

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**UTILIZAÇÃO DE BULKED SEGREGANT ANALYSIS NA IDENTIFICAÇÃO DE  
MARCADORES LIGADOS A GENES QUE CONTROLAM A RESISTÊNCIA À  
FERRUGEM (*Puccinia psidii* WINTER) EM *Eucalyptus* sp.**

**KARINA CARNIELLI ZAMPROGNO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Proteção de Plantas.

BOTUCATU -SP

Agosto - 2005

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

**USE OF BULKED SEGREGANT ANALYSIS IN IDENTIFICATION OF  
MOLECULAR MARKERS LINKED TO RESISTANCE THE RUST (*Puccinia psidii*  
WINTER) IN *Eucalyptus* sp.**

Engenheira Agrônoma: Karina Carnielli Zamprogno

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em  
Agronomia - Proteção de Plantas.

BOTUCATU

Agosto - 2005

Aos meus pais **José Oswaldo** e **Maria Silvia**, pela confiança, apoio nos momentos mais difíceis e por todo amor...

Ao meu noivo **Marco Cotrim**, pela compreensão, estímulo e todo carinho que me trouxeram momentos de muita felicidade...

A minha sobrinha **Jaqueline**, minha alegria.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, em especial:

A **Deus** pelas oportunidades concedidas, por me fazer sentir amparada diante de toda e qualquer dificuldade.

Ao Professor **Edson L. Furtado** pela amizade, pela eficiência, compreensão e orientação durante toda pesquisa.

Ao Professor **Celso Marino** pelo apoio, amizade e paciência.

A empresa Votorantim Celulose e Papel pelo material cedido e pelas preciosas informações.

Aos meus familiares que de alguma forma torceram por mim, em especial a minha cunhada Patrícia que me fez sentir importante e querida.

Aos meus amigos: **Tatiana Paulossi** (Tati), **Helenize Gabriela** (Juá), **Ligia Martins** (Jamanta) e **Evandro Tambarussi** (Crovis) pela ajuda espontânea nos momentos mais difíceis.

Aos amigos e companheiros de laboratório, **Márcia, Michelle, Rosana, Adimara, Marcel, Fábio, Marco Tavares, Andréia, Fernanda, Meire, Ana Paula, Virginia, Helena, Cristiane, Tânia, Douglas e Dudu**, obrigada por cada dia de alegria e companheirismo.

A todos os **funcionários** do Departamento de Proteção de Plantas da FCA e do Departamento de Genética do IB.

Aos **professores** do departamento de Proteção de Plantas da FCA pela contribuição na minha formação e principalmente nas difíceis decisões.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Lista de Quadros.....	v
Lista de Figuras.....	vi
RESUMO.....	1
SUMARY.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	7
2.1.GÊNERO <i>Eucalyptus</i> .....	7
2.1.1. Características gerais.....	7
2.1.2. Importância.....	9
2.2. FERRUGEM: <i>Puccinia psidii</i> .....	11
2.2.1. Características gerais.....	11

2.2.2. Importância.....	13
2.3. Controle da ferrugem através da resistência.....	16
2.4. Marcadores RAPD e Bulked Segregant Analysis (BSA).....	17
2.5. Uso de marcadores moleculares na cultura de <i>Eucalyptus</i> sp.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Inoculação do material vegetal.....	22
3.2. Avaliação da ferrugem.....	23
3.3. Extração do DNA.....	24
3.4. Reação de RAPD.....	25
3.5. Composição dos “bulks” .....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Segregação da ferrugem e herança da resistência.....	28
4.2. Composição dos “bulks” e distância do marcador.....	35
5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

## LISTA DE QUADROS

	<b>Página</b>
1. Cálculo do Qui-quadrado.....	31
2. Cálculo Qui-quadrado – Fórmula simplificada.....	31
3. Teste Qui-quadrado para segregação da ferrugem na câmara.....	32
4. Teste Qui-quadrado para segregação da ferrugem no campo.....	32
5. Classificação das plantas nos níveis de severidade da doença no campo.....	35
6. Classificação das plantas nos níveis de severidade da doença em câmara.....	36
7. Indivíduos componentes dos “bulks” contrastantes.....	36
8. “Primers polimórficos” e suas seqüências.....	38

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1. Área de ocorrência natural de <i>Eucalyptus</i> sp.....	8
2. Gel de quantificação do DNA genômico.....	25
3. Escala de notas para avaliação da severidade da ferrugem em eucalipto.....	29
4. Porcentagem de plantas nos níveis de severidade da doença no campo e em câmara.....	30
5. Teste de polimorfismo dos <i>primers</i> utilizando os “bulks” resistente e suscetível.....	37
6. Amplificação dos indivíduos componentes dos “bulks” com o <i>primer</i> AK01.....	39

## RESUMO

Um dos maiores problemas enfrentados pelo setor florestal, no Brasil, tem sido a ocorrência da ferrugem do eucalipto causada por *Puccinia psidii* Winter, devido a sua severidade em plantações de procedências muito suscetíveis, com menos de dois anos de idade, onde a produtividade das plantas atacadas é bastante reduzida. Devido a grande importância da cultura de *Eucalyptus* no Brasil e no mundo empresas do setor florestal têm buscado, através de programas de melhoramento genético, reduzir as perdas de produção e atender a demanda do mercado de papel e celulose.

No presente trabalho, mudas de *Eucalyptus* pertencentes a uma geração F1, provenientes do cruzamento controlado entre os parentais: C0 (resistente) e VR (susceptível), foram inoculadas com *Puccinia psidii* em casa de vegetação e acompanhadas até o aparecimento dos sintomas da ferrugem. Foram classificadas, em dois grupos, segundo sua resistência como resistentes

(ausência de sintomas) e suscetíveis (presença de sintomas e esporulação), cujas amostras de DNA foram comparadas com o uso de marcadores moleculares associado ao método de BSA (Bulked Segregant Analysis). O polimorfismo entre os “bulks” foi geneticamente relacionado ao loco que determina a característica de resistência ou suscetibilidade. Dentre os 720 “primers” testados, 19 foram polimórficos, porém, apenas o marcador AK 01 manteve-se presente, quando testado em todos os indivíduos integrantes do “bulk” e no restante da população e mostra-se localizado a uma distância genética estimada de 20 cM do gene de resistência.

