

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**SELEÇÃO FENOTÍPICA E IDENTIFICAÇÃO DE SNPs EM
REGIÕES GENÔMICAS LIGADOS A RESISTÊNCIA À FERRUGEM
EM *Eucalyptus grandis***

GLEICE VIVIANE NUNES PEREIRA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutora
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP
Março 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**SELEÇÃO FENOTÍPICA E IDENTIFICAÇÃO DE SNPs EM
REGIÕES GENÔMICAS LIGADOS A RESISTÊNCIA À FERRUGEM
EM *Eucalyptus grandis***

GLEICE VIVIANE NUNES PEREIRA

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Co-orientador: Prof. Dr. Celso Luis Marino

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutora
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP
Março 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

P436s Pereira, Gleice Viviane Nunes, 1985-
Seleção fenotípica e identificação de SNPs em regiões genômicas ligados a resistência à ferrugem em *Eucalyptus grandis* / Gleice Viviane Nunes Pereira. - Botucatu : [s.n.], 2015
xiv, 91 f. : fots. color., grafs., ils. color., tabs. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2015
Orientador: Edson Luiz Furtado
Coorientador: Celso Luis Marino
Inclui bibliografia

1. Eucalipto - Doenças e pragas. 2. Eucalipto - Resistência a doenças e pragas - Aspectos genéticos. 3. Ferrugem nas árvores. I. Furtado, Edson Luiz. II. Marino, Celso Luis. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "SELEÇÃO FENOTÍPICA E IDENTIFICAÇÃO DE SNPs EM REGIÕES GENÔMICAS
LIGADAS A RESISTÊNCIA À FERRUGEM EM *Eucalyptus grandis*"

AUTORA: GLEICE VIVIANE NUNES PEREIRA

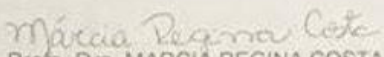
ORIENTADOR: Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. CELSO LUIS MARINO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA
(PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO

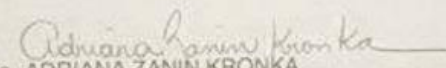
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu


Prof. Dra. MARCIA REGINA COSTA

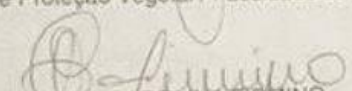
Instituto de Ciências Agrárias - UFVJM


Prof. Dr. QUELMO SILVA DE NOVAES

Fitotecnia e Zootecnia / UESB


Prof. Dra. ADRIANA ZANIN KRONKA

Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu


Prof. Dra. ANA CAROLINA FIRMINO

Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

Data da realização: 26 de março de 2015.

À Hilda Rosa de Jesus, minha amada avó, pelo amor incondicional e pelas suas orações que sempre me fortaleceram e me fizeram acreditar que acima de qualquer dificuldade existe um Deus maravilhoso, e nada acontece se não for por sua vontade.

OFEREÇO

Aos meus amados pais, Vilma Nunes e Geraldo Pereira, por todo amor, incentivo, confiança e por seus ensinamentos. Tudo que sou hoje agradeço a vocês.

Ao meu querido irmão Maykon Pereira, pelas palavras de incentivo, apoio, e por ser meu amigo de todas as horas.

Família minha base!!!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha fonte inesgotável de força, paz e fé. Obrigada pai por tudo que o senhor me proporcionou e por não me deixar desistir, quando achei que não conseguiria mais;

Aos meus pais Vilma Nunes e Geraldo Pereira pelo incentivo e pelas palavras de conforto, que mesmo à distância sempre me mantiveram forte nos momentos difíceis. Agradeço a vocês por serem meus exemplos de vida;

Ao meu irmão Maykon Pereira, pelo carinho, compreensão, e apoio constante;

Às minhas queridas avós, Hilda Rosa e Eudésia Limeira (*in memorian*), por todo amor, afeto e dedicação;

Às minhas tias, Fernanda Freitas; Cleide Freitas; Nilza Rosa, Lourdes Rosa e Andrea Freitas, pelo grande apoio durante toda minha vida;

Aos meus priminhos, Emny Dias e Pedro Henrique, por preencherem minha vida com sua alegria;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Luiz Furtado, pela disponibilidade em me orientar, por tantos conhecimentos transmitidos, e pela confiança depositada em meu trabalho;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Celso Luis Marino, pela colaboração na execução desse trabalho;

À Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Costa, pela fundamental contribuição na minha formação acadêmica, e por prontamente aceitar participar de mais essa etapa da minha vida;

Ao Prof. Dr. Quelmo Silva de Novaes, pela colaboração e incentivo para realização do curso de doutorado;

À Prof^a. Dr^a. Adriana Zanin Kronka, pela convivência e exemplo de profissional;

À Dr^a. Ana Carolina Firmino, pela valiosa contribuição para melhoria desse trabalho;

À Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, em especial ao programa de Pós-Graduação em Agronomia – Proteção de Plantas, pela oportunidade e por toda contribuição;

À CAPES, pela concessão da bolsa;

Ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF, pela gentileza em disponibilizar mudas para a realização do experimento, e em especial à Aline Miranda, pelo grande apoio;

À empresa Suzano Papel e Celulose, por ter disponibilizado área para condução do trabalho, em especial ao Fabiano Bida e Edson Diniz pelo auxílio nos trabalhos de campo e por estarem prontamente disponíveis durante todas as atividades;

À empresa Dimafran, em especial à Carina e sua equipe, pelo apoio nas avaliações de campo;

Ao Dr. Leo Zimbak, pelos conhecimentos compartilhados;

Ao Laboratório de Genética do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu, em especial à Vanusa Leite e ao Leonardo Curi, por toda disponibilidade, apoio na condução e análises dos experimentos;

A todos do Laboratório de Patologia Florestal da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu, especialmente à Marília Pizzeta e Thiago Tássio (Pará), pela amizade, e pelos momentos de diversão, alegrias e sorrisos compartilhados durante nossas confraternizações;

À minha querida amiga Paulinha, pela sua amizade sincera, companheirismo, palavras de conforto quando mais precisei e por ter me emprestado a sua família, a qual me acolheu de todo coração. Obrigada por terem tornado os meus dias mais felizes em Botucatu;

À querida Marylia Gabriella, pela amizade que construímos durante o doutorado e que tenho certeza que se fortalecerá mesmo à distância. Agora você faz parte da minha história;

À Glauce Portela, pela amizade, companheirismo e por ajudar na minha adaptação em Botucatu;

À Ivana Ferraz, pelo apoio durante as avaliações de campo e contribuição nas análises estatísticas do experimento;

À Patrícia Leite e Ivana Ferraz, pela amizade, respeito, confiança e companhia de todos os dias;

À Françoise Lima, Susiane Moura e Patrícia Leite, pelo companheirismo, apoio e por terem me acolhido em Botucatu;

À Aline Fernanda, Amanda Rodrigues, Ivana Fernandez, Ivana Ferraz, Laís Cristina, Marylia Gabriella, Patrícia Leite, Paula Leite e Rafaela Morando, pelo companheirismo, apoio, convívio e pelos momentos de descontração, sorrisos e alegrias durante as nossas reuniões;

Aos meus amigos Bruno Ramos, Bruna Madureira, Alexandre Silva, Thallyta Mendes, Cristiane Ramos, pela amizade, apoio, e palavras de incentivo. Vocês me mostraram que mesmo à distância nossa amizade permanece;

A todos os professores de Pós-Graduação em Agronomia – Proteção de Plantas, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados;

A todos os funcionários do Departamento de Proteção Vegetal, especialmente à Lu e Maria, pelo carinho, dedicação e gentileza;

A todos os funcionários da Biblioteca “Paulo de Carvalho Mattos”, pela gentileza e dedicação;

A todos os familiares e amigos, pela torcida e por compreender a minha ausência durante tantos momentos importantes;

E a todos, que de alguma forma contribuiu para que esse momento se tornasse realidade,

Obrigada!!!

Penso que...

Eu sozinho não sou ninguém;

Três coisas são fundamentais a todo ser humano: respeito ao outro, solidariedade e tolerância;

O tempo e a distância não nos separam de quem amamos verdadeiramente;

O estudo é fundamental para aqueles que desejam um futuro melhor;

Nossa vitória é do tamanho de nossa luta;

O que o estudo oferece de mais significativo é a possibilidade de compartilhar conhecimentos;

Planejar e alcançar objetivos, superando as adversidades, é algo gratificante;

Acreditar que dias melhores virão, às vezes, é a única saída;

O respeito à diferença é um valor capaz de diminuir a violência;

Agradecer a Deus por uma conquista é algo muito prazeroso;

Só alcançaremos a tal felicidade quando nos encorajarmos a modificar o nosso triste caminhar.

(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
RESUMO.....	1
SUMMARY	3
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1 Gênero <i>Eucalyptus</i>	8
2.1.1 Aspectos gerais e importância	8
2.2 A ferrugem do eucalipto - <i>Puccinia psidii</i>	9
2.3 Resistência genética.....	11
2.4 Melhoramento visando à resistência à ferrugem	14
2.5 Marcadores moleculares	14
2.6 SNP - Single Nucleotide Polymorphism	15
2.7 Quitinase	16
2.8 1,3 β -glucanase	18
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO 1 - SELEÇÃO FENOTÍPICA PARA RESISTÊNCIA À FERRUGEM EM PROGÊNIES F₁ DE <i>Eucalyptus grandis</i>	27
RESUMO.....	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
Caracterização da área experimental e material genético	31

População inicial.....	31
População F ₁	32
Avaliação da resistência à ferrugem	35
Estimativa dos parâmetros genéticos e estatísticos.....	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
Seleção fenotípica para resistência a <i>Puccinia psidii</i> em progênies F ₁ de <i>Eucalyptus grandis</i> avaliadas sob condições naturais de infecção.....	39
Parâmetros genéticos para resistência a <i>Puccinia psidii</i> em progênies F ₁ de <i>Eucalyptus grandis</i> avaliadas sob condições naturais de infecção.....	51
Ganho na seleção para resistência à <i>Puccinia psidii</i> em progênies F ₁ de <i>Eucalyptus grandis</i> avaliadas sob condições naturais de infecção.....	58
CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS	60
CAPÍTULO 2 - IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA EM GENES RELACIONADOS COM A RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO EUCALIPTO.....	64
RESUMO.....	65
ABSTRACT	65
INTRODUÇÃO	66
MATERIAL E MÉTODOS	67
Material vegetal	67
Extração e quantificação do DNA	68
Quantificação e diluição do DNA.....	69
Procura das enzimas relacionadas com resistência à ferrugem	69
Seleção dos iniciadores específicos e condições de amplificação	69
Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento.....	70
Alinhamento das sequências.....	70
Análises dos SNPs	70

Análise da diversidade	70
RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
Enzimas encontradas e relacionadas ao gene que confere resistência à ferrugem	71
Busca de homólogos para as enzimas quitinase e 1,3 β -glucanase em banco de dados de eucalipto	73
Amplificação dos oligonucleotídeos específicos	73
Análise <i>in silico</i> das sequências correspondentes aos genes quitinase e 1,3 β -glucanase no banco de dados do eucalipto	78
Identificação e classificação dos SNPs no gene quitinase em eucalipto	78
Identificação e classificação dos SNPs no gene 1,3 β -glucanase em eucalipto.....	84
Análise da diversidade	87
CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.1. Genótipos iniciais de <i>Eucalyptus grandis</i> selecionados para avaliação da resistência parcial à ferrugem na F ₁ , Itararé-SP, 2014.....	33
Tabela 1.2. Porcentagem dos genótipos iniciais de <i>Eucalyptus grandis</i> e geração F ₁ em cada classe de severidade da ferrugem avaliadas sob condições de campo no experimento 1 no município de Itararé-SP. Itararé-SP, 2014.	41
Tabela 1.3. Porcentagem dos genótipos de <i>Eucalyptus grandis</i> e geração F ₁ em cada classe de severidade da ferrugem avaliadas sob condições de campo no experimento 2 no município de Itararé-SP, Itararé-SP, 2014.....	43
Tabela 1.4. Média da comparação entre as classes de ferrugem dos genótipos iniciais e das médias da população F ₁ em cada avaliação realizada no experimento 1. Itararé-SP, 2014.	46
Tabela 1.5. Média da comparação entre as classes de ferrugem dos genótipos iniciais e das médias da população F ₁ em cada avaliação realizada no experimento 2. Itararé-SP, 2014.	49
Tabela 1.6. Repetibilidade e coeficiente de determinação dos efeitos permanentes. Itararé-SP, 2014.	52
Tabela 1.7. Estimativas de parâmetros genéticos para avaliação da resistência à ferrugem em progênies F ₁ de <i>Eucalyptus grandis</i> no experimento 1, Itararé-SP, 2014.	53
Tabela 1.8. Estimativas de parâmetros genéticos para avaliação da resistência à ferrugem em progênies F ₁ de <i>Eucalyptus grandis</i> no experimento 2, Itararé-SP, 2014.	54
Tabela 1.9. Análise de teste da razão de verossimilhança (LTR) (Deviance), para análise conjunta das avaliações dos dois experimentos. Itararé-SP, 2014.....	55
Tabela 1.10. Estimativas de parâmetros genéticos para avaliação da resistência à ferrugem em progênies F ₁ de <i>Eucalyptus grandis</i> em análise conjunta, Itararé-SP, 2014.	56

Tabela 1.11. Seleção das progênies de <i>Eucalyptus grandis</i> utilizando a quarta avaliação e o Índice de Multi-efeitos (IME) com base na resistência à ferrugem nos dois experimentos, Itararé-SP, 2014.....	58
TABELA 2.1: Genótipos utilizados para identificação dos SNPs, Botucatu-SP, 2015.....	68
TABELA 2.2: Enzimas selecionadas por meio do banco de dados do GenBank. São apresentados o EC-Number das enzimas, nome das enzimas, espécie obtida, número de identificação no GenBank, acesso no Tair e referência atual sobre as enzimas.....	73
TABELA 2.3: <i>Primers</i> , “forward” e “reverse”, utilizados para amplificar o gene quitinase e 1,3 β -glucanase, em eucalipto. Identidade dos <i>primers</i> ; temperatura de pareamento ($^{\circ}$ C); tamanho do fragmento amplificado, em pares de base (pb); e as sequências de cada <i>primer</i>	75
TABELA 2.4: Resultado do BlastX com a sequência alinhada, obtida na amplificação dos dois pares de <i>primers</i> construídos para cobrir todo o gene quitinase. São apresentados: Número de acesso no Genbank, nome da enzima e organismo possuidor, score e máxima identidade.	77
TABELA 2.5: Resultado do BlastX com a sequência alinhada, obtida na amplificação dos três pares de <i>primers</i> construídos para cobrir todo o gene 1,3 β -glucanase. São apresentados: Número de acesso no Genbank, nome da enzima e organismo possuidor, score e máxima identidade.	78
TABELA 2.6: SNPs polimórficos obtidos a partir do sequenciamento de genótipos de <i>Eucalyptus grandis</i> , suas posições e as modificações resultantes, utilizando o <i>primer</i> CH1.....	80
TABELA 2.7: SNPs polimórficos obtidos a partir do sequenciamento de genótipos de <i>Eucalyptus grandis</i> , suas posições e as modificações resultantes, utilizando o <i>primer</i> CH2.....	81
TABELA 2.8: Número e porcentagem de transições e transversões detectadas na análise de SNPs utilizando os <i>primers</i> CH1 e CH2.....	83
TABELA 2.9: SNPs polimórficos obtidos a partir do sequenciamento de genótipos de <i>Eucalyptus grandis</i> , suas posições e as modificações resultantes, utilizando o <i>primer</i> Glu1.....	84

TABELA 2.10: SNPs polimórficos obtidos a partir do sequenciamento de genótipos de <i>Eucalyptus grandis</i> , suas posições e as modificações resultantes, utilizando o <i>primer</i> Glu2.....	85
TABELA 2.11: SNPs polimórficos obtidos a partir do sequenciamento de genótipos de <i>Eucalyptus grandis</i> , suas posições e as modificações resultantes, utilizando o <i>primer</i> Glu3.....	85
TABELA 2.12: Número e porcentagem de transições e transversões detectadas na análise de SNPs utilizando os <i>primers</i> Glu1, Glu2, Glu3.....	86
TABELA 2.13: Diversidade nucleotídica para os genes da quitinase e 1,3 β -glucanase....	87

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. Mudanças de <i>Eucalyptus grandis</i> selecionadas para plantio em campo, A- mudas semeadas em tubetes; B- plantas germinadas; C- mudas selecionadas e identificadas. Itararé-SP, 2014.	34
Figura 1.2. Dados meteorológicos do município de Itararé-SP, obtidos durante as avaliações da resistência à ferrugem no período de agosto a dezembro de 2014. Itararé-SP, 2014.	35
Figura 1.3. Escala de notas para avaliação da resistência à ferrugem do eucalipto no campo, onde: 0 = ausência de esporulação ou planta sadia; I = pústulas puntiformes isoladas nos limbos e folhas novas; II = esporulação mais abundante nos limbos e folhas novas; III = esporulação intensa em ambas as faces das folhas, podendo ocorrer em pecíolos e hastes jovens, modificada de Zamprogno et al., (2008). Itararé-SP 2014.	36
Figura 1.4. A- progênies F ₁ de <i>Eucalyptus grandis</i> com sintoma S2; B-sintoma S3, aos 120 dias após o plantio. Itararé, 2014.	42
Figura 1.5. Distribuição das plantas dos genótipos iniciais e F ₁ classificadas dentro das quatro classes de severidade da ferrugem na quarta avaliação realizada em Itararé-SP, Itararé-SP, 2014.	44
 FIGURA 2.1: Ilustração retirada do site de rotas metabólicas de plantas <i>Plantcyc</i> , mostrando a atuação da enzima quitinase na formação da quitina.	 71
FIGURA 2.2: Ilustração retirada do site de rotas metabólicas <i>KEGG</i> mostrando a atuação da enzima 1,3 β-glucanase na formação da 1,3 β-glucana.	72
FIGURA 2.3: Teste de amplificação do <i>primer</i> Glu3 em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.	74
FIGURA 2.4: Eletroferograma parcial, mostrando a ótima qualidade das sequências amplificadas pelos <i>primers</i> (A) CH1, (B) CH2, (C) Glu3.	76
FIGURA 2.5: Alinhamento realizado pelo programa ChromasPro versão 1.42, comparando indivíduos divergentes na procura de SNPs. A região	

destacada em vermelho mostra a localização dos SNPs nos indivíduos que possuem alelos em homozigose e heterozigose (A), e indivíduos que possuem alelos diferentes em homozigose (B). 79

SELEÇÃO FENOTÍPICA E IDENTIFICAÇÃO DE SNPs EM REGIÕES GENÔMICAS LIGADOS A RESISTÊNCIA À FERRUGEM EM *Eucalyptus grandis*.

Botucatu, 2015. 105 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

Autora: GLEICE VIVIANE NUNES PEREIRA

Orientador: Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO

Co-orientador: Prof. Dr. CELSO LUIS MARINO

RESUMO

Amplamente disseminada pelo Brasil, causando enormes prejuízos em viveiros e plantios comerciais, a ferrugem do eucalipto, incitada por *Puccinia psidii*, é atualmente umas das principais doenças da cultura do eucalipto. A busca por progênies resistentes é facilitada quando existem informações a respeito do controle genético da resistência e estratégias de seleção, como a seleção assistida por marcadores moleculares. Assim, objetivou-se estimar parâmetros genéticos, avaliar o ganho genético por meio da seleção para resistência parcial à ferrugem causada por *P. psidii* em progênies F₁ de *Eucalyptus grandis*, bem como a identificação de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) nos genes quitinase e 1,3 β -glucanase relacionados à resistência. O trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo foi realizado no município de Itararé-SP, onde foram instalados dois experimentos com 88 progênies F₁ de *Eucalyptus grandis*. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro

repetições, sendo cinco plantas por parcela, totalizando 1760 plantas por campo experimental. Aos 30 dias após o plantio, foi realizada a primeira avaliação quanto à ocorrência da ferrugem, mediante a escala de notas. Foram realizadas quatro avaliações mensais no período de setembro a dezembro de 2014. As estimativas dos componentes de variância e parâmetros genéticos foram obtidas pelo método REML/BLUP, empregando-se o programa genético-estatístico SELEGEN-REML/BLUP. Os parâmetros genéticos encontrados demonstraram pouca variabilidade genética e alta resistência à ferrugem. Os ganhos de seleção foram satisfatórios para essa fase da seleção. O segundo capítulo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular, pertencente ao Departamento de Genética do Instituto de Biociências, da UNESP, *câmpus* de Botucatu. Foram escolhidos dois genes relacionados com a resistência à ferrugem e confeccionados cinco pares de “primers” para flanquear as regiões de tais genes, sendo eles a quitinase e 1,3 β -glucanase. Em seguida, as sequências foram alinhadas e os SNPs encontrados. Foram detectados 53 SNPs em uma sequência de 1193 pb para o gene quitinase, e 24 SNPs em uma sequência de 3564pb, para o gene 1,3 β -glucanase. Não houve relação entre as mutações encontradas com a classe de severidade da ferrugem. Os 15 genótipos de *Eucalyptus grandis* analisados formaram 11 haplótipos para o gene quitinase e 12 para o gene 1,3 β -glucanase.

Palavras-chave: Eucalipto; Ganho genético; Genes de resistência.

PHENOTYPIC SELECTION AND IDENTIFICATION OF SNPs IN GENOMIC REGIONS ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO RUST IN *Eucalyptus grandis*.

Botucatu, 2015. 105 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista.

Author: GLEICE VIVIANE NUNES PEREIRA

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

Co-adviser: CELSO LUIS MARINO

SUMMARY

Widely disseminated in Brazil, causing huge losses in nurseries and commercial plantations, eucalyptus rust, incited by *Puccinia psidii*, is currently one of the main diseases of eucalyptus plantation. The search for resistant progenies is facilitated when information regarding the genetic control of resistance and selection strategies as an assisted selection by molecular markers are available. This study objective was to estimate genetic parameters, assess the genetic gain by selection for partial resistance to rust caused by *P. psidii* in *Eucalyptus grandis* of F₁ progenies, as well as identification of SNPs (single nucleotide polymorphisms) in genes chitinase and β -1,3-glucanase related to resistance. This study was divided into two chapters. The first chapter was conducted in the city of Itararé-SP, which were installed two experiments with 88 F₁ progenies of *Eucalyptus grandis*. The experimental design utilized was a randomized complete block design with four replications and five plants per plot, totaling 1760 plants per experimental field. At 30 days after planting was carried out the first assessment regarding the occurrence of rust, by the rating scale. Four monthly evaluations were carried out from September to December

2014. Estimates of variance components and genetic parameters were obtained by REML/BLUP, method using the genetic-statistical program SELEGEN-REML/BLUP. Genetic parameters found demonstrated a low genetic variability and high resistance to rust. The selection gains were satisfactory for this stage of selection. The second chapter was conducted at the Laboratory of Biotechnology and Molecular Genetics, part of the Genetics Department of the Biosciences Institute, UNESP, *campus* of Botucatu. We chose two genes related to resistance to rust and made five pairs of "primers" to flank regions of such genes, being them chitinase and β -1,3-glucanase. Then the sequences were aligned and the SNPs found. 53 SNPs were identified in a sequence of 1193 bp for chitinase gene, and 24 SNPs in a 3564pb sequence for the β -1,3-glucanase gene. There was no relation between the mutations found with the disease severity class. 15 *Eucalyptus grandis* genotypes assessed formed 11 haplotypes genes for the chitinase and 12 genes for β -1,3-glucanase.

Keywords: *Eucalyptus*; Genetic gain; Resistance genes.

1 INTRODUÇÃO

As principais espécies usadas no reflorestamento pertencem ao gênero *Eucalyptus*, devido à facilidade de propagação, ao rápido desenvolvimento e às múltiplas finalidades de utilização da madeira produzida. Os plantios de eucalipto suprem hoje, no Brasil, a demanda por madeira com propriedades tecnológicas e silviculturais específicas de diversos setores industriais, como o de papel e celulose, carvão vegetal, postes, moirões de cerca e, mais recentemente, o de madeira serrada (ABRAF, 2013).

A incidência de várias doenças na cultura do eucalipto, aliada à inexistência de cultivares resistentes, tem causado danos severos na produtividade e prejuízos para o setor florestal, economicamente importante para o Brasil. Dentre as doenças consideradas importantes para o cultivo do eucalipto no Brasil, destacam-se a ferrugem, incitada pelo fungo *Puccinia psidii* Winter (FERREIRA, 1989).

A ferrugem só ataca plantas jovens, com menos de dois anos de idade, sempre em órgãos tenros (primórdios foliares com seus pecíolos, terminais de galhos e haste principal), seja no viveiro ou no campo (FURTADO et al., 2009).

Devido à ampla variabilidade genética inter e intraespecífica do gênero *Eucalyptus*, a forma mais empregada de controle do patógeno é a utilização de materiais resistentes ou com rápido crescimento, nesse 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 (ZAUZA, 2007).

Tradicionalmente, tem-se usado genes maiores de resistência, à ferrugem do eucalipto, com grande efeito sobre o fenótipo, os quais são rapidamente superados após o lançamento de novos clones, devido à alta variabilidade e elevada taxa de mutação do patógeno. Dessa forma, novas estratégias são necessárias para a obtenção de cultivares com resistência durável, isto é, que permaneçam resistentes por longo período, mesmo que o ambiente seja propício à doença e o patógeno esteja presente.

