizete da Costa Dias, comunicação pessoal).

Neste sentido, devem ser buscadas metodologias alternativas que facilitem o trabalho e reduzam os custos envolvidos no melhoramento. A seleção de genótipos superiores usando marcadores moleculares foi proposta há alguns anos e tem grande potencial de sucesso. Usando informações do genoma, marcadores moleculares podem aumentar a eficiência de seleção dos programas de melhoramento, quer seja permitindo a seleção na fase juvenil de características que são expressas somente na fase adulta, quer seja facilitando a seleção de características de difícil mensuração ou que consomem muito tempo e recursos, como é o caso da resistência a doenças. Em adição a isto, marcadores permitem a seleção de diversas características simultaneamente (EDWARDS; MCCOUCH, 2008). Apesar de ainda não estar sendo empregada na rotina de muitos programas de melhoramento de espécies florestais, a seleção assistida por marcadores (SAM) tem sido empregada com sucesso em algumas culturas como tomate (FOOLAD; SHARMA, 2005), trigo (KUNCHEL, et al., 2007) e arroz (NGUYEN et al., 2002), que são culturas que possuem programas de melhoramento bem estruturados e muitas informações genômicas disponíveis, condições essenciais para o desenvolvimento e implementação da SAM.

Em eucalipto, a seleção assistida por marcadores ainda não está sendo empregada na rotina dos programas de melhoramento, mas existem muitos mapas genéticos e marcadores moleculares ligados a genes para diferentes características, como qualidade da madeira (GRATTAPAGLIA et al., 1996, VERHAEGEN et al., 1997, MYBURG, 2001, THAMARUS et al., 2004), florescimento precoce (MISSIAGIA, et. al., 2005; DOMINGUES et al., 2006), crescimento, altura de planta e área foliar (GRATTAPAGLIA et al., 1996; BYRNE et al., 1997; VERHAEGEN et al., 1997), capacidade de propagação vegetativa (GRATTAPAGLIA et al., 1995, MARQUES et al., 1999) e resistência a mancha de *Mycosphaerella* (FREEMAN et al., 2008).

Para a resistência a ferrugem, um gene de grande efeito foi mapeado em uma progênie de *E. grandis* com marcadores RAPD e denominado *Ppr1* (JUNGHANS et al., 2003b). No entanto, variações no aspecto e tamanho da pústula de plantas com *Ppr1*, assim como diferenças em padrões de segregação dependente dos genitores envolvidos no cruzamento, indicaram que, além

de *Ppr1*, outros genes de efeito secundário ou modificadores também estariam envolvidos. Posteriormente, Bueno et al., (2004), trabalhando com a mesma progênie de *E. grandis* utilizada por Junghans et al., (2003b) e marcadores microssatélites, posicionaram o gene *Ppr1* no grupo de ligação 3 de um mapa de referência de *Eucalyptus* com o auxílio de marcadores microssatélites (BRONDANI et al., 2006). Trabalhos posteriores com outras progênies inter-específicas de irmãos completos envolvendo diferentes espécies de *Eucalyptus* spp., identificaram marcadores microssatélites ligados à resistência a ferrugem e também posicionaram o QTL identificado no grupo de ligação 3 do mapa de referência de eucalipto (Rosado, 2007; Alves, 2008). Finalmente, Zamprogno et al., (2008), trabalhando com uma progênie segregante interespecífica que foi fenotipada tanto em condições controladas como em condições de campo, encontraram um marcador de RAPD ligado em repulsão a 20 cM de um gene de resistência, que foi transformado em um marcador SCAR. No entanto, este marcador não foi posicionado no mapa de referência de eucalipto, o que não permite distinguir se este loco identificado é o mesmo loco já identificado anteriormente neste grupo 3.

Apesar da disponibilidade de informações de vários marcadores moleculares ligados a gene de resistência a ferrugem, a seleção assistida para esta característica ainda não é rotina em programas de melhoramento de eucalipto. No caso do gene *Ppr1*, por exemplo, a informação de ligação do marcador ficou restrita à população original utilizada no mapeamento. Por outro lado, os demais marcadores microssatélites e RAPD identificados nos outros trabalhos estão geneticamente distantes do loco.

Não só para resistência a ferrugem, mas para a maioria das demais características onde marcadores foram identificados em eucalipto como ligados a genes de interesse, estes amostram regiões anônimas do genoma, em sua maioria regiões que não codificam proteínas (GRATTAPAGLIA et al., 1996, VERHAEGEN et al., 1997, MARQUES et al., 1999; MYBURG et al., 2003; MISSIAGIA, et al., 2005), o que poderia estar contribuindo para a dificuldade do emprego da SAM em eucalipto.

Avanços na área de genômica resultaram no desenvolvimento de novas classes de marcadores moleculares, principalmente com base em informações de seqüências expressas do genoma. Este conhecimento permitiu desenvolver marcadores que identificam alelos específicos e/ou formas alternativas de genes, ao invés de regiões genômicas anônimas (PFLIEGER, et al., 2001). Esta abordagem abriu a perspectiva de usar polimorfismos em genes candidatos, isto é,

genes participantes de vias metabólicas que controlam características fenotípicas importantes, o que traz a vantagem de tornar o próprio gene de interesse uma marca genética. Esta alternativa tem sido bastante utilizada em várias culturas como milho (GUILLET-CLAUDE et al., 2004), batata (TROGNITZ et al., 2002), arroz (HAYASHI et al., 2004), trigo (TYRKA et al., 2004) e melão (MORALES et al., 2004) para identificar genes de importância econômica, entre eles genes de resistência a doenças (LINDEN, et al., 2004).

Vários genes que conferem resistência a fungos, bactérias e vírus foram clonados nos últimos anos (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997; ELLIS, et al., 2000; HAMMOND-KOSACK; PARKER, 2003; MEYERS, et al., 2005). A caracterização destes genes revelou regiões conservadas (domínios), tais como regiões repetidas ricas em leucina (LRR), sítio de ligação de nucleotídeos (NBS) e domínios similares ao domínio *Toll/interleukin-1/resistance* (TIR) (JONES; DANGL, 2006), que permitiram o agrupamento da maioria destes genes em seis classes/subclasses (JONES, 2001). Assim, o conhecimento da sequência de vários genes de resistência e principalmente destas regiões conservadas, facilitou o desenvolvimento de marcadores moleculares mais específicos para genes de resistência comparados aos marcadores tradicionais, que podem até ser utilizados em espécies de plantas que não possuem volume de informações necessário para a clonagem de genes de resistência. Coletivamente, estes marcadores são denominados de “resistance gene analogs”, ou RGA e são genes candidatos a genes de resistência que podem estar proximamente ligados ou segregarem com os locos de resistência (PFLIEGER, et al., 2001).

Existem vários trabalhos relatando o uso de RGAs como marcadores desenvolvidos principalmente pelo uso de “primers” degenerados que amplificam os domínios conservados. Estes podem ser gerados através de diferentes técnicas, tais como AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) modificado (HAYES; SAGHAI MAROOF, 2000), TRAP (“Target Region Amplified”) (MIKLAS, et al., 2006) e “NBS Profiling” (CALENGE et al, 2005). Esta última abordagem foi utilizada em diversas culturas para identificar marcadores ligados a genes de resistência a doenças (CALENGE et al, 2005) e na construção de mapas genéticos (SYED et al., 2006). Em eucalipto, este tipo de marcador ainda não foi relatado.

Proposta por Linden, et al., (2004), a estratégia “NBS Profiling”, baseia-se no uso simultâneo de um “primer” complementar a um adaptador que se liga a um sítio de enzima de restrição e um “primer” degenerado que se anela em regiões que codificam domínios NBS. A

variação genética é amostrada na região do gene que flanqueia o sítio de ligação do “primer” NBS. Assim, esta técnica permite simultaneamente a amplificação e o mapeamento de marcadores genéticos ancorados nos domínios conservados NBS de genes de resistência.

A análise de populações segregantes, derivadas do cruzamento de fenótipos heterozigóticos e contrastantes para dada característica de interesse é a estratégia mais utilizada em estudos genéticos em espécies florestais. Uma metodologia bastante empregada em conjunto com este tipo de população é a análise de segregantes agrupados (ASA) (“Bulk Segregant Analysis”- BSA) (MICHELMORE et al., 1991). Este método envolve a comparação de dois agrupamentos constituídos de amostras de DNA de indivíduos pertencentes a extremos fenotípicos de uma população segregante originária de um único cruzamento. Dentro de cada agrupamento, os indivíduos são fenotipicamente idênticos para uma região genômica de interesse, porém, são arbitrários para todos os outros genes. Com isso, os dois agrupamentos resultantes devem diferir entre si apenas para regiões ligadas a característica usada para construir os agrupamentos. O DNA dos genitores da população e dos agrupamentos são analisados com um grande número de marcadores, buscando-se fragmentos polimórficos entre eles, que são relacionadas ao loco que determina a característica usada para construir os conjuntos. A evidência de ligação entre o marcador polimórfico e a região alvo é confirmada através de uma análise de co-segregação utilizando-se todos os indivíduos da população, na qual é realizada uma estimativa da recombinação entre o marcador e o gene que controla o caráter. Seu único pré-requisito é a existência de uma população segregante para o gene de interesse que esteja em desequilíbrio de ligação em relação ao loco marcador. É uma metodologia que reduz significativamente o número de locos marcadores a serem analisados na população segregante. Esta metodologia foi utilizada para identificar marcadores moleculares ligados a genes de interesse em algumas características de importância econômica em eucalipto (VERHAEGEN;PLOMION, 1996; GRATTAPAGLIA et al., 1996; MISSIAGIA et al., 2005; DOMINGUES et al., 2006; ZAMPROGNO et al., 2008).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo: *i*) estudar o modo de herança da resistência à ferrugem em 14 famílias segregantes oriundas do cruzamento entre clones resistentes e suscetíveis, avaliadas sob condições de infecção natural em diferentes ambientes e *ii*) identificar marcadores moleculares de várias classes (AFLP, SSR e RGA) ligados a genes de resistência a este patógeno utilizando a técnica análise de segregantes agrupados e definir sua localização genética mediante análise de co-segregação com marcadores microssatélites.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Material vegetal

Quinze progênies foram obtidas a partir de cruzamentos e auto-cruzamentos controlados, incluindo cruzamentos recíprocos, realizados em 2005 por técnicos do programa de melhoramento da Votorantim Celulose e Papel – VCP. Os quatro genitores (denominados V1, V2, V3 e V4) são híbridos inter-específicos de *E. grandis* Hill ex Maiden x *E. urophylla* S. T. Blake e contrastam para resistência a ferrugem. Os clones V1 e V4 são suscetíveis, classificados como S3 e S2, respectivamente, e os clones V2 e V3 são resistentes, classificados respectivamente como S0 e S1, segundo critério de classificação proposto por Junghans et al. (2003a).

Tabela 1 - Relação e número de plantas de cada progênie plantadas em duas áreas experimentais

Progênies	Santa Branca/SP	Itapetininga/SP
Progênie 1. V2 x V2	60	60
Progênie 2. V2 x V3	60	60
Progênie 3. V2 x V4	60	60
Progênie 4. V3x V2	60	60
Progênie 5. V3x V3	60	60
Progênie 6. V3 x V4	60	60
Progênie 7. V3 x V1	60	60
Progênie 8. V4 x V2	60	60
Progênie 9. V4 x V3	60	60
Progênie 10. V4 x V4	60	60
Progênie 11. V4 x V1	60	60
Progênie 12. V1 x V2	60	60
Progênie 13. V1 x V3	60	60
Progênie 14. V1 x V4	60	60

Quatorze destas progênies (Tabela 1) foram avaliadas para reação à infecção natural por *Puccinia psidii* Winter e utilizadas para estudo de herança da resistência. A décima quinta progênie foi utilizada em estudo de ligação genética entre loco de resistência e marcadores moleculares e é oriunda do cruzamento entre os clones V2 e V1.

2.1.2 Avaliação da resistência à *P. psidii*

As quatorze progênies listadas na Tabela 1 foram avaliadas para resistência à *P. psidii* em dois ambientes de ocorrência natural de ferrugem, comumente utilizados no programa de melhoramento da empresa como “campos de prova de ferrugem” para seleção de genótipos resistentes. Os campos estão localizados nos municípios de Itapetininga e Santa Branca, ambos no Estado de São Paulo. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com parcelas lineares de 10 plantas e 6 repetições. Os quatro genitores foram incluídos como tratamentos testemunha. Bordaduras externas com o genitor suscetível V1 foram utilizadas para aumentar e homogeneizar a distribuição do inóculo nas áreas experimentais.

A progênie V2 x V1 também foi avaliada para resistência à *P. psidii* em campo, em experimentos instalados em três ambientes localizados nos municípios de Capão Bonito, Itapetininga e Santa Branca, todos no Estado de São Paulo. Em cada experimento foram utilizadas 1.000 plantas F1. O delineamento experimental foi o de blocos aumentados, considerando os genitores como tratamentos comuns e cada indivíduo da progênie como tratamentos regulares, totalizando 1.000 tratamentos regulares. Os tratamentos foram distribuídos em 10 blocos com 102 tratamentos cada. Bordaduras externas com o genitor suscetível V1 também foram utilizadas.