USE OF BULKED SEGREGANT ANALYSIS IN IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS LINKED TO RESISTANCE THE RUST (*Puccinia psidii* WINTER) IN *Eucalyptus* sp. Botucatu, 2005. 54p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: KARINA CARNIELLI ZAMPROGNO

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

## SUMMARY

One of the biggest problems faced by forest sector in Brazil, has been the occurrence of specific case of rust in eucalyptus caused by *Puccinia psidii* Winter, due to its severity in crops from highly susceptible origins, with less than two years of life, where the infected plants yield is extremely reduced. Due to the great importance of the *Eucalyptus* crop in Brazil and in the world, companies in the forest sector have aimed, through

genetic breeding programs, to reduce yield losses and meet the demands of the paper and cellulosis market.

On the present study, seedlings of *Eucalyptus* from an F1 generation, bred from controlled crossing between parents C0 (resistant) and VR (susceptible), were inoculated with *Puccinia psidii* in a greenhouse and followed until the rust symptoms appeared. They were classified into two groups, according to their reaction in: resistant (absence of symptoms) and susceptible (presence of symptoms and buds), whose DNA samples were compared using molecular markers associated to the BSA (Bulked Segregant Analysis) method. The polymorphism among the “bulks” was genetically characteristic. Among the 720 tested “primers”, 19 were polymorphic. But, only the AK01 marker kept present, when tested in all individuals who composed the “bulk” and in the rest of the population and it was shown as located in an estimated genetic distance of 20 cM from the resistance gene.

---

Keywords: *Eucalyptus* sp; *Puccinia psidii*; Bulked Segregant Analysis

## 1. INTRODUÇÃO

O eucalipto é a espécie florestal de grande importância econômica para diversos países, sendo que cerca de 40% da área plantada com *Eucalyptus* no mundo encontra-se no Brasil (ELDRIDGE et al., 1994). Os plantios florestais no Brasil ocorrem, em sua maioria, com espécies deste gênero devido ao fácil manejo, a grande variabilidade genética, a plasticidade em diferentes condições ambientais e um rápido ciclo de rotação.

Conforme relatado pela Bracelpa (2004), o setor florestal brasileiro vem apresentando um significativo desempenho e participação no desenvolvimento sócio-econômico nacional, gerando um PIB superior a US\$ 20 bilhões, equivalente a 4% do PIB nacional, propiciando quase dois milhões de empregos (700 mil diretos) e divisas anuais de aproximadamente US\$ 4,5 bilhões, representando 8% do total das exportações brasileiras.

Em 2003, o setor florestal exportou aproximadamente US\$ 3,1 bilhões, gerando um saldo comercial de US\$ 2,5 bilhões, com o recolhimento de aproximadamente R\$ 1,7 bilhão em impostos. Os segmentos industriais de celulose e papel, nos últimos anos, têm produzido médias anuais de aproximadamente nove e oito milhões de toneladas, respectivamente, conferindo-lhes a sétima e décima primeira colocações na lista dos maiores produtores mundiais (BRACELPA, 2004).

A principal vantagem competitiva do Brasil é a sua tecnologia florestal, baseada em programas de melhoramento genético e de multiplicação clonal do eucalipto desenvolvidos nos últimos trinta anos. Para González et al. (2002), todo esse conhecimento científico e tecnológico gerou um ganho na produtividade das plantações florestais, passando de 20 m<sup>3</sup>/ha no início da década de 70, para 50 m<sup>3</sup>/ha em 1999.

Diante da necessidade de aumentar a oferta de madeira de florestas plantadas, torna-se imprescindível introduzir ou aperfeiçoar técnicas que contribuam eficientemente para o aumento da produtividade e melhoria da qualidade das plantações, conferindo-lhes sustentabilidade dos sistemas de produção, sem prejuízos ao ambiente.

A ferrugem do eucalipto causada pelo fungo *Puccinia psidii* Winter é, atualmente, uma das mais importantes doenças do *Eucalyptus* no país, devido a sua severidade em plantações de procedências muito suscetíveis à doença e com menos de dois anos de idade, onde a produtividade é bastante reduzida (FERREIRA, 1989).

Empresas do setor florestal vêm nos últimos anos desenvolvendo programas de melhoramento objetivando a obtenção de materiais vegetais resistentes a ferrugem. 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 destes materiais.

No caso específico da *Puccinia psidii* uma estratégia para auxiliar nos programas de melhoramento é a utilização de marcadores moleculares associados ao método de BSA (*Bulked Segregant Analysis*). Trata-se de um método introduzido por Michelmore *et al.* (1991), que consiste na comparação entre dois conjuntos de DNA contrastantes em relação a uma característica, como resistência e suscetibilidade a determinada doença. É um método rápido para identificar marcadores ligados a qualquer gene específico ou região do genoma que poderá facilitar uma seleção baseada em marcadores moleculares e possibilitará o mapeamento de genes de resistência dentro da população analisada (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1995).

O objetivo do presente trabalho foi utilizar a técnica BSA no estudo de uma geração F1, obtida pelo cruzamento de dois parentais contrastantes com relação a resistência a ferrugem, gentilmente cedidas pela empresa Votorantim Celulose e Papel.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. O GÊNERO *EUCALYPTUS***

#### **2.1.1. Características gerais**

O eucalipto pertence à divisão Angiospermae, classe Dicotyledonea, ordem Myrtales, família *Myrtaceae* e gênero *Eucalyptus*, com muitas espécies, subespécies e alguns híbridos naturais, sendo também notórias as variedades fenotípicas intraespecíficas decorrentes de condições ambientais ou da hibridação (BERTOLUCCI et al., 1995). É um dos gêneros predominantes da flora australiana, estendendo-se das áreas sub-alpinas às florestas úmidas costeiras, às florestas temperadas e à zona mais árida da Austrália.

O gênero está subdividido, taxonomicamente, em oito sub-gêneros 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 contém 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*).

De acordo com Eldridge et al. (1994), as espécies do gênero *Eucalyptus* tiveram sua origem na Austrália e regiões próximas, como Timor, Indonésia, Papua Nova Guiné, Molucas, Irian Jaya e sul das Filipinas, mas confinadas predominantemente ao continente australiano, na faixa latitudinal entre 9°N e 45°S, encontrando-se amplamente distribuídas entre as altitudes de 30 m a 2.000 m. Segundo Waugh (1998), as florestas australianas são dominadas por eucaliptos, onde mais de 720 espécies são reconhecidas, das quais aproximadamente uma centena é utilizada em produtos da madeira.