A resistência horizontal tem sido sugerida como uma alternativa de resistência mais durável. Trata-se de um tipo de resistência parcial, geralmente condicionada por genes menores, em que, embora o hospedeiro apresente reação de suscetibilidade, verifica-se uma baixa taxa de progresso da doença (PARLEVLIET, 1979).

As empresas do setor florestal vêm, nos últimos anos, desenvolvendo programas de melhoramento visando à obtenção de materiais vegetais com resistência duradoura à ferrugem, uma vez que um dos fatores que dificultam esse processo é o longo tempo necessário para cada ciclo de seleção. A incorporação de técnicas de biologia molecular em programas de melhoramento genético de diferentes culturas vem demonstrando eficiência na redução do tempo necessário para seleção desses materiais.

No caso específico de *P. psidii*, uma estratégia para auxiliar nos programas de melhoramento é a utilização de marcadores moleculares ligados a genes que conferem resistência, uma vez que conhecer a resposta de resistência a essa doença, é de extrema importância, a fim de embasar a seleção de progênies resistentes. Um tipo de marcador molecular que tem sido bastante utilizado, a partir do crescimento dos projetos de sequenciamento em larga escala, são os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de base única).

O SNP é uma variação na sequência do DNA, resultante da diferença de um único nucleotídeo que leva a diferentes alelos entre membros de uma mesma espécie (ZHU et al., 2003). Os SNPs constituem o tipo de variação mais abundante nos genomas eucariotos, e podem ser encontrados tanto em regiões codificantes como não codificantes (LIAO; LEE, 2010).

Além dessas formas de manejo da doença, citadas anteriormente, as plantas possuem seus próprios mecanismos de defesa, onde a resistência de plantas contra fitopatógenos está associada a um conjunto de respostas de defesa ativadas pelo hospedeiro após o contato com agentes patogênicos. Estudos têm demonstrado que a super expressão de genes de quitinases e 1,3 β -glucanase em plantas, tem aumentado a resistência dessas

plantas a patógenos, uma vez que a enzima catalisa a hidrólise dos polímeros quitina e 1,3 β -glucana respectivamente, componentes principais das paredes celular dos fungos. Tais enzimas possuem a capacidade potencial de degradar parcialmente as paredes celulares de muitos fungos, liberando oligossacarídeos, muitos dos quais com atividade elicitora dos sistemas de defesa das plantas (BOAVA et al., 2010).

Assim, o trabalho teve por objetivo estimar parâmetros genéticos, avaliar o ganho genético por meio da seleção para resistência parcial à ferrugem causada por *P. psidii* em progênies F₁ de *Eucalyptus grandis*, bem como a identificação de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) nos genes quitinase e 1,3 β -glucanase relacionados à resistência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Eucalyptus*

2.1.1 Aspectos gerais e importância

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e possui como centro de origem a Austrália e regiões próximas, como Timor, Indonésia, Papua Nova Guiné, Molucas, Irian Jaya e sul das Filipinas, em uma faixa compreendida entre latitudes 9° N e 44° S (ELDRIDGE et al., 1994). Apresenta uma ampla plasticidade e dispersão mundial, crescendo satisfatoriamente em diferentes situações edafoclimáticas, extrapolando àquelas das regiões de origem (SANTOS et al., 2001). O nome eucalipto deriva do grego: eu (=bem) e kalipto (=cobrir), referindo-se à estrutura globular arredondada de seu fruto, caracterizando o opérculo que protege bem as suas sementes. Existem cerca de 500 a 700 espécies de eucalipto descritas, além de muitas subespécies e alguns híbridos naturais (BERTOLUCCI et al., 1995).

O gênero está subdividido, taxonomicamente, em oito subgêneros informais, segundo Pryor (1976). O sub-gênero *Symphyomyrtus* é o grupo que engloba a maior parte das espécies cultivadas no mundo, apresentando nove seções, das quais três contêm praticamente todas as espécies mais cultivadas como exótica: Seção Transversaria (*E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*); Seção Exsertaria (*E. camaldulensis*, *E. exserta*, *E. tereticornis*) e Seção Maidenaria (*E. globulus*, *E. viminalis*).

O eucalipto possui um genoma de aproximadamente 630 Mb com um conjunto haploide de 11 cromossomos. Devido ao grande interesse econômico da espécie pela indústria papelreira, estudos estão sendo realizados com o foco principal na qualidade da madeira. Desta forma, vários genes que participam na formação da madeira, como o gene *ccr*, *ccoaomt*, *cad*, *comt* entre outros, bem como genes de florescimento, são os principais genes em estudo atualmente.

As espécies do gênero *Eucalyptus* são as mais utilizadas em reflorestamentos no país, sendo que o Brasil ocupa lugar de destaque como um dos países de maior área de florestas plantadas do mundo, com cerca de 5.473.176 milhões de hectares (IBÁ, 2014). O principal uso da madeira dos reflorestamentos plantados no Brasil destina-se à produção de celulose de fibra curta, amplamente utilizada no mundo, principalmente para a produção de papel e carvão (CÂMCIO, 1998). O uso da madeira de eucalipto para energia industrial também tem sido crescente em diversos países, como consequência da primeira crise mundial do petróleo.

A área de florestas plantadas com eucalipto no Brasil, em 2013, foi de 5.473.176 há, representando um crescimento de 3,2% (169.012 ha) frente ao indicador de 2012. Desse total, o estado de Minas Gerais contribui com 1.404.429 ha, seguido do estado de São Paulo, com 1.010.444ha e o estado do Mato Grosso do Sul com 699.128ha (IBÁ, 2014). O setor florestal brasileiro apresenta vantagem competitiva e possui a capacidade de alavancar o crescimento socioeconômico do país, uma vez que o desenvolvimento é expresso na geração de empregos, tanto na área rural como na urbana, na arrecadação de impostos, na geração de divisas e no crescimento do produto interno bruto-PIB. Deste modo, a eucaliptocultura tem demonstrado ser uma das mais produtivas, avançadas e competitivas do mundo.

2.2 A ferrugem do eucalipto - *Puccinia psidii*

A ferrugem do eucalipto causada pelo fungo *Puccinia psidii* foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1929, embora tenha sido formalmente descrita apenas em 1944, constituindo uma das mais importantes doenças do eucalipto no país (FERREIRA, 1989). Segundo Junghans (2003), é considerada uma das doenças mais

severas na cultura do eucalipto no Brasil, com potencial de causar perdas em outras áreas tropicais e subtropicais do mundo que possuam florestas desta cultura.

A ferrugem só incide em plantas jovens, com menos de dois anos de idade, sempre em órgãos tenros (primórdios foliares com seus pecíolos, terminais de galhos e haste principal), seja no viveiro ou no campo. Especialmente nos rebentos foliares, os indícios de ataque são minúsculas pontuações na parte inferior da folha, levemente salientes, de coloração verde-clara ou vermelho amarelada. Após um a dois dias, essas pontuações já são pústulas de uredósporos amarelos. A partir daí, as pústulas aumentam de tamanho e caracterizam-se pela intensa e típica esporulação uredospórica do patógeno, de coloração amarelo-gema de ovo, que aparece nos órgãos atacados, (ALFENAS et al., 2004).

O período latente ou de geração de *P. psidii* é relativamente curto, variando em média de 5 a 7 dias. Infecção e esporulação variam com o período de molhamento, temperatura, fenologia do hospedeiro e luz (ALFENAS et al., 2001). No campo, sob temperaturas de 18 a 25°C e molhamento foliar acima de oito horas de duração, a enfermidade incide em órgãos jovens da planta. Temperaturas menores ou iguais a 10°C e temperaturas maiores ou iguais a 30°C, presença de luz e inexistência de órgãos juvenis limitam os processos iniciais de infecção. Temperaturas abaixo de 15°C e acima de 30°C, após incubação, limitam a esporulação (ALFENAS et al., 2001).

Esses patógenos não apresentam fase saprofítica em seu ciclo vital, são parasitas obrigatórios que retiram nutrientes diretamente das células vivas do hospedeiro, através dos haustórios. A ação destes fungos pode ser devastadora sobre o seu hospedeiro causando perdas em várias culturas de importância econômica no mundo. As plantas doentes têm seu processo fotossintético afetado, tanto pela retirada de nutrientes promovida pelo fungo, como pela destruição de área foliar decorrente da formação de pústulas e da queda de folhas provocada pelo patógeno (FERREIRA, 1989).

Para escolher o método de quantificação da doença, os graus de acurácia e precisão precisam ser obrigatoriamente considerados, uma vez que estes determinam a qualidade das estimativas (AMORIM; BERGAMIN FILHO, 1991). Alguns trabalhos de avaliação da intensidade da ferrugem nas folhas foram feitos baseadas na percentagem da área foliar lesionada (NUTTER et al., 1993). Os parâmetros de quantificação da doença incluem a proporção da doença por folhas e ramos e a quantidade e o tipo de pústula (TAKAHASHI et al., 1997, ZAMPROGNO, 2005).

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

O controle da ferrugem pode ser feito por meio de aplicação de fungicidas, colheita de materiais suscetíveis em épocas desfavoráveis à doença (escape pela época) e plantio de materiais resistentes (ALFENAS et al., 1993). Entretanto com a atual preocupação com o impacto causado no meio ambiente devido ao uso inadequado desses produtos, métodos alternativos de controle, têm sido pesquisados. Todavia, a utilização da resistência genética é a medida de controle mais indicada, por apresentar menor custo, ser facilmente exequível e por reduzir o impacto de fungicidas no ambiente (ALFENAS et al., 1989).

2.3 Resistência genética

A necessidade de encontrar formas de resistência mais eficientes para o controle da ferrugem do eucalipto é uma realidade cada vez mais premente. Dentre as principais estratégias de controle de doenças de plantas cultivadas, o uso da resistência genética tem sido considerado a mais eficiente, devido a sua economicidade e por ser ambientalmente segura. O termo resistência refere-se à capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e ou subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (PARLEVLIET, 1993).

Segundo Fry (1982), resistência é a característica de uma planta que restringe o desenvolvimento do patógeno e da doença. Strange (2003) *apud* Brommonschenkel (2013) define como o retardo da infecção e crescimento do patógeno

nos tecidos do hospedeiro. Porém, vale ressaltar um ponto importante, comum entre as definições, não há menção sobre os efeitos da resistência sobre a produção da planta. Pode-se afirmar que as espécies vegetais são imunes ou completamente resistentes (ausência de doença) à maioria dos fitopatógenos.

Van der Plank (1963) classificou a resistência de plantas a doenças em dois tipos: resistência vertical e resistência horizontal. A resistência vertical é também conhecida como resistência raça-específica, qualitativa, monogênica ou oligogênica (um ou poucos genes de efeito maior), diferencial e completa. Tem como característica não ser afetada pelo ambiente (temperatura, umidade, pH do solo, radiação solar etc.), e a expressão da resistência é manifestada por apenas duas formas: resistência total ou imunidade e suscetibilidade total, dependendo da interação com as raças do patógeno.

A resistência horizontal, também chamada de parcial, duradoura, quantitativa ou raça não específica, é poligênica e efetiva uniformemente contra uma grande parte ou todas as raças do patógeno (AGRIOS, 2005).

Na resistência parcial observam-se níveis variados de doença, sendo comum plantas altamente resistentes, mediantemente resistentes e pouco resistentes, ou suscetíveis (MIZUBUTI; MAFFIA, 2006). A planta atua reduzindo a taxa de progresso da doença, pois os efeitos na epidemia refletem a atuação da resistência em vários componentes epidemiológicos, como diminuição do tamanho da lesão, do número de esporos produzidos por lesão e do aumento do período latente (CAMARGO, 2011).

A resistência parcial é, geralmente, do tipo quantitativa, baseada em genes de efeito no fenótipo, embora possa, em alguns casos ser controlada por genes de grande efeito fenotípico (JOHNSON, 1984). As variedades que apresentam esse tipo de resistência permanecem resistentes no campo indefinidamente, pois os mecanismos de resistência do hospedeiro estão além da capacidade micro evolucionária do patógeno (ROBINSON, 1979).

A resistência parcial pode ser definida como resistência incompleta, uma vez que apresenta como característica a redução da taxa de epidemia por meio da diminuição do número e tamanho de pústulas, da diminuição da produção de uredosporos, aumento do período latente e menor área abaixo da curva do progresso da doença. Isso faz com que a população do patógeno seja reduzida, diminuindo a quantidade de inóculo e, conseqüentemente, a doença (PARLEVLIET, 1995).

Períodos de latência mais prolongados, lesões menores e menor produção de esporos são componentes que atrasam ou reduzem a magnitude de vários estágios do ciclo reprodutivo do patógeno, tornando mais lento o progresso da doença (SHANER; HESS, 1978).

A investigação detalhada do comportamento de genótipos, em relação ao progresso da doença é um fator essencial para direcionar programas de melhoramento visando à resistência. Parlevliet (1979) definiu os componentes monocíclicos como: período de incubação (intervalo de tempo compreendido entre a inoculação e o aparecimento dos sintomas); período latente (período de tempo entre a inoculação e a produção de esporos); frequência de infecção (número de lesões produzidas por unidade de área, a partir de uma concentração conhecida de inóculo); esporulação (número de esporos produzidos por unidade de área de tecido afetado e/ou por unidade de tempo).

A quantificação do período de incubação e do período latente tem sido feita, experimentalmente, considerando-se o período entre a inoculação e o aparecimento de 50% dos sintomas ou lesões esporulantes, respectivamente (PARLEVLIET, 1979). Quanto maiores os períodos de incubação e latente e quanto menor a frequência de infecção, menor será o número de ciclos do patógeno sobre seu hospedeiro. Consequentemente, menor será a severidade final da doença (PARLEVLIET, 1979).

De acordo com Ferreira (1989), a variabilidade genética dentro do gênero *Eucalyptus* para a resistência às doenças e a fatores fisiológicos adversos é muito grande e isto acontece, especialmente, em relação à ferrugem do eucalipto.

Segundo Junghans et al (2003), em *E. grandis* a resistência à ferrugem é controlada por um gene de efeito principal denominado *Ppr-1*(*Puccinia psidii* resistência- gene 1). Este constitui o primeiro gene de resistência identificado e mapeado na cultura do eucalipto.

Furtado et al.(2005), estudando a variabilidade fisiológica de *P. psidii* em *E. grandis* e no híbrido *urograndis*, verificaram que em relação aos genótipos de eucalipto utilizados, há uma maior suscetibilidade em *E. grandis* quando comparado com o híbrido. Já Xavier et al. (2007), avaliando a resistência das espécies de *E. globulus* e *E. nitens*, constataram a variabilidade intra-específica para resistência á ferrugem nas duas espécies e que *E. globulus* apresentou maior percentagem de indivíduos resistentes.

Segundo Menten (1986), os patógenos apresentam uma grande variabilidade genética impedindo que os clones com resistência completa mantenham esta característica por muitos anos. O surgimento de novas raças de patógenos tem levado a incorporação de novos fatores de resistência no hospedeiro.

2.4 Melhoramento visando à resistência à ferrugem

A seleção de espécies, procedências, progênies ou clones resistentes de *Eucalyptus* constitui a estratégia mais eficiente no controle da doença (CARVALHO, 1992). Até hoje, poucos são os estudos sobre a resistência do eucalipto à ferrugem. Em geral, esses trabalhos restringem-se à identificação e à seleção de espécies e procedências resistentes (SILVA et al., 2013; MIRANDA et al., 2013).

No Brasil, os programas de melhoramento genético tiveram início na década de 70 com o objetivo de encontrar espécies melhor adaptadas para as condições ambientais e propiciar o aumento do conjunto genético e qualidade das plantas (BRUNE; ZOBEL, 1981). Clones elite de híbridos de *E. grandis* e *E. urophylla* foram gerados e são amplamente utilizados pela indústria de papel e celulose, devido à qualidade da madeira, o rápido crescimento e os grandes volumes de madeira que são produzidos (BERTOLUCCI et al., 1995).

O uso de variedades resistentes constitui um dos mais importantes meios de controle de doenças de plantas cultivadas dentre elas a ferrugem do eucalipto. Sempre que existam fontes satisfatórias, que possibilitem a obtenção de variedades resistentes, o emprego destas no controle de doenças de plantas é a medida mais econômica e a que menos afeta o custo de produção (BERGAMIN FILHO et al., 1995). Embora a seleção de materiais resistentes seja feita nas empresas florestais, até o presente não se determinou o padrão de herança da resistência no patossistema *Eucalyptus-P. psidii*, cujo conhecimento pode contribuir para determinar as estratégias de melhoramento genético visando à obtenção de materiais resistentes à ferrugem (BERGAMIN FILHO et al., 1995).

2.5 Marcadores moleculares

No melhoramento genético de plantas, tem-se buscado cada vez mais a manipulação assistida por marcadores moleculares, visando obter maior eficiência na transparência de fatores genéticos (BORÉM; CAIXETA et al., 2006). Um marcador genético é uma característica cuja segregação pode ser acompanhada e essa característica pode ser um caracter fenotípico, uma proteína ou um fragmento de DNA (VALENTE et al., 2005). Para isso, basta que haja polimorfismo genético entre indivíduos, isto é, diferenças entre essas formas alélicas.

Segundo Valente et al. (2005), os marcadores morfológicos e isoenzimáticos exploram o polimorfismo dos produtos da expressão dos genes. O polimorfismo nos fragmentos de DNA, por sua vez, é devido à variação na sequência de nucleotídeos em determinados sítios que, por analogia, são também chamados de locos e podem corresponder a sequências únicas ou repetidas e que codifiquem ou não um gene.

Os marcadores moleculares podem ser classificados em dois tipos principais: marcadores codominantes como (RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição); microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats* – Repetições de Sequências Simples); e mais recentemente, SNPs, (*Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismos de Nucleotídeos Simples) e marcadores moleculares dominantes os (RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) (VALENTE et al.,(2005).

2.6 SNP - Single Nucleotide Polymorphism

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) são marcadores do tipo Polimorfismo de Base Única e se baseiam nas alterações mais elementares da molécula de DNA, isto é, mutações em apenas uma das bases nitrogenadas da cadeia (Adenina, Citosina, Timina e Guanina). As mutações mais recorrentes são as do tipo transição, em que há troca de purina por outra purina (A <-> G) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C <-> T), e transversões, purina-pirimidina ou pirimidina-purina (A/C, A/T, G/C, G/T) (BROOKES, 1999).

Assim, na prática, SNPs são marcadores bi-alélicos, podendo ocorrer tri-alélicos em uma proporção menor, de forma que o conteúdo informativo em um único SNP é limitado, em comparação com os marcadores microsatélites (SSR) que são polialélicos (GRIFFIN; SMITH, 2000; GUPTA et al., 2001; ORAGUZIE et al., 2007).

Os SNPs ocorrem tanto em regiões codificadoras como em não codificadoras dos genomas. Em regiões codificadoras, quando resultam em uma substituição de aminoácido na sequência protéica, são denominados não sinônimos, podendo a substituição ser conservativa ou não conservativa em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca. Nesses casos, pode haver modificações estruturais e funcionais na proteína (GUIMARÃES; COSTA, 2002).

Os SNPs são extremamente abundantes no genoma de espécies não endogâmicas e sua existência não é novidade. Os primeiros trabalhos de sequenciamento de fragmentos específicos de DNA detectaram esse tipo de polimorfismo (Orita et al., 1989). Além disso, os SNPs são a base molecular de vários tipos de marcadores moleculares que foram desenvolvidos com diferentes metodologias ao longo das últimas três décadas, como RFLPs, RAPDs, AFLPs, entre outros.

Em espécies vegetais os SNPs passaram a ser mais utilizado a partir da crescente disponibilidade de coleções de ESTs nos bancos de dados públicos, o que reduziu os custos para descoberta dos mesmos. Essas coleções tem sido fonte de identificação de SNPs em algumas plantas como beterraba (SCHNEIDER et al., 2001), milho (CHING et al., 2002), arroz (NASU et al., 2002), soja (ZHU et al., 2003), e de cana de açúcar (GRIVET et al., 2003).

2.7 Quitinase

O desenvolvimento de sintomas na planta, durante a patogênese, vem geralmente acompanhado da síntese e ou acúmulo nos tecidos infectados e adjacentes ao sítio de infecção, de um grupo de proteínas conhecidas por proteínas relacionadas à patogênese (proteínas RP ou Os-RP) (VAN LONN, 1985).

O termo Ps-RP foi criado para designar um grupo de proteínas solúveis acumuladas em resposta à infecção por *Tobacco mosaic virus* (TMV) em fumo contendo o gene N. Esse gene é responsável pelo sintoma de lesões necróticas localizadas,

restringindo a presença do vírus às células das lesões e tecidos imediatamente adjacentes. Mais tarde, comprovou-se a independência da expressão dessas proteínas com a presença do gene N (VAN LONN, 1975).

Dentre as principais proteínas relacionadas à patogênese, têm-se as quitinases, as quais pertencem às famílias PR-3, PR-8 e PR-11. A quitina é um polímero linear composto por resíduos de N-acetil-Dglucosamina (GLcNAc) formando ligações $\beta(1-4)$. É o segundo polissacarídeo mais abundante do planeta, depois da celulose, sendo o principal componente da parede celular dos fungos e leveduras. É insolúvel em água e apresenta duas formas cristalinas polimórficas α e β . A α -quitina é composta por cadeias de GLcNAc paralelas e antiparalelas dispostas alternadamente; a β -quitina é menos comum e possui cadeias arranjadas em paralelo (MINKE; BLACKWELL, 1978; AAM et al., 2010).

A quitina desempenha funções importantes na bioquímica de vários processos metabólicos de todos os organismos vivos que a possuem (FELSE; PANDA, 1999a e b). Apesar da quitina ser um dos mais importantes biopolímeros da natureza, o conhecimento da sua biossíntese ainda é incompleto.

A efetiva degradação de quitina pelas quitinases na natureza revela a importância dessas enzimas na biosfera, principalmente em organismos que não contêm quitina, mas utilizam essas enzimas em mecanismos de defesa, como é o caso de plantas, e no consumo de carbono e nitrogênio e sua reciclagem no ambiente, no caso de bactérias (VAAJE-KOLSTAD, et al., 2005).

Quitinases podem ser utilizadas como agentes de controle de fitopatógenos, uma vez que a parede celular de muitos deles possui quitina. Em fungos, as quitinases desempenham uma variedade de funções, como a digestão da parede celular, a formação de septos, a germinação e a diferenciação de esporos, o crescimento e a autólise de hifas (XIA et al., 2001; DUO-CHUAN, 2006). Estudos recentes demonstram que o gene *ch1*, que codifica uma quitinase de *Rhizopus oligosporus* Saito, é transcrito durante o crescimento de suas hifas (TAKAIA et al., 1998a), enquanto que, em *A. nidulans* a frequência na germinação de esporos e o crescimento hifal decai com a disrupção do gene *ch1A*, que codifica uma quitinase nesse fungo (TAKAIA et al., 1998b). Portanto, quitinases e seus inibidores são alvos bastante atraentes para o desenvolvimento de fármacos antifúngicos.

Em plantas, a produção de quitinase é efetiva na defesa contra fungos patogênicos, sendo estas enzimas alvos atraentes na aplicação industrial de

fungicidas agrícolas (DAHIYA et al., 2006). Muitas quitinases de plantas, associadas com β -glucanases, inibem o crescimento de certos fungos patogênicos em culturas, evidenciando sua atividade inibitória (BROGLIE; BROGLIE, 1992) e sua capacidade de induzir naturalmente atividade antifúngica (DAHIYA et al., 2006).

Diversos trabalhos têm estudado a inserção de genes de quitinases em plantas de interesse agrícola para que elas tenham uma maior resistência a microrganismos patogênicos, potencializando as defesas naturais dessas plantas durante o ataque de fungos (DAHIYA et al., 2006).

Trabalhos realizados por Roby et al., (1988) indicam o aumento da resistência ao fungo *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ellis e Halst. em meloeiros devido a elevada atividade quitinolítica produzida por essas plantas ao serem tratadas com elicitores do próprio fungo, sugerindo que o aumento da atividade da quitinase é responsável, em parte, pela indução da resistência sistêmica contra *C. lagenarium*. A inibição *in vitro* de *Trichoderma viride*, Schumacher também se mostrou eficiente após a aplicação de quitinases purificadas (MAUCH et al., 1988).

2.8 1,3 β -glucanase

As β -1,3-glucanases são enzimas que hidrolisam polímeros de β -1,3-glucana, composto esse, que juntamente com a quitina, constitui os principais componentes que conferem resistência à parede celular dos fungos conhecidas. São monômeros com massa molecular entre 25-35 KDa e que produzem oligômeros com 2-6 unidades de glicose a partir do substrato laminarina (uma β -1,3-glucana). Muitas glucanases foram isoladas de diferentes plantas induzidas por vários agentes bióticos e abióticos (BOLLER, 1988).

As β -1,3-glucanases são produzidas por uma grande diversidade de fungos. Cruz et al., (1993) relataram a presença de atividade lítica do fungo *Trichoderma harzianum* quando cultivado na presença da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e *Botrytis cinerea* como fonte de carbono, devido à produção de enzimas como β -glucanases e quitinases.