Todos os experimentos foram instalados entre novembro e dezembro de 2005 e quatro avaliações da severidade da doença foram realizadas no primeiro semestre de 2006, aproximadamente aos 90, 120, 150 e 180 dias após o plantio.

A avaliação foi baseada em uma escala de notas de quatro níveis de severidade proposta inicialmente por Takahashi (2002) e posteriormente adaptada por melhoristas do setor florestal e utilizada por Zamprogno et al. (2008):

Nota 0: planta com ausência de esporulação ou planta com necrose, semelhante a reação de hipersensibilidade;

Nota 1: planta com poucas pústulas, com esporulações, geralmente espaçadas ou apenas ocasionalmente abundantes nos limbos de folhas novas;

Nota 2: planta com pústulas com esporulação abundante nos limbos foliares, folhas novas e pecíolos de folhas mais novas;

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.

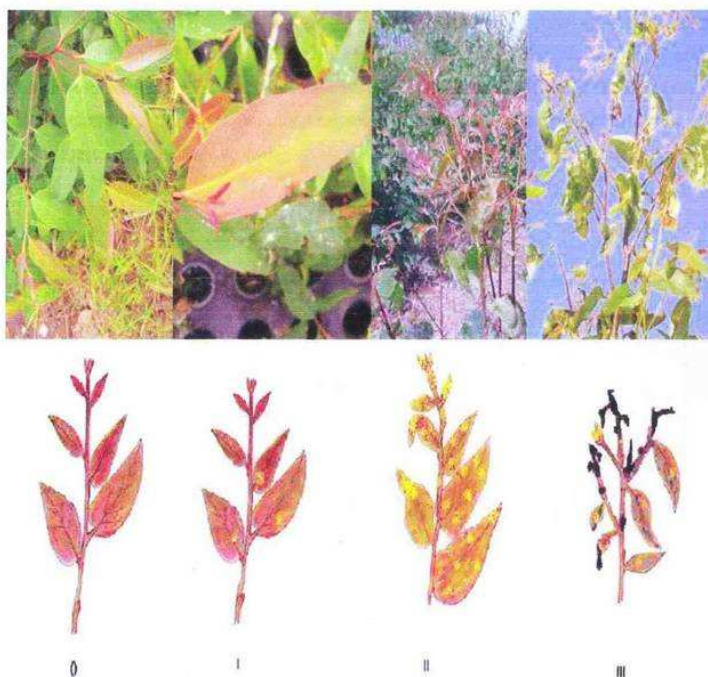


Figura 1 - Escala de notas utilizada para avaliação da severidade de ferrugem modificada de Takahashi (2002)

Plantas com notas N0 e N1 foram consideradas resistentes e plantas com notas N2 e N3 suscetíveis. Este critério foi adotado levando-se em conta que sintomas do tipo N1 não comprometem o crescimento e desenvolvimento da planta em campo, o que não ocorre com plantas com sintomas N2 e N3, que podem evoluir para a perda da dominância apical e

comprometimento da estrutura da planta, afetando seu crescimento e desenvolvimento. Este critério tem sido usado em rotina na seleção de genótipos resistentes no programa de melhoramento da VCP.

2.1.3 Herança da resistência

Hipóteses de segregação mendeliana foram formuladas e as razões de segregação esperadas, associadas a cada hipótese, foram comparadas com as segregações observadas por meio de teste de qui-quadrado em níveis de 5% e 1% de probabilidade. Os dados foram corrigidos utilizando a correção de Yates e submetidos ao teste de heterogeneidade do qui-quadrado (ZAR, 1996) visando confirmar se a análise de qui-quadrado utilizando os dados dos dois experimentos e agrupados para cada progênie poderia ser utilizada.

2.1.4 Mapeamento de loco de resistência

2.1.4.1 Genotipagem com marcadores moleculares

A extração de DNA foi realizada seguindo os procedimentos descritos por Ferreira & Grattapaglia (1996) utilizando folhas jovens. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro e confirmadas em gel de agarose 0,8% coradas com Sybr Safe (Invitrogen) por comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas com padrões de DNA fago λ de concentrações conhecidas sob luz ultravioleta.

O protocolo utilizado nas reações de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) foi adaptado de S. Hazen e R.W. Ward (<http://www.msu.edu/user/hazensam/aflp/AFLPprotocoloIMSU.html>) e de Vos et al., (1995). O DNA genômico foi digerido com três combinações de enzimas, *MseI/EcoRI*, *MseI/HindIII* e *MseI/PstI*. Para a reação de digestão foram utilizados 200 ng de DNA que foram digeridos com 5 U de cada uma das enzimas, 5 μ L de tampão One Phor All (OPA, Amersham), 0,5 μ L de BSA (10 μ g/ μ L; New England) em um volume final de 50 μ L. A reação foi incubada a 37°C por 4 horas. Após este tempo, as enzimas foram desnaturadas por inativação térmica a 70°C por 15 minutos. Para verificar o resultado da digestão, 5 μ L da reação foram analisados em gel de agarose 0,8%

por 3 horas em tampão TBE 1x (2,5V/cm) corados com Sybr Safe (Invitrogen) e visualizados em fotodocumentador sob luz UV.

Os adaptadores *EcoRI*, *HindIII* e *PstI* (Tabela 2) foram diluídos a 5 pM em solução contendo 0,5 x de tampão One Phor All 10x (OPA, Amersham). Os adaptadores *MseI* (Tabela 2) foram diluídos a 50 pM em solução 0,5 x de tampão One Phor All 10 x (OPA, Amersham). A hibridização dos adaptadores foi realizada em termociclador modelo PTC-100 (MJ Research) por 10 min a 65°C, 10 min a 37°C e 10 min a 25°C. Os adaptadores foram ligados aos fragmentos de DNA em uma reação contendo 1 µL de tampão da enzima T4 DNA ligase (10 x), 1 µL de cada um dos adaptadores (5 ou 50 pM), 3 U de T4 DNA ligase (Fermentas), 6,67 µL de água mili-Q e 45 µL de solução de DNA digerido. A ligação foi realizada a 22°C por 3 horas.

Foram utilizadas quatro combinações de “primers” nas reações de pré-amplificação (E3/M2, E2/M1, P1/M2 e H1/M2). Utilizando “primers” com seqüências complementares a cada um dos adaptadores mais um nucleotídeo seletivo na extremidade 3’ (Tabela 2), as reações foram compostas por 1 µL de cada um dos “primers” (25 ng/µL), 0,8 µL de dNTPs (10 mM), 2 µL de tampão 10 x da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas), 1,25 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas) e 2 µL de DNA digerido e ligado, em um volume final de 20 µL. O programa para pré-amplificação foi: 94°C por 2 min, 26 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 5 minutos. Posteriormente, ao produto desta reação foram acrescentados 80 µL de água mili-Q estéril.

Foram testadas sessenta e oito combinações de reações de amplificações seletivas. Estas reações utilizaram “primers” com seqüências contendo dois nucleotídeos seletivos a mais na extremidade 3’ (Tabela 2) e foram compostas de 1,2 µL de cada “primer” (25 ng/µL), 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 2 µL de tampão 10 x da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas), 1,2 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas) e 2 µL de reação de pré-amplificação diluída, em um volume final de 20 µL. O programa para amplificação seletiva foi: 94°C por 2 min, 12 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, 23 ciclos de 94°C 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com extensão final de 72°C por 5 minutos. Amostras de DNA dos genitores foram feitas em duplicadas, desde a extração do DNA, para verificar a reprodutibilidade da reação.

Tabela 2 - Sequências dos adaptadores e dos “primers” utilizados na amplificação de marcadores AFLP

Enzima		Sequências
<i>EcoRI</i>	Adaptador	5' CTCGTAGACTGCTACC 3' 5' AATTGGTACGCAGTCTAC 3'
	“primer” da pré-amplificação N: T ou A	5' GACTGCGTACCAATTCN 3'
	“primers” da amplificação seletiva NNN: AAA, AAC, AAG, ACC, ACG, ACT, AGA, AGC, AGG, ACA, TAA, TTA, TCA, TGC, TCG, TAT, TAC, TAG, TTT, TTC, TTG, TCT, TCC, TGA, TGT, TGG	5' GACTGCGTACCAATTCNNN 3'
<i>MseI</i>	Adaptador	5' GACGATGAGTCCTGAG 3' 5' TACTCAGGAACTCAT 3'
	“primer” da pré-amplificação N: C ou G	5' GATGAGTCCTGAGTAAN 3'
	“primers” da amplificação seletiva NNN: CAA, CAC, CAG, CAT, CCT, GC, CGT, CTA, CTC, CTG, CTT, CGG, GAA, GTT, GTG, GTC, GCG, GTA, GCT, GAC	5' GATGAGTCCTGAGTAANNN 3'
<i>PstI</i>	Adaptador	5' CTCGTAGACTGCGTACATGCA 3' 5' TGTACGCAGTCTAC 3'
	“primer” da pré-amplificação	5' GACTGCGTACATGCAGA 3'
	“primer” da amplificação seletiva	5' GATGAGTCCTGAGTAAACT 3'
<i>HindIII</i>	Adaptador	5' CTCGTAGACTGCGTACC 3' 5' AGCTGGTACGCAGTCTAC 3'
	“primer” da pré-amplificação	5' GACTGCGTACCAGCTTA 3'
	“primers” da amplificação seletiva NNN: ATG, ATC, AGT	5' GACTGCGTACCAGCTTNNN 3'

Após a amplificação seletiva foram adicionados 8 µL de tampão de carregamento (10 mL de formamida, 200 µL de EDTA 0,5M pH8,0, 10 mg de azul de bromofenol e 10 mg de xilene cianol). As amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 94°C e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% de 0,5 mm de espessura com o sistema “Sequi-gen GT” (BioRad) de 38 x 50 cm. Foi realizada pré-corrída a potência constante de 80 W por 1 hora seguida de corrída por 4 horas a 80 W. Para a revelação dos géis foi utilizado o método de coloração com nitrato de prata seguindo o protocolo proposto por Creste et al., (2001).

Nos casos de fragmentos polimórficos, o tamanho dos mesmos foi estimado por comparação com padrão de peso molecular 50 pb (Promega). Cada “primer” foi identificado por uma letra e os polimorfismos foram identificados pelas letras de cada um dos “primers” seguidos pelo peso molecular do fragmento polimórfico em pares de bases (pb).

A técnica de “NBS Profiling”, descrita por Linden, et al., (2004), foi utilizada para amplificar marcadores do tipo RGA (“Resistance Gene Analogs”). DNA genômico foi digerido com 4 enzimas de restrição individualmente: *RsaI*, *AluI*, *EcoRV* e *HaeIII*, durante 4 horas. Para a reação de digestão foram usados 200 ng de DNA, 5 U de enzima, 5 µL de tampão 10 x específico para cada enzima em um volume final de 50 µL. Cada reação foi incubada a 37°C por 4 horas. Após este tempo, as enzimas foram desnaturadas por inativação térmica a 70°C por 15 minutos. Para verificar o resultado da digestão, 5 µL da reação de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% por 3 horas em tampão TBE 1 x (2,5V/cm) corados com Sybr Safe (Invitrogen) e visualizados em fotodocumentador sob luz UV.

Um adaptador que hibridiza a todas as extremidades de fragmentos de DNA gerados pela digestão com qualquer enzima de restrição foi ligado às extremidades dos fragmentos. Este adaptador foi descrito por Linden, et al., (2004). Ele possui um grupo amino na extremidade 3’ da fita menor o que impede a extensão pela *Taq* DNA polimerase e apresenta a extremidade 5’ fosforilada, o que facilita sua ligação às extremidades da fita de DNA geradas pela digestão com enzimas de corte abrupto. As seqüências estão descritas na Tabela 2. Este adaptador foi preparado do mesmo modo que os adaptadores usados nas reações de AFLP. A reação de ligação do adaptador foi realizada usando alta concentração de T4 DNA ligase (3 U/µl) por 16 h a 20°C. A reação de ligação foi terminada por inativação térmica a 70 °C.

A amplificação de fragmentos RGA NBS-específicos envolveu um procedimento de amplificação por PCR em dois passos. O primeiro consistiu em uma reação linear e o segundo em uma reação exponencial. As reações lineares foram efetuadas usando 4 “primers” NBS degenerados, descritos por Linden, et al., (2004) e Calenge et al., (2005) (Tabela 3). Estes “primers” foram desenhados a partir de regiões conservadas do motivo *P-loop* e *Kinase-2* presentes em domínios NBS (“nucleotide binding site”) de genes de resistência. As reações lineares foram compostas de 0,5 μM de cada “primer” NBS-específico, 10 μM de dNTPs, 1,25 mM de MgCl_2 , 1 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1 μL de Tampão da Taq, em um volume final de 10 μL . As reações foram iniciadas por um ciclo de 95°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55, 60 ou 62°C (55°C para NBS5 e NBS7, 60°C para NBS2 e 62°C para NBS3) e 1 min a 72°C, terminando com uma extensão a 72°C por 7 min.