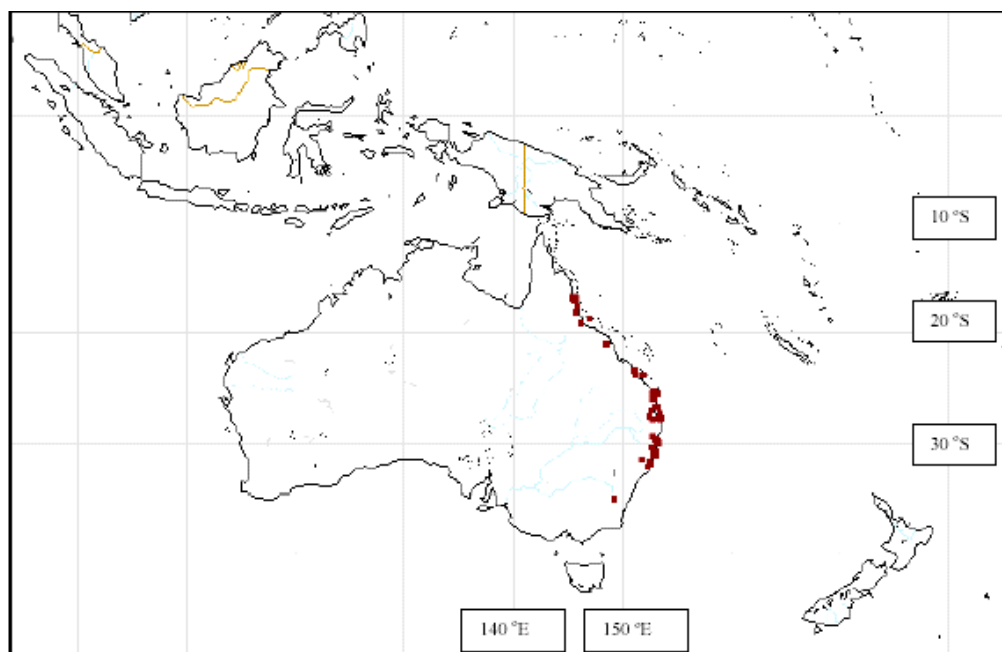


Figura 1. Área de ocorrência natural de *Eucalyptus* sp.

FONTE: Plant Distribution Mapper – CANB SPECIMEN RECORDS - AUSTRALIA  
<http://www.anbg.gov.au/cgi-bin/map/winmap>

### 2.1.2. Importância

Muitas espécies de eucalipto foram levadas para diversos países do mundo, mas, poucas são aquelas utilizadas comercialmente para plantio, provavelmente não mais de vinte espécies, adicionados os híbridos interespecíficos, vêm sendo utilizadas em escala comercial em 80 países da Ásia, da África, das Américas (Central, Norte e do Sul), da Europa, de alguns países do Mediterrâneo e de algumas Ilhas do Oceano Pacífico, compreendidos entre as latitudes de 40N e 45S (FLYNN, 1999). Nesses países, a produtividade do eucalipto é altamente variável, em função das condições edafoclimáticas de cada local, da espécie utilizada, da origem ou procedência da mesma e intensidade de melhoramento.

Desde o uso inicial da madeira de eucalipto para a produção de celulose e papel, ocorrido na Europa, por volta de 1919, muitas espécies vêm ganhando crescente importância e tornando-se mundialmente expressivas. Uma substancial parte da celulose de espécies folhosas usadas na fabricação de papel para impressão e escrita é oriunda de plantações de eucalipto feitas pelos maiores produtores mundiais, principalmente Brasil, Índia, África do Sul, Portugal, Angola, Espanha, China, França e Japão (SBS, <http://www.sbs.org.br>, 2004).

A tendência do comércio internacional de celulose de eucalipto, segundo Flynn (1999), continua motivando o estabelecimento de centenas de milhares de hectares de plantações no mundo. O uso da madeira de eucalipto para energia industrial também tem sido crescente em diversos países, como consequência da primeira crise mundial do petróleo. Estimativas do ano de 1985 já indicavam que a área cultivada mundialmente era superior a 6 milhões de hectares (ELDRIDGE et al., 1994). Davidson (1998), fornece uma estimativa de 13,6 milhões de hectares plantados em todo o mundo com o gênero, mas ressalva que plantações com o propósito industrial devem somar cerca de 50% deste total, sendo a outra metade constituída de plantações em escala não comercial destinadas à produção de lenha. Esse valor da área mundial plantada também é confirmado por Flynn (1999) e Silva (2004), os quais relatam que, dos quase 100 países com programas de reflorestamento no mundo, somente 58 deles o fazem em grande escala.

No Brasil, atualmente, as plantações de eucalipto, com propósito industrial, somam aproximadamente três milhões de hectares, estabelecidas para a produção de celulose,

papel, carvão vegetal destinado às siderurgias, como forma alternativa de substituição do carvão mineral. Também, presta-se, à fabricação de lâminas e compensados de madeira e painéis de madeira reconstituída, tais como as chapas de fibras, os aglomerados de madeira, “MDF” (fibras de média densidade) e “OSB” (painel de partículas orientadas), além de madeira serrada. Espécies de eucalipto têm sido predominantemente utilizadas nos reflorestamentos brasileiros, devido ao seu rápido crescimento, capacidade de readaptação de determinadas espécies às diversas regiões ecológicas e pelo potencial econômico de utilização da sua madeira. Dentre as principais espécies utilizadas, *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden e seus híbridos interespecíficos, principalmente com a espécie *E. urophylla*, continuam sendo as mais importantes, face ao seu uso intensivo e crescente nos segmentos industriais e, mais recentemente, para a produção de madeira serrada (SILVA, 2004).

## 2.2. FERRUGEM – *Puccinia psidii*

### 2.2.1. Características gerais

Recebem o nome de ferrugens as doenças fúngicas causadas por basidiomicotas pertencentes a Ordem Uredinales (CUTTER JR., 1959; COFFEY, 1975; MARTINS et al., 1995). Nesta ordem estão relatados mais de 130 gêneros e 5000 espécies. São considerados parasitas evoluídos (colonização intercelular) e afetam um elevado número de plantas (BERGAMIN FILHO et al, 1995).

Estes 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 tem 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).

As ferrugens estão distribuídas em regiões temperadas e tropicais úmidas, tendo o vento como o seu principal disseminador a longas distâncias (até mesmo intercontinentais). A sobrevivência destes patógenos, devido ao parasitismo obrigatório, ocorre em hospedeiros intermediários principalmente na forma de uredósporos, mas, geralmente os teliósporos atuam como estrutura de resistência e garantem a sobrevivência do patógeno na ausência do hospedeiro (KRUGNER, 1980).