As β -1,3-glucanases, mais conhecidas como (PR-2), são amplamente distribuídas em plantas superiores e são induzidas durante a resposta de

hipersensibilidade da planta a patógenos (BUCHER et al., 2001). Segundo Schlumbaum et al., (1986), essas enzimas hidrolíticas são capazes de inibir o crescimento dos patógenos, presumivelmente degradando suas paredes. As β -1,3-glucanases são enzimas líticas capazes de degradar os polissacarídeos encontrados nas paredes celulares de muitos fungos e possui atividade antifúngica quando analisada *in vitro* (MAUCH et al., 1992).

A aplicação de β -1,3-glucanases ou dos microrganismos produtores dessas enzimas é importante também para retardar o crescimento de fungos patogênicos e diminuir a deterioração dos frutos causados pelos mesmos. Xu e Tian (2008) observaram indução da produção dessas enzimas pela levedura *Pichia membranaefaciens* na presença de *Penicillium expansum*, agente causal do stress oxidativo em tomateiros, favorecendo o controle deste fitopatógeno.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAM, B.B. et al. Production of Chitoooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. **Marine Drugs**. v. 8, p. 1482-1517, 2010.

ABRAF-Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas–Anuário estatístico da ABRAF, 2013. Disponível em <http://www.abraflor.org.br/estatisticas.asp>. Acesso em 10 de outubro de 2014.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, 2005, 922p.

ALFENAS, A. C.; DEMUNER, N. L; BARBOSA, M. M. A ferrugem e as opções de controle. **Correio Agrícola**. v.1, p.18-20. 1989.

ALFENAS, A. C. et al. Eficiência de triadimenol, oxicarboxin e diniconazole para o controle da ferrugem (*Puccinia psidii*) em brotações de *Eucalyptus cloeziana*, em condições de campo. **Revista Árvore**. v.17,p.247-263. 1993.

ALFENAS, A.C. et al. *Sporothrix eucalypti*, um novo patógeno do eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.2, p.221, 2001.

ALFENAS, A.C.et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 1st Ed. Viçosa MG. Editora UFV, 2004.

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Sugarcane smut development models: I. Annual curves of disease progress. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.98, p.605-612. 1991.

BERGAMIN FILHO, A. et al. Avaliação de danos causados por doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 3. 1995. p.133-84.

BERTOLUCCI, F.; REZENDE, G.; PENCHEL, R. Produção e utilização de híbridos de eucalipto. **Silvicultura**, v. 51. 1995. p. 12-16.

BOAVA, L. P. et al. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa phytopathol.** vol.36, n.2, 2010.

BOLLER, T. 1988. Ethylene and regulation of hydrolases in plants. In: MIFFLIN, B. J. (ed). **Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology**. Oxford University Press, Oxford, v. 5:145-74.

BOREM, A.; CAIXETA, T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG, 2006. p. 79-107.

BROGLIE, R.; BROGLIE, K. Chitinase and plant protection. In: Fritig, B., Legrand, M. **Mechanisms and plant defense response**. Kluwer, Strasbourg – France. p. 411-421, 1992.

BROMMONSCHENKEL, S. H. Bases conceituais da resistência à ferrugem asiática da soja. **Palestra no XXXIV Reunião de pesquisa de soja-RPS**, 2013.

BROOKES, AJ, The essence of SNPs. **Gene**, v.234, n.2, p.177-186, 1999.

BRUNE, A.; ZOBEL, B. Genetic base populations, gene pools and breeding populations for *Eucalyptus* in Brazil. **Silvae genetic**, v. 30, n. 4/5, p. 146-149, 1981.

BUCHER, G. L. et al. Local expression of enzymatically active class I b-1, 3- glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. **The Plant Journal**, New York, v.28, n.3, p.361-369, 2001.

CAMARGO, L.E.A. **Controle Genético**. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A.M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. 4 ed. São Paulo. Agronômicas Ceres, 2011, v. 1, p.325-340.

CÂMCIO, O.N. **Diversidade genética de progênes de meios irmãos de *E. urophylla* por meio de metodologia quantitativa e marcadores moleculares RAPD**. Viçosa, MG:UFV. 1998, 52 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, 1998.

CARVALHO, A. O. **Progresso da ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) do eucalipto no sudeste da Bahia e resistência de *Eucalyptus* à doença**, 1992. UFV. (Dissertação de mestrado). Viçosa. UFV. 1992. 64p.

CASTRO, H. A. **Padronização de metodologia de inoculação e avaliação da resistência de *Eucalyptus* spp. a ferrugem causada por *Puccinia psidii* Winter**, 1983. ESALQ. (Tese de Doutorado). Piracicaba. ESALQ/USP. 1983.

CHING, A, et al, SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. **BMC Genetics**, v.3, p.19, 2002.

CRUZ, J. et al. Carbon source control on β -glucanases, chitinase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. **Archives of Microbiology**, New York, v. 159, p. 316-322, 1993.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 71, p. 773–782, 2006.

DI STEFANO, J.F. et al. Invasive potential of *Syzigium jambos* (Myrtaceae) in forest fragments. **Rev. Biol. Trop.**, 46:567-573. 1998.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**. Vol. 161, p. 345-360, 2006.

ELDRIDGE, K. G. et al. Eucalypt domestication and breeding. Oxford: **Oxford Science Publications**. 1994. 288p.

FELSE, P.A.; PANDA, T. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. **Applied Microbiology Biotechnology**. vol. 51, p.141-151, 1999b.

FELSE, P.A.; PANDA, T. Studies on applications of chitin and its derivatives. **Bioprocess Engineering**. vol. 20, p. 505-512, 1999a.

FERREIRA, F. A. Ferrugem do eucalipto. In: **Patologia Florestal. Principais Doenças Florestais no Brasil**. Viçosa, MG, Sociedade de Investigações Florestais. 1989. p 129-152.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal – principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: UFV, SIF, 570p.1989.

FRY, W.E. Principles of plant disease management. San Diego: **Academic Press**, 1982, 378p.

FURTADO, G.Q., CASTRO, H.A., POZZA, E.A. Variabilidade fisiológica de *Puccinia psidii* WINTER em *Eucalyptus grandis* e no híbrido *urograndis*. **Summa Phytopathologica**, v.31, p.227, 2005.

FURTADO, E.L. et al .2009. **Doenças do Eucalipto no Brasil**, p. 74.

GRIFFIN, TJ, SMITH, LM, Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. **Trends in Biotechnology**, v.18, n.2, p.77-84, 2000.

GRIVET, L et al, ESTs as a source for sequence polymorphism discovery in sugarcane: example of the Adh genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, n.2, p.190-197, 2003.

GUIMARÃES, P. E. M.; COSTA, M. C. R. SNPs: Sutis diferenças de um código. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.26, p. 24-27, 2002.

GUPTA, PK, ROY, JK, PRASAD, M, Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science**, v.80, n.4, p.4524-4535, 2001.

IBÁ- **Indústria Brasileira de Árvores**, 2014. Disponível em: <http://www.bracelpa.org.br/pt/>. Acesso em 12 de novembro de 2014.

JOHNSON, R. A critical analysis of durable resistance. **Ann. Rev. Phytopathol**, v. 22, p. 309-312, 1984.

JUNGHANS, D.T. et al. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in eucalyptus: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theor Appl Genet**. 175-180. 2003.

LAUDON, G. F. & WATERSTON, J. M. *Puccinia psidii*. CMI **Descriptions of pathogenic fungi and bacteria**, no 56. 1965.

LIAO, M. P.Y.; LEE, K.H. From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. **Biochemical Engineering Journal**, v.49, p.149-158, 2010.

MAcLACHLAN, J. D. A rust of the pimento tree in Jamaica. **Phytopathology**, 28:157-170. 1938.

MARLATT, R. B & KIMBROUGH, J. W. *Puccinia psidii* on *Pimenta dioica* in South Florida. **Plant Dis.**, 63:510-512. 1979.

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. **Plant Physiology**. Vol. 88, p. 936-942, 1988.

MAUCH, F.; MEEHL, J. B.; STAEHELIN, L. A. Ethylene-induced Chitinase and β 1,3-glucanase accumulate specifically in the lower epidermis and along vascular strands of bean leaves. **Planta**. 186:367-75. 1992.

MENTEN, J.O.M. Atualidades na pesquisa de doenças da seringueira associadas ao melhoramento genético. In: Simpósio sobre a Cultura da Seringueira no Estado de São Paulo, 1, Piracicaba, 1986. **Anais**. Campinas, Fundação Cargill, 1986. p.187-192.

MINKE, R.; BLACKWELL, J. The structure of alpha-chitin. **J Mol Biol**. v. 120, p. 167-181, 1978.

MIRANDA, A. C. et al. Heritability for resistance to *Puccinia psidii* Winter rust in *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden in Southwestern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, v. 9, n. 2, p.321-329, 2013.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. (Ed). **Introdução à fitopatologia**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006, 190p.

NASU, S, et al, Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNP markers. *DNA Research*, v.9, n.5, p.163–171, 2002.

NUTTER, F. V et al. Assessing the accuracy, inharater repeatability, and inter-rater reability of disease assessment systems. **Phytopathology**, v. 83,p. 806-812, 1993.

ORAGUZIE, NC, et al, Association Mapping in Plants. New York, USA: **Springer**, v.IX, p.277, 2007.

ORITA, M, IWAHANA, H, KANAZAWA, H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as singlestrand conformation polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.86, n.8, p.2766-70, 1989.

PARLAVELIET, J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.17, p.203-22, 1979.

PARLERVLIET, J. E. Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. In: Effect of cultivar and development stage on latent period, **Euphytica**, v. 24, p. 21-27, 1995.

PARLERVLIET, J. E. What is durable resistance a general outline. In: Durability os disease resistance. Jacobs. Th. And PARLERVLIET, J. E. (Eds), p.23-29. Kluwer **Academic. Publishers Dordrech**, The Netherlands. 1993.

PRYOR, L.D. **The Biology of Eucalypts**. Edward Arnold, London. 1976.

ROBINSON, R. A Permanent and impermanent resistance to crop parasites. A reexamination of the pathosystem concept with especial reference to rice blast (*Pyricularia oryzae*). **Z-Pflanzemzucht**, v. 83, p. 1-39, 1979.

ROBY, D.; TOPPAN, A.; ESQUERRE-TUGAYE, M.T. Systemic induction of Chitinase activity and resistance in melon plants upon fungal infection or elicitor treatment. **Physiology and Molecular Plant Pathway**. Vol. 33, p. 409-417, 1988.

SANTOS, A.F.; AUER, S.G.; GRICOLETTI JR, A. Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Circular técnica 45, **Embrapa Florestas**,1ªed, 19p, 2001.

SCHLUMBAUM, A.et al. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, London, v.324, p.365-367, 1986.

SCHNEIDER, K. et al. SNP frequency and allelic haplotype structure of Beta vulgaris expressed genes. **Molecular Breeding**, v.8, n.1, p.63–74, 2001.

SHANER, G., HESS, F.D. Equations for integrating components of slow leaf-rusting in wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 68, p. 1464-1469, 1978.

SILVA, P.H.M; MIRANDA, A.C; MORAES, M.L.T et al. Selecting for rust (*Puccinia psidii*) resistance in *Eucalyptus grandis* in São Paulo State, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 303, p. 91-97, 2013.

TAKAHASHI, S. S. et al. Avaliação de clones e procedências de eucalipto à ferrugem na região do Vale do Paraíba – SP. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22. 1997. p. 313-314.

TAKAIA, N. et al. Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. Vol. 62, p. 60-65, 1998b.

TAKAIA, N. et al. Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus*: molecular cloning and characterization. **Microbiology**. Vol. 144, p. 2647-2654, 1998a.

VAAJE-KOLSTAD, G.; HORN, S.J.; van AALTEN, D.M.F.; SYNSTAD, B.; EIJSINK, V.G.H. The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. **The Journal of Chemistry**. Vol. 280, n. 31, issue August n. 5, p 28492-28497, 2005.

VALENTE, S.E.S., BECHARA, M.D., PALMIERI, D.A. Utilização de RAPDs como marcadores moleculares na genética de plantas. **UNIMAR CIÊNCIAS**, vol. xiv (1-2) – 2005.

VAN DER PLANK, J. E. **Plant diseases: epidemic and control**. New York: Academic Press, 1963. 349p.

VAN, LONN. C. 1985. Pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**. 4: 11-116.

VAN, LONN. C. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun and Samsun NN” IV. Similarity of qualitative changes of specific proteins after infection with different viruses and their relationship to acquired resistance. **Virology**. 67:566-75. 1975.

XAVIER, A. A. et al. Resistência de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens* à ferrugem (*Puccinia psidii*), **Revista Árvore**, v. 31, n. 4, 2007.

XIA, G. et al. A novel chitinases having a unique model of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. **European Journal of Biochemistry**. Vol 208, p. 4079-4085, 2001.

XU, X. B.; TIAN, S. P. Reducing oxidative stress in sweet cherry fruit by *Pichia* membrane efaciens: a possible mode of action against *Penicillium expansum*. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 105, p. 1170-1177, 2008.

ZAMPROGNO, K.C. **Utilização de Bulk Segregant Analysis na identificação de marcadores ligados a genes que controlam a resistência à Ferrugem (*Puccinia psidii* WINTER) em *Eucalyptus***. 52p. Tese de Mestrado em Agronomia – Área de Concentração - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp de Botucatu, 2005.

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

ZHU, YL, et al., Single-nucleotide polymorphisms in soybean. **Genetics**, v.163, n.3, p.1123, 2003.

**CAPÍTULO 1- SELEÇÃO FENOTÍPICA PARA RESISTÊNCIA À FERRUGEM
EM PROGÊNIES F₁ DE *Eucalyptus grandis***

(Artigo redigido conforme normas da Revista Floresta)

**SELEÇÃO FENOTÍPICA PARA RESISTÊNCIA À FERRUGEM EM
PROGÊNIES F₁ DE *Eucalyptus grandis*
PHENOTYPIC SELECTION FOR RUST RESISTANCE IN F₁ PROGENIES OF
*Eucalyptus grandis***

RESUMO

Uma das maiores dificuldades enfrentadas pelo setor florestal no plantio de *Eucalyptus* no Brasil, tem sido a ocorrência da ferrugem incitada por *Puccinia psidii* Winter, devido aos danos ocasionados, onde a produtividade das plantas atacadas é bastante reduzida. Nesse sentido, empresas do setor florestal têm buscado em programas de melhoramento genético florestal, reduzir as perdas de produção por meio do controle genético. Assim, o trabalho teve como objetivo estimar parâmetros genéticos, avaliar o ganho genético por meio da seleção para resistência parcial à ferrugem causada por *P. psidii* em progênies F₁ de *Eucalyptus grandis* em condições de campo. Foram instalados dois experimentos com 88 progênies F₁ de *Eucalyptus grandis*, no município de Itararé-SP. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cinco plantas por parcela, totalizando 1760 plantas por campo experimental. Aos 30 dias após o plantio, foi realizada a primeira avaliação quanto à ocorrência da ferrugem, mediante a escala de notas. Foram realizadas quatro avaliações mensais no período de setembro a dezembro de 2014. As estimativas dos componentes de variância e parâmetros genéticos foram obtidas pelo método REML/BLUP empregando-se o programa genético-estatístico SELEGEN-REML/BLUP. Os parâmetros genéticos encontrados demonstraram pouca variabilidade genética e alta resistência à ferrugem. Os ganhos de seleção foram satisfatórios para essa fase da seleção.

Palavras-chave: Ganho de seleção; Parâmetros genéticos; *Puccinia psidii*.

ABSTRACT

One of the major difficulties faced by the forestry sector, in *Eucalyptus* planting in Brazil, has been the occurrence of rust incited by *Puccinia psidii* Winter, due to the damage caused where the productivity of the attacked plants is greatly reduced. In this sense forestry companies has sought in forest genetic improvement programs, reduce production losses through genetic control. Thus, the study aimed to estimate genetic parameters, to evaluate the genetic gain by selection for partial resistance to rust caused by *P. psidii* in F₁ progenies of *Eucalyptus grandis* under field conditions. Two experiments were carried with 88 F₁ progenies of *Eucalyptus grandis* in the city of Itararé. The experimental design utilized was a randomized complete block design with four replications and five plants per plot, totaling 1760 plants per experimental field. At 30 days after planting date, was carried out the first assessment regarding the occurrence of rust by the rating scale. Four monthly evaluations were carried out from September to December 2014. Estimates of variance components and genetic parameters were obtained by REML/BLUP method using the genetic-statistical program SELEGEN-REML/BLUP. Genetic parameters found demonstrated a low genetic variability and high resistance to rust. The selection gains were satisfactory for this stage of selection.

Keywords: Gain selection; Genetic parameters; *Puccinia psidii*.

INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e possui como centro de origem a Austrália e regiões próximas como Timor, Indonésia, Papua Nova Guiné. É considerada uma das culturas mais importantes do Brasil, constituindo-se em fonte de energia e madeira renovável, podendo ser usada ainda para fins paisagísticos, preservação de espécies nativas e na recuperação de áreas degradadas (FURTADO et al., 2008).

A espécie *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden é a mais plantada no Brasil, devido ao seu potencial produtivo e às características da madeira, além de possuir excelente base genética disponível (HARWOOD, 2011). Entretanto, muitos de seus genótipos são suscetíveis ao fungo *Puccinia psidii* Winter, principalmente no estado de São Paulo, sudeste do Brasil, onde as plantações de eucalipto representam importante papel no setor florestal e as condições climáticas são favoráveis para o desenvolvimento da doença (FURTADO et al., 2008).

A ferrugem do eucalipto é umas das doenças que mais preocupa o setor florestal, principalmente pelo aumento de sua ocorrência no território nacional e pelos danos ocasionados (MIRANDA et al., 2013). Levantamentos efetuados na região sul do estado de São Paulo revelaram incidências de até 35% de árvores doentes em plantios de *E. grandis* com idade em torno de seis meses (TEIXEIRA et al., 2009).

A doença incide em mudas na fase de viveiro, plantas jovens com até dois anos de idade e em brotações após o corte raso. O patógeno ataca, preferencialmente, folhas jovens e terminais de galhos, ocasionando deformações dos órgãos, perda de dominância apical e, provavelmente, redução do crescimento (ALFENAS et al., 2009). O fungo pode ser facilmente caracterizado pela presença de pústulas de coloração amarela intensa sobre os órgãos infectados.

Devido à ampla variabilidade genética inter e intraespecífica do gênero *Eucalyptus*, a forma mais empregada de controle do patógeno é a utilização de progênies resistentes ou com rápido crescimento, nesse 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 (ZAUZA, 2007). Desse modo, o uso da resistência genética é apontado como a melhor opção para o controle da ferrugem do eucalipto, devido à existência de variabilidade no grau de resistência, tanto entre espécies de *Eucalyptus*, quanto entre procedências de uma mesma espécie.

A resistência parcial tem sido sugerida como uma alternativa de resistência mais durável. Trata-se de uma resistência controlada por muitos genes, onde é observada uma distribuição contínua de graus de resistência entre as progênies, variando de altamente resistentes até altamente suscetíveis (CAMARGO, 2011).

Na literatura, são abordados diversos trabalhos sobre a resistência à ferrugem (ROSADO, 2010; PINTO et al., 2010; MIRANDA et al., 2013; SILVA et al., 2013). No entanto, esses trabalhos limitam-se na seleção de procedências e progênies por meio de inoculações artificiais ou infecções naturais do patógeno. Junghans et al., (2003), relataram que a resistência à ferrugem em *E. grandis* em condições controladas de infecção, é devido a um gene dominante, denominado *Ppr1* (*P. psidii* resistance gene 1), de penetrância incompleta e dependente do “background” genético. Rosado (2007) e Alves (2008) descreveram um padrão de herança diferente de um controle monogênico.

Assim, é de extrema importância a seleção de progênies superiores que apresentem resistência genética parcial, sendo o objetivo desse trabalho estimar parâmetros genéticos, avaliar o ganho genético por meio da seleção para resistência parcial à ferrugem causada por *P. psidii* em progênies F₁ de *Eucalyptus grandis* em condições de campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da área experimental e material genético

O ensaio foi conduzido no município de Itararé-SP, em uma área experimental disponibilizada pela empresa Suzano Papel e Celulose, localizada ao sudoeste do estado de São Paulo a 24°06' de latitude sul e 49°19' longitude oeste, Itararé possui clima temperado úmido com verão quente, classificado segundo Köppen e Alvares et al., (2013) como sendo do tipo Cbf, e a área de realização do experimento apresenta solo classificado como Latossolo Vermelho Distrófico de acordo EMBRAPA (1999).

População inicial

Na área experimental, a população de *Eucalyptus grandis* correspondia a 160 genótipos provenientes de 10 procedências de Coffs Harbour e Atherton, originários de seleção realizada pelo Programa Cooperativo em Melhoramento Florestal do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), implantado em 2009. Os genótipos foram plantados em espaçamento de 3m x 2m, mantendo-se bordadura externa dupla, sendo consideradas como parcela útil, seis plantas de cada genótipo. O experimento foi conduzido em delineamento experimental em blocos casualizados com quatro repetições, totalizando na área 640 parcelas com 3840 plantas.

Aos seis meses após o plantio, foi realizada avaliação quanto à severidade da ocorrência da ferrugem, utilizando para tal a escala de notas proposta por Takahashi (2002), e adaptada por Zamprogno (2008). Nela são considerados quatro níveis distintos de severidade, sendo eles: S0: ausência de esporulação ou planta sadia; S1: pústulas puntiformes isoladas nos limbos e folhas novas; S2: esporulação mais abundante nos limbos e folhas novas; S3: esporulação intensa em ambas as faces das folhas, podendo ocorrer em pecíolos e hastes jovens (ZAMPROGNO, 2008). As plantas que apresentaram sintomas classificados como sendo do tipo S3 foram desbastadas, sendo

mantidas nos blocos apenas plantas com sintomas dos tipos S0, S1 e S2, para que ocorresse a polinização cruzada natural. Estas plantas foram devidamente marcadas, para posteriores análises.

População F₁

Em janeiro de 2014, as árvores previamente marcadas, foram identificadas conforme a severidade dos sintomas. Nos blocos 1 e 2, foram identificadas árvores classificadas como sendo de sintomas S0 e S1, e nos blocos 3 e 4 árvores com sintomas S1 e S2, totalizando ao final 340 genótipos. Destes, 88 produziram sementes e foram selecionados (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Genótipos iniciais de *Eucalyptus grandis* selecionados para avaliação da resistência parcial à ferrugem na F₁, Itararé-SP, 2014.
 Table 1.1. Initial genotypes of *Eucalyptus grandis* selected for assessment of partial resistance to rust in F₁, Itararé-SP, 2014

Genótipos	Escala de Ferrugem	Genótipos	Escala de Ferrugem	Genótipos	Escala de Ferrugem	Genótipos	Escala de Ferrugem
M01	S0	M104	S1	M167	S0	M246	S0
M03	S1	M107	S2	M174	S0	M249	S1
M05	S0	M116	S1	M180	S0	M251	S0
M08	S0	M122	S0	M181	S0	M254	S1
M11	S1	M125	S1	M184	S0	M256	S0
M18	S0	M132	S0	M185	S0	M257	S0
M20	S0	M136	S1	M189	S1	M262	S0
M25	S1	M138	S0	M196	S0	M263	S0
M30	S2	M139	S1	M197	S0	M271	S1
M33	S2	M142	S0	M200	S0	M289	S1
M40	S2	M149	S1	M202	S0	M293	S2
M45	S1	M151	S0	M205	S0	M295	S1
M47	S2	M153	S0	M207	S1	M298	S2
M49	S1	M155	S1	M211	S1	M299	S2
M75	S2	M156	S0	M230	S0	M300	S1
M78	S1	M157	S0	M233	S0	M301	S1
M84	S1	M158	S0	M235	S0	M303	S1
M85	S1	M159	S0	M237	S0	M308	S1
M94	S1	M160	S0	M240	S0	M317	S1
M100	S1	M161	S0	M241	S0	M321	S1
M101	S2	M164	S1	M243	S0	M322	S1
M103	S2	M166	S0	M245	S0	M330	S2

Essas sementes foram colhidas, beneficiadas, e semeadas em tubetes contendo volume de 53 cm³ de substrato Tropstrato Tubete Florestal Plus, devidamente identificados e cultivados no viveiro do IPEF localizado no município de Piracicaba-SP (Figuras 1.1A, 1.1B). Foram semeadas cerca de 10 sementes por tubete e os 45 dias após a semeadura realizou-se o desbaste, mantendo-se apenas uma planta.

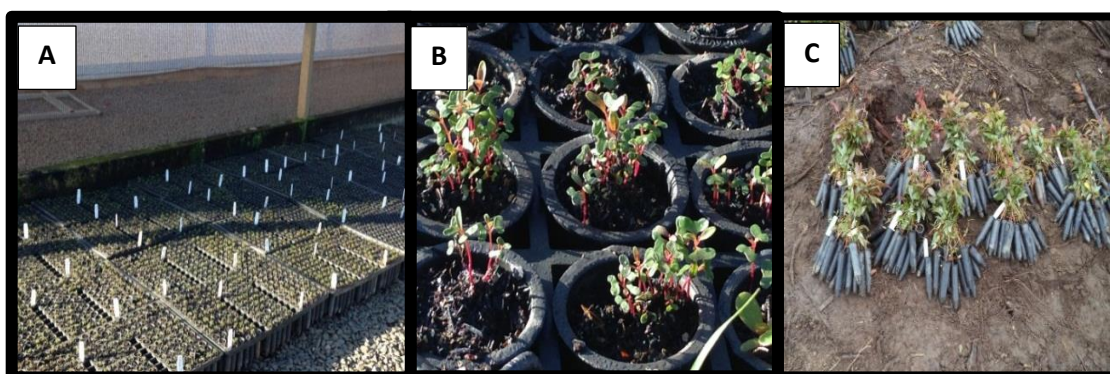


Figura 1.1. Mudas de *Eucalyptus grandis* selecionadas para plantio em campo, A- mudas semeadas em tubetes; B- plantas germinadas; C- mudas selecionadas e identificadas. Itararé-SP, 2014.