Após a amplificação, o produto da PCR linear foi diluído cinco vezes e 10 μL desta diluição foram utilizados como molde para o segundo passo de amplificação. As reações exponenciais foram efetuadas com os “primers” NBS-específicos e o “primer” complementar ao adaptador (Tabela 2) e foram compostas de 0,2 μM de cada “primer”, 0,2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl_2 , 1 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2 μL de tampão da Taq, em um volume final de 20 μL . As reações exponenciais foram realizadas nas mesmas condições de amplificação das reações lineares. Amostras de DNA dos genitores foram feitas em duplicadas, desde a extração do DNA, para verificar a reprodutibilidade da reação.

Os produtos da amplificação exponencial foram resolvidos em eletroforese em gel de poliacrilamida 6 %, como descrito para os marcadores AFLP. A identificação e análise dos fragmentos também foram realizadas usando a mesma metodologia e os mesmos critérios usados para os marcadores AFLP. A nomenclatura dos marcadores foi feita com base na enzima de restrição utilizada seguido pelo primers NBS específico utilizado e pelo peso molecular do fragmento polimórfico.

Tabela 3 - Seqüências dos adaptadores e “primers” utilizados na amplificação de marcadores RGA pela técnica “NBS Profiling”

Seqüências	
Adaptador – Long Arm	5' ACTCGATTCTCAACCCGAAAGTATAGATCCCA 3'
Adaptador – Short Arm	5' TGGGATCTATACTT 3' (with 3' amino group)
“primer” do Adaptador	5' ACTCGATTCTCAACCCGAAAG 3'
“primer” NBS 2	5' GTWGYTTICCYRAICCISSCAT 3'
“primer” NBS 3	5' GTWGYTTICCYRAICCISSCATICC 3'
“primer” NBS 5	5' YYTKRTHGTMITKGATGATGTITGG 3'
“primer” NBS 7	5' ATTGTTGGRATGGGMGGIMTIGG 3'

Marcadores microssatélites foram utilizados para duas finalidades neste trabalho: confirmação da paternidade das progênies e análise de co-segregação entre marcadores AFLP, RGA e marcadores SSR do grupo de ligação 3 do mapa de referência de eucalipto (BRONDANI et al., 2006)¹. A escolha do grupo 3 foi baseada em trabalho de Bueno et al, (2004) que localizaram um gene de resistência à ferrugem neste grupo.

As reações de amplificação foram realizadas usando 2,5 µL de solução PCR Master Mix (Qiagen), 0,5 µL Q solution (Qiagen), 0,02 µM de cada “primer” e 2,0 ng DNA para um volume final de 5 µL. As reações de amplificação foram iniciadas por um ciclo de 95°C por 15 min, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 min e 30 segundos a 57°C e 1 min a 72°C, terminando com 60°C por 30 minutos. A amplificação foi feita em sistema multiplex com até 5 locos de marcadores microssatélites.

Após a amplificação, 1 µL do produto de PCR foi misturado com 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e 1,0 µL de marcador de peso molecular ROX size standard desenvolvido por Brondani & Grattapaglia (2001) e analisado em seqüenciador automático ABI 3100 DNA analyzer (Applied Biosystems). Os dados foram coletados automaticamente pela detecção das diferentes fluorescências 6-FAM, HEX e NED (Applied Biosystems) com filtro virtual D (Applied Biosystems) e analisados com o auxílio dos softwares GeneScan/Genotyper (Applied Biosystems), que permitem a genotipagem automatizada dos alelos comparando-os com os valores de um marcador interno. A denominação dos marcadores foi feita com base no “primer” usado na amplificação.

¹ Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Genética Vegetal do CENARGEN/EMBRAPA, sob a supervisão do Prof. Dr. Dario Grattapaglia.

2.1.4.2 Confirmação da paternidade dos indivíduos F1 da progênie V2 x V1

A análise de paternidade de todos os indivíduos da progênie V2 x V1 que foram usados nas análises de co-segregação com marcadores moleculares foi realizada utilizando os “primers” desenvolvidos por Brondani et al. (2006) e pelo projeto Genolyptus identificados pelo acrônimo EMBRA (GRATTAPAGLIA et al., 2005) e pelo CSIRO (“Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation”), identificados pelo acrônimo Eg. Foram utilizados os seguintes “primers”: Eg 98, Embra 41, Embra 122, Embra 130 e Embra 239. Após estas análises, genótipos que possuíam alelos diferentes dos pais foram eliminados.

2.1.4.3 Análise de agrupamentos segregantes com marcadores AFLP e RGA

A análise de segregantes agrupados (ASA) (MICHELMORE et al., 1991) foi utilizada para identificar marcadores ligados a genes de resistência à ferrugem. Três agrupamentos com plantas suscetíveis e três com plantas resistentes, um para cada local de avaliação, foram constituídos com base em resultados das avaliações da resistência dos 3.000 indivíduos da progênie V2 x V1.

Os agrupamentos resistentes foram constituídos por alíquotas de concentrações equivalentes de DNA de 25 plantas da progênie com nota 0 e por DNA de 25 plantas suscetíveis com nota 3. As plantas escolhidas para comporem os agrupamentos receberam a mesma nota em todas as avaliações, ou seja, tanto as plantas classificadas com nota 0 como as plantas nota 3 obtiveram estas notas em todas as 4 avaliações.

Inicialmente foram utilizadas amostras de DNA dos genitores e dos seis agrupamentos para selecionar combinações de marcadores AFLP e RGA que revelassem fragmentos polimórficos entre os genitores e todos os agrupamentos. Posteriormente, estas combinações foram utilizadas na amplificação de DNA de cada um dos 150 indivíduos que originaram os agrupamentos de DNA resistentes e suscetíveis. Uma vez confirmadas combinações que geraram marcadores co-segregantes com a resistência a ferrugem, estas foram utilizadas na amplificação de 170 indivíduos da progênie escolhidos após confirmação da paternidade e proporcionalmente entre os três locais, mas de maneira aleatória dentre locais, os quais foram usados em análises de co-segregação. Esta sub-amostra de 170 indivíduos foi denominada “população de mapeamento”.

2.1.4.4 Genotipagem seletiva com marcadores microssatélites pertencentes ao grupo de ligação 3

Noventa e quatro indivíduos F1 da população de mapeamento foram selecionados aleatoriamente para genotipagem com marcadores microssatélites pertencentes ao grupo de ligação 3, desenvolvidos por Brondani et al., (2006) e CSIRO. Inicialmente foi realizada uma análise prévia com 23 marcadores SSR do grupo 3 (Eg 61, Eg 94, Eg 98, Embra 34, Embra 49, Embra 77, Embra 115, Embra 122, Embra 125, Embra 144, Embra 171, Embra 181, Embra 189, Embra 239, Embra 266, Embra 277, Embra 286, Embra 350, Embra 361, Embra 1071, Embra 1139, Embra 1656, Embra 1845) utilizando os genitores e 4 plantas F1 visando identificar locos polimórficos para serem usados no mapeamento. Marcadores polimórficos foram utilizados em sistemas multiplex para genotipar os genitores e os 94 F1's da progênie.

2.1.4.5 Análise de co-segregação

A análise de co-segregação foi baseada em dados genotípicos e fenotípicos da população de mapeamento. Os dados de marcadores AFLPs e RGA foram obtidos por visualização de fragmentos polimórficos no gel de acrilamida. Somente fragmentos bem definidos e de fácil visualização foram considerados. Para os dados de AFLP e RGA, o teste de aderência de qui-quadrado foi adotado, em nível de 5% de significância, para verificar a hipótese nula de segregação mendeliana, cujas proporções esperadas são 1:1, para locos segregando em apenas um genitor e 3:1 para locos segregando nos dois genitores. Para os dados de microssatélites, segregações 1:2:1 e 1:1:1:1 também foram consideradas.

Análise de co-segregação entre resistência a *P. psidii* e locos marcadores AFLP, RGA e microssatélites foi realizada com o auxílio do programa “One Map” (MARGARIDO et al., 2007), desenvolvido utilizando metodologia descrita por Wu et al., (2002) que analisa a ligação em populações de polinização aberta como eucalipto e também estima a fase de ligação de cada par de marcadores. Usando esta metodologia, cada alelo marcador foi simbolizado por *a*, *b*, *c* ou *d*, sendo co-dominante em relação ao outro e dominantes para os alelos nulos, simbolizados por *o*. Dependendo de como os alelos são arrançados nos dois genitores do cruzamento e na progênie, 18 possíveis combinações, classificadas em sete grupos (A, B1, B2, B3, C, D1 e D2) são esperadas,

conforme apresentada na Tabela 4. Marcadores que tem o mesmo genótipo em ambos os genitores (B3 e C) são chamados de marcadores simétricos e marcadores específicos para cada genitor são chamados de assimétricos (WU et al., 2002).

Tabela 4 – Possíveis combinações de genótipos marcadores e padrões moleculares que podem ser observados nos parentais e progênie (modificada de Wu et al., 2002).

Tipo de cruzamento	Genitores			Progênie				
	Cruzamento	fragmentos observados	Obs.: ¹	fragmentos observados	Segregação	Nº de fenótipos moleculares		
A	1	<i>ab x cd</i>	<i>ab x cd</i>	A	<i>ac, ad, bc, bd</i>	1:1:1:1	4	
	2	<i>ab x ac</i>	<i>ab x ac</i>	A	<i>a, ac, ba, bc</i>	1:1:1:1	4	
	3	<i>ab x co</i>	<i>ab x c</i>	A	<i>ac, a, bc, b</i>	1:1:1:1	4	
	4	<i>ao x bo</i>	<i>a x b</i>	A	<i>ab, a, b, o</i>	1:1:1:1	4	
B	B ₁	5	<i>ab x ao</i>	<i>ab x a</i>	A	<i>ab, 2a, b</i>	1:2:1	3
	B ₂	6	<i>ao x ab</i>	<i>a x ab</i>	A	<i>ab, 2a, b</i>	1:2:1	3
	B ₃	7	<i>ab x ab</i>	<i>ab x ab</i>	S	<i>a, 2ab, b</i>	1:2:1	3
C	8	<i>ao x ao</i>	<i>a x a</i>	S	<i>3a, o</i>	3:1	2	
D	D ₁	9	<i>ab x cc</i>	<i>ab x cc</i>	A	<i>ac, bc,</i>	1:1	2
		10	<i>ab x aa</i>	<i>ab x a</i>	A	<i>a, ab</i>	1:1	2
		11	<i>ab x oo</i>	<i>ab x o</i>	A	<i>a, b</i>	1:1	2
		12	<i>bo x aa</i>	<i>b x a</i>	A	<i>ab, a</i>	1:1	2
		13	<i>ao x oo</i>	<i>a x o</i>	A	<i>a, o</i>	1:1	2
	D ₂	14	<i>cc x ab</i>	<i>c x ab</i>	A	<i>ac, bc</i>	1:1	2
		15	<i>aa x ab</i>	<i>a x ab</i>	A	<i>a, ab</i>	1:1	2
		16	<i>oo x ab</i>	<i>oo x ab</i>	A	<i>a, b</i>	1:1	2
		17	<i>aa x bo</i>	<i>a x b</i>	A	<i>ab, a</i>	1:1	2
		18	<i>oo x ao</i>	<i>o x a</i>	A	<i>a, o</i>	1:1	2

¹ A – marcador assimétrico e S - marcador simétrico

Os critérios para a construção do mapa usados foram LOD “score” = 5,0 e um valor de frequência de recombinação de 0,5. O mapa gerado pelo programa é baseado em testes de dois pontos entre marcas, através do algoritmo EM, para o agrupamento dos marcadores, e através do

algoritmo “Rapid Chain Delineation” para ordenação dos marcadores. As distâncias de mapa em centiMorgans entre os marcadores e o loco de resistência a ferrugem foram calculadas a partir da frequência de recombinação através da função de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944).

2.2 Resultados e Discussão

2.2.1 Herança da resistência a *Puccinia psidii* em progênes de híbridos inter-específicos de eucalipto avaliadas sob condições naturais de infecção

Progênes de irmãos-completos foram obtidas a partir de cruzamentos e autofecundações entre 4 genitores classificados como resistentes ou suscetíveis com base em resultados de inoculações artificiais realizadas anteriormente. A natureza resistente ou suscetível dos genitores foi confirmada no presente estudo em dois locais distintos, escolhidos por serem locais de ocorrências naturais de epidemias de ferrugem em anos anteriores.