A infecção ocorre quando os esporos (predominantemente uredósporos) atingem a planta hospedeira suscetível, germinam quando a umidade do ar está próxima da saturação, melhor ainda se houver filme d' água na superfície foliar. Ocorre então formação do apressório, a penetração se dá através dos estômatos e a colonização através de micélio intercelular e emissão de haustórios para o interior das células e quando o patógeno inicia sua reprodução, ocorre um rompimento da epiderme foliar ficando exposta a massa de uredósporos. Estas pústulas são geralmente salientes e podem coalescer, tomando uma parte considerável do limbo foliar (FIGUEIREDO & CARVALHO JR, 1994).

É importante destacar que, além das diferenças morfológicas, também existem diferenças fisiológicas entre as ferrugens, sendo tais diferenças resultantes da ação de fatores ambientais sobre as espécies. Desta forma, muitas ferrugens encontradas em regiões de clima temperado ou tropical possuem as paredes de seus esporos extremamente espessas e com elevada concentração de substâncias auto-inibidoras da germinação. Assim, os esporos permanecem em dormência durante os períodos de temperaturas extremas. Estas substâncias auto-inibidoras também possibilitam a sobrevivência do esporo na ausência do hospedeiro, porque induzem à germinação aleatória dessas estruturas (FIGUEIREDO & CARVALHO JR., 1994).

Trata-se de patógenos altamente específicos quanto ao hospedeiro, tanto em nível de família quanto gênero ou espécie da planta (apresentam raças fisiológicas e formas especiais). Estudos indicam a existência de especializações, pois, verificou-se que esporos de *P. psidii* retirados de goiabeira não infectam o eucalipto (CASTRO, 1983; CASTRO et al., 1984). Também que esporos provenientes do jambo são capazes de infectar eucalipto (CASTRO, 1983). De acordo com Coutinho & Figueiredo (1984) existem pelo menos cinco tipos de especializações fisiológicas dentro da espécie, em relação a seis gêneros de hospedeiros pertencentes a família *Myrtaceae*. Quando inoculados 13 isolados de urediniosporos de *P. psidii*, obtidos de diferentes hospedeiros, em goiabeira, jambeiro, *Myrcia itambensis* e diferentes espécies de *Eucalyptus*, obtiveram como resultado três grupos de especialização fisiológica: grupo 1, que infecta eucalipto e jambo, Grupo 2, infectando eucalipto e goiabeira e grupo 3 que provoca infecção apenas em goiabeira (COELHO, 1988). A única diferença observada entre os grupos foi a produção de maior e menor quantidade de soros por unidade de área foliar (COELHO, 1988).

Castro et al., (1984) também por meio de inoculações cruzadas, observaram que nem todos os isolados de *P. psidii* utilizados em seus estudos eram capazes de infectar ou produzir pústulas em determinadas procedências de *Eucalyptus*. Em algumas das procedências ocorria apenas uma reação de hipersensibilidade, em enquanto que em outras ocorria uma severa infecção.

As ferrugens também podem ser classificadas como macrocíclicas quando seu ciclo vital é dito longo ou completo (possui as cinco fases) e microcíclica quando for curto ou incompleto. Recebem também denominação de autoécia quando todo ciclo vital se

completa em um único hospedeiro e heteroécia quando for necessário que haja um hospedeiro alternativo para completar o ciclo (PECCININ & PASCHOLATI, 1997).

### 2.2.2. Importância

No Brasil, algumas ferrugens possuem grande importância por causarem perdas bastante significativas as culturas de interesse agrônômico, sendo que a idade das plantas atacadas varia de acordo com o material genético e as condições ambientais (TAKAHASHI, 2002). Entre essas, estão a ferrugem do trigo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*), a ferrugem do café (*Hemileia vastatrix*), a ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizae*), ferrugem do feijão (*Uromyces appendiculatus*), a ferrugem das hortícolas e a ferrugem das *Myrtaceas* frutíferas e florestais (*Puccinia psidii*).

A ferrugem do eucalipto foi relatada pela primeira vez no Brasil, em 1929 (GONÇALVES, 1929), e formalmente descrita em 1944 (JOFFILY, 1944). Atualmente, constitui uma das mais importantes doenças do eucalipto no país. Incide tanto em mudas no viveiro quanto em plantas jovens no campo (FERREIRA, 1989), aproximadamente nos dois primeiros anos de plantio, em brotações após o corte raso e em jardins e mini jardins clonais.

Em 1973, ocorreu na costa do Espírito Santo, a primeira constatação de danos preocupantes em um viveiro de *E. grandis*, procedentes da África do Sul (FERREIRA, 1989). Como resultado dessa infecção mais de 400 mil mudas foram perdidas. A partir de 1979, novos ataques foram registrados no vale do Rio Doce, Zona da Mata de Minas Gerais, Nordeste do Espírito Santo e Sudeste da Bahia (FERREIRA & ARAUJO, 1981; FERREIRA & SILVA, 1982). Embora fossem bastante severos esses ataques ocorriam esporadicamente, atingindo viveiros e plantações de *E. grandis*, *E. phaeotricha*, *E. citriodora* e *E. cloenziana* procedentes da África do Sul e Zimbawe (FERREIRA & ARAUJO, 1981).

Em 1980 ocorreram novos registros, porém mais severos que os anteriores, sendo que em Ipatinga, MG, mais de 300 hectares de *E. grandis*, com seis meses de idade, foram dizimados pela doença (FERREIRA, 1983).

A partir de 1991 começaram a ser registrados os primeiros surtos de ferrugem em áreas de reforma florestal, na região do Vale do Paraíba, onde desde 1996 a doença tem se manifestado de forma generalizada (TAKAHASHI et al., 1997).

Segundo Demuner & Alfenas (1991), as espécies de *Eucalyptus* mais suscetíveis á *P. psidii* são: *E. grandis* W. Hill ex Maiden, *E. pellita* F. Muell, *E. phaeotricha* Blakely et Mckie e *E. cloeziana* F. Muell. De acordo com Ruiz et al., (1989), *E. cloeziana* é uma espécie com grande potencialidade para o reflorestamento no sudeste da Bahia devido ao rápido crescimento e a alta densidade de sua madeira. Porém, a ferrugem constitui um dos fatores limitantes do estabelecimento de *E. cloeziana* e da condução da rebrota após o corte raso no sudeste da Bahia. Em 1987, cerca de 122 ha de *E. cloeziana* foram praticamente dizimados em Teixeira de Freitas - BA em razão do ataque de *P. psidii* (RUIZ et al., 1987).