Figure 1.1. Seedlings of *Eucalyptus grandis* selected for cultivation in the field, A- seedlings sown in tubes; B- germinated plants; C- selected and labeled seedlings. Itararé-SP, 2014.

Em agosto de 2014, 90 dias após a semeadura, foram selecionadas 20 mudas por progênie (Figura 1.1C), as quais foram identificadas e plantadas no campo experimental de 2,11ha, disponibilizado pela Suzano Papel e Celulose, no município de Itararé-SP, localizado na Fazenda Santa Isabel, sendo o experimento realizado em duplicata. Os campos experimentais escolhidos para o plantio das progênies são áreas com histórico de ocorrência de ferrugem.

Na figura 1.2, são apresentados os dados de temperatura e precipitação, coletados na área experimental da Fazenda Santa Isabel, no período de realização dos experimentos, de agosto a dezembro de 2014.

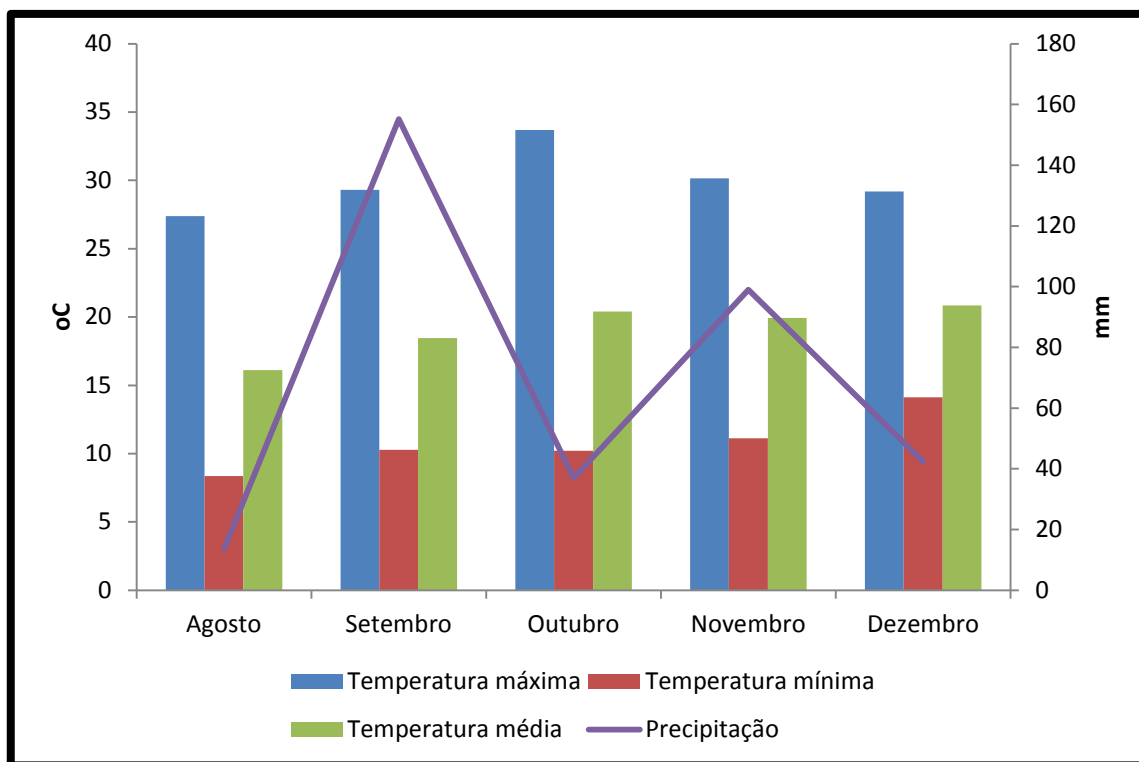


Figura 1.2. Dados meteorológicos do município de Itararé-SP, obtidos durante as avaliações da resistência à ferrugem no período de agosto a dezembro de 2014. Itararé-SP, 2014.

Figure 1.2. Meteorological data from the city of Itararé-SP produced during the rust resistance assessments from August to December 2014. Itararé-SP, 2014.

O experimento foi realizado em duplicata, utilizando 88 progênies, plantadas no espaçamento de 3m x 2m, no delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cinco plantas por parcela, totalizando 1760 plantas por campo experimental.

Avaliação da resistência à ferrugem

Aos 30 dias após o plantio das mudas, foi realizada a primeira avaliação quanto à ocorrência de ferrugem, mediante o uso da escala de severidade sugerida por Takahashi (2002) readaptada por Zamprognio (2008) (Figura 1.3). As avaliações foram realizadas mensalmente no período de setembro a dezembro de 2014, nos dois campos experimentais.

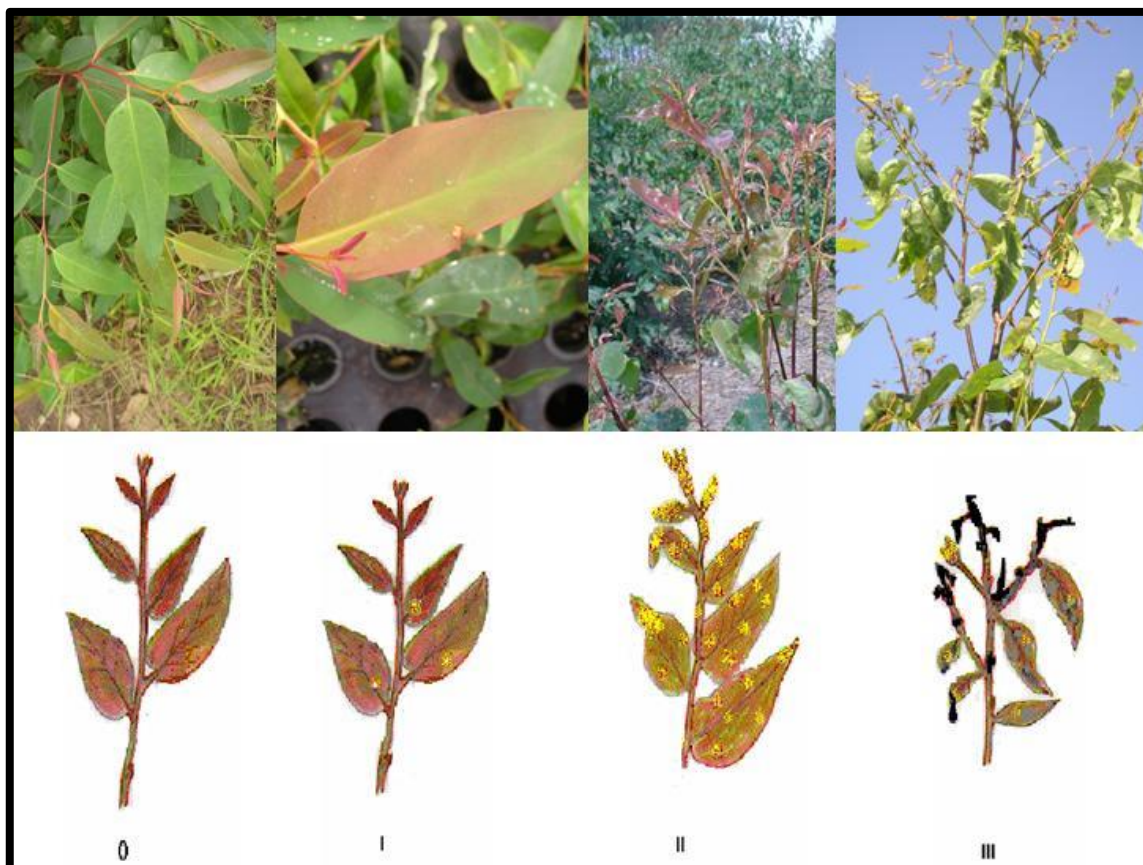


Figura 1.3. Escala de notas para avaliação da resistência à ferrugem do eucalipto no campo, onde: **0** = ausência de esporulação ou planta sadia; **I** = pústulas puntiformes isoladas nos limbos e folhas novas; **II** = esporulação mais abundante nos limbos e folhas novas; **III** = esporulação intensa em ambas as faces das folhas, podendo ocorrer em pecíolos e hastes jovens, modificada de Zamprogno et al., (2008). Itararé-SP 2014.

Figure 1.3. Rating scale for assessment of eucalyptus resistance to rust in the field where: **0** = no sporulation or healthy plant; **I** = isolated pinpoint pustules in limbo and new leaves; **II** = most abundant sporulation in limbo and new leaves; **III** = heavy sporulation on both sides of leaves, petioles and may occur in young stems, modified from Zamprogno et al., (2008). Itararé-SP, 2014.

Estimativa dos parâmetros genéticos e estatísticos

As estimativas dos componentes de variância e parâmetros genéticos foram obtidas pelo método REML/BLUP (máxima verossimilhança restrita/melhor predição linear não viciada), empregando-se o programa genético-estatístico SELEGEN-REML/BLUP, desenvolvido por Resende (2007b).

Os dados foram transformados pelo log de x e submetidos ao programa SELEGEN, onde foram calculados os valores de repetibilidade e do coeficiente de

determinação dos efeitos permanentes, utilizando-se o modelo 008, aplicados a progênies de meio- irmãos, várias plantas por parcela, medidas repetidas, delineamento em blocos casualizados, utilizando o modelo matemático:

$$y = X_m + Z_a + W_p + T_s + e$$

Em que y é o vetor de dados, m é o vetor dos efeitos das combinações medição-repetição (assumidos como fixos) somados à média geral, a é o vetor dos efeitos genéticos aditivos individuais (assumidos como aleatórios), p é vetor dos efeitos de parcela (aleatórios), s é vetor dos efeitos permanentes (aleatórios) e e é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios).

Já as variáveis quantitativas foram estimadas por meio do modelo 093-ANOVA-REML, aplicados aos testes de progênies de polinização aberta (assumindo progênies de meios-irmãos), delineamento blocos ao acaso, várias plantas por parcela, em um local e uma única população, por meio do modelo estatístico:

$$y = X_r + Z_a + W_p + e$$

Em que y é o vetor de dados; r é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral; a é o vetor dos efeitos genéticos aditivos individuais (assumidos como aleatórios); p é o vetor dos efeitos de parcela, e e é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios).

Os parâmetros genético-estatísticos estimados foram os seguintes: h_a^2 : herdabilidade aditiva dentro da parcela; c_p^2 : coeficiente de determinação dos efeitos de parcela; h_{mp}^2 : herdabilidade média de progênies; Ac_{prog} : acurácia na seleção de genótipos; $CV_{gi}\%$: coeficiente de variação genética de progênies; $CV_e\%$: coeficiente de variação experimental; CV_r : coeficiente de variação relativa:

a) Herdabilidade individual no sentido restrito, ou seja, dos efeitos aditivos:

$$\hat{h}_a^2 = \frac{\hat{\sigma}_a^2}{\hat{\sigma}_f^2}$$

b) Coeficiente de determinação dos efeitos de parcela:

$$\hat{C}_{parc}^2 = \frac{\hat{\sigma}_c^2}{\hat{\sigma}_f^2}$$

c) Herdabilidade da média de progênies, assumindo sobrevivência completa:

$$\hat{h}_m^2 = \frac{(1/4) \cdot \hat{\sigma}_a^2}{(1/4) \cdot \hat{\sigma}_a^2 + \frac{\hat{\sigma}_c^2}{r} + \frac{(0,75 \cdot \hat{\sigma}_a^2 + \hat{\sigma}_e^2)}{n \cdot r}}$$

d) Acurácia da seleção de progênies, assumindo sobrevivência completa:

$$r_{aa} = \sqrt{\hat{h}_m^2}$$

e) Coeficiente de variação genética aditiva individual:

$$CV_{gi}(\%) = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_a^2}}{\hat{m}} \cdot 100$$

f) Coeficiente de variação experimental:

$$CV_e(\%) = \frac{\sqrt{[(0,75 \cdot \hat{\sigma}_a^2 + \hat{\sigma}_e^2) / n] + \hat{\sigma}_c^2}}{\hat{m}} \cdot 100$$

g) Coeficiente de variação relativa:

$$CV_r = \frac{CV_{gp}}{CV_e}$$

Para a análise conjunta dos dois experimentos foi utilizado o modelo 51, aplicado a blocos completos, várias observações por parcela, por meio do modelo estatístico:

$$y = Xr + Zg + Wp + Ti + e$$

Em que y é o vetor de dados; r é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral; g é o vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios), p é o vetor dos efeitos de parcela (aleatórios); i é vetor dos efeitos da interação genótipo x ambiente (aleatórios) e e é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios).

O ganho genético foi estimado utilizando o modelo otimização da seleção em termos de maximização do ganho genético com restrição na endogamia via manutenção de um tamanho efetivo adequado. Este modelo trabalha sobre os valores genéticos individuais preditos. Assim, seleção individual com restrição no número máximo de indivíduos selecionados por progênie. O Índice Multi-efeitos foi empregado objetivando a estimativa de ganhos na seleção, com base no DAP (RESENDE, 2002). O Índice Multi-efeitos possui a expressão:

$$\hat{I} = \hat{b}_1 Y_{ijk} + (\hat{b}_2 - \hat{b}_3) \bar{Y}_{i..} + (\hat{b}_3 - \hat{b}_1) \bar{Y}_{ij.} - \hat{b}_3 \bar{Y}_{.j.} + (\hat{b}_3 - \hat{b}_2) \bar{Y}_{...}$$

Em que: $\bar{Y}_{...}$: média geral do ensaio; Y_{ijk} : valor individual; $\bar{Y}_{i..}$: média da matriz do ensaio; $\bar{Y}_{ij.}$: média da progênie em determinado bloco (média da parcela); $\bar{Y}_{.j.}$: média do bloco; $\hat{b}_1 = \hat{h}_d^2$: herdabilidade no sentido restrito dentro de parcelas; $\hat{h}_a^2 = \frac{(3/4)\hat{\sigma}_A^2}{\hat{\sigma}_d^2}$; $\hat{b}_2 = \hat{h}_m^2$ herdabilidade no sentido restrito de progênies; $\hat{h}_m^2 = \frac{[(3+n.b)/(4.n.b)]\hat{\sigma}_A^2}{\hat{\sigma}_p^2 + \frac{\hat{\sigma}_e^2}{r} + \frac{\hat{\sigma}_d^2}{n.r}}$; $\hat{b}_3 = \hat{h}_p^2$ herdabilidade

no sentido restrito de parcelas: $\hat{h}_p^2 = \frac{[3/(4.n)]\hat{\sigma}_A^2}{\hat{\sigma}_e^2 + \frac{\hat{\sigma}_d^2}{n}}$

Foram utilizados os resultados da última avaliação para a seleção dos melhores indivíduos com base na resistência e nos valores genéticos dos indivíduos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção fenotípica para resistência a *Puccinia psidii* em progênies F_1 de *Eucalyptus grandis* avaliadas sob condições naturais de infecção

Visando verificar a severidade e a incidência da ocorrência da ferrugem, todas as progênies foram avaliadas em quatro diferentes períodos após o plantio. No

experimento 1, durante a primeira e segunda avaliação da severidade da ferrugem, realizadas aos 30 e 60 dias após o plantio das mudas em campo, respectivamente, observou-se que a quase totalidade das progênies mostrou-se isenta da doença, variando de 91,14% a 97,05% com classe S0, enquanto que foi verificada baixa incidência de progênies (variando de 0,68% a 5,91%), com classe S1 entre os quatro blocos (Tabela 1.2). Não foram encontradas progênies com sintomas do tipo S2 e S3 nas primeiras avaliações, entretanto, não se pode atribuir a ausência de sintomas somente à resistência das progênies à doença, uma vez que o ambiente e o estágio fenológico das plantas influenciam diretamente na ocorrência.

Nas primeiras avaliações, as plantas estavam com quatro e cinco meses de idade, fato esse que pode ter influenciado na ausência da severidade da doença, já que a ferrugem é comumente observada em plantas de eucalipto a partir de seis meses de idade. Takahashi (2002), analisando epidemias de ferrugem do eucalipto no Vale do Paraíba, também verificou que o máximo de doença ocorreu em função da idade das plantas, variando de nove aos treze meses, conforme a região de plantio.

O fato de um campo de eucalipto apresentar ferrugem está associado à ocorrência de períodos favoráveis durante o tempo em que a cultura emite brotações jovens e sobrepostas. Diferença na época de plantio ou de procedências pode resultar em diferentes períodos de exposição, que podem ou não coincidir com condições ambientais favoráveis à infecção por *Puccinia psidii* (FERREIRA, 1981).

Tabela 1.2. Porcentagem dos genótipos iniciais de *Eucalyptus grandis* e geração F₁ em cada classe de severidade da ferrugem avaliadas sob condições de campo no experimento 1 no município de Itararé-SP. Itararé-SP, 2014.

Table 1.2. Percentage of initial genotypes of *Eucalyptus grandis* and F₁ generation in each rust severity class evaluated under field conditions in experiment 1 in the city of Itararé-SP. Itararé-SP, 2014.

Nota	Bloco	% Genótipos iniciais	% F ₁			
			1 ^a Avaliação	2 ^a Avaliação	3 ^a Avaliação	4 ^a Avaliação
S0	I	48,86	97,05	91,82	79,77	73,18
S1	I	37,50	1,14	5,68	17,73	23,64
S2	I	13,64	0	0	0	0,68
S3	I	0	0	0	0	0
Mortas	I	0	1,82	2,5	2,5	2,5
S0	II	48,86	95,45	93,41	82,95	70,23
S1	II	37,50	0,68	1,82	12,50	23,64
S2	II	13,64	0	0	0	0,45
S3	II	0	0	0	0	0,68
Mortas	II	0	3,86	4,77	4,55	5,0
S0	III	48,86	92,95	91,14	86,82	82,73
S1	III	37,50	5,91	5,91	10,0	13,86
S2	III	13,64	0	0	0	0,23
S3	III	0	0	0	0	0,23
Mortas	III	0	2,95	2,95	3,18	2,95
S0	IV	48,86	93,18	90,23	87,73	92,27
S1	IV	37,50	2,73	5,23	7,27	5,0
S2	IV	13,64	0	0	0	0
S3	IV	0	0	0	0	0,45
Mortas	IV	0	4,09	4,55	5,0	2,27

Verificou-se aumento da classe de severidade ao longo das avaliações, principalmente na quarta avaliação (120 dias após o plantio), onde a média da porcentagem de plantas classificadas como S0 reduziu, de 94,66% para 79,61% (Tabela 1.2). Em conjunto, a ocorrência de plantas S1 aumentou, chegando a 16,54%, e foi possível observar plantas que apresentaram sintomas classificados como S2 e S3 (Figura 1.4).

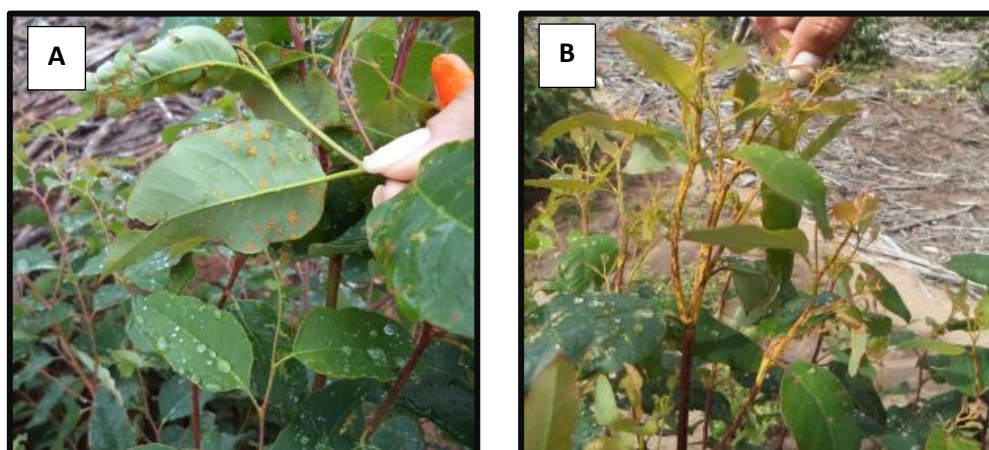


Figura 1.4. A- progênies *F*₁ de *Eucalyptus grandis* com sintoma S2; B-sintoma S3, aos 120 dias após o plantio. Itararé, 2014.
 Figure 1.4. A- *F*₁ progenies of *Eucalyptus grandis* with S2 symptom; B-symptom S3, 120 days after planting. Itararé, 2014.

Para o experimento 2, verificou-se comportamento semelhante quanto à severidade da ferrugem nas progênies, onde, nas duas primeiras avaliações, a incidência foi bastante reduzida. Entre os quatro blocos de 95,45% a 97,73% das progênies avaliadas apresentaram sintoma S0, enquanto que, para a classe S1, apenas de 0,45% a 1,36% (Tabela 1.3). Como apresentado anteriormente para o experimento 1, no experimento 2 também não foram observados plantas com sintomas S2 e S3 nas primeiras avaliações. Entretanto, com o decorrer do período de avaliação, foram encontradas plantas apresentando classes superiores de severidade, fato que, consequentemente, reduziu a média da porcentagem de plantas anteriormente classificadas como S0.

Na primeira avaliação, realizada aos 30 dias após o plantio, em média, 96,42% das progênies tiveram seus sintomas classificados como sendo S0, enquanto que aos 120 dias após o plantio, esse percentual foi reduzido para 87,84%. Além disso, a média do sintoma S1 aumentou e foi verificada a ocorrência de em média, 0,74% e 0,29% das progênies com sintomas S2 e S3, respectivamente.

Os níveis de severidade de ferrugem verificados nos dois experimentos foram baixos, comportamento já esperado, visto que as progênies utilizadas nos experimentos são provenientes de um programa de melhoramento, onde foram pré-selecionadas pelos bons resultados apresentados para a resistência à doença, aliadas a condições ambientais pouco favoráveis à sua ocorrência.

Tabela 1.3. Porcentagem dos genótipos de *Eucalyptus grandis* e geração F₁ em cada classe de severidade da ferrugem avaliadas sob condições de campo no experimento 2 no município de Itararé-SP, Itararé-SP, 2014.

Table 1.3. Percentage of genotypes of *Eucalyptus grandis* and F₁ generation in each rust severity class evaluated under field conditions in experiment 2 in the city of Itararé-SP. Itararé-SP, 2014.

Nota	Bloco	% F ₁				
		% Genótipos iniciais	1 ^a Avaliação	2 ^a Avaliação	3 ^a Avaliação	4 ^a Avaliação
S0	I	48,86	95,45	95,45	84,09	86,36
S1	I	37,50	1,36	0,91	11,82	8,86
S2	I	13,64	0	0	0,45	0,45
S3	I	0	0	0	0	0,68
Mortas	I	0	3,18	3,64	3,64	3,64
S0	II	48,86	97,27	97,73	90,00	88,18
S1	II	37,50	0,68	0	7,50	8,41
S2	II	13,64	0	0	0	1,14
S3	II	0	0	0	0	0,23
Mortas	II	0	2,05	2,27	2,50	2,05
S0	III	48,86	96,36	95,68	86,59	85,23
S1	III	37,50	0,45	0,68	9,09	9,32
S2	III	13,64	0	0	0	0,91
S3	III	0	0	0	0	0,23
Mortas	III	0	3,18	3,64	4,32	4,32
S0	IV	48,86	96,59	96,36	87,50	91,59
S1	IV	37,50	0,45	0,45	9,32	4,55
S2	IV	13,64	0	0	0	0,45
S3	IV	0	0	0	0	0
Mortas	IV	0	2,95	3,18	3,18	3,41

Dessa forma, foi possível verificar que as avaliações tardias se mostraram mais eficientes em estudos que visam avaliar o comportamento de progênies de *Eucalyptus grandis* quanto à resistência a ferrugem.

Considerando somente os dados coletados durante a quarta avaliação, a figura 1.5 demonstra a distribuição dos 88 genótipos iniciais e da geração F₁ em cada classe de severidade da ferrugem.