Todas as plantas foram avaliadas quatro vezes e algumas podem ter recebido notas diferentes entre avaliações. Nestes casos, considerou-se a maior nota para efeito de classificação final dentro dos quatro níveis de severidade. Este critério foi adotado para garantir que plantas classificadas com notas N2 ou N3 em dada avaliação e que apresentaram notas N0 ou N1 em avaliações subseqüentes fossem erroneamente classificadas como resistentes. Isto, pois, como as avaliações representam momentos pontuais da epidemia, é possível que no momento de uma das avaliações, uma determinada planta suscetível pode não ter aprestando sintomas em dada avaliação, pois esta pode ter coincido com o momento de lançamento de novas folhas.

Os níveis de severidade de ferrugem verificados nos dois experimentos foram elevados e permitiram a distinção de genótipos resistentes e suscetíveis, conforme Tabela 5 e Figuras 2 e 3. Verificou-se um aumento da severidade de cada planta ao longo das avaliações, evoluindo, principalmente, de N0 para N1 e de N2 para N3. Um maior número de plantas cujos níveis de severidade foram os mais altos foi observado em Santa Branca/SP (Figuras 2 e 3).

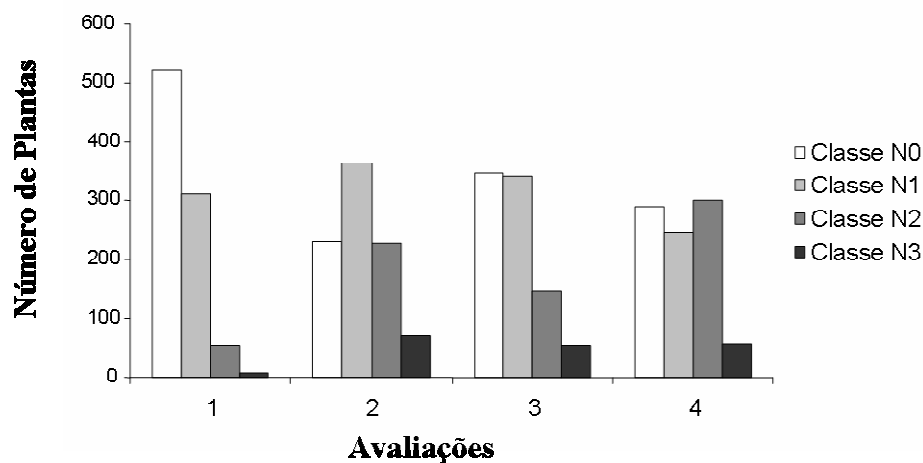


Figura 2 - Distribuição das plantas de todas as progênies classificadas dentro das quatro classes de severidade nas 4 avaliações realizadas em Santa Branca/SP

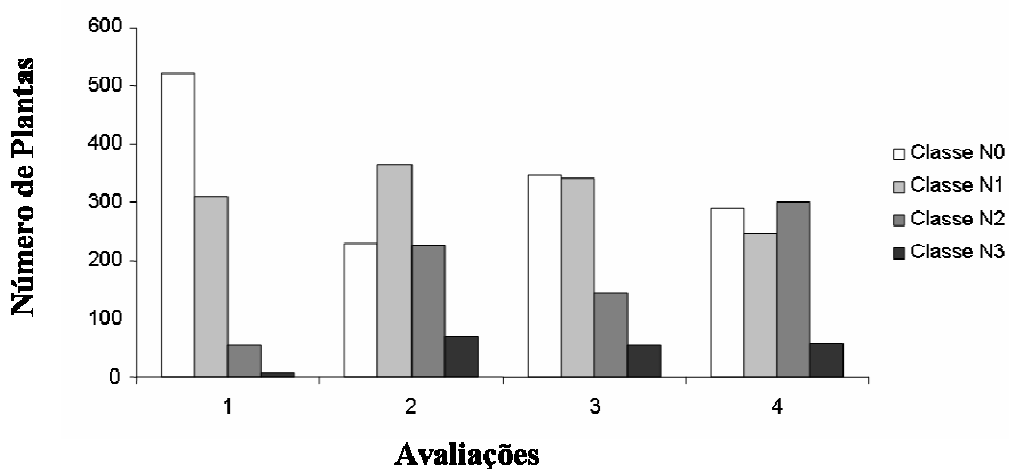


Figura 3 - Distribuição das plantas de todas as progênies classificadas dentro das quatro classes de severidade nas 4 avaliações realizadas em Itapetininga/SP

Como os dados fenotípicos de cada progênie dos dois experimentos foram testados contra a mesma hipótese nula e as amostras pertencem à mesma população, os valores de qui-quadrado de cada progênie apresentados na Tabela 5 foram obtidos através da soma dos valores observados nos dois experimentos e corrigidos utilizando a correção de Yates para continuidade dos dados (ZAR, 1996).

Todas as progênies segregaram para resistência a ferrugem (Tabela 5), sendo que todas as progênies oriundas do cruzamento entre genitores resistentes ou da autofecundação destes (progênies 1, 2, 4 e 5) segregaram na proporção de 3 resistentes para 1 suscetível. Já progênies oriundas da autofecundação ou do cruzamento entre genitores suscetíveis segregaram na proporção de 3 suscetíveis para 1 resistente (progênies 10, 11 e 14). Em progênies oriundas de cruzamentos entre genitores resistentes e suscetíveis, a segregação observada foi de 1 resistente para 1 suscetível (progênies 3, 6, 7, 8, 9, 12 e 13). Estes resultados indicaram tanto controle monogênico da resistência como que todos os genitores são heterozigóticos para o loco de resistência. Como pode ser observado também na Tabela 5, nenhuma diferença na segregação para a resistência foi observada entre cruzamentos recíprocos, sugerindo que não existe influência citoplasmática no controle deste caráter.

Apenas as progênies 4 e 11 apresentaram valores que não se ajustaram à hipótese de herança monogênica. No entanto, quando analisamos a segregação destas duas progênies em cada experimento individualmente, observou-se que os padrões de segregação da progênie 4 nos dois experimentos e da progênie 11 avaliada em Santa Branca/SP se ajustaram à hipótese de herança monogênica (Tabela 6). Apenas a progênie 11, oriunda do cruzamento entre os dois genitores suscetíveis (V1 e V4), quando avaliada em Itapetininga, não apresentou um resultado que pudesse ser explicado pelo modelo de herança monogênica em nível de 5 ou 1% de probabilidade.

Os resultados da progênie 11 avaliada em Itapetininga/SP, apesar de estatisticamente significativos, estão muito próximos da não significância. Uma vez que as condições ambientais foram favoráveis ao desenvolvimento da doença, explicações para este fato podem ter origem no acaso, durante a escolha aleatória dos indivíduos da progênie que foram usados nos experimentos, ou que alguns indivíduos desta progênie sejam provenientes de contaminação (mistura de pólen, sementes ou mudas).

Tabela 5 – Distribuição de plantas em cada classe de severidade e proporção esperada entre plantas resistentes e suscetíveis assumindo modelo de herança monogênica em 14 progênies F1 avaliadas sob condição de campo em Santa Branca e Itapetininga, SP

Progênie	Número de Plantas/Classe de Severidade						Proporção Esperada	X ²
	N0	N1	N2	N3	R	S	R:S ^a	
Progênie 1 V2xV2	31	64	20	2	95	22	3:1	2,08 ^{ns}
Progênie 2 V2xV3	14	67	30	5	81	35	3:1	1,39 ^{ns}
Progênie 3 V2xV4	14	45	36	23	59	59	1:1	0,00 ^{ns}
Progênie 4 V3xV2	24	49	32	11	73	43	3:1	8,70 [*]
Progênie 5 V3xV3	20	68	24	0	88	24	3:1	0,58 ^{ns}
Progênie 6 V3xV4	11	60	34	12	71	46	1:1	4,92 ^{ns*}
Progênie 7 V3xV1	5	45	53	11	50	64	1:1	1,48 ^{ns}
Progênie 8 V4xV2	8	50	33	27	58	60	1:1	0,08 ^{ns}
Progênie 9 V4xV3	5	48	54	12	53	66	3:1	1,21 ^{ns}
Progênie 10 V4xV4	3	22	59	32	25	91	1:3	0,56 ^{ns}
Progênie 11 V4xV1	0	14	54	50	14	104	1:3	10,17 [*]
Progênie 12 V1xV2	16	41	42	20	57	62	1:1	0,13 ^{ns}
Progênie 13 V1xV3	13	54	36	16	67	52	1:1	1,65 ^{ns}
Progênie 14 V1xV4	0	33	60	25	33	85	1:3	0,41 ^{ns}

^aA razão resistente:suscetível (R:S) é baseada em R=N0+N1 e S=N2+N3. Hipótese de herança monogênica.

^{ns} Não significativo em nível de 5% de probabilidade e ^{ns*} não significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado.

Tabela 6 - Distribuição de plantas em cada classe de severidade e proporção esperada entre plantas resistentes e suscetíveis assumindo modelo de herança monogênica das progênes 4 e 11 avaliados sob condição de campo em Santa Branca e Itapetininga, SP

Progênie	Número de Plantas/Classe de Severidade						Proporção Esperada	X ²
	N0	N1	V2	N3	R	S	R:S ^a	
Progênie 4/ Itapetininga	16	21	19	4	37	23	3:1	5,00 ^{ns*}
Progênie 4/ Santa Branca	8	28	13	7	36	20	3:1	2,88 ^{ns}
Progênie 11/ Itapetininga	0	5	28	26	5	54	1:3	7,73 [*]
Progênie 11/ Santa Branca	0	9	26	24	9	50	1:3	2,48 ^{ns}

^aA razão Resistente:Suscetível (R:S) é baseado em R=N0+N1 e S=N2+N3. Hipótese de herança monogênica.

^{ns} Não significativo em nível de 5% de probabilidade e ^{ns*} não significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado.

Os resultados de herança da resistência à ferrugem em condições naturais de infecção relatados aqui corroboram com resultados encontrados nos trabalhos realizados em condições controladas de infecção (JUNGHANS et al., 2003b; ROSADO, 2007; ALVES, 2008). Segundo estes trabalhos, variações dentro de cada classe fenotípica, principalmente classes N1 e N2, também foram observadas e pode ser um indicativo de que genes de efeitos secundários também participem da resposta de resistência. No entanto, é evidente que um loco de grande efeito é o responsável por grande parte da resistência, a exemplo do já relatado em outros trabalhos com base em análises em progênes de origens diferentes (JUNGHANS et al., 2003b; BUENO et al., 2004; ROSADO, 2007; ALVES, 2008).

Considerando os padrões de segregação fenotípica de cada progênie, a resistência pode ser explicada por um modelo monogênico com pelo menos 3 alelos (A¹, A² e A³) seguindo uma série alélica de dominância: A¹ > A² > A³. Neste modelo, os alelos A¹ e A³ conferem resistência à ferrugem e o alelo A² suscetibilidade. Este modelo foi proposto principalmente baseado nas segregações das progênes oriundas de autofecundações e cruzamentos entre clones de mesmo fenótipo. Como nas autofecundações de genitores resistentes (V2 e V3) bem como no cruzamento entre eles a segregação encontrada foi de 3 resistentes para 1 suscetível, estes genitores devem possuir os mesmos alelos, um de resistência (A¹) e um de suscetibilidade, sendo que o alelo de resistência é dominante sobre o de suscetibilidade (A²). Considerando os genitores suscetíveis (V1 e V4), como tanto no cruzamento entre eles como na autofecundação de V4, a segregação

encontrada foi de 3 suscetíveis para 1 resistente, estes genitores também devem possuir um alelo de resistência e um alelo de suscetibilidade, porém, nestes genitores o alelo de resistência (A^3) é recessivo em relação ao alelo de suscetibilidade (A^2). Todas as segregações esperadas para os cruzamentos foram deduzidas e estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Cruzamentos e segregações possíveis considerando que a resistência à ferrugem seja controlada por um gene com 3 alelos seguindo a ordem de dominância $A^1 > A^2 > A^3$

Genótipos		Segregação	Progênie
V1- A^2A^3	V1- A^2A^3	1R:3S	-
	V2- A^1A^2	1R:1S	Progênie 12
	V3- A^1A^2	1R:1S	Progênie 13
	V4- A^2A^3	1R:3S	Progênie 14
V2- A^1A^2	V1- A^2A^3	1R:1S	-
	V2- A^1A^2	3R:1S	Progênie 1
	V3- A^1A^2	3R:1S	Progênie 2
	V4- A^2A^3	1R:1S	Progênie 3
V3- A^1A^2	V1- A^2A^3	1R:1S	Progênie 7
	V2- A^1A^2	3R:1S	Progênie 4
	V3- A^1A^2	3R:1S	Progênie 5
	V4- A^2A^3	1R:1S	Progênie 6
V4- A^2A^3	V1- A^2A^3	1R:3S	Progênie 11
	V2- A^1A^2	1R:1S	Progênie 8
	V3- A^1A^2	1R:1S	Progênie 9
	V4- A^2A^3	1R:3S	Progênie 10

A maioria dos genes de resistência identificados até o momento possui interação alélica do tipo dominância completa (HAMMOND-KOSAK; PARKER, 2003; BENT; MACKEY, 2007), porém em alguns casos alelos recessivos também são encontrados. No patossistema eucalipto-ferrugem, alelos de resistência dominantes e recessivos já foram descritos (JUNGHANS et al., 2003b, ROSADO, 2007, ALVES, 2008, ZAMPROGNO et al., 2008).