*P. psidii* é um fungo nativo da América do Sul e encontra-se amplamente distribuído nas Américas do Sul e Central e nas ilhas do Caribe (LAUDON & WATERSTON, 1965; DI STEFANO et al., 1998), havendo ainda relatos da sua presença na Jamaica (MACLACHLAN, 1938) e na Flórida - EUA (MARLATT & KIMBROUGH, 1979; RAYACHHETRY et al., 1997). Provavelmente a ferrugem em eucalipto seja causada por isolados do patógeno provenientes das mirtáceas nativas (CASTRO et al., 1983). O fungo ainda não foi encontrado na Austrália, centro de origem do *Eucalyptus* (COUTINHO et al., 1998). Naquele país só há, no momento, relatos de duas ferrugens em Myrtaceae, sendo uma das quais causada por *P. cygnorum* Shivas & Walker em *Kunzea ericifolia* (Sm) Rchb. ex Heynh, uma espécie arbustiva utilizada em arranjos florais (SHIVAS & WALKER, 1994).

O controle da ferrugem pode ser feito por meio de aplicação de fungicidas, colheita de materiais suscetíveis em épocas desfavoráveis à doença (escape pela época) e plantio de materiais resistentes. Em materiais suscetíveis de alto valor comercial, pode-se aplicar triadimenol a 0,5 g ou 0,5 ml i.a./L, a cada 20 dias, nas brotações após o corte raso e em jardins clonais (ALFENAS et al., 1993).

Devido a atual preocupação com as questões ambientais, métodos alternativos de controle, tem sido pesquisados. Para o controle biológico, estuda-se o uso de *Bacillus subtilis* que produzem metabólitos antagônicos e *Fusarium decemcellulare* que apresentam ação hiperparasitária sobre as estruturas esporíficas de *P. psidii* (AMORIM et al., 1993; WICHMANN & BETIOL, 1994; SANTOS et al., 1998).

O plantio de genótipos de eucalipto de rápido crescimento é também uma medida preconizada (FERREIRA, 1983). Todavia, a utilização da resistência genética é a

medida de controle mais indicada, por ser de menor custo, facilmente exeqüível e por reduzir o impacto de fungicidas no ambiente (ALFENAS et al., 1989).

### 2.3. CONTROLE DA FERRUGEM ATRAVÉS DA RESISTÊNCIA

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 (FERREIRA & SILVA, 1982; DIANESE et al., 1984; DIANESE et al., 1986; PASSADOR, 1994; CARVALHO et al., 1998; JUNGHANS, 2000).

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 sempre a medida mais econômica e a que menos afeta o custo de produção (BERGAMIN FILHO et al., 1995). As espécies arbóreas, pelas características que apresentam, dificultam ou tornam impossível a aplicação de medidas de controle de outra natureza.

A variabilidade genética dentro do gênero *Eucalyptus* para resistência às doenças e a fatores fisiológicos adversos é muito grande e isto acontece, particularmente, com a ferrugem do eucalipto. Portanto, a primeira medida de controle da ferrugem do eucalipto é evitar o plantio comercial de materiais altamente suscetíveis. A variabilidade com relação à resistência a ferrugem também existe dentro de determinada procedência que pode ser detectada no campo, somente em condições de intenso ataque ou por meio de inoculações artificiais com alta concentração de esporos (FERREIRA, 1989).

É possível selecionar espécies, procedências, progênies ou clones de eucalipto resistentes para plantio ou emprego em programas de melhoramento a partir de infecções naturais no campo, em áreas onde a enfermidade é severa, ou por meio de inoculações artificiais do patógeno em mudas, sob condições controladas (CARVALHO, 1992). Embora a seleção de materiais resistentes ocorra nas empresas florestais, nada se conhece sobre a herança da resistência no patossistema *P. psidii* X *Eucalyptus* sp.

#### 2.4. MARCADORES RAPD E “BULK”ED SEGREGANT ANALYSIS (BSA):

O advento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MULLIS E FALOONA, 1987) e seus posteriores avanços, utilizando uma enzima DNA polimerase termoestável e termocicladores programáveis com elevada capacidade de processamento, imprimiram grande automatização à síntese *in vitro* de DNA. A técnica de PCR consiste na síntese enzimática de um segmento de DNA, delimitado por um par de “primers” de seqüências específicas de nucleotídeos de fita simples. “primers” são seqüências curtas de DNA, que pareiam com o DNA molde e servem de iniciadores para a síntese *in vitro* de uma nova fita de DNA. As reações ocorrem em ciclos alternados de temperatura, sendo que cada ciclo do PCR envolve três etapas. Na primeira ocorre a desnaturação da fita dupla de DNA, posteriormente, os “primers” se pareiam com as seqüências complementares específicas que flanqueiam o sítio alvo, e então a nova fita de DNA é sintetizada a partir das extremidades 3'-OH livres dos “primers” por meio da enzima DNA polimerase. Como cada ciclo é repetido diversas vezes, a amplificação do DNA-alvo ocorre em progressão geométrica, requerendo uma quantidade muito pequena de DNA molde (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

A facilidade, a rapidez e a sensibilidade dessa técnica possibilitaram o surgimento de uma nova geração de marcadores moleculares baseados em PCR. O primeiro deles foi o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990) ou AP-PCR (*Arbitrarily Primed-PCR*) (WELSH & MCCLELLAND, 1990).

O RAPD é uma variação da técnica de PCR que utiliza um único “primer” de dez nucleotídeos e com seqüência arbitrária. Portanto, para que um fragmento de DNA seja amplificado, duas regiões complementares ao “primer” devem estar separadas por até 2.000 pb e em orientações opostas. Com isso, são amplificados fragmentos de DNA distribuídos ao acaso no genoma, sem a necessidade do conhecimento prévio da seqüência do DNA. A detecção dos produtos de amplificação é feita em gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

As bases moleculares do polimorfismo de RAPD são mutações de ponto ou deleções no sítio de pareamento do “primer”, ou inserções entre os sítios de pareamento, deixando-os a uma distância tal que impossibilita a sua amplificação. O RAPD é uma técnica

de fácil execução, de custo reduzido e aplicável a qualquer tipo de organismo. No entanto, existem problemas inerentes à reprodutibilidade dos padrões de amplificação, além do baixo conteúdo de informação genética por loco, uma vez que, são marcadores dominantes. Este tipo de marcador possibilita a detecção de apenas um alelo por locos, sendo que a presença de uma banda no gel identifica indivíduos homozigotos dominantes (AA) e heterozigotos (Aa), não permitindo a distinção entre eles. O homozigoto recessivo (aa) é identificado pela ausência da banda. A grande vantagem da técnica de marcadores RAPD está, sem dúvida, na sua capacidade de detectar polimorfismo de modo simples e rápido, permitindo assim que possam ser usados como “fingerprinting” distinguindo divergências mínimas entre espécies ou clones ou dentro destes. Além disso, os RAPDs são muito eficientes em identificar marcadores mais proximamente ligados, assim como podem mapear regiões constituídas por seqüências repetitivas (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1995).