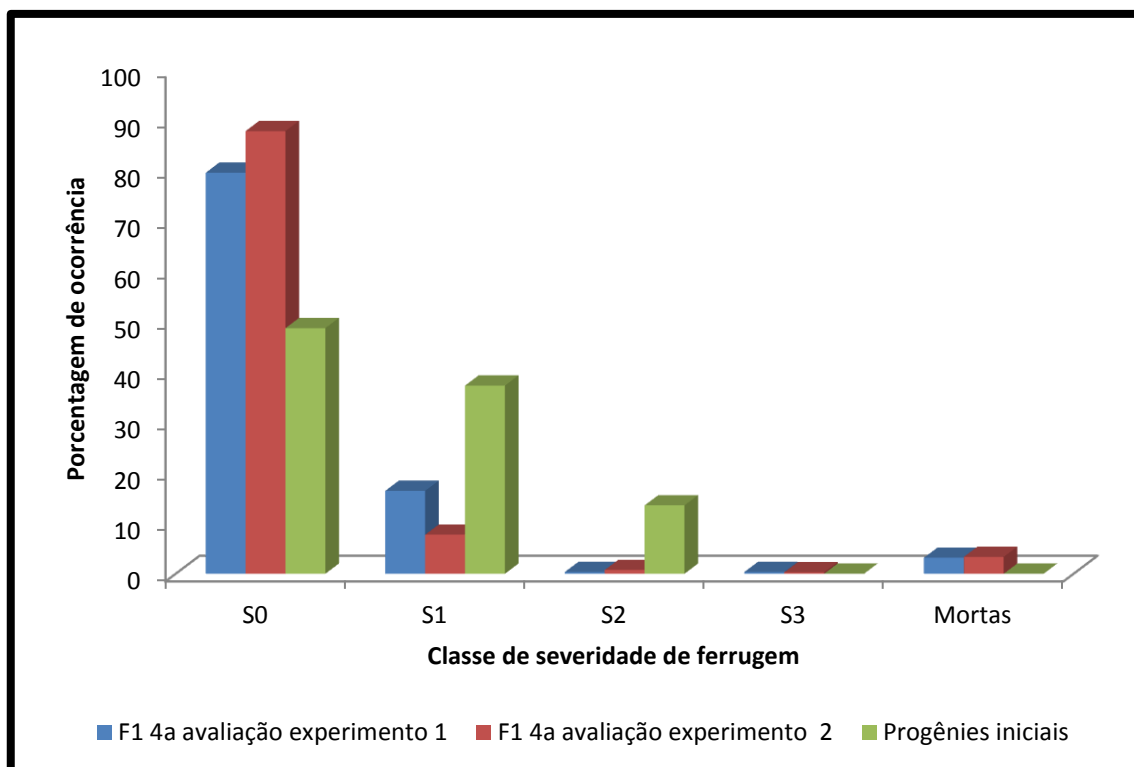


Figura 1.5. Distribuição das plantas dos genótipos iniciais e F_1 classificadas dentro das quatro classes de severidade da ferrugem na quarta avaliação realizada em Itararé-SP, Itararé-SP, 2014.

Figure 1.5. Distribution of plants of the initial genotypes and F_1 classified within the four rust severity classes in the fourth evaluation in Itararé-SP, Itararé - SP, 2014.

Na figura 1.5 é observado percentual de segregação na geração F_1 das progênies avaliadas entre as classes de severidade da ferrugem, principalmente entre as classes S1 e S2 para S0, pois, inicialmente apenas cerca de 49% dos genótipos iniciais foram classificados como sendo S0, enquanto que na geração F_1 verificou-se aumento da resistência, uma vez que o percentual de plantas S0 aumentou para 79,6% e 87,8% nos experimentos 1 e 2 respectivamente. Em contrapartida, o percentual de progênies F_1 classificadas como S1 reduziu de 37,5% para 16,53% (experimento 1) e 7,78% (experimento 2). Dos 13,64% dos genótipos iniciais classificadas com S2, a grande maioria segregou quanto à resistência para ambos os experimentos, sendo encontradas apenas 0,34% e 0,74% nos experimentos 1 e 2 respectivamente.

Esses resultados corroboram com os relatados por Junghans et al. (2003b), Rosado (2007) e Alves (2008). Segundo esses autores, variações dentro de cada classe

fenotípica, principalmente as S1 e S2, também foram observadas e pode ser indicativo de que genes de efeitos secundários têm participação na resistência das plantas à ferrugem. No entanto, é evidente que um loco de grande efeito é o responsável por grande parte da resistência, conforme verificado em análises de progênies de diferentes origens.

Os resultados encontrados neste trabalho evidenciam que houve ganho na seleção das progênies F_1 , demonstrando que a seleção visando obter progênies que apresentem resistência parcial é de extrema importância, afim de evitar o descarte de genótipos de interesse que, embora não possuam resistência completa podem apresentar boa resistência à doença, em condições de campo. Dessa forma, a avaliação criteriosa do nível de resistência que as progênies apresentaram é uma condição indispensável para se avançar em qualquer programa de melhoramento.

Entre as 88 progênies F_1 estudadas no experimento 1, a quase totalidade segregou quanto à resistência à ferrugem, sendo que apenas a M263 permaneceu isenta da doença durante as quatro avaliações realizadas, mantendo a classificação inicial S0. Das 43 progênies iniciais classificadas como S0, 42 segregaram para a classe S1, onde pelo menos 1 planta de cada progênie apresentou sintomas da doença, elevando a média da classe da população F_1 . Entretanto, das 33 progênies classificadas anteriormente como S1, apenas na M189 não foram observados sintomas da ferrugem, recebendo nota S0 em todas as avaliações, enquanto que das 12 progênies iniciais classificadas como S2, todas segregaram para a classe S1 (Tabela 1.4).

Tabela 1.4. Média da comparação entre as classes de ferrugem dos genótipos iniciais e das médias da população F₁ em cada avaliação realizada no experimento 1. Itararé-SP, 2014.

Table 1.4. Average comparison among rust classes of initial genotypes and average of F₁ population in each evaluation carried out in experiment 1. Itararé,-SP, 2014.

Genótipos	Notas iniciais	F ₁ Avaliação 1	F ₁ Avaliação 2	F ₁ Avaliação 3	F ₁ Avaliação 4
M01	0	0	0,05	0,15	0,05
M05	0	0	0,05	0,05	0,10
M08	0	0	0	0,18	0,17
M18	0	0	0	0,06	0,25
M20	0	0	0,20	0,35	0,15
M122	0	0	0	0,15	0,15
M132	0	0,10	0	0,10	0,23
M138	0	0	0,05	0,23	0,10
M142	0	0	0,10	0,30	0,20
M151	0	0,10	0,05	0,05	0,10
M153	0	0	0,15	0	0,15
M156	0	0	0	0,10	0,05
M157	0	0	0	0	0,10
M158	0	0	0	0	0,15
M159	0	0	0,10	0,15	0,30
M160	0	0	0	0,15	0,20
M161	0	0	0,25	0	0,15
M166	0	0	0,05	0,15	0,10
M167	0	0	0	0,10	0
M174	0	0	0	0	0,21
M180	0	0	0,15	0,23	0
M181	0	0	0,05	0,30	0
M184	0	0	0,20	0	0,15
M185	0	0,05	0,05	0	0,20
M196	0	0	0,10	0,20	0,30
M197	0	0	0	0,20	0,30
M200	0	0,05	0,05	0,15	0,30
M202	0	0	0,05	0,05	0
M205	0	0	0,10	0	0,10
M230	0	0	0,05	0,16	0,23
M233	0	0	0,08	0,11	0,13
M235	0	0	0,05	0,20	0,25
M237	0	0	0	0,10	0,17
M240	0	0	0,05	0	0,29
M241	0	0	0,10	0,05	0,20
M243	0	0	0,16	0,25	0,05

M245	0	0	0	0,10	0,45
M246	0	0	0,10	0,05	0
M251	0	0	0,10	0,15	0,25
M256	0	0,05	0,10	0	0,05
M257	0	0	0	0,05	0,05
M262	0	0	0,05	0,11	0,25
M263	0	0	0	0	0
M03	1	0,15	0	0,30	0
M11	1	0,13	0,13	0,19	0,15
M25	1	0	0,15	0	0,25
M45	1	0,11	0	0,20	0,30
M49	1	0	0	0,10	0,35
M78	1	0,06	0,05	0,18	0
M84	1	0	0	0,20	0,15
M85	1	0	0	0,10	0,20
M94	1	0	0,05	0,15	0,25
M100	1	0,05	0	0,20	0
M104	1	0	0,05	0,20	0,20
M116	1	0,10	0	0,10	0,25
M125	1	0,05	0,05	0,15	0,15
M136	1	0	0	0	0,40
M139	1	0	0	0,23	0,25
M149	1	0	0	0,11	0,25
M155	1	0,20	0,05	0,20	0,10
M164	1	0	0,10	0,10	0,25
M189	1	0	0	0	0
M207	1	0	0,06	0,13	0,15
M211	1	0,05	0	0	0,06
M249	1	0	0,05	0	0,05
M254	1	0	0,10	0,10	0,30
M271	1	0	0	0,10	0,05
M289	1	0,10	0,10	0,45	0,45
M295	1	0,10	0,05	0	0,05
M300	1	0,05	0	0,20	0,05
M301	1	0	0	0,15	0,25
M303	1	0	0,20	0,15	0,40
M308	1	0,05	0	0,40	0,50
M317	1	0,05	0,05	0,10	0
M321	1	0	0	0,10	0,20
M322	1	0,10	0	0	0,45
M30	2	0	0	0,25	0
M33	2	0	0	0,15	0,28
M40	2	0,05	0,05	0,25	0,30
M47	2	0	0,05	0,30	0,23

M75	2	0	0	0,10	0,05
M101	2	0	0	0,16	0,24
M103	2	0	0,05	0,10	0,45
M107	2	0	0	0,15	0,35
M293	2	0,30	0,10	0	0,05
M298	2	0	0,11	0,06	0,30
M299	2	0	0	0	0,18
M330	2	0,05	0	0,05	0,40

Para o experimento 2, verificou-se comportamento diferente das 88 progênies F_1 estudados. Das 43 progênies iniciais classificadas como S0, apenas o M08 e M246, mantiveram-se resistentes, as demais segregaram para a classe S1, onde pelo menos uma planta de cada progênie apresentou sintomas da ferrugem, elevando a média da classe da população F_1 . Em contrapartida, das 33 progênies iniciais classificadas como S1, cinco (M11, M78, M104, M164 e M249) não apresentaram sintomas da doença nas quatro avaliações realizadas, segregando para a classe S0. Já para a classe S2, das 12 progênies iniciais, todas segregaram quanto à resistência à ferrugem, sendo 10 progênies para a classe S1 e 2 para a classe S0 (Tabela 1.5).

Apesar dos dois experimentos terem sido instalados em áreas próximas, verificou-se comportamento diferente das 88 progênies F_1 estudadas em cada experimento, indicando possíveis zonas de escape da doença e influência ambiental, ressaltando a importância da escolha do local de plantio.

Tabela 1.5. Média da comparação entre as classes de ferrugem dos genótipos iniciais e das médias da população F₁ em cada avaliação realizada no experimento 2. Itararé-SP, 2014.

Table 1.5. Average comparison among rust classes of initial genotypes and average of F₁ population in each evaluation carried out in experiment 2. Itararé,-SP, 2014.

Genótipos	Notas iniciais	F1 avaliação 1	F1 avaliação 2	F1 avaliação 3	F1 avaliação 4
M01	0	0	0	0,25	0,10
M05	0	0	0	0,35	0,25
M08	0	0	0	0	0
M18	0	0	0	0,20	0,30
M20	0	0	0	0,05	0,15
M122	0	0	0	0,13	0,10
M132	0	0	0	0,35	0,20
M138	0	0	0	0,19	0
M142	0	0	0	0,10	0,35
M151	0	0	0	0,10	0,05
M153	0	0	0	0,25	0,25
M156	0	0	0	0,10	0,05
M157	0	0	0	0,10	0,33
M158	0	0	0	0	0,20
M159	0	0	0	0,06	0
M160	0	0,05	0	0,10	0,10
M161	0	0	0	0	0,05
M166	0	0	0	0	0,05
M167	0	0	0	0,05	0,10
M174	0	0	0	0,05	0,16
M180	0	0	0	0,38	0,29
M181	0	0	0,05	0	0,11
M184	0	0	0	0,15	0,40
M185	0	0	0	0,10	0,15
M196	0	0	0	0,10	0,20
M197	0	0	0	0,30	0,05
M200	0	0	0	0,05	0,21
M202	0	0	0	0,17	0,08
M205	0	0	0	0,10	0,10
M230	0	0	0	0,15	0,20
M233	0	0	0	0	0,10
M235	0	0	0	0,11	0,25
M237	0	0,05	0	0,05	0,15
M240	0	0	0	0,15	0,15
M241	0	0	0	0,10	0,10
M243	0	0,06	0,13	0,24	0,13
M245	0	0	0	0	0,05

M246	0	0	0	0	0
M251	0	0	0	0,15	0
M256	0	0	0	0,16	0
M257	0	0	0	0,15	0,15
M262	0	0	0	0,18	0,38
M263	0	0	0	0,19	0,06
M03	1	0	0	0,15	0,20
M11	1	0	0	0	0
M25	1	0	0	0,05	0
M45	1	0	0	0,15	0,05
M49	1	0	0	0	0,10
M78	1	0	0	0	0
M84	1	0	0	0,05	0
M85	1	0,05	0,05	0	0
M94	1	0	0	0	0,21
M100	1	0	0	0,05	0
M104	1	0	0	0	0
M116	1	0	0	0,11	0,13
M125	1	0	0	0,05	0
M136	1	0	0	0,05	0,10
M139	1	0	0	0,15	0,11
M149	1	0	0	0,05	0
M155	1	0	0	0,15	0,10
M164	1	0	0	0	0
M189	1	0	0	0,20	0
M207	1	0	0	0,15	0,10
M211	1	0	0	0,19	0,11
M249	1	0	0	0	0
M254	1	0	0	0,10	0,05
M271	1	0	0	0,05	0,05
M289	1	0,05	0	0	0
M295	1	0	0	0,29	0,05
M300	1	0	0	0,06	0
M301	1	0	0	0	0,06
M303	1	0	0	0	0,15
M308	1	0	0	0,11	0
M317	1	0	0	0,06	0
M321	1	0	0	0,05	0,10
M322	1	0	0	0,05	0,05
M30	2	0,05	0	0,20	0,15
M33	2	0,10	0,23	0,28	0,29
M40	2	0	0	0	0
M47	2	0,15	0,05	0	0
M75	2	0	0	0,05	0,15

M101	2	0	0	0,27	0,08
M103	2	0	0	0,20	0,30
M107	2	0	0	0,10	0,30
M293	2	0,05	0	0	0,05
M298	2	0	0	0	0
M299	2	0	0	0,15	0,10
M330	2	0,05	0	0,05	0

Parâmetros genéticos para resistência a *Puccinia psidii* em progênies F₁ de *Eucalyptus grandis* avaliadas sob condições naturais de infecção.

A repetibilidade é expressa como a correlação entre as medidas repetidas dos mesmos indivíduos, ou seja, a repetibilidade expressa a proporção da variância total que é explicada pelas variações proporcionadas pelos genótipos e atribuídas ao ambiente comum.

Valores altos de estimativas de repetibilidade para determinado caráter indicam que é viável prever o valor real do indivíduo utilizando-se um número relativamente pequeno de medições (CRUZ; REGAZZI, 1997), sendo que ocorre o inverso quando a repetibilidade é baixa.

Foram obtidos baixos valores de coeficiente de repetibilidade indicando irregularidade da superioridade dos genótipos de uma avaliação para outra, fornecendo indícios da não existência de regularidade na repetição dessas avaliações (Tabela 1.6). Como todas as plantas foram avaliadas em quatro momentos distintos, e havendo cinco repetições de cada progênie em cada parcela, a mesma progênie pode ter recebido notas diferentes entre as avaliações.

As avaliações representam momentos pontuais da epidemia, e é possível que no momento de uma das avaliações, uma determinada planta suscetível não tenha apresentado sintomas da doença, se esta coincidiu, por exemplo, com o momento de brotação.

Tabela 1.6. Repetibilidade e coeficiente de determinação dos efeitos permanentes. Itararé-SP, 2014.

Table 1.6. Repeatability and determination coefficient of permanent effects. Itararé-SP, 2014.

Parcela	R	c2 perm
Análise conjunta	0,199877	0,000015
1-2	0,140588	0,000040
1-3	0,201117	0,000028
1-4	0,283622	0,000080
1.2-3	0,158354	0,000080
1.2-4	0,249170	0,000007
1.3-4	0,000007	0,000010
2.1-2	0,281595	0,000642
2.1-3	0,166265	0,000951
2.1-4	0,115715	0,000016
2.2-3	0,192608	0,000336
2.2-4	0,133229	0,000030
2.3-4	0,208636	0,000057

Parcela: interação entre os blocos; r: repetibilidade; c2 perm: coeficiente de determinação dos efeitos permanentes.

Os resultados referentes aos parâmetros genéticos para a resistência à ferrugem para progênies F_1 de *E. grandis* encontram-se descritos nas tabelas 1.7 e 1.8. O coeficiente de variação experimental (CVe%) obtido das análises de variância individuais para resistência à ferrugem apresentou valores de 1,06, 1,31, 2,23 e 3,33 nas quatro avaliações, respectivamente (Tabela 1.7), para o teste de campo realizado no primeiro experimento, valores esses considerados baixos.

No segundo experimento, os coeficientes de variação experimental (CVe%) também apresentou valores baixos, sendo 0,51, 0,48, 2,03, 2,26 nas quatro avaliações respectivamente (Tabela 1.8). Entre os locais houve pouca diferença em todas as avaliações.

As estimativas do coeficiente de variação genética (CVgi), observado para resistência nos experimentos 1 e 2, foram baixo para as avaliações iniciais, o que já era esperado, por apresentar pequena incidência da doença, aumentando com as avaliações tardias, demonstrando variabilidade genética entre as progênies (Tabelas 1.7 e 1.8). Os

valores altos no CVgi, demonstram potencialidades para a seleção em programas de melhoramento.

A seleção de progênies com base em valores genéticos proporciona vantagens práticas que vão desde a concepção dos experimentos até a seleção propriamente dita, pois possibilita selecionar indivíduos e progênies em diferentes testes de mesma idade, ou em experimentos com progênies pertencentes a várias procedências (populações), além de permitir uma comparação direta e eficiente entre todos os indivíduos de uma mesma progênie em todo o experimento, uma vez que a seleção é baseada em desvios ponderados (PINTO, 2010).

A análise de Deviance (ANADEV) para os dois experimentos, apresentou diferenças estatísticas entre as avaliações, e pode-se verificar que mesmo havendo plantas com diferentes graus de severidade, somente uma avaliação foi significativa (Tabela 1.7 e 1.8).

Tabela 1.7. Estimativas de parâmetros genéticos para avaliação da resistência à ferrugem em progênies F₁ de *Eucalyptus grandis* no experimento 1, Itararé-SP, 2014.

Table 1.7. Genetic parameter estimates to assess rust resistance in F₁ progenies of *Eucalyptus grandis* in experiment 1, Itararé-SP, 2014.

Parâmetros Genéticos	Avaliação 1	Avaliação 2	Avaliação 3	Avaliação 4
h^2_a	0,08	0,03	0,04	0,006
c^2_p	0,19	0,08	0,16	0,27
h^2_{mp}	0,19	0,10	0,11	0,01
Acprog	0,44	0,31	0,34	0,12
CVgi%	0,52	0,43	0,81	0,40
CVe%	1,06	1,31	2,23	3,33
CVr	0,24	0,16	0,18	0,06
LTR	0,02 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,50 ^{ns}	0,02 ^{ns}
Média	2,07	1,95	2,09	2,07

h^2_a : herdabilidade aditiva dentro da parcela; c^2_p : coeficiente de determinação dos feitos de parcela; h^2_{mp} : herdabilidade média de progênies; Acprog: acurácia na seleção de genótipos; CVgi%: coeficiente de variação genética de progênies; CVe%: coeficiente de variação experimental; CVr: coeficiente de variação relativa; LTR= Teste da razão de verossimilhança; média: média geral do nível de severidade.

Tabela 1.8. Estimativas de parâmetros genéticos para avaliação da resistência à ferrugem em progênies F₁ de *Eucalyptus grandis* no experimento 2, Itararé-SP, 2014.

Table 1.8. Genetic parameter estimates to assess rust resistance in F₁ progenies of *Eucalyptus grandis* in experiment 2, Itararé-SP, 2014.

Parâmetros Genéticos	Avaliação 1	Avaliação 2	Avaliação 3	Avaliação 4
h^2_a	0,05	0,25	0,06	0,06
c^2_p	0,06	0,15	0,14	0,07
h^2_{mp}	0,18	0,44	0,15	0,19
Acprog	0,43	0,67	0,39	0,44
CVgi%	0,24	0,43	0,86	1,11
CVe%	0,51	0,48	2,03	2,26
CVr	0,24	0,45	0,21	0,24
LTR	1,40 ^{ns}	12,07 ^{**}	1,03 ^{ns}	1,6 ^{ns}
Média	2,12	2,12	2,09	2,09

h^2_a : herdabilidade aditiva dentro da parcela; c^2_p : coeficiente de determinação dos feitos de parcela; h^2_{mp} : herdabilidade média de progênies; Acprog: acurácia na seleção de genótipos; CVgi%: coeficiente de variação genética de progênies; CVe%: coeficiente de variação experimental; CVr: coeficiente de variação relativa; LTR= Teste da razão de verossimilhança (**significativo a 1%, com 0,5 graus de liberdade; ^{ns} não significativo). média: média geral do nível de severidade.

As estimativas dos coeficientes de herdabilidade individual variaram entre 0,006 a 0,25, e para herdabilidade média variou de 0,01 a 0,44 entre os dois experimentos, indicando a presença de componente genético atuando nesse caráter. Estimativas de herdabilidade, quando apresentam baixa magnitude, evidenciam que possíveis fatores de resistência ambiental estão influenciando na expressão da característica. Esses contrastes também podem ser parcialmente atribuídos ao escape da doença quando avaliada em condições naturais de infecção, condição utilizada no trabalho. As quatro avaliações foram realizadas em duas áreas diferentes, indicando possíveis zonas de escape e influência ambiental.

A herdabilidade média de progênies apresentou valores menores que 0,15, sendo considerada de baixa magnitude. Os resultados encontrados nesse trabalho diferem dos relatados por Martins (2007), e por Silva et al. (2013), os quais encontraram médias de herdabilidade acima de 0,70% para a espécie *Eucalyptus grandis*. As estimativas de herdabilidade são ferramentas de suma importância nos trabalhos de melhoramento,

pois expressam a quantidade da variabilidade genética disponível numa população, proporcionando o conhecimento da magnitude relativa das variações genéticas e ambientais (WRIGTH, 1976).

Em relação aos coeficientes de variação relativa (CVr), os valores encontrados variaram de 0,06 a 0,45 nos dois experimentos, sendo considerados de baixa e média magnitude, respectivamente. De acordo com Vencovsky e Barriga (1992), maiores valores de CVr indicam que o controle dos caracteres é baixo, influenciado por fatores ambientais.

As acurácias (Acprog) obtidas nos experimentos foram medianas, exceto para o experimento 1, na quarta avaliação, onde foi observado o menor valor (0,12). Segundo Resende (1995), quanto maior a acurácia, maior a precisão da seleção e, consequentemente, maior o ganho genético.

O parâmetro c_p^2 (coeficiente de determinação dos efeitos ambientais entre parcelas) quantifica a variabilidade dentro dos blocos. Um coeficiente alto significa alta variabilidade ambiental entre parcelas, e, ao contrário, um coeficiente baixo, baixa variabilidade. Os valores de c_p^2 encontrados nesse trabalho foram altos, variando de 0,27 a 0,06, permitindo inferir que houve erro intra-bloco, possivelmente irregularidade de inóculo no espaço.

A análise conjunta dos dois experimentos foi significativa para a resistência à ferrugem, indicando que, para a análise de parcela, há existência de heterogeneidade nas avaliações. Em relação à interação progênie x local, a mesma não foi significativa, indicando que não houve variação entre os ambientes estudados nos dois experimentos (Tabela 1.9).

Tabela 1.9. Análise de teste da razão de verossimilhança (LTR) (Deviance), para análise conjunta das avaliações dos dois experimentos. Itararé-SP, 2014.

Table 1.9. Analysis of the likelihood test ratio (LTR) (Deviance), for combined analysis of assessments of the two experiments, Itararé-SP, 2014.

LTR	
Fonte de Variação	Resistência
Progênies	11,89**
Parcela	431,31**
Prog x Loc	2,7 ^{ns}

LTR= Teste da razão de verossimilhança (**significativo a 1%, com 0,5 graus de liberdade; ^{ns} não significativo).

Os parâmetros genéticos obtidos por meio da análise conjunta para a resistência à ferrugem encontram-se na Tabela 1.10. A estimativa do coeficiente de herdabilidade individual encontrada foi de 0,09, sendo considerada de baixa magnitude e para herdabilidade média de 0,39, valor considerado mediano. As herdabilidades de maiores magnitudes proporcionam a expressão genética de indivíduos superiores, em função do maior controle genético. Nesse sentido, vale ressaltar que a mais importante função da herdabilidade no estudo genético é o seu papel preditivo, expressando a confiança do valor fenotípico como um guia para o valor genético, ou o grau de correspondência entre o valor fenotípico e o valor genético (MARTINEZ, et al., 2012).

Tabela 1.10. Estimativas de parâmetros genéticos para avaliação da resistência à ferrugem em progênies F_1 de *Eucalyptus grandis* em análise conjunta, Itararé-SP, 2014.

Table 1.10. Genetic parameters estimates to assess rust resistance in F_1 progenies of *Eucalyptus grandis* with combined analysis, Itararé-SP, 2014.

Parâmetros Genéticos	Análise Conjunta
h^2_a	0,09
h^2_{mp}	0,39
c^2_p	0,16
C_{int}	0,008
Ac_{prog}	0,62
R_{gloc}	0,47
CVgi%	0,27
CVe%	1,86
Média	2,10

h^2_a : herdabilidade aditiva dentro da parcela; c^2_p : coeficiente de determinação dos feitos de parcela; C_{int} : coeficiente de determinação dos efeitos da interação genótipo x ambiente; h^2_{mp} : herdabilidade média de progênies; Ac_{prog} : acurácia na seleção de genótipos; R_{gloc} : correlação genotípica entre o desempenho nos vários ambientes; CVgi% : coeficiente de variação genética de progênies; CVe%: coeficiente de variação experimental; CVr: coeficiente de variação relativa; média: média geral do nível de severidade.