Outros modelos de herança considerando um loco com mais de 3 alelos ou modelos mais complexos, onde a resistência é conferida por mais de um gene, também poderiam explicar estes

resultados. Por exemplo, um modelo que considera um loco de resistência bialélico interagindo epistaticamente com outro loco também se aplica aos resultados. Neste modelo, os genitores resistentes seriam AaBB e os genitores suscetíveis aaBb, sendo que o alelo “A” conferiria resistência e o alelo “a” suscetibilidade. O alelo “b”, quando em homozigose na presença do alelo “a”, também em homozigose, conferiria resistência ao indivíduo. Modelos mais complexos de herança conferida por dois genes com interações epistáticas têm sido propostos para explicar os resultados de algumas progênies oriundas de cruzamentos interespecíficos (ROSADO, 2007; ALVES, 2008). No entanto, a hipótese de herança monogênica multialélica é favorecida por ser mais parcimoniosa e pelo fato de que genes de resistência a ferrugens em outras espécies ocorrem em séries multialélicas, (JOHAL; BRIGGS, 1992; LAWRENCE et al., 1995; BUSCHGES et al., 1997). No entanto, a hipótese de multialelismo só poderá ser comprovada após a clonagem destes genes.

A existência de um loco multialélico de resistência a *P. psidii* em eucalipto é curiosa do ponto de vista evolutivo, já que o histórico coevolutivo deste patossistema é relativamente recente e séries alélicas são provavelmente fruto de pressão de seleção exercida por mutações em genes complementares de virulência no patógeno após longo contato entre patógeno e hospedeiro (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997; STAHL; BISHOP, 2000; BENT; MACKAY, 2007). Variação em resistência a *P. psidii* também foi relatada em outros gêneros de mirtáceas provenientes de várias regiões da Austrália, indicando que não só o gênero *Eucalyptus* possui genes de resistência a este fungo (ZAUZA, 2007). Em patossistemas florestais com pouco histórico coevolutivo e onde existe resistência monogênica, como pinus x ferrugem e populus x ferrugem, a resistência é conferida por genes de resistência a patógenos similares encontrados no local de origem do hospedeiro (DEVEY et al., 1995; NEWCOMBE et al., 1996) e exemplos de um mesmo gene conferindo resistência a diferentes patógenos (ROSSI et al., 1998; ROUPE VAN DER VOORT et al., 1999; MEKSEM et al., 1999; COOLEY et al., 2000; DWEIKAT et al., 2002), a várias raças de um patógeno (BUSCHGES et al., 1997) ou mesmo controlando a expressão de diferentes características (GODIARD et al., 2003; LLORENTE et al., 2005) tem sido encontrados na literatura. Estes patógenos devem codificar proteínas que possuem certas regiões em comum, que possivelmente desempenham papel indispensável à sua sobrevivência, permitindo assim que a proteína de resistência do hospedeiro reconheça diferentes proteínas de avirulência do patógeno.

Desta forma, é possível que o loco detectado neste estudo, a exemplo do discutido acima também confira resistência a vários isolados/raças do patógeno ou mesmo a outros patógenos geneticamente relacionados encontrados no centro de origem do eucalipto. De fato, um loco de resistência à ferrugem foi mapeado em várias famílias segregantes no grupo de ligação 3 do mapa de referencia de eucalipto (BUENO et al., 2004; ROSADO, 2007; ALVES, 2008), onde um QTL de resistência a *Mycopsphaerella* também foi mapeado neste mesmo grupo de ligação (FREEMAN et al., 2008), o que sugere a existência de um loco de resistência que atue contra mais de um patógeno.

2.2.2 Mapeamento genético de um loco de resistência à ferrugem do eucalipto usando marcadores moleculares

2.2.2.1 Análise de paternidade

Dentre os 320 genótipos da progênie V2 x V1, usados no estudo de ligação, a paternidade de 190, foi confirmada usando os “primers” Eg 98, Embra 41, Embra 122, Embra 130 e Embra 239. Dos 190 genótipos investigados, 15 foram considerados filhos ilegítimos, autofecundantes ou mistura de genótipos desta família: 10 foram oriundos da autofecundação do genitor V2, 2 possuíam um alelo da mãe (V2) e 1 alelo diferente dos alelos do genitor masculino e 3 não possuíam alelos presentes nos genitores. Todos estes 15 genótipos foram excluídos da análise. Dos 175 genótipos restantes, 170 foram usados para as genotipagens com marcadores AFLP e RGA, constituindo a população base de mapeamento, dos quais 94 também foram genotipados com marcadores SSR.

2.2.2.2 Análise de agrupamentos segregantes

A análise de agrupamentos segregantes (ASA) em associação com marcadores AFLP e RGA foi usada para identificar marcadores associados a regiões contendo locos de resistência de *P. psidii*. Em uma primeira etapa, sessenta e oito combinações de enzimas e “primers” foram analisadas usando os dois genitores e os seis agrupamentos de DNA dos 25 indivíduos mais resistentes e 25 mais suscetíveis de cada experimento. Como marcadores AFLP são em sua

maioria dominantes, foram considerados polimórficos os locos onde o fragmento foi amplificado em um genitor e no outro não.

Usando as enzimas *EcoRI* e *MseI*, foram testadas 37 combinações de “primers” com 1 nucleotídeo seletivo na pré-amplificação e três nucleotídeos seletivos na amplificação seletiva, estas últimas escolhidas com base no trabalho de Gaiotto et al., (1997) que mostraram que estas combinações produzem fragmentos mais bem definidos e de fácil visualização, se bem que em menor número. Todas as combinações apresentaram qualidade de amplificação satisfatória. As 37 combinações amplificaram 1970 locos de comprimento variando de 65 a 700 pb. O número de locos polimórficos variou de 2 a 22, com média de 11,2/combinção de “primers”. Todas as combinações produziram fragmentos polimórficos entre os genitores, totalizando 331 locos polimórficos (16,8%). O nível de polimorfismo encontrado foi baixo comparado a valores encontrados em outros trabalhos de mapeamento com marcadores AFLP (MARQUES et al., 1998; MYBURG et al., 2003) e pode refletir uma menor divergência genética entre os genitores.

Das 37 combinações, 23 revelaram polimorfismos entre os genitores e os agrupamentos e, destas, 10 revelaram locos polimórficos entre agrupamentos de apenas um local, 7 revelaram locos polimórficos entre agrupamentos de dois locais e 8 revelaram locos polimórficos entre agrupamentos dos três locais. Fato interessante é que estes 8 fragmentos foram amplificados no genitor suscetível.

Em uma segunda etapa, apenas as combinações que apresentaram locos polimórficos entre os genitores e os agrupamentos dos três ambientes foram analisadas também nos demais genótipos da progênie (Tabela 8). Na população de mapeamento, além dos locos polimórficos descritos na Tabela 8, outros locos polimórficos amplificados por estas combinações também foram analisados. Nesta etapa foram analisados 154 marcadores, dos quais 67 (43%) segregaram na proporção de 1:1, 57 (37%) segregaram na proporção de 3:1 e 30 (19%) apresentaram distorção de segregação (Tabela 9). Os valores de locos com distorção de segregação encontrados estão dentro do esperado de acordo com os trabalhos de Marques et al., (1998) que encontrou 15% de locos com distorção de segregação e de Myburg et al., (2003) que encontrou valores entre 28,5 e 32% ao genotipar duas famílias de retro cruzamento de *E. globulus* e *E. grandis*.

Tabela 8 – Informação gerada por combinações de “primers” AFLP que amplificaram locos polimórficos entre os genitores e os seis agrupamentos

Combinação de “primers”	Número total de locos amplificados	Número de locos polimórficos entre os genitores	Número de locos polimórficos entre os seis agrupamentos	Fragmentos polimórficos identificados entre os seis agrupamentos
E10M21	58	11	1	E10M21_150 pb
E10M30	95	17	1	E10M30_100 pb
E12M32	87	10	2	E12M32_270 pb e E12M32_165 pb
E16M26	76	13	1	E16M26_150 pb
E20M9	107	11	1	E20M9_210 pb
E17M6	97	14	1	E17M6_115 pb
E24M14	82	13	1	E24M14_210 pb
E8M18	84	22	1	E8M18_195 pb

Tabela 9 - Número médio de tipos de segregação de locos polimórficos de marcadores AFLP

Combinação	Número total de fragmentos escorada	Número de fragmentos segregando 1:1	Número de fragmentos segregando 3:1	Fragmentos com distorção de segregação*
E8M18	5	5	-	-
E10M21	8	4	2	2
E10M30	24	9	10	5
E12M32	13	7	4	2
E16M26	19	12	6	1
E17M6	25	12	11	2
E20M9	32	9	11	12
E24M14	28	15	7	6
Total	154	67	57	30
		43%	37%	19%

* Significativo a 5% de probabilidade

A Figura 4 ilustra a segregação de indivíduos da progênie de mapeamento em uma faixa de um gel de amplificação.

Entre as 23 combinações testadas usando as enzimas *HindIII/MseI*, foram observados apenas 2 locos polimórficos entre os genitores e agrupamentos de apenas 2 ambientes. Entre as 8 combinações usando as enzimas *PstI/MseI* não foi observado nenhum polimorfismo entre os genitores e os agrupamentos. Como não foram encontrados locos polimórficos entre os genitores e os agrupamentos dos 3 ambientes, estas combinações não foram analisadas nos demais indivíduos da progênie. Estas duas combinações de enzimas *HindIII/MseI* e *PstI/MseI* parecem não ser adequadas para espécies de *Eucalyptus* spp., uma vez que geram poucos locos polimórficos em relação a combinação *EcoRI/MseI*, o que está de acordo com a maioria dos trabalhos usando marcadores AFLP em eucalipto que usaram esta última combinação (GAIOTTO et al., 1997; MARQUES et al., 1998; MYBURG et al., 2003).

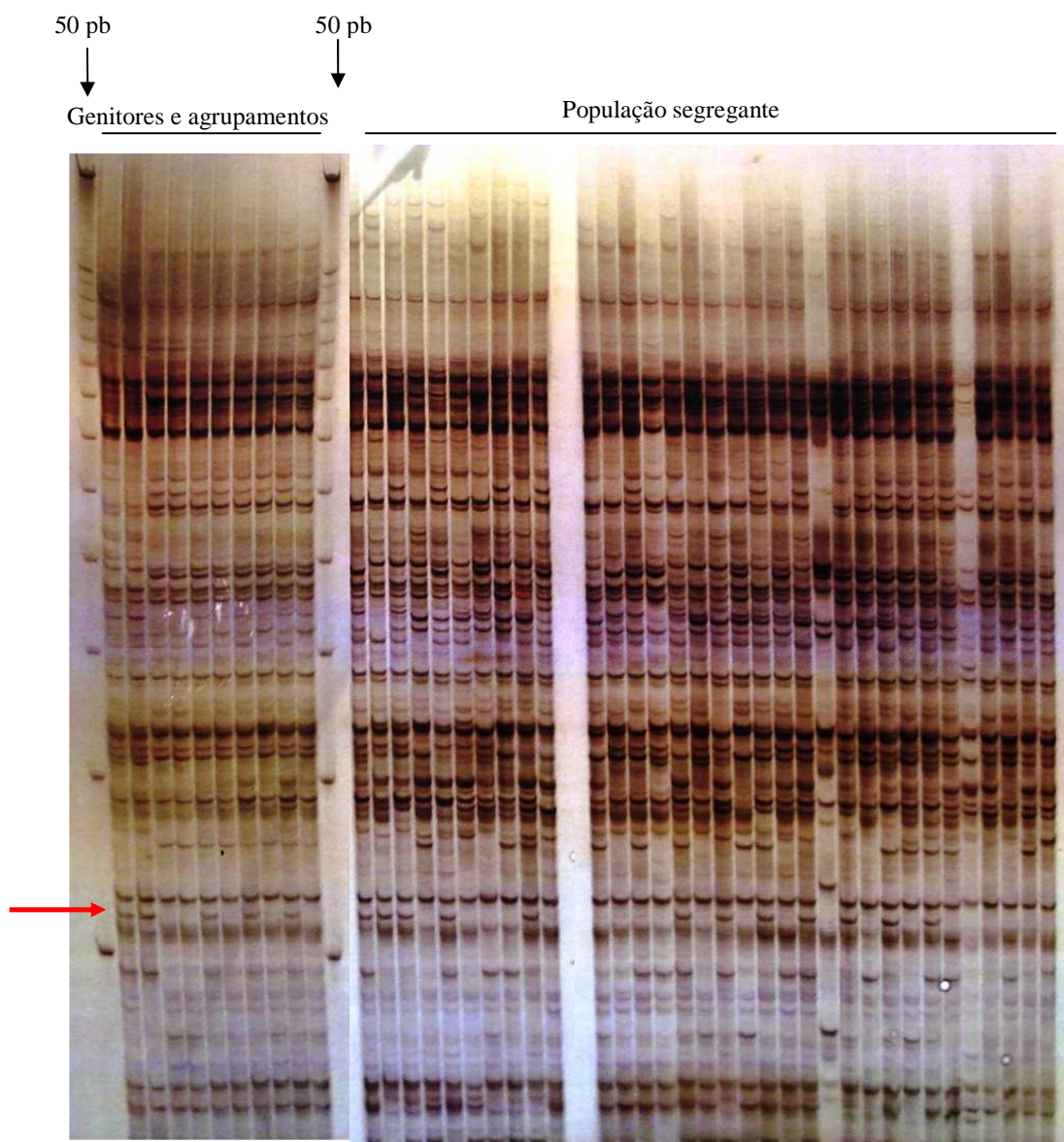


Figura 4 - Faixa de gel de AFLP mostrando a presença e a ausência do marcador E20M9_210 (indicado pela seta), nos genitores (em duplicata), nos agrupamentos e a segregação na progênie

Nas análises com marcadores RGA, em uma primeira etapa, dezesseis combinações de enzimas e “primers” degenerados de marcadores RGA foram analisadas usando os dois genitores e os seis agrupamentos de DNA. Como os marcadores AFLP, os marcadores RGA também são dominantes e foram considerados polimórficos os locos onde o fragmento foi amplificado em um genitor e no outro não.