Os RAPDs são bastante estudados, e favorece inúmeras aplicações nos setores agrônomicos e florestais, neste mais recentemente. Com essa metodologia, constatam-se vantagens como o grande potencial para automação, que reflete o alto número de marcadores analisados em curto tempo; proporciona a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, de melhoramento e de bancos de germoplasma; e como principal vantagem a construção de mapas genéticos que fornece a obtenção de análise completa de genomas, localização de regiões genômicas importantes, além do mapeamento do *locus* de características “quantitativas”. Esses resultados obtidos são responsáveis pelo desenvolvimento de linhagens, programas de retrocruzamento, clonagem de genes e outras importantes “informações” para o sucesso dos programas de melhoramento florestal (NEWBERRY & FORD-LLOYD, 1993).

Dois métodos podem ser utilizados para agilizar a identificação de marcadores ligados a um gene ou a uma região genômica: a análise em linhagens quase isogênicas (NIL’s - “near isogenic lines”) ou a análise de populações segregantes com fenótipos contrastantes, pela técnica de BSA (MICHELMORE et al., 1991). A utilização de NIL’s no melhoramento florestal é inviável, pois requer vários retrocruzamentos, um processo lento e que levaria à depressão endogâmica (HARDNER & POTTS, 1995).

O método de “Bulked Segregant Analysis” (BSA), envolve a comparação de duas misturas “pools” de amostras de DNA dos indivíduos que apresentam o mesmo fenótipo

para determinada característica, provenientes de uma população segregante originária de um único cruzamento. Dentro de cada “pool” ou “bulk”, os indivíduos são identificados para características ou gene de interesse, mas são arbitrários para todos os outros genes. Dois “pools” contrastantes para uma característica (por exemplo: resistência ou suscetibilidade a uma doença particular) são analisados para identificar marcadores que os distinguem. Marcadores que são polimórficos entre os “pools” são relacionados ao loco que determina a característica usada para construir os conjuntos.

A caracterização molecular da diversidade genética entre 38 cultivares de soja brasileiros, por meio de marcadores RAPD, foi estreitamente correlacionada com dados genealógicos (ABDELNOOR et al., 1995). O estudo da diversidade genética entre genitores de feijoeiro, utilizando marcadores RAPD e proteínas de reserva, agrupou corretamente os cultivares de acordo com a origem evolutiva, permitindo uma caracterização mais detalhada dos genótipos dentro de cada grupo (VASCONCELOS et al., 1996).

A técnica de BSA associada a marcadores RAPD já foi utilizada com sucesso em cevada por Molnar et al., (2000), Kutcher et al., (1996) e Barua et al., (1993). Liu et al., (1992) e Nesbitt, (1995 e 1997) fizeram o mesmo com outras culturas. Em espécies florestais, Villar et al., (1996) e Grattapaglia et al., (1996) relataram a eficiência das técnicas aliadas. Conforme Ferreira & Grattapaglia, (1995), a análise de segregantes em “bulk” é um método rápido para identificar marcadores ligados a qualquer gene específico ou região do genoma.

## 2.5. USO DE MARCADORES MOLECULARES NA CULTURA DO *Eucalyptus* sp.

Desde 1990 o RAPD tem sido usado para distinguir espécies, cultivares, híbridos e clones em uma variedade de plantas (CHEN & FILIPPIS, 1996; JUNGHANS et al., 1998) e embora relativamente nova é usada em vários estudos de uma gama de organismos inclusive plantas, insetos e microrganismos (LANGE et al., 1993).

A técnica de RAPD é apontada por Chen & Filippis, (1996) como rápida, precisa, sensível e relativamente barata para análise genômica de árvores, permitindo a avaliação de numerosos loci no genoma, o que faz do método atraente para análises de distância genética e similaridade entre espécies. Essa observação feita pelos autores foi baseada num estudo realizado por eles, no qual empregou-se com sucesso a técnica para análise de parentesco entre plantas de *E. microcorys*. Também, Grattapaglia et al., (1995), combinam o uso de *pseudo-testcross* e RAPD para mapeamento de QTLs (*quantitative trait loci*) controlando traços relacionados à propagação vegetativa em *E. grandis* e *E. urophylla* assim como, Verhaegen & Plomion (1996).

Utilizada por Baril et al., (1997), para análise da estrutura da diversidade genética dentro de espécies e entre duas espécies de *Eucalyptus* com o objetivo de determinar os melhores cruzamentos dentre todos possíveis usando distâncias genéticas obtidas através desse marcador, a técnica demonstrou-se extremamente útil.

Um estudo conduzido por Sale et al., (1996), prova que é viável o uso do RAPD para detectar diferenças genéticas que em muitos casos não são aparentes baseando-se apenas nos aspectos morfológicos. Neste trabalho realizado com duas espécies de *Eucalyptus* e seus híbridos pode-se detectar que as diferenças moleculares entre populações de mesma espécie pode ser tão grande quanto ou maior que entre espécies diferentes.

O RAPD foi empregado por Gaiotto et al., (1996) juntamente com AFLP para estimar a proporção relativa de fecundação cruzada numa população de *E. urophylla* na qual foi encontrada predomínio de fecundação cruzada e manutenção de variabilidade genética adequada dentro de famílias.

Em um programa de melhoramento através de RAPD, Leite, (1998), determinou a diversidade genética em populações base de *E. grandis* e *E. urophylla*. Utilizando-se também deste marcador Paris (1997), caracterizou 14 clones elites de um programa de plantio operacional e Verhaegen et al., (1997) empregou o RAPD para determinar a posição genética e efeitos de regiões genômicas controlando caracteres como densidade da madeira, crescimento do caule e forma do caule em duas espécies de *Eucalyptus*. Junghans (2000), utilizou as técnicas associadas de RAPD e BSA para identificação de genes ligados a resistência a ferrugem em eucalipto.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Inoculação do Material Vegetal**

O material genético utilizado no presente estudo é oriundo do programa de melhoramento do Setor Florestal da Votorantim Celulose e Papel (VCP), proveniente de um cruzamento entre um clone resistente (CO) e um clone reconhecidamente suscetível (VR), que já vinham sendo testados pela área de Patologia Florestal, do Departamento de Produção Vegetal (DPV), na Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu.

Das sementes geradas (F1), obteve-se 145 plantas, que foram clonadas através de cultura de tecido no laboratório de Microbiologia e Cultura de Tecidos da VCP. A intenção da clonagem foi obter, pelo menos 60 repetições de cada planta, para testes em condições controladas e experimentação no campo.