Em relação ao coeficiente de variação experimental (CVe%) e ao coeficiente de variação genética (CVgi), as estimativas observadas também foram baixas, sendo de 1,86 e 0,27, respectivamente. A acurácia encontrada foi de 0,62, sendo considerada alta,

indicando que houve boa precisão experimental. A alta acurácia é indicativa de ótima relação entre os valores preditos e os reais, o que resulta em segurança na seleção de genótipos agronomicamente superiores (RESENDE; DUARTE, 2007).

As diferenças obtidas para as estimativas dos parâmetros genéticos por meio da análise conjunta e as análises individuais devem-se ao fato de analisar o experimento em conjunto, obtendo-se parâmetros médios entre os locais.

O coeficiente de determinação dos efeitos da interação genótipo x ambiente (C_{int}) observado foi de baixa magnitude, evidenciando que as particularidades dos ambientes em que as progênies foram avaliadas não influenciaram a expressão fenotípica. Entretanto, a correlação genotípica entre o desempenho nos vários ambientes (R_{gloc}) foi de magnitude média (0,47), provavelmente influenciada pelo erro intra-bloco.

As estimativas dos parâmetros genéticos são importantes no direcionamento dos programas de melhoramento, uma vez que auxiliam o processo seletivo e servem como referencial teórico para suporte às recomendações dos materiais comerciais (MAIA et al., 2009).

Os resultados genéticos mostraram baixa variabilidade, possivelmente em função da presença de alta frequência de genes de resistência vertical, não permitindo a manifestação dos genes de resistência horizontal, aliado a condições não favoráveis de manifestação da doença no início das avaliações.

Ganho na seleção para resistência à *Puccinia psidii* em progênes F₁ de *Eucalyptus grandis* avaliadas sob condições naturais de infecção.

Optou-se por conduzir a seleção utilizando a quarta avaliação quanto à resistência à ferrugem, uma vez que foi observada uma maior severidade da doença a partir dos 120 dias após o plantio das mudas.

As estimativas de ganho genético para os dois experimentos foram obtidas baseando-se no valor genético predito dos indivíduos, que resulta dos efeitos genéticos preditos mais a média geral do experimento com uso do procedimento BLUP. A seleção entre e dentro de progênes foi realizada com base no Índice Multi-efeitos.

A análise foi realizada limitando-se ao máximo de 3 indivíduos por progênie e ao total de 132 melhores indivíduos (k_f) (Tabela 1.11). O número de progênes e a média de indivíduos selecionados por progênes foram diferentes para cada experimento.

Tabela 1.11. Seleção das progênes de *Eucalyptus grandis* utilizando a quarta avaliação e o Índice de Multi-efeitos (IME) com base na resistência à ferrugem nos dois experimentos, Itararé-SP, 2014.

Table 1.11. Selection of *Eucalyptus grandis* progenies utilizing the fourth assessment and the Multi-effects Index (MEI) based on rust resistance in both experiments, Itararé-SP, 2014.

Progênes			
Experimento 1	k_f	Experimento 2	k_f
M01	3	M05	3
M03	3	M25	3
M05	3	M33	3
M08	1	M45	3
M11	2	M75	3
M20	3	M84	3
M30	3	M85	3
M75	3	M122	3
M78	3	M132	3
M84	2	M136	3
M85	1	M156	3
M100	3	M157	3
M101	1	M158	3
M122	3	M159	3
M125	2	M164	3
M132	2	M167	3
M138	1	M174	3

M139	1	M180	3
M142	2	M181	3
M151	3	M184	3
M153	3	M185	3
M156	3	M189	3
M157	3	M197	3
M158	2	M200	3
M161	3	M205	3
M164	1	M230	3
M166	3	M235	3
M167	3	M237	3
M174	2	M243	3
M180	3	M245	3
M184	3	M246	3
M185	1	M249	3
M189	3	M251	3
M202	3	M254	3
M205	3	M256	3
M207	2	M262	3
M211	3	M263	3
M237	1	M289	3
M241	2	M298	3
M243	3	M299	3
M246	3	M301	3
M249	3	M317	3
M256	3	M322	3
M257	3	M330	3
M263	3		
M271	3		
M293	3		
M295	3		
M298	2		
M300	3		
M301	3		
M317	3		
M321	2		
k _f		132	
N _f Exp. 1		53	
N _f Exp. 2		44	
Gs% Exp. 1		20,73	
Gs% Exp. 2		20,93	

k_f: n° de indivíduos selecionados por progênie; N_f: n° de progênies selecionadas; Gs %: ganho na seleção.

A seleção praticada quanto à resistência à ferrugem conduziu a ganhos de 20,73% e 20,93% para as progênies de *E. grandis* para os experimentos 1 e 2

respectivamente. A seleção no experimento 1 foi mais eficiente, pois manteve praticamente o mesmo valor de ganho genético, por realizar a seleção de mais progênies, com N_f 53.

Os resultados das estimativas de ganho de seleção observados nesse trabalho, estão acima dos valores relatados por ROCHA et al., (2006), que relataram um ganho de 16,1% para a espécie de *E. grandis* para a característica DAP.

Quanto maior a intensidade de seleção maior poderá ser o ganho genético. Entretanto, ao se determinar o número de indivíduos para recombinação na população de produção, procura-se a maximização do ganho genético, levando-se em consideração o tamanho efetivo populacional adequado para que haja segurança na seleção, considerando a endogamia na geração de plantio (ROCHA et al., 2006).

Os resultados observados nesse trabalho evidenciam que os ganhos de seleção encontrados são satisfatórios para essa fase de seleção em um programa de melhoramento genético florestal.

CONCLUSÕES

As progênies F_1 de *E. grandis* apresentaram alta resistência à ferrugem e mostraram ter baixa variabilidade genética, evidenciadas pelos parâmetros genéticos encontrados.

A seleção praticada para a resistência à ferrugem possibilitará o estabelecimento de uma população de melhoramento com ganho genético na ordem de 20,73%, para o experimento 1 e 20,93% para o experimento 2.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa MG. Editora UFV, 2st Ed., 2009. 500p.

ALVARES, C.A. et al. Köppen climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n.6, p.711-728. 2013.

ALVES, A. A. **Herança e mapeamento genético da resistência á ferrugem (*Puccinia psidii*) em cruzamentos interespecíficos de *Eucalyptus***. Dissertação de Mestrado (Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG. 2008.

CAMARGO, L.E.A.; **Controle Genético**. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A.M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. 4 ed. São Paulo. Agronômicas Ceres, 2011, v. 1, p.325-340.

CRUZ, C.D.;REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa: UFV, 1997. 390 p.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1999. 212 p.

FERREIRA, F. A. Ferrugem do Eucalipto: ocorrências, temperatura para germinação de uredosporo, produção de teliosporo, hospedeiro alternativo e resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.603-604, 1981.

FURTADO, E.L., SANTOS, C.A.G., MASSON, M.V., 2008. **Impacto potencial das mudanças climáticas sobre a ferrugem do eucalipto no Estado de São Paulo**. In: GHINI R., HAMADA E. (Eds.), Mudanças Climáticas. Impactos Sobre Doenças de Plantas no Brasil. Embrapa Informação Tecnológica, pp. 273–286.

HARWOOD, C., 2011. New introductions – doing it right. In: Walker (Ed.), Developing a Eucalypt Resource. Learning from Australia and elsewhere Wood **Technology Research Centre**, University of Canterbury, Christchurch, New Zealand. p. 125–136.

JUNGHANS, D.T. et al. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theor Appl Genet**, v.108,p.175–180, 2003.

JUNGHANS, D.T. et al. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics** 108:175-180. 2003b.

MAIA, M.C.C.et al. Seleção simultânea para produção, adaptabilidade e estabilidade genotípicas em clones de cajueiro, via modelos mistos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.39, p.43-50, 2009.

MARTINEZ, D. T.et al. Estudo da interação genótipo x ambiente em progênies de *Pinus taeda* por meio da análise de parâmetros genéticos. **Floresta**, v. 42, n. 3, p.539-532, 2012.

MARTINS, F. B. **Desenvolvimento e estresse hídrico em mudas de *Eucalyptus grandis* (Hill exMaiden) e *Eucalyptus saligna* (Smith)**. 2007. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

MIRANDA, A.C. et al. Heritability for resistance to *Puccinia psidii* Winter rust in *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden in Southwestern Brazil. **Tree Genetics & Genomes**, v. 9, n.2, p. 321-329, 2013.

PINTO, C.S. **Variabilidade genética em progênies de meios-irmãos de *Eucalyptus dunnii* maiden para resistência a ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) em diferentes ambientes.** Butucatu, 2010, 50 p. Dissertação de mestrado (Ciências Florestais), Universidade Estadual Paulista. Botucatu, Brasil.

RESENDE, M. D. V. Delineamento de experimentos de seleção para maximização da acurácia seletiva e do progresso genético. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 19, n. 4, p. 479-500, 1995.

RESENDE, M.D.V. de. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 975p.

RESENDE, M.D.V. de; DUARTE, J.B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, p.182-194, 2007.

RESENDE, M. D. V. **SELEGEN-REML/BLUP: sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos.** Colombo: Embrapa Florestas, 2007b. 259 p.

ROCHA, M. G. et al. Avaliação genética de progênies de meio-irmãos de *Eucalyptus grandis* por meio dos procedimentos REML/BLUP e da ANOVA. **Scientia Forestalis**, N. 71, P. 99- 107, 2006.

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

ROSADO, T.B. et al. Detection of QTL associated with rust resistance using IBD-based methodologies in exogamic *Eucalyptus* spp. Populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.10, p. 321-328, 2010.

SILVA, P. H. M. et al. Selecting for rust (*Puccinia psidii*) resistance in *Eucalyptus grandis* in São Paulo State, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 303, p. 91-97, 2013.

TAKAHASHI, S. S. **Ferrugem do eucalipto: Índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionadas á intensidade da doença no campo.** 2002. Dissertação de mestrado (Ciências Florestais), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu. UNESP. 2002. 101 p.

TEIXEIRA, J. E. C. et al. Análise da herança da resistência a *Puccinia psidii* em progênies de híbridos interespecíficos de eucalipto avaliadas sob condições naturais de infecção. **Tropical Plant Pathology**, v. 4, n. 4, p. 203-210, 2009.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 486p.

WRIGHT, J. W. **Introduction to forest genetics**. New York: Academic Press, 1976. 464 p.

ZAMPROGNO, K.C. et al. Utilização de análise de segregantes agrupados na identificação de marcadores ligados a gene que controlam a resistência à ferrugem *Puccinia psidii* Winter em *Eucalyptus* sp. **Summa Phytopatológica**, 34, 253–255. 2008.

ZAUZA, E.A.V. **Epidemiologia da ferrugem do eucalipto e resistência genética**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG. 2007.

**CAPÍTULO 2- IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA EM
GENES RELACIONADOS COM A RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO
EUCALIPTO**

(Artigo redigido conforme normas da Revista Ciência Florestal)

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA EM GENES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO EUCALIPTO

IDENTIFICATION OF POLYMORPHISM BASED ONLY ON GENES RELATED TO *Eucalyptus* RUST RESISTANCE

RESUMO

A ferrugem das mirtáceas, incitada pelo fungo *Puccinia psidii*, é atualmente a mais importante doença do eucalipto. Essa doença está amplamente disseminada pelo Brasil e causa sérios prejuízos em viveiros e plantações, sendo o controle realizado basicamente por meio de genótipos resistentes. Uma estratégia para auxiliar nos programas de melhoramento é a utilização de marcadores moleculares ligados a genes que conferem resistência, associados a fatores genéticos, uma vez que conhecer a resposta de resistência a essa doença, é de extrema importância para embasar a seleção de genótipos resistentes. Assim, objetivou-se identificar SNPs nos genes quitinase e 1,3 β -glucanase relacionados à resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em mudas de *Eucalyptus grandis*. As sequências das regiões em estudo foi encontrada em genomas de plantas modelo por meio do banco de dados GenBank, sendo as mesmas utilizadas para a procura de similaridades no banco de dados do eucalipto *Phytozome*. Após a constatação de homologia no banco de dados de eucalipto, foram confeccionados cinco pares de "primers" para flanquear essas regiões, sendo esses avaliados, amplificando fragmentos únicos. Depois de realizado o sequenciamento dos genes quitinase e 1,3 β -glucanase, foi utilizada a ferramenta BLAST no GenBank, confirmando, com sucesso, a identidade da sequência. Em seguida, as sequências foram alinhadas e os SNPs encontrados. Foram encontrados 53 SNPs para o gene da quitinase, 51 desses localizados em regiões codificantes (éxons) e 2 em regiões não codificantes (íntrons), e 24 SNPs para o gene 1,3 β -glucanase, sendo 23 destes localizados em éxons e 1 em íntron. Quanto à classificação das mutações em sinônimas e não sinônimas, dos 53 SNPs observados para o gene quitinase 16 (30%) foram classificados como mutação não sinônima, e 37 (70%) como mutação sinônima. Para o gene 1,3 β -glucanase, dos 24 SNPs encontrados, 10 (42%) foram classificados como mutação não sinônima e 14 (58%) como sinônima. Não foi observada relação entre as mutações encontradas com a classe de severidade da ferrugem. Na análise da diversidade constatou-se a formação de 11 haplótipos, sendo a diversidade haplotípica de 1,000, e a diversidade nucleotídica de 0,01618 para o gene da quitinase. Para o gene da 1,3 β -glucanase foi observada a formação de 12 haplótipos, sendo a diversidade haplotípica de 0,987, e a diversidade nucleotídica de 0,00825.

Palavras-chave 1,3 β -glucanase; *Eucalyptus*; quitinase; SNPs

ABSTRACT

The rust in myrtaceans, incited by the fungus *Puccinia psidii*, is currently the most important eucalyptus disease. This disease is widely spread in Brazil and causes serious damage in nurseries and plantations, and the control performed mainly through resistant genotypes. A strategy to assist breeding programs is the use of molecular markers linked to genes, which confer resistance associated to genetic factors, once knowing the resistance response to this disease, it is extremely important to support the selection of resistant genotypes. The objective was to identify SNPs in genes chitinase and β -1,3-glucanase related to rust-resistance (*Puccinia psidii*) in *Eucalyptus grandis* seedlings. The sequence of genes under study were found in the genomes of plant model through GenBank data bank, the same being used for the search for similarities in eucalyptus *Phytozome* database. After the statement homology in the eucalyptus database, five pairs were made of "primers" to flank these regions, and these, evaluated, amplifying unique fragments. After performing the sequence of chitinase genes and β -1,3-glucanase was used BLAST tool in GenBank, successfully confirming the identity of the sequence. The sequences were aligned and the SNPs found. 53 SNPs were found for chitinase gene, 51 of these are located in the coding regions (exons) and 2 non-coding regions (introns), and 24 SNPs for β -1,3-glucanase gene, 23 of these being located in exons and 1 in intron. Regarding the classification of changes in synonymous and non-synonymous, the 53 SNPs observed for chitinase gene 16 (30%) were classified as non-synonymous mutation, and 37 (70%) as synonymous mutation. For the β -1,3-glucanase gene of the 24 SNPs found 10 (42%) were classified as non-synonymous

mutation and 14 (58%) as synonymous. Relationship between the mutations and the rust disease severity class were not found. The analysis of the diversity found the formation of 11 haplotypes, and the haplotype diversity of 1.000, and the nucleotide diversity of 0.01618 for the chitinase gene. For β -1,3-glucanase gene was observed the formation of 12 haplotypes, and the haplotype diversity of 0.987, and the nucleotide diversity of 0.00825.

Keywords β -1,3-glucanase; *Eucalyptus*; chitinase; SNPs

INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus* é atualmente o gênero florestal de maior importância mundial, devido à sua adaptação aos diferentes tipos de clima e solos e ao seu alto potencial como matéria prima para a indústria madeireira e a produção de papel e celulose. Seu plantio em larga escala no Brasil iniciou-se há mais de 30 anos, e o país já se tornou o maior produtor mundial do gênero, com cerca de 5.473.176 milhões de hectares plantados (IBÁ, 2014). Desse modo, a eucaliptocultura tem demonstrado ser uma das mais produtivas, avançadas e competitivas do mundo.

Entretanto, com o avanço das áreas reflorestadas para as regiões mais quentes e úmidas, o plantio de espécies mais suscetíveis ou de materiais clonais com baixa diversidade genética, tem favorecido a ocorrência de várias doenças. Dentre elas, a ferrugem incitada pelo fungo *Puccinia psidii* Winter é uma das doenças mais limitantes no estabelecimento de novos plantios e na condução de brotações de algumas espécies.

A ferrugem do eucalipto, conhecida também como ferrugem das mirtáceas, foi relatada pela primeira vez no Brasil por Gonçalves (1929) e atualmente, constitui-se em uma das mais importantes doenças do eucalipto no país. A ferrugem só ataca plantas jovens, com menos de dois anos de idade, sempre em órgãos tenros (primórdios foliares com seus pecíolos, terminais de galhos e haste principal), seja na fase de viveiro ou no campo.

O controle da doença tem sido realizado basicamente por meio de aplicação de fungicidas, colheita de materiais suscetíveis em épocas desfavoráveis à doença (escape pela época), e plantio de materiais resistentes. Além dessas formas de controle, as plantas possuem seus próprios mecanismos de defesa, os quais são cada vez mais específicos. Estudos sobre a coevolução entre patógenos e hospedeiros revelam que as proteínas relacionadas à patogênese (PR), produzidas pelas plantas em resposta à infecção por algum agente patogênico, constituem-se em importante ferramenta para melhor compreensão sobre a interação planta-patógeno. A invasão do patógeno causa diversas alterações fisiológicas nas plantas, ativando variadas estratégias de defesa como resposta à hipersensibilidade, indução da biossíntese de enzimas hidrolíticas e de fitoalexinas. Essas respostas se iniciam após alterações da membrana plasmática causadas pela ligação de elicitores, proteínas e compostos excretados pelo patógeno, que induzem a resposta de defesa na planta aos receptores localizados na membrana plasmática das células vegetais (CEITA et al., 2007).

Dentre as proteínas relacionadas à patogênese, destacam-se as quitinases e as 1,3 β -glucanases, as quais possuem atividade antifúngica sinérgica, além de liberarem, por meio de hidrólise, moléculas com atividade elicitora dos mecanismos de defesa das plantas. Fortes evidências indicam que as quitinases e as 1,3 β -glucanases exercem papel fundamental no mecanismo de defesa das plantas a fungos fitopatogênicos, visto que os substratos dessas enzimas, respectivamente a quitina e a β -glucana, são os maiores componentes da parede celular de diversos fungos (BOAVA et al., 2010). Essas proteínas possuem a capacidade potencial de degradar parcialmente as paredes celulares dos fungos, liberando oligossacarídeos, muitos dos quais com atividade elicitora dos sistemas de defesa da planta, mesmo na ausência do agente de infecção (MARTINS, 2008).

O advento das técnicas da biologia molecular tornou possível o estudo das sequências de genes homólogos a genes de resistência a patógenos. A utilização de marcadores moleculares ligados a genes que conferem resistência é uma importante ferramenta utilizada em programas de melhoramento genético florestal, pois permite avaliação prévia de indivíduos superiores, otimizando o processo de seleção dentro dessas espécies, além de possibilitar o estudo de caracterização de genótipo de indivíduos a partir de células e tecidos em qualquer estágio de desenvolvimento da planta.

Um tipo de marcador molecular que tem sido bastante utilizado a partir do crescimento dos projetos de sequenciamento em larga escala são os *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs). Os SNPs, polimorfismo de base individual ou única, é a definição utilizada para identificar a variação da sequência observada em uma posição individual do DNA (ZHU et al., 2003). Além dos estudos de diversidade populacional, os SNPs podem ser utilizados para identificação de variantes alélicas em regiões codificadoras, levando à associação entre genótipo e fenótipo observados.

Assim, objetivou-se identificar SNPs nos genes quitinase e 1,3 β -glucanase relacionados à resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em mudas de *Eucalyptus grandis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Para a identificação de SNPs nas regiões gênicas pré-selecionadas foram utilizados progênies de *Eucalyptus grandis* produzidas pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF). Em casa de vegetação do Laboratório de Patologia Florestal, pertencente ao Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), câmpus de Botucatu-SP, foram aclimatadas 10 mudas de 15 genótipos, por cinco dias, e transplantadas para vasos, devidamente identificadas, e irrigadas diariamente.

Aos 60 dias após o transplântio das mudas foi realizada a inoculação de ferrugem utilizando uma concentração de $2,0 \times 10^4$ esporos/mL e atomizada homogeneamente na superfície adaxial das quatro folhas mais jovens de cada genótipo estudado. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em

câmara de nevoeiro por 24 h, no escuro, a 25 °C, sendo posteriormente mantidas a 22±1 °C, com fotoperíodo de 12 h e intensidade luminosa de 36 mmol.m⁻²s⁻¹.

Com base na escala de notas de severidade da ferrugem proposta por Pieri (2012), aos 14 dias após a inoculação, as mudas foram classificadas, conforme apresentado na Tabela 2.1.

TABELA 2.1: Genótipos utilizados para identificação dos SNPs, Botucatu-SP, 2015.

TABLE 2.1: Genotypes used for SNPs identification, Botucatu-SP, 2015.

S0	S1	S2	S3	Hipersensibilidade	Suscetível
193	112	191	219	189	H13
195	213	205	239	203	
	245	267	250	264	

S1: pústulas puntiformes isoladas nos limbos e folhas novas; S2: esporulação mais abundante nos limbos e folhas novas; S3: esporulação intensa em ambas as faces das folhas, podendo ocorrer em pecíolos e hastes.

Extração e quantificação do DNA

Folhas das 15 progênies de eucalipto foram coletadas, identificadas, limpas e mantidas em freezer. Para extração do DNA, foram então levadas ao Laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular, pertencente ao Departamento de Genética do Instituto de Biociências, da UNESP, câmpus de Botucatu.

A extração de DNA foi realizada conforme protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998) com adaptação na etapa de CTAB 10%, que foi substituída pela utilização de CTAB 5%. O CTAB 5% apresenta manipulação mais fácil, tendo menor viscosidade, sendo que sua utilização em trabalhos anteriores não mostrou alteração na qualidade do DNA final (DOMINGUES, 2003; BORTOLOTO, 2006).

Cerca de 150 mg de tecido foliar fresco foram macerados com N₂ líquido e incubados a 65°C por 30-40 minutos em tubos eppendorf de 2 mL com 800µL de tampão de extração (2% CTAB; 1,4M NaCl, 20mM EDTA pH8; 100mM Tris-HCl pH 8,0; 2% PVP; 0,2% mercaptoetanol).

O extrato obtido foi submetido a duas extrações com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente, com posterior transferência do sobrenadante para novos tubos eppendorf de 1,5 mL. Os ácidos nucleicos na fase aquosa foram precipitados em volume de isopropanol na proporção de 1:1 e incubados a -20°C, por 2 a 3 horas. Após esse período foi centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante foi removido e o precipitado (pelet) lavado uma vez com etanol 70% e uma vez com etanol 95%, para retirar o sal presente. Após o precipitado secar por cerca de 15 a 20 minutos em temperatura ambiente foi efetuada a modificação proposta por Cheung et al. (1993), para remoção de polissacarídeos, onde foram adicionados 500µL de NaCl 1M, e dissolvido o pelet a 65°C por 10

minutos em banho-maria. Depois da total dissolução do pelet, esse foi incubado por 1 hora a -20°C e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e precipitado com 2/3 do volume de isopropanol, e novamente incubado por 2 a 3 horas a -20°C, com posterior centrifugação, remoção do sobrenadante e lavagem do pelet com etanol 70% e etanol 95%.

O precipitado foi redissolvido com 300 µl TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl e 1mM EDTA), contendo RNase na concentração final de 40 µl mL⁻¹. A solução foi incubada em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após a incubação foi adicionado NaCl 5M na proporção de 1:10 e 2/3 do volume de isopropanol gelado para precipitar o DNA, incubando novamente a 4°C, por 2 a 3 h. Após centrifugado e lavado o pelet com etanol 70% e 95%, o precipitado foi ressuspensão com 100 µL de TE.

Quantificação e diluição do DNA

A quantificação foi realizada em espectrofotômetro Nano Drop® - ND1000 (Technologies Wilmington USA). Esse equipamento além de avaliar o DNA com precisão utiliza volumes pequenos (1µl) sem necessidade de diluição, e fornece parâmetros para avaliar sua pureza, quanto a proteínas e compostos fenólicos. O DNA utilizado nas reações de amplificação padrão foi diluído à concentração de 15 ng µl⁻¹ em água ultra pura autoclavada.

Procura das enzimas relacionadas com resistência à ferrugem

As enzimas relacionadas à resistência à ferrugem do eucalipto, quitinase e 1,3 β-glucanase, foram obtidas em “Plantcyc” (Plant metabolic pathway database) (<http://www.plantcyc.org/>) e “Kegg” (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<http://www.genome.jp/kegg/>). Foi utilizado o E. C. number como palavra-chave para procura das sequências no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Utilizando as sequências de aminoácidos de referência foi feita uma prévia procura por sequências similares, utilizando o tBlastx, no banco de dados de *Eucalyptus* “Phytozome” (www.phytozome.net).