As dezesseis combinações de enzimas/“primers” degenerados amplificaram 865 locos de comprimento variando de 95 a 700 pb. O número de locos polimórficos variou de 2 a 23, com média de 13,5/combinção. O número de locos polimórficos entre os genitores foi de 865 dos quais 7 foram polimórficos também entre os agrupamentos (Tabela 10). O nível de polimorfismos encontrado foi de 25%. Resultados similares foram encontrados no trabalho de Linden, et al., (2004), onde foram observados entre 50-60 fragmentos por combinação, dos quais pelo menos 15 foram polimórficos. Comparado aos dados obtidos com marcadores AFLP neste estudo, a técnica “NBS Profiling” revelou um menor número de locos amplificados, no entanto, o nível de polimorfismo encontrado entre os genitores foi maior (16% com marcadores AFLP e 25% com marcadores RGA).

Em uma segunda etapa, usando apenas os indivíduos que compunham os seis agrupamentos, todas as combinações de enzimas/“primers” degenerados que amplificaram locos RGA polimórficos entre os genitores e os seis agrupamentos foram analisadas (Tabela 10). Alguns marcadores falharam em mostrar associação com o fenótipo de resistência. Apenas um fragmento de 600 pb, identificado no genitor suscetível e nos três agrupamentos suscetíveis, amplificado pela combinação *AluI*/NBS3 (marcador *AluI*/NBS3_600 pb), apresentou alto grau de associação com o fenótipo de resistência, sendo amplificado apenas nos indivíduos suscetíveis e nenhum indivíduo recombinante foi identificado.

Tabela 10 - Combinações de enzimas/ “primers” degenerados testados na amplificação de marcadores RGA pelo método “NBS Profiling”, número de locos total e locos polimórficos entre os genitores e os seis agrupamentos

Combinação	Número total de locos	Número de locos polimórficos entre os genitores	Número de locos polimórficos entre os seis agrupamentos	Fragmentos polimórficos identificados entre os seis agrupamentos
<i>RsaI</i> / NBS2	63	18	1	<i>RsaI</i> / NBS2_395 pb
<i>AluI</i> / NBS2	55	9	-	
<i>EcoRV</i> / NBS2	45	15	1	<i>EcoRV</i> / NBS2_440 pb
<i>HaeIII</i> / NBS2	55	14	-	
<i>RsaI</i> / NBS3	55	19	1	<i>RsaI</i> / NBS3_410 pb
<i>AluI</i> / NBS3	54	19	3	<i>AluI</i> / NBS3_680 pb, <i>AluI</i> / NBS3_600 pb, <i>AluI</i> / NBS3_430 pb
<i>EcoRV</i> / NBS3	45	16	-	
<i>HaeIII</i> / NBS3	51	16	-	
<i>RsaI</i> / NBS5	55	7	1	<i>RsaI</i> / NBS5_220 pb
<i>AluI</i> / NBS5	55	2	-	
<i>EcoRV</i> / NBS5	60	23	-	
<i>HaeIII</i> / NBS5	50	7	-	
<i>RsaI</i> / NBS7	50	12	-	
<i>AluI</i> / NBS7	60	10	-	
<i>EcoRV</i> / NBS7	54	21	-	
<i>HaeIII</i> / NBS7	58	9	-	

Em uma terceira etapa, este marcador foi analisado na população de mapeamento. Após análise da progênie somente oito genótipos apresentaram-se como indivíduos recombinantes, e todos com severidade N1 ou N2 (Figura 5).

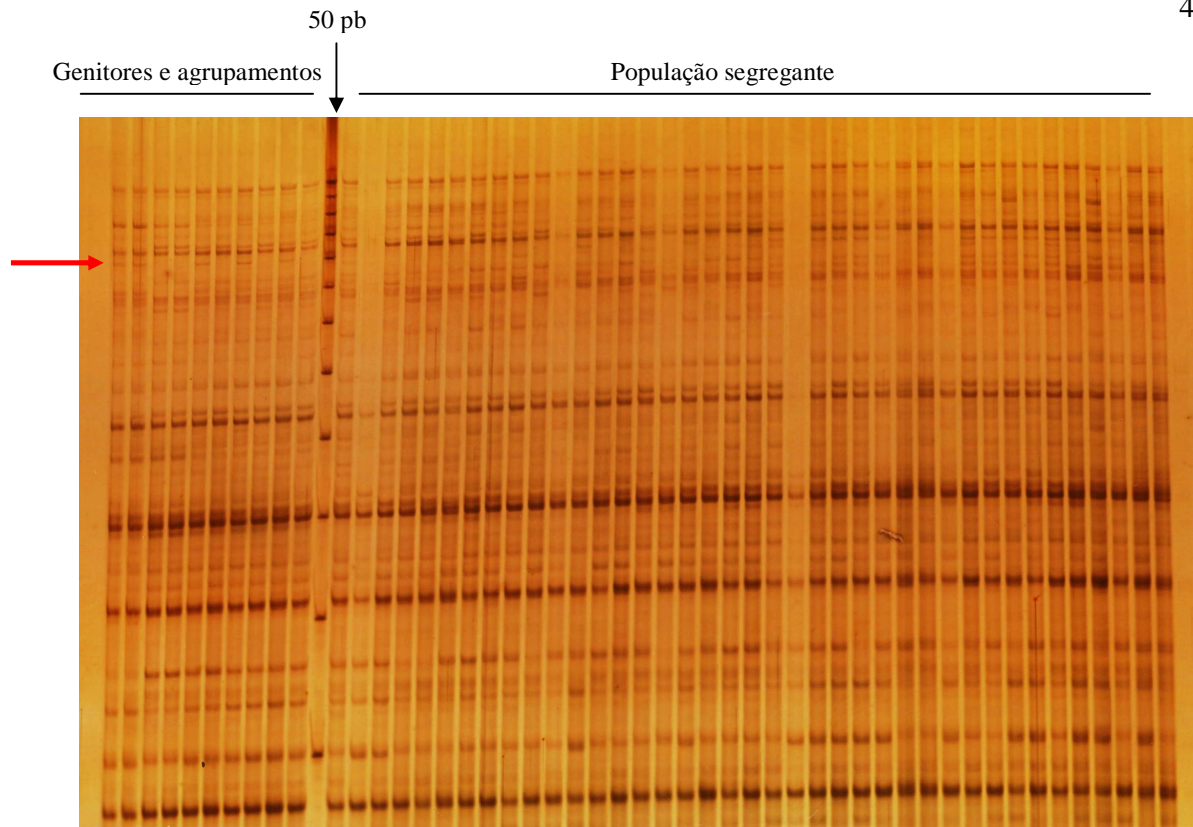


Figura 5 - Faixa de gel da combinação *AluI/NBS3* mostrando a presença e ausência do marcador *Alu I/NBS3* _600 pb (indicado pela seta) nos genitores (em duplicata), nos agrupamentos e a segregação na progênie

2.2.2.3 Análise de co-segregação entre resistência fenotípica e marcadores moleculares

Visando confirmar se os marcadores AFLPs e RGA identificados co-segregavam com marcadores microssatélites que compõe o grupo de ligação 3 do mapa de referência de *Eucalyptus*, 94 indivíduos da população de mapeamento foram genotipados com os 23 marcadores que compõe este grupo. Dos 23 marcadores microssatélites testados apenas 1 (Embra 171) não resultou em produto de amplificação. Dos 22 restantes, 5 mostraram-se não informativos, ou seja, não revelaram polimorfismos entre os genitores (Embra 266, Embra 361, Embra 1139 e Embra 239) e 17 amplificaram alelos distintos e segregaram na população de mapeamento. Destes, 9 foram completamente informativos (segregação 1:1:1:1), 2 informativos apenas para V2 (segregação 1:1), 1 parcialmente informativo e segregou na proporção 1:2:1 (Embra 227) e 5 apresentaram locos duplicados, ou seja, apresentaram mais de 3 alelos (Embra 49, Embra 77, Embra 122, Embra 144 e Embra 181). Estes locos duplicados foram analisados como marcadores dominantes. Todos os locos não duplicados não apresentaram distorção de

segregação. O número de alelos nos locos duplicados variou de 5 a 7 e vários alelos com distorção de segregação foram observados (Tabela 11).

Tabela 11 - Número de alelos amplificados nos locos de microssatélites duplicados e número de alelos com distorção de segregação

Nome do Loco	Número total de alelos amplificados	Número de alelos com distorção de segregação
Embra 49	6	1
Embra 77	6	3
Embra 122	5	1
Embra 144	6	3
Embra 181	7	1

A análise de co-segregação entre marcadores e loco de resistência a ferrugem foi baseada na análise de uma amostra aleatória de 170 indivíduos F₁. Destes indivíduos, 34 foram classificados como N0, 25 como N1, 27 como N2 e 34 como N3. Estes indivíduos foram genotipados com 8 combinações de “primers” de marcadores AFLP (E8M18, E10M21, E10M30, E16M26, E17M6, E20M9, E24M14, E12M32), 1 combinação de enzimas/“primers” degenerados de marcadores RGA (*AluI*/NBS3) e 17 marcadores SSR, que geraram um total de 160 locos (124 marcadores AFLP, 1 marcador RGA e 35 marcadores SSR (locos duplicados e não duplicados).

O mapa integrado construído a partir da análise de co-segregação entre os marcadores e o loco de resistência gerou 11 grupos de ligação (dados não apresentados) contendo 92 marcadores.

O loco de resistência co-segregou com 22 marcadores, incluindo os microssatélites representantes do grupo de ligação 3 (Figura 6). O comprimento deste grupo de ligação foi de 160,7 cM. Os marcadores mais próximos do loco de resistência foram os marcadores AFLP E12M32_165pb e o marcador RGA *AluI*/NBS3_600 pb, distantes 4,3 e 6,8 cM, respectivamente. Todos os marcadores AFLP e o marcador RGA mapeados próximos ao loco de resistência haviam anteriormente revelado polimorfismos entre os agrupamentos das três localidades, indicando que a estratégia de análise de segregantes agrupados foi eficiente para identificar combinações de enzimas e “primers” que maximizassem as chances de amplificar marcadores ligados ao gene, corroborando com os resultados de Junghans et al., (2003b) e Zamprogno, et al., (2008), onde a ASA também foi aplicada com sucesso para identificar marcadores ligados à resistência a

ferrugem em eucalipto. Todos estes marcadores foram mapeados em repulsão com o alelo de resistência.