As mudas foram preparadas para inoculação e levadas para uma câmara destinada a esse fim, sendo colocada para nebulizar 24 horas antes, e o ambiente foi mantido saturado neste período.

Para a realização da inoculação foram utilizados uredósporos de *P. psidii* retirados de folhas de eucalipto infectadas, de plantas multiplicadoras de inóculo, mantidas no Departamento de Produção Vegetal.

Os esporos foram desprendidos das folhas com auxílio de um estilete e suspensos em água destilada acrescida de Tween 80%. A concentração da suspensão de esporos foi ajustada para 100.000 esporos/ml.

A aplicação do inóculo nas mudas realizou-se com auxílio de um atomizador ARPRESX, modelo 5, acionado por um compressor elétrico a 0,8 kgf/cm<sup>2</sup> de pressão. Para garantir que todas as plantas receberiam a suspensão de esporos, foram inoculadas 10 repetições de cada planta, distribuídas ao acaso nas bandejas. As plantas foram mantidas na temperatura de 22°C, umidade relativa média de 80% e fotoperíodo de 12 horas até a última avaliação.

Na experimentação de campo, as mudas foram plantadas no delineamento em blocos casualizados, com 4 repetições e 10 plantas, colocadas em linha, no espaçamento 1m X 1m, no município de Jacareí-SP, em área pertencente a VCP, de ocorrência natural da doença.

### **3.2. Avaliação da Ferrugem**

Para avaliação no campo utilizou-se uma escala de notas proposta por Takahashi, (2002), adaptada para este fim, que considera três níveis distintos de severidade: N1 = planta isenta de doença ou sadia; N2 = planta com pústulas normais de ferrugem geralmente esparsas ou apenas ocasionalmente abundantes, nos limbos e folhas novas; e N3 = planta com pústulas normais abundantes, podendo em estágios mais avançados da doença apresentar pústulas nos pecíolos de folhas mais novas e nos terminais de galhos e haste principal, comprometendo a dominância apical e estrutura foliar da planta. As plantas foram avaliadas aos quatro e seis meses de idade.

Nas avaliações em câmara, houve uma alteração na escala. Segundo melhoristas do setor florestal é importante a diferenciação das plantas que apresentam pontos cloróticos nos locais de infecção. Estes pontos, quando se tornam pústulas isoladas, podem

indicar a ocorrência de quebra de resistência, por outro lado, existem casos em que a planta apresenta algum ponto clorótico, mas este evolui para uma necrose localizada, mostrando ter ocorrido uma resposta de hipersensibilidade (HR), continuando a planta a ser considerada resistente. Esse limiar entre resistência e suscetibilidade originou o que se denominou nível 0 e nível I, respectivamente.

As avaliações em ambiente controlado (câmara) foram realizadas 15, 21 e 30 dias após a inoculação baseadas nos níveis de severidade: **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 (Figura 3).

### **3.3. Extração do DNA:**

As folhas de eucalipto coletadas para realização da extração do DNA foram levadas ao laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular do Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu sob a coordenação do Professor Doutor Celso Luis Marino. Cada amostra foi devidamente identificada, limpa e guardada em freezer para uma possível repetição na extração.

Pesou-se em torno de 150mg de tecido vegetal que foram colocados em tubos *ependorf* e macerados na presença de nitrogênio líquido. A maceração mecânica garante o rompimento das paredes celulares e membranas do tecido, em seguida, foram adicionados 700µl de tampão de extração contendo 2-mercaptoetanol, visando solubilização de membranas lipoprotéicas e desnaturação de proteínas, enquanto o DNA é protegido pela ação de enzimas de dregadação. Após agitação, o material foi submetido à incubação em banho-maria a 65°C por 1h com agitação freqüente, facilitando assim a solubilização e homogeneização da suspensão. Assim que o material foi retirado do banho-maria e esfriado, realizou-se a 1ª extração com adição de 600µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Através da centrifugação, as fases orgânica e aquosa foram separadas sobrando lipídios, proteínas e a maioria dos polissacarídeos na fase aquosa superior.

A fase aquosa foi transferida para outro tubo onde adicionou-se 50µl de CTAB 10%. Uma 2ª extração foi feita com 600µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) homogeneizando levemente. Foi observada a formação de três fases após a centrifugação, o sobrenadante foi removido para um novo tubo, onde adicionou-se 400µl de álcool isopropílico gelado (-20°C). A extração foi interrompida nessa fase e o material incubado a -20° por 24 horas. Uma centrifugação foi feita para a precipitação de “pellets” no fundo do tubo. O sobrenadante foi retirado e o “pellet” seco com o auxílio de uma bomba a vácuo. Após a secagem, o material foi ressuspendido em 50µl de tampão TE (Tris-EDTA pH8,0) contendo 10mg/ml de RNase, incubando a 37°C para digestão do RNA e para que o “pellet” se desfça. Restou assim, apenas o DNA desejado, que foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose (0,8%) na presença de DNA com peso conhecido ( $\lambda$  DNA-GIBCO). A quantidade de DNA presente em cada amostra foi estimada por comparação visual com a amostra padrão: 3µL das amostras de DNA e 5µL de tampão de carregamento (TE acrescido com 0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose). O tempo de corrida foi de 40 minutos em solução tampão Tris-borato TBE x pH 8,0 (Tris base, ácido bórico e EDTA 0,5M), a uma voltagem de 80 volts e 100mA.

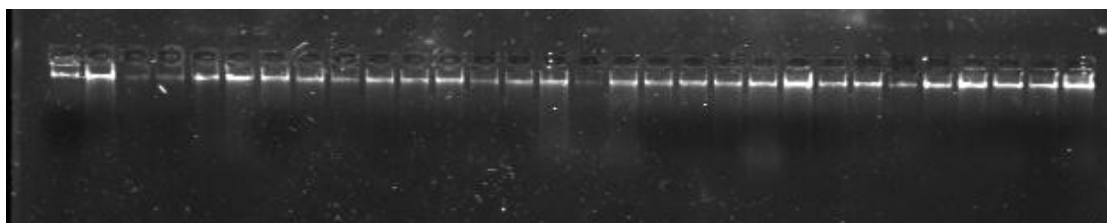


Figura 2. Gel de quantificação do DNA genômico.

### 3.4. Reação de RAPD

Fez-se uma quantificação do DNA genômico extraído e diluiu-se para a concentração 5ng/µl (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Esta diluição foi realizada prevendo possível degradação do DNA pela ação de DNases, e devido a constantes

congelamentos e descongelamentos que podem ocorrer ao se manipular estas soluções estoques.