Seleção dos iniciadores específicos e condições de amplificação

Com base em dados disponíveis na literatura, pares de *primers* foram desenhados a partir da sequência de dois genes relacionados com a resistência à ferrugem do eucalipto, sendo eles o gene quitinase e 1,3 β-glucanase. As sequências de cada gene foram comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados do *Eucalyptus* “Phytozome”

Os pares de *primers* foram desenhados com a utilização do programa PerlPrimer, versão 1.1.14, para amplificarem produtos de 400-1400 pb (pares de base). A ressuspensão desses *primers* foi feita com tampão Tris-EDTA (T.E.) à concentração final de 100 µM, sendo os mesmos diluídos a concentração final de 10 µM para serem utilizados nas reações de PCR.

190 A melhor temperatura, de pareamento para amplificação de cada *primer* foi determinada via
 191 gradiente de temperatura utilizando-se o termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA,
 192 USA).

193 As reações foram realizadas em cadeia da polimerase (PCR), em 32 ciclos de 1 minuto a 95°C,
 194 1 minuto a X°C e 1 minuto a 72°C, onde X é temperatura de pareamento de cada *primer*. Cada reação
 195 conteve um volume final de 10µl, onde foram utilizados 0,3 µM de cada *primer* “forward” e “reverse”,
 196 15 ng de DNA genômico e PCR Master Mix, da Promega Corporation®, o qual contém 50 unidades
 197 ml⁻¹ de Taq DNA polimerase, 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP, 3mM
 198 MgCl₂, estocados em tampão para reação com pH 8,5.

199 Os fragmentos resultantes foram visualizados em gel de agarose a 1%, corado com brometo de
 200 etídio e comparado com um padrão de peso molecular conhecido (Ladder – Fermentas®) de 100 pb e
 201 1Kb para confirmação da especificidade da amplificação.

202

203 **Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento**

204 Os fragmentos de PCR de cada indivíduo foram enviados para a empresa MacroGen situada em
 205 Seul, Coréia do Sul, onde foi realizada a purificação dos produtos de PCR e posteriormente realizado o
 206 sequenciamento.

207

208 **Alinhamento das sequências**

209 Os eletroferogramas das sequências “forward” e “reverse”, gerados automaticamente, foram
 210 inspecionados visualmente por meio do programa ChromasPro versão 1.42 (Technelysium Pty Ltd), no
 211 qual consensos de sequências podem ser formados para um mesmo gene. Após obtenção das
 212 sequências, foi realizado o BLAST, para comparações com os “reads” originais e com outras
 213 sequências disponíveis no GenBank.

214

215 **Análises dos SNPs**

216 O alinhamento das sequências foi realizado para possibilitar a identificação visual dos SNPs
 217 como transições ou transversões em regiões codificantes. Esses SNPs foram classificados como
 218 sinônimos e não sinônimos, e a posição de cada um deles no códon também foram determinados.

219

220 **Análise da diversidade**

221 Utilizando o software DnaSP 5.10 (www.ub.es/dnasp) (ROZAS et al., 2010), foram obtidas as
 222 seguintes estimativas:

- 223 a) Número total de sítios segregantes (S);
- 224 b) Diversidade nucleotídica π (NEI e LI, 1979; NEI, 1987);

- c) Número médio de diferenças nucleotídicas (SNPs, polimorfismos de bases individuais);
 d) Diversidade haplotípica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Enzimas encontradas e relacionadas ao gene que confere resistência à ferrugem

Os resultados encontrados após a aplicação da metodologia para a procura das enzimas relacionadas com a resposta de defesa da planta à ferrugem do eucalipto encontram-se dispostos nas Figuras 2.1 e 2.2. Foram selecionadas duas enzimas, a quitinase (Figura 2.1) e 1,3 β -glucanase (Figura 2.2).

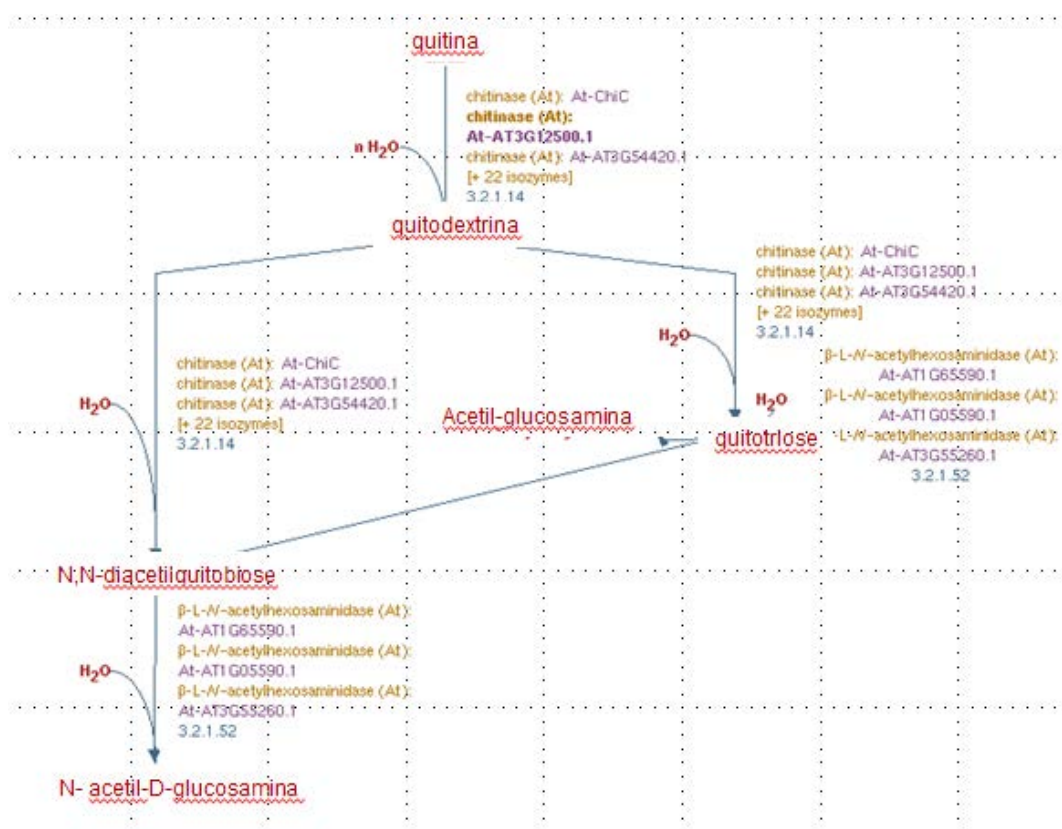


FIGURA 2.1: Ilustração retirada do site de rotas metabólicas de plantas *Plantcyc*, mostrando a atuação da enzima quitinase na formação da quitina.

FIGURE 2.1: Illustration taken from Plantcyc plants website of metabolic pathways of, showing the action of the enzyme chitinase in the formation of chitin.

a resistência à infecção do fungo *Exserohilum turcicum*, causador da queima em plantas de milho (PUNJA; ZHANG,1993).

TABELA 2.2: Enzimas selecionadas por meio do banco de dados do GenBank. São apresentados o EC-Number das enzimas, nome das enzimas, espécie obtida, número de identificação no GenBank, acesso no Tair e referência atual sobre as enzimas.

TABLE 2.2: Selected Enzymes via GenBank database. Are shown the enzymes EC-Numbers, enzyme name, species obtained from GenBank identification number, access to Tair and current reference about the enzymes.

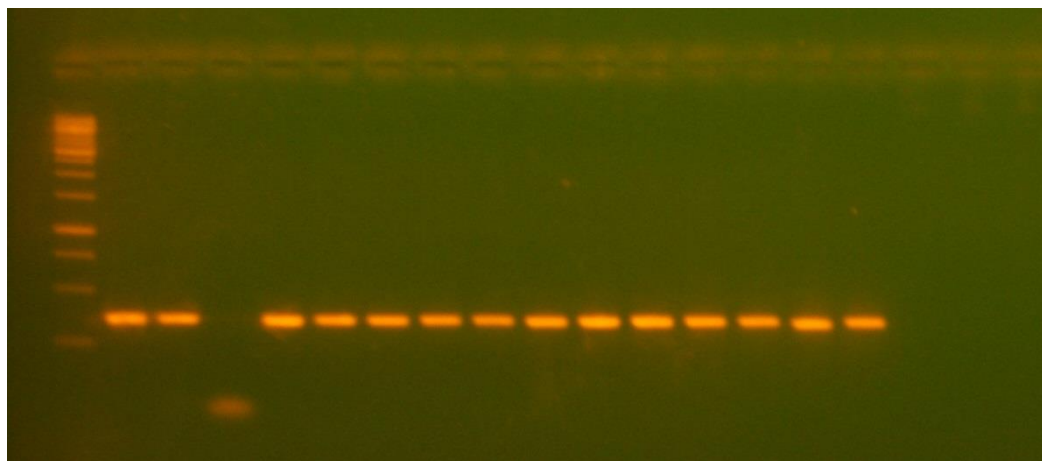
E.C NUMBER	ENZIMA	ESPÉCIE	GenBank	TAIR	Referência sobre a enzima
E 3.2.1.39	1,3 β -glucanase	<i>Zea mays</i>	gi.168394	—	Wu S et al.(1994)
3.2.1.14	quitinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	—	AT2G43570	Breitenbach et al.(2014)

Busca de homólogos para as enzimas quitinase e 1,3 β -glucanase em banco de dados de eucalipto

As buscas foram realizadas no banco de dados de *Eucalyptus* “Phytozome”, onde as sequências modelo de aminoácidos das enzimas candidatas quitinase de *Arabidopsis thaliana* e 1,3 β -glucanase de *Zea mays* apresentaram maior identidade a um consenso de 1193 pares de base (pb) e 1139 respectivamente. Essas sequências foram utilizadas como moldes para o desenho dos oligonucleotídeos específicos *primers*, que permitiram a amplificação da região dos genes utilizados no presente estudo, sendo desenhados dois *primers* para o gene da quitinase e três para 1,3 β -glucanase.

Amplificação dos oligonucleotídeos específicos

Dos cinco pares de *primers* construídos para amplificar os genes da quitinase e da 1,3 β -glucanase, todos apresentaram amplificação de banda única. Na Figura 2.3, pode ser observado o teste de amplificação realizado com o *primer* Glu3 para os 15 indivíduos de *Eucalyptus grandis*. Na extremidade está o marcador de peso molecular conhecido (Ladder 1Kb – Fermentas®).



293

294 FIGURA 2.3: Teste de amplificação do *primer* Glu3 em gel de agarose 1%, corado com brometo de
295 etídio.

296 FIGURE 2.3: Primer amplification test of Glu 3 primer in 1% agarose gel, stained with ethidium
297 bromide.

298

299 A temperatura de pareamento dos *primers* utilizados variou entre 55 e 60°C e os fragmentos
300 variando em tamanhos de 197 a 484 pares de base (pb) (Tabela 2.3). Todos os fragmentos
301 apresentaram tamanho amplificado de acordo com o esperado.

302

303 TABELA 2.3: *Primers*, “forward” e “reverse”, utilizados para amplificar o gene quitinase e 1,3 β -
 304 glucanase, em eucalipto. Identidade dos *primers*; temperatura de pareamento (°C); tamanho do
 305 fragmento amplificado, em pares de base (pb); e as sequências de cada *primer*.

306 TABLE 2.3: *Primers*, "forward" and "reverse", used to amplify the chitinase gene and β -1,3-glucanase in
 307 eucalyptus. *Primers* identity; pairing temperature (°C); size of the amplified fragment in base pairs (bp); and
 308 each primer sequences.

<i>Primer</i>	Temperatura pareamento	Fragmento amplificado	Sequência “Forward” “Reverse”
CH1	55°C	484 pb	5'-GATCATCATTTCTGCCCTG-3' 5'-TGAAGCTCCATCTATCTCGT-3'
CH2	55°C	481 pb	5'-GCTACATAAACGAGATAGATGG-3' 5'-GATACAATGAATACACCCGA-3'
Glu1	55°C	270 pb	5'-GCTACTCGCAACCCATCTC-3' 5'-GAACTCGATCACGCTCCAC-3'
Glu2	60°C	197 pb	5'-CGGTGATCCAAACAGTGAC-3' 5'-TGATGGCGTTTCTCAAGAGG-3'
Glu3	58°C	344 pb	5'-CTTATCACATAGACCTCACT -3' 5'-GAAATAGACCGATCCTTCCT -3'

309

310 Os 15 indivíduos foram amplificados pelos cinco pares de *primers*, com intuito de que todo o
 311 gene fosse sequenciado. As sequências resultantes apresentaram ótima qualidade, como pode ser
 312 observado no eletroferograma (Figura 2.4), o qual apresentou picos altos e bem espaçados.

313 A estratégia de sequenciamento direto a partir do fragmento amplificado pela PCR foi eficiente
 314 e permitiu identificar SNPs sem a necessidade de clonagem.

315

316

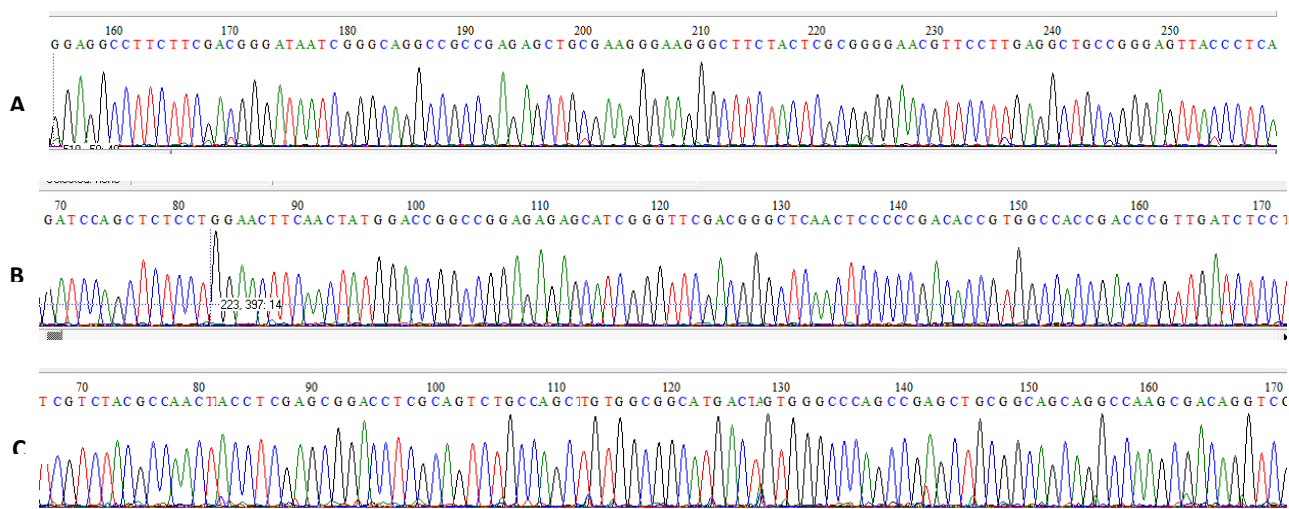


FIGURA 2.4: Eletroferograma parcial, mostrando a ótima qualidade das sequências amplificadas pelos primers (A) CH1, (B) CH2, (C) Glu3.

FIGURE 2.4: Partial electropherogram showing the high quality of the sequences amplified by the primers (A) CH1, (B) CH2, (C) Glu3.

Posteriormente, essas sequências foram alinhadas com o auxílio do software ChromasPro versão 1.42 e, em seguida, foi realizado um BlastX (ALTSCHUL et al., 1997), no GenBank, com os fragmentos sequenciados, mostrando que os mesmos correspondem às enzimas em estudo (Tabela 2.4 e 2.5).

Com os resultados obtidos após o BlastX foi possível observar também que os éxons de *Eucalyptus grandis* apresentam uma similaridade em relação ao de outras plantas como *Malus domestica*, *Populus trichocarpa*, *Jathopha curcas*. Entretanto, aos íntrons se diferenciam entre os organismos. Uma possível explicação para a ocorrência desse fato seria devido os íntrons evoluírem mais rapidamente que os éxons, envolvendo alterações no seu tamanho (deleções e inserções). As mutações ocorrem com a mesma frequência nas regiões de íntrons e éxons, mas são mais facilmente removidas dos éxons devido à pressão seletiva (LEWIN, 2008).

339 TABELA 2.4: Resultado do BlastX com a sequência alinhada, obtida na amplificação dos dois pares
 340 de *primers* construídos para cobrir todo o gene quitinase. São apresentados: Número de acesso no
 341 Genbank, nome da enzima e organismo possuidor, score e máxima identidade.

342 TABLE 2.4: BlastX result with the aligned sequence obtained in the two pairs of amplification primers
 343 constructed to cover the entire chitinase gene. Are shown: Genbank accession number, the enzyme
 344 name and organism owner, score and maximum identity.

Número de acesso	Nome da enzima/organismo	Score	Máxima identidade
KCW876221	Proteína hipotética/ <i>Eucalyptus grandis</i>	479	90%
XP0083691971	Endoquitinase/ <i>Malus domestica</i>	390	73%
ACM457161	Chitinase/ <i>Pyrus pyrifolia</i>	389	73%
XP002360391	Chitinase/ <i>Populus trichocarpa</i>	384	72%
XP0022745371	Endoquitinase/ <i>Vitis vinífera</i>	382	72%
XP0070338031	Chitinase/ <i>Theobroma cacao</i>	381	71%

345

346

TABELA 2.5: Resultado do BlastX com a sequência alinhada, obtida na amplificação dos três pares de *primers* construídos para cobrir todo o gene 1,3 β -glucanase. São apresentados: Número de acesso no Genbank, nome da enzima e organismo possuidor, score e máxima identidade.

TABLE 2.5: BlastX result with the aligned sequence obtained in the two pairs of amplification primers constructed to cover the entire β -1,3-glucanase gene. Are shown: Genbank accession number, the enzyme name and organism owner, score and maximum identity.

Número de acesso	Nome da enzima/organismo	Score	Máxima identidade
BAM055881	1,4 β -glucanase/ <i>Eucalyptus globulus</i>	243	88%
KCW554181	Proteína hipotética/ <i>Eucalyptus grandis</i>	243	88%
KDP276441	Proteína hipotética/ <i>Jatropha curcas</i>	200	70%
AE0971981	1,4 β -glucanase/ <i>Populus trichocarpa</i>	199	70%
XP0083916191	Endoglucanase/ <i>Malus domestica</i>	200	71%
XP0082368491	Endoglucanase/ <i>Prunus mume</i>	199	71%

Análise *in silico* das sequências correspondentes aos genes quitinase e 1,3 β -glucanase no banco de dados do eucalipto

As análises *in silico* realizadas no banco de dados do eucalipto “Phytozome” mostraram que não houve a ocorrência de cópias homólogas no genoma, sendo possível prosseguir com os objetivos desse trabalho na procura de SNPs, nos genes.

Identificação e classificação dos SNPs no gene quitinase em eucalipto

Para a procura dos SNPs, as sequências dos 15 indivíduos divergentes geneticamente foram alinhadas pelo programa ChromasPro versão 1.42, sendo considerados, na análise, tanto os SNPs que possuem alelos diferentes em homozigose quanto os que possuem alelos em heterozigose. A procura foi realizada por meio dos resultados emitidos pelo eletroferograma, comparando-se os picos em cada sequência, além da comparação das sequências nucleotídicas, como mostrado na Figura 2.5.

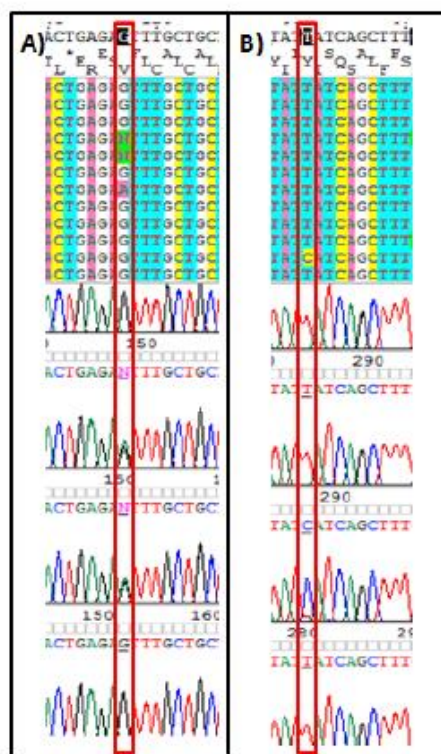


FIGURA 2.5: Alinhamento realizado pelo programa ChromasPro versão 1.42, comparando indivíduos divergentes na procura de SNPs. A região destacada em vermelho mostra a localização dos SNPs nos indivíduos que possuem alelos em homozigose e heterozigose (A), e indivíduos que possuem alelos diferentes em homozigose (B).

FIGURE 2.5: Alignment performed by ChromasPro program, version 1.42, comparing diverging individuals in the search for SNPs. The highlighted red area shows the location of SNPs in individuals that have alleles in homozygosis and heterozygosis (A), and individuals that have different alleles in homozygosis (B).

A metodologia utilizada, a qual consistiu em sequenciamento direto de indivíduos, subsequente alinhamento utilizando ferramentas de bioinformática, para posterior comparação das sequências na procura de SNPs, tem sido bastante utilizada por diversos autores em diferentes áreas de estudo, tais como em humanos (LEVY et al., 2009), bovinos (CALVO et al., 2006; ABATEPAULO et al., 2008), plantas (VAN et al., 2004; NOVAES et al., 2008; KÜLHEIM et al., 2009; GANAL et al., 2009), além de outros organismos (LIAO; LEE, 2010).

Foram detectados 53 SNPs (Tabela 2.6 e 2.7) em uma sequência de 1193 pb para o gene quitinase em eucalipto, sendo a média de SNPs de 1 para cada 22,05 pb.

387 TABELA 2.6: SNPs polimórficos obtidos a partir do sequenciamento de genótipos de *Eucalyptus*
 388 *grandis*, suas posições e as modificações resultantes, utilizando o *primer* CH1.
 389 TABLE 2.6: Polymorphic SNPs obtained from genotype sequencing of *Eucalyptus grandis*, their
 390 positions and resulting modifications, utilizing the CH1 primer.

SNP	Indivíduo	Posição	Modificação	Aminoácido	Modificação	Escala ferrugem
1*	21	38	A/T	TAC (Tir)	TTC (Fen)	S1
2*	21	47	C/A	ACG (Tre)	AAG (Lis)	S1
3*	21	56	A/G	CAG (Glu)	CGG (Arg)	S1
4*	1	71	A/T	AAC (Asn)	TAC (Tir)	S0
5*	61	71	A/T	AAC (Asn)	TAC (Tir)	Hipersensibilidade
6*	71	71	A/T	AAC (Asn)	TAC (Tir)	Suscetível
7	21	100	C/G	GTC (Val)	GTG (Val)	S1
8	1	10	G/T	GCG (Ala)	GCT (Ala)	S0
9	61	118	G/A	ACG (Tre)	ACA (Tre)	Hipersensibilidade
10	71	118	G/A	ACG (Tre)	ACA (Tre)	Suscetível
11	21	133	C/T	GAC (Asp)	GAT (Asp)	S1
12	21	187	A/G	CGA (Arg)	CGG (Arg)	S1
13	1	187	A/G	CGA (Arg)	CGG (Arg)	S0
14	21	217	C/T	TAC (Tir)	TAT (Tir)	S1
15	21	223	G/A	CAG (Glu)	CAA (Glu)	S1
16	1	223	G/A	CAG (Glu)	CAA (Glu)	S0
17	21	253	G/A	TCG (Ser)	TCA (Ser)	S1
18	21	260	G/C	CGG (Arg)	CGC (Arg)	S1
19	1	260	G/C	CGG (Arg)	CGC (Arg)	S0
20	61	265	A/T	ATA (Iso)	ATT (Iso)	Hipersensibilidade
21	71	265	A/T	ATA (Iso)	ATT (Iso)	Suscetível
22	21	272	T/C	ATA (Iso)	ATT (Iso)	S1
23	1	272	T/C	ATA (Iso)	ATT (Iso)	S0
24*	21	284	G/T	TTT (Fen)	CTT (Leu)	S1
25*	1	284	G/T	TTT (Fen)	CTT (Leu)	S0
26*	1	341	C/G	GTC (Val)	TTC (Fen)	S0
27*	21	347	G/T	GTC (Val)	TTC (Fen)	S2
28	1	376	A/T	GGA (Gli)	GGT (Gli)	S0

*Mutações não sinônimas

394 TABELA 2.7: SNPs polimórficos obtidos a partir do sequenciamento de genótipos de *Eucalyptus*
 395 *grandis*, suas posições e as modificações resultantes, utilizando o *primer* CH2.

396 TABLE 2.7: Polymorphic SNPs obtained from genotype sequencing of *Eucalyptus grandis*, their positions and
 397 resulting modifications, utilizing the CH2 primer.