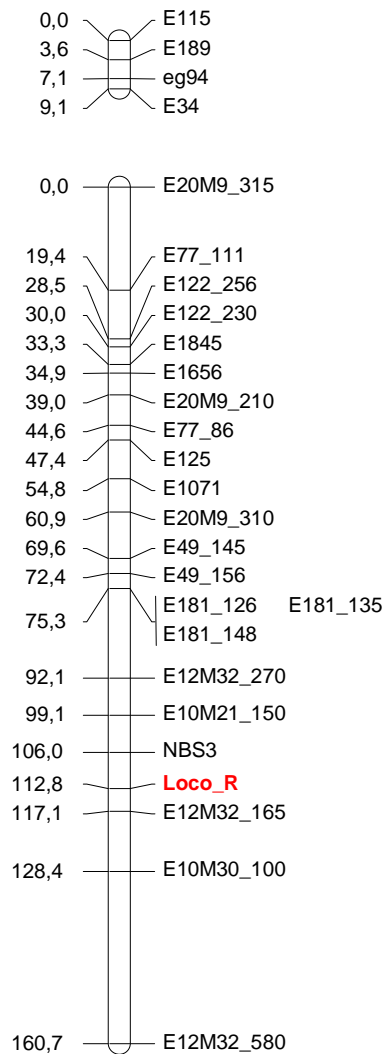


Figura 6 – Mapa integrado para a progênie V2 x V1 mostrando a localização do loco de resistência a ferrugem (Loco R) utilizando marcadores AFLP, RGA e SSR

Entre os marcadores microssatélites, o marcador que mapeou mais próximo do loco de resistência foi o marcador Embra 181, distante 37,5 cM do loco de resistência. A ordem dos marcadores microssatélites foi mantida em relação ao mapa de referência de Brondani et al., (2006). Os marcadores microssatélites Eg 94, Embra 34, Embra 115 e Embra 189 foram

mapeados em um grupo isolado, provavelmente por não existir marcadores polimórficos que permitissem a ligação destes ao restante do grupo de ligação (Figura 6). Os marcadores Embra 350, Embra 227 e Embra 286 não se agruparam a nenhum destes dois grupos de ligação que continham marcadores SSR.

Neste trabalho nós identificamos vários locos microssatélites duplicados, ou seja, locos com mais de três alelos amplificados tanto nos genitores como nos indivíduos da progênie. Como não foi possível definir os alelos de cada loco, cada um foi considerado como um marcador e foram mapeados como se fossem marcadores dominantes. Locos duplicados são geralmente descartados das análises, pois podem resultar em um ordenamento errôneo dos marcadores no mapa de ligação (FRISCH et al., 2004). No entanto, neste trabalho eles foram considerados, principalmente para permitir que um maior número de locos microssatélites fossem mapeados e facilitasse assim o posicionamento do loco de resistência e posterior comparação com informações na literatura. Como a ordem dos marcadores microssatélites foi mantida em relação ao mapa de referência de Brondani et al., (2006), a decisão de manter estes marcadores nas análises foi acertada.

Como relatado em vários trabalhos de mapeamento, principalmente envolvendo híbridos inter-específicos, marcadores com distorção de segregação também foram observados neste trabalho (MARQUES et al., 1998; MYBURG et al., 2003). Cerca de 30% de marcadores AFLP e marcadores microssatélites que amplificaram locos duplicados apresentaram distorção de segregação. Estes marcadores foram retirados da análise de mapeamento para não comprometer a qualidade do mapa. Este fenômeno tem sido atribuído a dois fatores: duplicação de marcadores, quando se manifesta em um ou poucos locos específicos ou a seleção zigótica, quando é detectada em muitos locos ligados (LIANG et al., 2006). Neste trabalho, todos os locos microssatélites com distorção de segregação foram mapeados próximos, o que poderia indicar que algum evento afetou a formação de gametas, confirmando os resultados encontrados por Rosado (2008), que identificou um gene letal localizado no grupo de ligação 3 de eucalipto e que afeta a formação de gametas. Isto poderia estar acontecendo também com a progênie estudada, pois muitos marcadores apresentam locos duplicados e foram mapeados próximos e poderiam explicar os resultados encontrados para a progênie 11 referente ao estudo de herança da resistência.

Neste trabalho, o loco de resistência à ferrugem foi mapeado no mesmo grupo de ligação onde outros três trabalhos relataram a existência de um loco de resistência ao mesmo patógeno

utilizando progênies segregantes fenotipadas em condições controladas. No trabalho de Bueno et al., (2004) onde foi utilizada a mesma progênie onde o loco de resistência *Ppr1* foi identificado por Junghans et al. (2003b), o loco de resistência foi mapeado próximo ao marcador Embra 227 (12 cM). No mapa de Rosado (2007) um QTL para resistência foi mapeado a 0,002 cM do marcador Embra 125 e entre os marcadores Embra 171 e Embra 239, e explicou 42% da variação fenotípica observada. Já no mapa de Alves (2008), o loco de resistência foi mapeado entre os marcadores Embra 239 e Embra 286. Por este motivo, Alves (2008) sugere que este loco seja distinto de *Ppr1* e o denominou de *Ppr2*. Neste trabalho, o loco de resistência foi mapeado na ponta do grupo de ligação 3, próximo ao marcador Embra 181, em um local diferente dos demais locos mapeados. Uma vez que o loco de resistência aqui relatado também foi localizado em uma região diferente de *Ppr1* e *Ppr2*, sugere-se que este seja denominado de *Ppr3*. No entanto, tal denominação é provisória, pois somente testes de alelismos envolvendo os genitores usados nestes trabalhos poderão elucidar se os genes identificados nestes diferentes trabalhos são alelos ou não. Os resultados apresentados nesta tese, referentes ao estudo da herança da resistência a ferrugem, sugerem que a resistência seja controlada por um loco com vários alelos. Com isso, apesar destes trabalhos terem identificados posições diferentes para o loco de resistência, pode-se estar diante de um loco de resistência multialélico.

Como relatado nos trabalhos citados acima, apesar de apenas um loco de resistência à ferrugem ter sido detectado, não se pode descartar a hipótese de que outros locos, de menor efeito, também participem da resposta de resistência à ferrugem, uma vez que a os dados fenotípicos foram obtidos considerando-se apenas duas classes fenotípicas. Nas avaliações de campo, foi observado que algumas plantas classificadas como N2 ou N3, poderiam ser classificadas em pelo menos 4 classes de severidade e não apenas 2. No entanto, para discriminar plantas resistentes e suscetíveis, a escala adotada é válida, pois é rápida e prática, permitindo o descarte de genótipos ruins (suscetíveis) e seleção de genótipos resistentes, além de ter sido útil na identificação de marcadores ligados a um loco de resistência de grande efeito.

O loco de resistência mapeado neste trabalho foi obtido pela análise de indivíduos avaliados em três locais de infecção natural de ferrugem sugerindo que este loco de resistência possui grande efeito e é estável. Apesar do marcador *AluI/NBS3_600pb* ter sido mapeado a 6,8 cM do loco de resistência, esta distância pode ter sido influenciada por erros de fenotipagem, uma vez que os recombinantes identificados eram indivíduos pertencentes as classes N1 e N2, que são

classes fenotípicas intermediárias e passíveis de serem confundidas entre si. Além disso, apesar da seqüência de nucleotídeos deste fragmento ainda não ter sido obtida, devido a problemas de isolamento e re-amplificação, é grande a chance de este marcador mostrar homologia com genes de resistência, uma vez que nos outros trabalhos usando a mesma técnica, todos os fragmentos polimórficos que foram seqüenciados mostraram homologia com seqüências de genes de resistência (Linden, et al., 2004; CALENGE, et al., 2005).

O emprego do marcador *AluI/NBS3_600pb*, que identifica um alelo de suscetibilidade, poderá contribuir para seleção de genótipos resistentes a ferrugem. A utilização deste marcador, especialmente nas etapas iniciais de seleção do programa de melhoramento, onde um grande número de genótipos é avaliado e grandes áreas experimentais têm que ser instaladas, minimizaria os trabalhos envolvidos, pois reduziria o número de genótipos a serem testados, uma vez que a avaliação prévia com o marcador permitiria eliminar muitos genótipos suscetíveis. No entanto, trabalhos de validação, usando outras famílias e/ou um painel de clones, deste marcador deverão ser realizados visando confirmar seu potencial para seleção assistida.

3 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

1. O modo de herança da resistência a ferrugem pode ser explicado por um modelo monogênico e multialélico.

2. Não existe influência citoplasmática no controle deste caráter.

3. Um loco de resistência de efeito principal foi localizado no grupo de ligação 3 do mapa de referência de *Eucalyptus* e designado como *Ppr3*.

4. Variações dentro de cada classe fenotípica, principalmente classes N1 e N2, foram observadas e indicam que genes de efeitos secundários também participam da resposta de resistência.

5. O marcador RGA *AluI/NBS3_600* pb, que marca um alelo de suscetibilidade apresenta potencial de utilização em programas de melhoramento.

6. Marcadores moleculares do tipo AFLP e RGA ligados ao loco de resistência à ferrugem foram identificados.

7. O marcador *AluI/NBS3_600* pb, que possivelmente marca um alelo de suscetibilidade, apresenta grande potencial de utilização na seleção assistida.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C.; DEMUNER, N.L.; BARBOSA, M.M. A ferrugem e as opções de controle. **Correio Agrícola**, São Paulo, v. 1, p.18-20, 1989.
- ALFENAS, A.C., VALLE, L.A.C., XAVIER, A.A., BROMMONSCHENKEL, S.H., GRATTAPAGLIA, D., SILVA, C.C., BERTOLUCCI, F.L., PENCHEL, R. Eucalyptus rust; genetic variability of elite clones and histological characterization of the resistance reaction. **IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypt**. Salvador, v. 2, p.60-64, 1997.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 442p. 2004.
- 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.
- Anuário Estatístico da Abraf 2007 – Disponível em: <http://www.abraflor.org.br>. Acesso em: 20 nov 2008.
- Anuário Estatístico da Abraf 2008 – Disponível em: <http://www.abraflor.org.br> Acesso em: 20 nov 2008.
- APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B.; FURTADO, E.L. Grupos de variabilidade fisiológica em populações de *Puccinia psidii*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, p. 234-238, 2003.
- BENT, A.F.; MACKAY, D. Elicitors, effectors and R genes: The new paradigm and lifetime supply of questions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 399-436, 2007.
- BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. A simple and cost effective method to synthesize a fluorescent labeled internal DNA standard for fragment sizing in an automatic sequencer. **BioTechniques**, Natick, v. 31, p. 793-800, 2001.
- 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.60, n.20, p.1-16. 2006.
- BUENO, N.W.; JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; GRATTAPAGLIA, D. Localized mapping of the *Puccinia psidii* resistance (*Ppr1*) locus in *Eucalyptus* with microsatellite markers. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 50, 2004, Florianópolis. **Anais eletrônicos ...** Ribeirão Preto, SBG, 2004, 1 CD Room..
- BUSCHGES, R.; HOLLRICHER, K.; PANSTRUGA, R.; SIMONS, G.; WOLTER, M.; et al., The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. **Cell**, London, v. 88, p.695–305, 1997.

BYRNE, M.; MURRELL, J.C.; OWEN, J.V.; KRIEDEMANN, P.; WILLIAMS, E.R.; MORAN, G.F. Identification and mode of action of quantitative trait loci affecting seeding height and leaf area in *Eucalyptus nitens*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.94, p.674-681, 1997.

CALENGE, F.; VAN DER LINDEN, E. C. G.; VAN DE WEG, E. E.; SCHOUTEN, H. J.; VAN ARKEL, E. G.; DENANCE, E. C.; DUREL, C. E. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 110, p. 660-668, 2005.

CARVALHO, A. D.O.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; CARMO, M.G.F. Resistance of *Eucalyptus* Species, Progenies and Prevariances to *Puccinia psidii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 139-147, 1998.

CASTRO, H.A.; KRUGNER, T.L.; IDERIHA, C.H.F.; CAPELLO, M.S.C.; MARCHI, A.B. Inoculação cruzada de *Eucalyptus*, goiaba (*Psidium guajava*) e jameiro (*Syzygium jambos*) com *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, p. 491-497, 1983.

COELHO, L. **Variabilidade fisiológica de *Puccinia psidii* – ferrugem do eucalipto**. Tese (Dissertação em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

COELHO, L.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A. Variabilidade fisiológica de *Puccinia psidii* – ferrugem do eucalipto. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, p. 295-300, 2001.

COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, Wageningen, v. 142, p.169-196, 2005.

COOLEY, M.B.; PATHIRANA, S.; WU, H.J.; KACHROO, P.; KLESSIG, D.F. Members of the *Arabidopsis*HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. **Plant Cell**, Baltimore, v.12, p.663–676, 2000.

COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, M.J. ALFENAS, A.C. CROUS, P.W. *Eucalyptus* rust: A disease with the potential for serious international implications. **Plant Disease**, St 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 y silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, p.299-306, 2001.

DEVEY, M.E.; DELFINO-MIX, A.; KINLOCH, B.B.; NEALE, D.B. Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. **Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 2066-2070, 1995.

DIANESE, J.C., MORAES, T.S.A, SILVA, A.R. Response of *Eucalyptus* to field infection by *Puccinia psidii*. **Plant Disease**, St Paul, v. 68, p.314-316, 1984

DIANESE, J.C.; HARIDASAN, N.; MORAES, R.S.A. Screening *Eucalyptus* for rust resistance in Bahia. **Tropical Pest Management**, London, v.32, p. 292-295, 1986.

DOMINGUES, D.S.; FARRO, A.P.C.; COSCRATO, V.E.; MELLO, E.J.; ODA, S.; MARINO, C.L. Identificação de marcador RAPD e SCAR relacionados ao caractere florescimento precoce em *Eucalyptus grandis*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n.3, p.251-260. 2006.

DWEIKAT, I.; ZHANG, W.; OHM, H. Development of STS markers linked to Hessian fly resistance gene H6 in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.105, p. 766–770, 2002.

EDWARDS, J.D.; MCCOUCH, S.R. Molecular markers for use in plant molecular breeding and germoplasm evaluation. In: GUIMARAES, E.P. et al. (Ed.). **Marker-Assisted Selection-Current Status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish**. FAO, Rome, 2007. chap 3, p.28-49.

ELLIS, J.; DODDS, P. PRYOR, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 3, p. 278-284, 2000.

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, p.91-109, 1983.

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

FOOLAD, M.R.; SHARMA, A. Molecular markers as selection tools in tomato breeding. **Acta Horticulture**, The Hague, v. 695, p.225–240, 2005.

FREEMAN, J.S.; POTTS, B. VAILLANCOURT, R.E. Few mendelian genes underlie the quantitative response of a forest tree, *Eucalyptus globulus*, to a natural fungal epidemic. **Genetics**, Austin, v.178, p.563-571, 2008.

FRISCH, M.; QUINT, M.; LUBBERSTEDT, T.; MELCHINGER, A.E. Duplicate marker loci can result in incorrect locus orders on linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.109, p. 305-316, 2004.

FURTADO, G.Q.; CASTRO, H.A.; POZZA, E.A. Variabilidade fisiológica de *Puccinia psidii* Winter em *Eucalyptus grandis* e no híbrido urograndis. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, n.3, p. 227-231, 2005.

GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, p.842-849, 1997.

GLEN, M; ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; WINGFIELD, M.J.; MOHAMMED, C. *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy – a Review. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood , v. 36, p.1-16. 2007.

GODIARD, L.; SAUVIAC, L.; TORII, K.U.; GRENON, O.; MANGIN, B.; Et Al. ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. **The Plant Journal**, Oxford,v.36, p. 353–365, 2003.

GRATTAPAGLIA, D.; BERTOLUCCI, F.L.G; SEDEROFF, R.R. Genetic mapping of QTL controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.90, p.933-947, 1995.

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**, Austin, 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 BIOTECHONOLGY CONFERENCE, 2005. **Anais eletrônicos...**Pretoria: IUFRO, 2005. Poster abstract 5.33. 1 CD Room.

GRATTAPAGLIA, D. Mapas Genéticos, QTLs e Seleção Assistida por Marcadores Moleculares. In: BOREM, A. (Ed.) **Biociencia Florestal**, Viçosa: UFV, 2007, p. 201-230.

GTI Forestry Consulting (2008) – Disponível em: <http://www.git-forestry.com> Acesso em: 10 dez 2008

GUILLET-CLAUDE, C.; BIROLLEAU-TOUCHARD, C.; MANICACCI, D.; ROGOWSKY, P.M.; RIGAU, J.; MURIGNEUX, A., MARTINANT, J.P.; BARRIÈRE, Y. Nucleotide diversity of the *ZmPox3* maize peroxidase gene: Relationships between a MITE insertion in exon 2 and variation in forage maize digestibility. **BMC Genetics**, London, v.60, n.19, p.1-11, 2004.

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.

HAMMOND-KOSACK, K. E; PARKER, J. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 14, p. 177-193, 2003.

HAYASHI, K.; HASHIMOTO, N; DAIGEN, M.; ASHIKAWA, I. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 108, p.1212-1220, 2004.

HAYES, A. J.; SAGHAI MAROOF, M. A. Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 1279-1283, 2000.

- JOHAL, G.S.; BRIGGS, S.P. Reductase activity encoded by the *HMI* disease resistance gene in maize. **Science**, Washington, v. 258, p. 985–987, 1992.
- JONES, D.A.; Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 281-287, 2001.
- JONES, J.D.G.; DANGL., J.L. The plant immune system. Vol 444j16 November 2006doi:10.1038/nature05286. Acesso em: 14 jan 2009.
- JUNGHANS, D.T. **Quantificação da severidade, herança da resistência e identificação de marcadores RAPD ligados a resistência a ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis***. 2000. 44p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.
- 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 2003a.
- 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. 2003b.
- KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**, Washington, v.12, p.172-175, 1944.
- KUCHEL, H.; FOX, R.; REINHEIMER, J.; MOSIONEK, L.; WILLEY, N.; BARIANA, H.; JEFFERIES, S. The successful application of a marker-assisted wheat breeding strategy. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 20, p.295-308, 2007.
- LAWRENCE, G.J.; FINNEGAN, E.J.; AYLIFFE, MA.A.; ELLIS, J.G. The *L6* gene for flax rust resistance is related to the Arabidopsis bacterial resistance gene *RPS2* and tobacco viral resistance gene *N*. **The Plant Cell**, Baltimore , v.7, p.1195-1206, 1995.
- LIANG, X.S.; ZHEN, X., S.; ZHEN, Z.T. Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology**, Cambridge, v.3, p 163-169, 2006.
- LINDEN, C.G. van der; WOUTERS, D.C.A.E.; MIHALKA, V.; KOCHIEVA, E.Z.; SMULDERS, M.J.M.; VOSMAN, B. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 109, p. 384-393, 2004.
- LLORENTE F, ALONSO-BLANCO C, SANCHEZ-RODRIGUEZ C, JORDA L, MOLINA A. ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 43, p.165–180, 2005.
- MACLACHLAN, J.D. A rust of pimento trees in Jamaica. **Phytopathology**, Lancaster, v. 28, p.157-170, 1934.

- MARGARIDO, G. R. A. ; GARCIA, A. A. F. ; SOUZA, A. P. . OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas**, Lund, v. 144, p. 78-79, 2007.
- MARLATT, R.B. & KIMBROUGH, J.W. *Puccinia psidii* on *Pimenta dioica* in South Florida. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 63, p. 510-512, 1979.
- MARQUES, C.N.; 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, n.727-737, 1998.
- MARQUES, C.M.; VASQUEZ-KOOL, J.; CAROCHA, V.J; FERREIRA, J.G.; O'MALLEY, D.M.; LIU, B.H; SEDEROFF, R. Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.99, p.936-946, 1999.
- MARQUES, M.; BRONDANI, V.; GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Conservation and synteny of SSR loci and QTLs for vegetative propagation in four *Eucalyptus* species. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.99, p.936-946, 2002.
- MEKSEM, K.; DOUBLER, T.W.; CHANCHAROENCHAI, K.; NJITI, V.V.; CHANG, S.J.C.; RAO ARELLI, A.P.; CREGAN, P.E.; GRAY, L.E.; GIBSON, P.T.; LIGHTFOOT, D.A. Clustering among loci underlying soybean resistance to *Fusarium solani*, SDS and SCN in near-isogenic lines. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 99, p. 1131-1142, 1999.
- MEYERS, B.C.; KAUSHIK, S.; NANDETY, R.S. Evolving disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 129-134, 2005.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulkd segregant analysis; a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating population. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.88, p.9828-9832, 1991.
- MIKLAS, P.N.; HU, J.; GRUNWALD, N.J.; LARSEN, K.M. 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.
- MISSIAGGIA, A.; PIACEZZI, A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic mapping of *Eefl*, a major effect QTL for early flowering in *Eucalyptus grandis*. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v.1, p.79-84, 2005.
- MORALES, M.; ROIG, E.; MONFORTE, A.J.; ARÚS, P.; GARCIA-MAS, J. Single-nucleotide polymorphisms detected in expressed sequence tags of melon (*Cucumis melo* L.). **Genome**, Ottawa, v. 47, p. 352-360, 2004.

MYBURG, A.A. **Genetic architecture of hybrid fitness and wood quality traits in a wide interspecific cross of *Eucalyptus* tree species**. Tese (Ph.D.) North Carolina State University, Raleigh. 2001.

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 Genetic**, New York, v. 107, p.1028-1042, 2003.

NEWCOMBE, G.; BRADSHAW JR., H.D.; CHASTAGNER, G.A.; STELLER, R.F. A major gene for resistance to *Melampsora medusae* f.sp. *deltoidea* in a hybrid poplar pedigree. **Phytopathology**, Lancaster, v. 86, p. 87-94, 1996.

NGUYEN, B.D.; BRAR, D.S.; BUI, B.C.; NGUYEN, T.V.; PHAM, L.N. NGUYEN, H.T. Identification and mapping of the QTL for aluminum tolerance introgressed from the new sources, *Oryzae rufipogon* Griff., into indica rice *Oryzae sativa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 106, p.583-593. 2002.

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

PFLIEGER, S.; LEFEBVRE, V.; CAUSSE, M. The candidate gene approach in plant genetics: a review. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.7, p.275-291, 2001.

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.

ROSSI, M.; GOGGIN, F.L.; MILLIGAN, S.B.; KALOSHIAN, I.; ULLMAN, D.E.; WILLIAMSON, V.M. The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. **Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 9750–9754, 1998.

ROUPPE VAN DER VOORT, J; KANYUKA, K; VAN DER VOSSEN, E.; BENDAHMANE, A.; MOOIJMAN, P.; KLEIN-LANKHORST, R.; STIEKEMA, W.; BAULCOMBE, D.; BAKKER, J. Tight physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 into cultivated potato. **Molecular Plant Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 12, p. 197-206, 1999.

SILVEIRA, R.L.V.A.; HIGASHI, E.N. Aspectos nutricionais envolvidos na ocorrência de doenças com ênfase para o eucalipto. **Circular Técnica IPEF**, Piracicaba n.200, p. 1-13, dezembro 2003.

Sociedade Brasileira de Silvicultura (2006) – Disponível em:
<http://www.sbs.or.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>. Acesso em: 11/11/2008.

STAHL, E.A.; BISHOP, J.G. Plant-pathogen arms races at the molecular level. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 299–304, 2000.

SYED, N.H.; SORENSEN, A.P.; ANTONISE, R.; VAN DE WIEL, C.; VAN DER LINDEN, C.G.; VAN'T WESTENDE, W.; HOOFTMAN, D.A.P.; DEN NIJS, H.C.M.; FLAVELL, A.J. A detail linkage map of lettuce based on SSAP, AFLP and NBS markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 112, p. 517-527. 2006.

TAKAHASHI, S.S. **Ferrugem do eucalipto: Índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionados à intensidade da doença no campo**. 2002. (Dissertação de mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Campus de Botucatu. Botucatu, UNESP. 2002. 101p.

TELECHEA, N.; ROLFO, M.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, M.J. *Puccinia psidii* on *Eucalyptus globulus* in Uruguay. **Plant Pathology**, London, v.52, p.427, 2003.

THAMARUS, K.A.; GROOM, K.; BRADLEY, A.; RAYMOND, C.A.; SCHILECK, L.R.; WILLIAMS, E.R.MORAN, G.F. Identification of quantitative trait loci for wood and fiber properties in two full-sib progenies of *Eucalyptus globulus*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.190, p.8569-864. 2004.

TROGNITZ, F.; MANOSALVA, P.; GYSIN, R.; NIÑO-LIU, D.; SIMON, R.; HERRERA, M.R.; TROGNITZ, B.; GHISLAIN, M.; NELSON, R. Plant Defense Genes Associated with Quantitative Resistance to Potato Late Blight in *Solanum phureja* × Dihaploid *S. tuberosum* Hybrids. **Molecular Plant Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 15, n. 6, p.587-597. 2002.

TYRKA, M; BLASZCZYK, L.; CHELKOWSKI, J.; LIND, V.; KRAMER, I.; WEILEPP, M.; WIŚNIEWSKA, H.; ORDON, F. Development of the single nucleotide polymorphism marker of the wheat *lr1* leaf rust resistance gene. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Przybyszewskiego, v. 9, p. 879-889, 2004.

VERHAEGEN, D.; PLOMION, C. Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers. **Genome**, Ottawa, v. 39, p.1051-1061, 1996.

VERHAEGEN, D.; PLOMION, C.; GION, J.M.; POITEL, M.; COSTA, P.; KREMER, A. Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers, 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression cross different ages. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, p.597-608, 1997.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprint. **Nucleic Acids Research**, London, 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**, New York, v. 61, p.349-63, 2002.

XAVIER, A.A. **Histopatologia da interação *Puccinia psidii* e virulência de isolados do patógeno em espécies de *Mirtaceae***. 2002. 71p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 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. 53p. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Campus de Botucatu. Botucatu, UNESP. 2005.

ZAMPROGNO, K.C.; FURTADO, E.L.; MARINO, C.L.; BONINE, C.A.V.; DIAS, D.C. Utilização de análise de segregantes agrupados na identificação de marcadores ligados a genes que controlam resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus* spp. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n.3, p. 253-255, 2008.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. New Jersey: Upper Saddle River, 1996. 662p.

ZAUZA, E.A.V. **Epidemiologia da ferrugem do eucalipto e resistência genética**. 2007. 67p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.