SNP	Indivíduo	Posição	Modificação	Aminoácido	Modificação	Escala ferrugem
1	37	29	C/T	TCC (Ser)	TCT (Ser)	S2
2	12	29	C/T	TCC (Ser)	TCT (Ser)	S1
3*	57	30	T/G	TGG (Trp)	GGG (Gli)	Hipersensibilidade
4*	42	30	T/G	TGG (Trp)	GGG (Gli)	S3
5	12	30	T/G	GGT (Gli)	GGA (Gli)	S1
6	57	44	T/C	TAT (Tir)	TAC (Tir)	Hipersensibilidade
7	22	47	T/A	GGT (Gli)	GGA (Gli)	S0
8*	22	47	G/A	GGA (Gli)	AGA (Arg)	S0
9	37	111	A/G	GGA (Gli)	GGG (Gli)	S2
10	52	111	A/G	GGA (Gli)	GGG (Gli)	S3
11	42	151	A/G	GGA (Gli)	GGG (Gli)	S3
12	57	161	A/G	GGA (Gli)	GGG (Gli)	Hipersensibilidade
13	2	161	C/T	CTG (Leu)	TTG (Leu)	S0
14	22	161	C/T	CTG (Leu)	TTG (Leu)	S1
15*	42	164	T/C	TTC (Fen)	TCC (Ser)	S3
16	7	168	G/A	CCG (Pro)	CCA (Pro)	S0
17	62	168	G/A	CCG (Pro)	CCA (Pro)	Hipersensibilidade
18	2	168	G/A	CCG (Pro)	CCA (Pro)	S0
19	22	168	G/A	CCG (Pro)	CCA (Pro)	S1
20	12	206	C/T	GGC (Gli)	GGT (Gli)	S1
21	42	206	C/T	GGC (Gli)	GGT (Gli)	S3
22	2	251	G/C	CGG (Arg)	CGC (Arg)	S0
23	22	251	G/C	CGG (Arg)	CGC (Arg)	S1
24*	2	352	G/C	ATG (Met)	ATC (Iso)	S0
25*	22	352	G/C	ATG (Met)	ATC (Iso)	S1

*Mutações não sinônimas

400 Outros estudos também relacionados ao gênero *Eucalyptus* revelam uma frequência
 401 relativamente semelhante dependendo do gene em estudo. Santos (2005), estudando os genes de
 402 lignificação 4c1 e ccoaomt e a diversidade genética em diferentes espécies de eucalipto, encontrou oito
 403 SNPs para a espécie *E. grandis* numa frequência de um polimorfismo a cada 55 pares de base, e sete
 404 SNPs em *E. urophylla* numa frequência de um polimorfismo para cada 62,8 pb. Neves et al., (2008)

trabalhando com um gene F5H, em *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla*, relataram uma frequência, respectivamente, de 1 SNP para cada 155, 77,5 e 52 pb. Thumma et al. (2005), mostraram que a frequência observada no gene CCR (cinnamoyl coA redutase) em *E. nitens* é de 1 SNP para cada 94 pares de base. No geral, para genoma de plantas, esses polimorfismos de base única variam entre 1 SNP para cada 100 a 300 pb (GUPTA et al., 2001).

Dos 53 SNPs encontrados nesse trabalho para o gene quitinase, 51 estão localizados em regiões codificantes (éxons) e dois em regiões não codificantes (íntrons), distribuídos da seguinte forma: 28 no *primer* CH1 e destes 26 em éxons e dois em íntrons e 25 no *primer* CH2, sendo todos em éxon.

As diferenças entre SNPs, em regiões codificantes e não codificantes, também ocorre no trabalho de Külheim et al., (2009), onde *E. camaldulensis* e *E. loxophleba*, possuem uma proporção significativa de SNPs nas regiões onde não ocorre a tradução. Os resultados observados nesse trabalho diferem dos encontrados na literatura, onde diversos autores afirmam que o maior número de SNPs ocorre em regiões não codificantes, pois lá, existe pouca ou nenhuma pressão seletiva (BROOKES, 1999; RAFALSKI, 2002; CHING et al., 2002; GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2006). Uma possível explicação para um elevado nível de mutações encontradas em regiões codificantes, pode ser devido à região não codificante do gene estudado ser pequena.

Segundo Hammer (1995) e Gonzales-Martinez et al. (2006), SNPs localizados em regiões codificantes têm particular importância por ser mais provável que estas variações nucleotídicas tenham algum tipo de significado funcional, em nível fenotípico, nos organismos.

Os SNPs encontrados utilizando-se o gene quitinase foram classificados em mutações sinônimas e não sinônimas. Dos 53 SNPs, 16 (30%) foram classificados como mutação não sinônima, isto é, a mudança no códon gerou alteração do aminoácido codificante, e 37 (70%) foram classificados como mutação sinônima, isto é, não causou alteração do aminoácido codificado, entretanto, pode modificar a estrutura e a estabilidade do RNA, podendo afetar a quantidade de proteína produzida. A importância de se encontrar SNPs que possam alterar a estrutura e função da proteína codificada, é que os mesmos representam marcadores alvo para se identificar variações genéticas associadas com características fenotípicas complexas.

Apesar da maioria das mutações ser sinônima, estudos recentes mostram que este tipo de mutação, algumas vezes, participa de alterações em expressões de genes e dobramentos de proteínas (CHAMARY et al., 2006; GUPTA; LEE, 2008). Nos últimos anos, estudos com códons sinônimos demonstraram resultados diferentes na expressão de genes, mostrando, desta forma, que SNPs sinônimos também podem produzir diferentes fenótipos (KUDLA et al., 2009).

Não foi detectada relação entre as mutações encontradas com a classe de severidade da ferrugem, uma vez que se observaram SNPs tanto em indivíduos suscetíveis quanto nos resistentes. Entretanto, das 53 mutações ocorridas, 31 (59%) foram observadas em indivíduos suscetíveis variando

entre as classes de severidade da ferrugem S1, S2, S3. Portanto, o alto nível de mutações encontradas em indivíduos suscetíveis pode ser devido ao fato dos genes analisados atuarem de alguma forma no processo de defesa do eucalipto contra o patógeno.

Os SNPs também foram analisados de acordo com a variação da base nucleotídica, em transição ou transversão, sendo transição quando uma pirimidina é substituída por outra pirimidina e transversão quando uma purina é substituída por uma pirimidina ou uma pirimidina substituída por purina. Dos 53 SNPs encontrados utilizando-se os *primers* CH1 e CH2 a partir do gene da quitinase, 29 foram transições (54%) e 24 transversões (46%) como pode ser observado no tabela 2.8. Os resultados encontrados seguiram a normalidade, pois geralmente as substituições por transição ocorrem com maior frequência no genoma de diversos organismos (LEWIN, 2008).

450

TABELA 2.8: Número e porcentagem de transições e transversões detectadas na análise de SNPs utilizando os *primers* CH1 e CH2.

TABLE 2.8: Number and percentage of transitions and transversions detected in SNP analysis utilizing the CH1 and CH2 primers.

Transições	Ocorrências	%
A-G	7	13,21
G-A	10	18,87
T-C	4	7,55
C/T	8	15,09
Sub-total	29	54,72
Transversões	Ocorrências	%
A-T	7	13,21
C-A	1	1,89
G-T	4	7,55
C-G	2	3,77
T-G	3	5,66
G-C	6	11,32
T/A	1	1,89
Sub-total	24	45,28
Total	53	100

455

A taxa de transições/transversões foi de 1,2. Em gengibre, essa taxa foi de 0,90 (CHANDRASERKAR et al., 2009). Em trabalhos realizados com cafeeiros, foram encontrados 80% de mutações causadas por transversões e 20% decorrentes de transições (ZARATE et al., 2010), o que difere dos resultados observados no presente trabalho. Embora as variações de transição ocorram numa

459

460 frequência mais alta que as transversões em genomas eucariotos, possivelmente como resultado de
 461 mecanismos moleculares pelos quais são geradas, existem evidências que isso não é universal
 462 (KELLER et al., 2007).

463

464 **Identificação e classificação dos SNPs no gene 1,3 β -glucanase em eucalipto**

465 Como resultado da procura de SNPs no gene 1,3 β -glucanase em eucalipto, foi
 466 encontrado um total de 24 SNPs (Tabelas 2.9; 2.10 e 2.11) em uma sequência de 3564 pb, sendo a
 467 média de SNPs de um para cada 148,5 pb. Desses 24 SNPs observados, 23 estão localizados em éxons
 468 e um em íntron, distribuídos da seguinte forma: oito no *primer* Glu1, seis no *primer* Glu2, sendo
 469 desses, cinco em éxons e um em íntron, e dez no *primer* Glu3.

470

471 TABELA 2.9: SNPs polimórficos obtidos a partir do sequenciamento de genótipos de *Eucalyptus*
 472 *grandis*, suas posições e as modificações resultantes, utilizando o *primer* Glu1.

473 TABLE 2.9: Polymorphic SNPs obtained from genotype sequencing of *Eucalyptus grandis*, their
 474 positions and resulting modifications, utilizing the Glu1 primer.

SNP	Indivíduo	Posição	Modificação	Aminoácido	Modificação	Escala ferrugem
1*	68	67	A/T	AAG (Lis)	TAG (Stop)	Hipersensibilidade
2*	68	68	A/T	AAG (Lis)	ATG (Met)	Hipersensibilidade
3*	73	99	A/G	AAA (Lis)	AGA (Arg)	Suscetível
4*	43	109	G/A	GGT (Gli)	GAT (Asp)	S3
5*	3	109	G/A	GGT (Gli)	GAT (Asp)	S0
6	23	157	G/C	TCG (Ser)	TCC (Ser)	S1
7	8	163	G/C	ACG (Tre)	ACC (Tre)	S0
8*	8	250	G/T	CGA (Arg)	CTA (Leu)	S0

475 *Mutações não sinônimas

476

477

478 TABELA 2.10: SNPs polimórficos obtidos a partir do sequenciamento de genótipos de *Eucalyptus*
 479 *grandis*, suas posições e as modificações resultantes, utilizando o *primer* Glu2.

480 TABLE 2.10: Polymorphic SNPs obtained from genotype sequencing of *Eucalyptus grandis*, their
 481 positions and resulting modifications, utilizing the Glu2 primer.

SNP	Indivíduo	Posição	Modificação	Aminoácido	Modificação	Escala ferrugem
1	29	82	T/G	GTT (Val)	GTG (Val)	S2
2*	29	83	G/C	GCA (Ala)	CCA (Pro)	S2
3	14	104	A/G	CCA (Pro)	CCG (Pro)	S1
4	4	108	A/G	CCA (Pro)	CCG (Pro)	S0
5	49	112	A/G	CCA (Pro)	CCG (Pro)	S3
6	44	117	A/G	CCA (Pro)	CCG (Pro)	S3

482 *Mutações não sinônimas

483

484 TABELA 2.11: SNPs polimórficos obtidos a partir do sequenciamento de genótipos de *Eucalyptus*
 485 *grandis*, suas posições e as modificações resultantes, utilizando o *primer* Glu3.

486 TABLE 2.11: Polymorphic SNPs obtained from genotype sequencing of *Eucalyptus grandis*, their
 487 positions and resulting modifications, utilizing the Glu3 primer.

SNP	Indivíduo	Posição	Modificação	Aminoácido	Modificação	Escala ferrugem
1	50	45	G/A	TCG (Ser)	TCA (Ser)	S3
2	75	72	T/A	ACT (Tre)	ACA (Tre)	Suscetível
3	40	93	G/T	CGG (Arg)	CGT (Arg)	S2
4	55	93	G/T	CGG (Arg)	CGT (Arg)	S3
5	30	93	G/T	CGG (Arg)	CGT (Arg)	S2
6	60	93	G/T	CGG (Arg)	CGT (Arg)	Hipersensibilidade
7	45	93	G/T	CGG (Arg)	CGT (Arg)	S3
8*	75	231	G/T	GTA (Val)	TTA (Leu)	Suscetível
9*	65	231	G/T	GTA (Val)	TTA (Leu)	Hipersensibilidade
10*	70	231	G/T	GTA (Val)	TTA (Leu)	Hipersensibilidade

488 *Mutações não sinônimas

489

490 Resultados relativamente semelhantes aos encontrados nesse trabalho foram relatados por
 491 outros autores. Thumma et al. (2012), estudando o efeito do estresse hídrico na expressão gênica em *E.*
 492 *camaldulensis*, encontraram 27 SNPs em 17 genes analisados. Dillon et al. (2012), trabalhando com os
 493 genes AcT7, COP1e CIP7, que influenciam nas propriedades da madeira, observaram nove SNPs em
 494 três populações de *Corymbia citriodora*.

Como os SNPs encontrados em regiões codificantes podem alterar o aminoácido e com isso a proteína, os mesmos foram classificados quanto ao tipo da mutação, em sinônima e não sinônima. Dos 24 SNPs encontrados para o gene da 1,3 β -glucanase, 10 (42%) foi classificado como mutação não sinônima e 14 (58%) em sinônima.

Quanto à classificação de mutações de substituição por transição e transversão, dos 24 SNPs encontrados utilizando-se os *primers* Glu1, Glu2 e Glu3 a partir do gene da 1,3 β -glucanase, oito foram transições (33%), nesse caso cinco SNPs foram substituídos pelas bases (A→G), três pelas bases (G→A) e 16 transversões (66%), sendo dois SNPs substituídos pelas bases (A→T), 9 (G→T), três (G→C), um (T→G) e um (T→A), (Tabela 2.12).

As mutações por substituições encontradas nesse trabalho não seguiram a normalidade, pois as substituições por transição costumam ocorrer com maior frequência no genoma de diversos organismos (LEWIN, 2008). A taxa de transições/transversões foi de 0,5.

Foram observadas mutações tanto nos indivíduos resistentes quanto nos suscetíveis, não sendo possível correlacionar as mutações encontradas com a classe de severidade da ferrugem do eucalipto para o gene da 1,3 β -glucanase. Entretanto, dos 24 SNPs encontrados, 15 (63%) foram observados em indivíduos suscetíveis.

TABELA 2.12: Número e porcentagem de transições e transversões detectadas na análise de SNPs utilizando os *primers* Glu1, Glu2, Glu3.

TABLE 2.12: Number and percentage of transitions and transversions detected in SNP analysis utilizing the primers Glu1, Glu2, Glu 3.

Transições	Ocorrências	%
A-G	5	20,83
G-A	3	12,50
Sub-total	8	33,33
Transversões	Ocorrências	%
A-T	2	8,33
G-T	9	37,50
G-C	3	12,50
T/G	1	4,17
T/A	1	4,17
Sub-total	16	66,67
Total	24	100

517 **Análise da diversidade**

518 Com o objetivo de quantificar a diversidade nucleotídica da espécie de *Eucalyptus grandis* no
 519 segmento dos genes quitinase e 1,3 β -glucanase, foram estimados os principais parâmetros (Tabela
 520 2.13). Nas análises dos 15 indivíduos genotipados, constatou-se a formação de 11 haplótipos, a
 521 diversidade haplotípica foi 1,0, a diversidade nucleotídica foi 0,01618 para o gene quitinase. Para o
 522 gene 1,3 β -glucanase foram observados a formação de 12 haplótipos, a diversidade haplotípica foi
 523 0,987, e a diversidade nucleotídica foi 0,00825.

524

525 TABELA 2.13: Diversidade nucleotídica para os genes da quitinase e 1,3 β -glucanase.

526 TABLE 2.13: Nucleotide diversity for chitinase genes and β -1,3-glucanase.

	Quitinase	1,3 β -glucanase
Nº. sequências de DNA	11	13
Nº. Sítios	745	556
Índice de diversidade		
S	37	16
Nº. haplótipos	11	12
Diversidade haplotípica	1,000	0,987
Π	0,01618	0,00825
Θ	0,01744	0,0098

527 S: número de sítios segregantes; π : diversidade nucleotídica

528

529 Outros estudos relacionados ao gênero *Eucalyptus* demonstraram resultados relativamente
 530 semelhantes para os valores de diversidade nucleotídica encontrados neste trabalho. Creux et al.
 531 (2013), estudando a diversidade genética em regiões promotoras dos genes que governam a síntese de
 532 celulose em diferentes espécies de eucalipto, relataram que o nível de diversidade nucleotídica variou
 533 de 0,014 a 0,068. Neves et al. (2008), trabalhando com os genes CCR e F5H, observaram que os
 534 valores médios para π nas espécies *E. grandis*, *E. globulus* e *E. urophlylla* foram, respectivamente
 535 0,01604; 0,00391 e 0,00305. Em outras espécies relacionadas à silvicultura, Pot et al. (2006),
 536 avaliando a diversidade nucleotídica em oito genes candidatos envolvidos na formação da madeira,
 537 encontraram valores médios de 0,00241 para *Pinus pinaster* e 0,00186 para *Pinus radiata*.

538 Em linhas gerais, devido à polinização cruzada, elevada heterozigosidade, baixo nível de
 539 domesticação e incipiente seleção artificial, espécies florestais tendem a apresentar elevada diversidade
 540 nucleotídica quando comparadas com outras espécies de plantas, como o milho, que já se apresenta
 541 altamente domesticado (SAVOLAINEN; PYHAJARVI, 2007).

CONCLUSÕES

Foram detectados 53 SNPs em uma sequência de 1193 pb para o gene quitinase, e 24 SNPs em uma sequência de 3564pb, para o gene 1,3 β -glucanase.

Não houve relação entre as mutações encontradas com a classe de severidade da ferrugem.

Os 15 genótipos de *Eucalyptus grandis* analisados formaram 11 haplótipos para o gene quitinase e 12 para o gene 1,3 β -glucanase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATEPAULO, A.R.; CAETANO, A.R.; MENDES, J.R.C.T, Detection of SNPs in bovine immune-response genes that may mediate resistance to the cattle tick *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. **Animal Genetics**, v.39, n.3, p.328-329, 2008.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1997.
- BOAVA, L. P. et al. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa phytopathol.** vol.36, n.2, 2010.
- BORTOLOTO, T.M. **Construção de mapa molecular de uma população de Eucalyptus grandis segregante para o caráter florescimento precoce utilizando marcadores RAPD**. Botucatu, 2006, Dissertação (para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Área de concentração em Genética)– Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v.234, n.2, p.177-186, 1999.
- CALVO, J.H.; MARTÍNEZ-ROYO, A.; SILVERI, L. Isolation, mapping and identification of SNPs for four genes (ACP6, CGN, ANXA9, SLC27A3) from a bovine QTL region on BTA3. **Cytogenetics and Genome Research**, v.114, n.1, p.39-43, 2006.
- CEITA, G. de O. et al. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Science**. Vol.173, p. 106-117, 2007.
- CHAMARY, JV, PARMLEY, JL, HURST, LD. Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals, **Nat. Rev. Genet.** 7:98–108, 2006.
- CHANDRASERKAR, A. et al. Identification os single nucleotide polymorphism in ginger using expressed sequence tags. **Bioinformation**, v.4, p.119-122, 2009.
- CHEUNG, W.Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **Technical Tips**, v. 3, p.69-70, 1993.

- CHING, A, et al. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. **BMC Genetics**, v.3, p.19, 2002.
- CREUX, N. M. et al. Diversity and cis-element architecture of the promoter regions of cellulose synthase genes in *Eucalyptus*. **Journal Information**, v. 9, p.989-1004, 2013.
- DAHIYA, N. et al. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 71, p.773–782, 2006.
- DILLON, S. K. et al. Association genetics in *Corymbia citriodora* subs variegata identifies single nucleotide polymorphisms affecting wood growth and cellulosic pulp yield. **Journal Information**, v. 195, p.595-603, 2012.
- DOMINGUES, D.S. **Identificação de marcador RAPD e SCAR relacionado ao caráter florescimento precoce em *Eucalyptu grandis***. Botucatu, 2003, 24p. Trabalho científico (exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- FERREIRA, ME, GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. Brasília: **Embrapa-Cenargen**, 3 ed. 220p. 1998.
- GANAL, M.W.; ALTMANN, T.; RODER, M.S, SNP identification in crop plants. **Plant Biol**. 12(2):211-7. 2009.
- GONÇALVES, S. 1929. **Lista preliminar das doenças das plantas do estado do Espírito Santo**. Rio de Janeiro. Ministério da Agricultura. p 1-12.
- GONZALEZ-MARTINEZ SC. et al. DNA sequence variation and selection of tag SNPs at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. **Genetics**. 172:1915-1926, 2006.
- GUPTA, P.; LEE, K.H. Silent mutations result in HlyA hypersecretion by reducing intracellular HlyA protein aggregates, **Biotechnol. Bioeng**. 101:967–974, 2008.
- GUPTA, P.K.; ROY, J.K.; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science**, v.80, n.4, p.4524-535, 2001.
- HAMMER, M.F. A recent common ancestry for human Y chromosomes. **Nature**, v.378, n.6555, p.376-378, 1995.
- IBÁ- **Indústria Brasileira de Árvores**, 2014. Disponível em: <http://www.bracelpa.org.br/pt/>. Acesso em 12 de novembro de 2014.
- KELLER, I.; BENSASSON, D.; NICHOLS, R. A. Transition-transversion bias is not universal: a counter example from grasshopper pseudogenes. **Plos Genetics**, v.3, p.22, 2007.
- KUDLA, G, et al, Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. **Science** 324: 255–258, 2009.
- KÜLHEIM, C. et al. Comparative SNP diversity among four *Eucalyptus* species for genes from secondary metabolite biosynthetic pathways. **BMC Genomics** 10:452-463, 2009.

- 641 KUMAR, K.K. et al. A high throughput functional expression assay system for a defence gene
642 conferring transgenic resistance on rice against the sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. **Plant**
643 **Science**.vol.165, p. 969–976, 2003.
- 644
645 LEVY, D, et al, Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. **Nature Genetics**.
646 41: 677-687, 2009.
- 647
648 LEWIN, B. **Genes IX**. 9 ed. Porto Alegre. Artmed, 2008, 15-16, 60 p.
- 649
650 LIAO, P.; LEE, K.H, From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology
651 applications. **Biochemical Engineering Journal**. 149-158, 2010.
- 652
653 LIU, B. et al. Effects of transgenic plants on soil microorganisms. **Plant and Soil**. Vol. 271, p. 1–13,
654 2005.
- 655
656 MARTINS, E. M. Proteínas relacionadas á patogênese. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.;
657 STANGARL, J.R.; CIA, P. **Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia**
658 **Molecular**. Piracicaba-SP:FEALQ, 2008.p.387-410.
- 659
660 NEI, M.; LI, W.-H. **Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction**
661 **endonucleases**. Proc Natl Acad Sci USA, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.
- 662
663 NEI, M. Molecular evolutionary genetics. **New York**: Columbia University Press, 512 p. 1987.
- 664
665 NEVES, L.G.et al. Diversidade nucleotídica e utilização de SNPs para o mapeamento de genes
666 candidatos em *Eucalyptus*. **Comunicado Técnico 180**, p.14, 2008.
- 667
668 NOVAES, E.; DROST, D.R.; FARMERIE, W.G.High-throughput gene and SNP discovery in
669 *Eucalyptus grandis*, an uncharacterized genome. **BMC Genomics**. 9: 320, 2008.
- 670
671 PIERI, C. **Caracterização de *Puccinia psidii*, identificação de mirtáceas diferenciadoras de raças**
672 **fisiológicas e estudos anatômicos do limbo foliar relacionados à resistência**. Botucatu, 2012. 169p.
673 Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal)- Faculdade de Ciências Agrônômicas, Júlio de Mesquita
674 Filho, Botucatu, 2012.
- 675
676 POT, D.et al. QTLs and candidate genes for wood properties in maritime pine (*Pinus pinaster* ait.).
677 **Tree genetics and genomes**, Berlin, v. 2, p. 10-24, 2006.
- 678
679 PUNJA, Z.K.; ZHANG, YE-YAN.Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases.
680 **Journal of Nematology**, v. 25, n.4,p.526-540, 1993.
- 681
682 RAFALSKI, A.Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Curr Opin Plant**
683 **Biol**, v. 5, n. 2, p. 94-100, 2002.
- 684
685 ROZAS J.et al. (2010). DnaSP Version 5 Help Contents [Help File]. Available with the program at.
686 <http://www.ub.edu/dnasp/>.
- 687
688 SANTOS, S.N. **Genes de Lignificação em *Eucalyptus*: estrutura e diversidade dos genes 4cl e**
689 **ccoamt**. 2005. 229 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade
690 Católica de Brasília, Brasília, D.F.
- 691

- 692 SAVOLAINEN, O.; PYHAJARVI, T. Genomic diversity in forest trees. **Current opinion in plant**
693 **biology**, v. 10, p. 162-167, 2007.
- 694
- 695 THUMMA, B.R. et al. Polymorphisms in Cinnamoyl CoA Reductase (CCR) are associated with
696 variation in microfibril angle in *Eucalyptus* ssp. **Genetics**, 2005.
- 697
- 698 THUMMA, B. R.; SHARMA, N.; SOUTHERTON, S. G. Transcriptome sequencing of *Eucalyptus*
699 *camaldulensis* seedlings subjected to water stress reveals functional single nucleotide polymorphisms
700 and genes under selection. **Journal Information**, v. 13, n.384, 2012.
- 701
- 702 VAN, K, et al. Discovery of single nucleotide polymorphisms in soybean using primers designed from
703 ESTs. **Euphytica**. 139: 147-155, 2004.
- 704
- 705 ZARATE, L. A.; CRISTANCHO, M. A.; MONCADA, P. Strategies to develop polymorphic markers
706 for *coffea arabica* L. **Euphytica**, v. 173, p. 243-253, 2010.
- 707
- 708 ZHU, YL, et al. Single-nucleotide polymorphisms in soybean. **Genetics**, v.163, n.3, p.1123, 2003.