O DNA genômico foi dividido em alíquotas de 3 $\mu$  em placas recicláveis de policarboneto onde também foram acrescentados 10 $\mu$ L de “mix” que é constituído por: 2,66  $\mu$ L de água destilada autoclavada; 1,30 $\mu$ L de Tampão 10x; 0,78 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>; 1,04 $\mu$ L de BSA (Albumina de Soro de Bovino); 1,04 $\mu$ L de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2,05mM de cada); 3,0 $\mu$ L de “primer” (oriundos da Operon Technologies Inc.) e 0,18 $\mu$ L de Taq DNA polimerase (INVITROGEN). A reação foi levada a um termociclador (MJ Research/modelo PTC 100<sup>TM</sup>).

O termociclador é previamente programado para reação de RAPD (1 minuto a 92°C para a desnaturação; 1 minuto a 35°C para o anelamento e 2 minutos a 72°C para que ocorra a extensão). Este ciclo repete-se por 40 vezes, e o DNA amplificado é submetido a um período de extensão de 5 minutos a 72°C.

Após o processo de amplificação foram adicionados à reação 7 $\mu$ L de corante, contendo brometo de etídio, indicado para a visualização do DNA. A separação dos fragmentos amplificados foi feita em gel de agarose à 1,5% com tampão Tris-borato TBE 1x pH8, sendo estes separados através de técnica de eletroforese, a 5volts/cm de gel. A amplificação no gel foi visualizada sob luz ultravioleta.

### **3.5. Composição dos “bulks”**

Para a composição dos “bulks”, tomou-se como base os resultados de inoculação controlada e infecção natural no campo, visando evitar os escapes à doença. Dentre os indivíduos componentes dos conjuntos, foram escolhidos aqueles considerados extremos na sua característica, resistente ou suscetível, e que tiveram resultados compatíveis em ambas situações.

O procedimento consistiu em detectar diferenças entre duas amostras agrupadas de DNA obtidas de uma população segregante. Estas amostras foram constituídas ao se misturar quantidades iguais de DNA de indivíduos selecionados com base na expressão fenotípica de um caráter (no caso resistência à ferrugem) para se ter um genótipo idêntico em

uma região genômica de interesse (região alvo) e genótipos ao acaso em regiões não ligadas à região alvo. Assim, as duas amostras de DNA diferiram somente na região selecionada (apresentaram polimorfismo) e foram monomórficas para todas as outras regiões.

O DNA dos indivíduos fenotipicamente resistentes foram misturados e comparados a mistura de DNA dos indivíduos fenotipicamente suscetíveis.

Foram usados na amplificação dos “bulks” *primers* da "Operon Technologies" (Kits OPA 01-20 até OPZ 01-20 que somam 520 “primers”, e os kits OPAA 01-20, OPAB, OPAC, OPAD, OPAE, OPAF, OPAG, OPAH, OPAJ e OPAK totalizando 720 “primers”. Aqueles que apresentaram polimorfismo foram selecionados e repetidos com todos os componentes dos “bulks” individualmente (Quadro 8).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Segregação da Ferrugem e Herança da Resistência**

A primeira avaliação em ambiente controlado limitou-se apenas em verificar presença ou ausência de esporulação do patógeno (pústulas amarelas), nas seguintes além desta verificação, também fez-se a classificação de acordo com a severidade da doença utilizando a escala própria para este fim (Figura 3).



Figura 3. Escala de notas para avaliação da severidade de ferrugem em eucalipto.

**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.

Após a última avaliação as plantas agrupadas de acordo com a severidade da doença foram contabilizadas. Em câmara obteve-se: 71 plantas classificadas no nível 0; 32 plantas no nível I; 25 plantas no nível II e 06 plantas no nível III. Do total de 145 plantas, 11 não possuíam repetições (clones) e, portanto, não puderam ser avaliadas. No campo foram contabilizadas 63 plantas no nível 1 (N1), 59 plantas N2 e 10 plantas N3 e não puderam ser avaliadas 13 plantas.

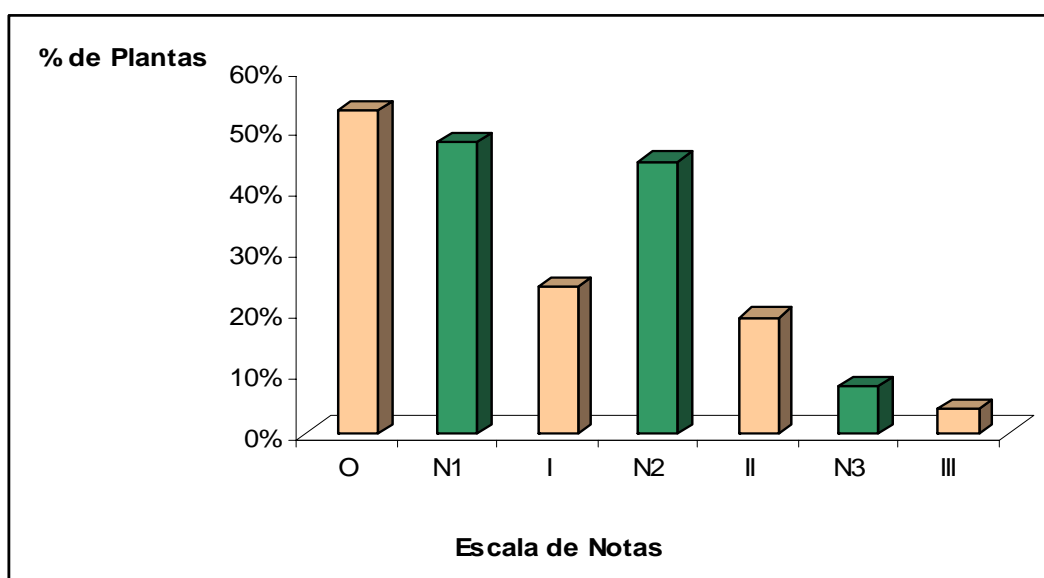


Figura 4. Porcentagem de plantas nos níveis de severidade da doença no campo (verde) e em câmara (marrom).

As plantas também foram classificadas em suscetíveis (plantas pertencentes aos níveis I, II, III e N2, N3) e resistentes (plantas pertencentes ao nível 0 e N1).

Os resultados demonstraram que a segregação da ferrugem nesta população foi de 1:1, conforme o esperado. Para validar o resultado foi feito o teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ).

O teste qui-quadrado é um artifício valioso que auxilia o pesquisador na determinação do grau de concordância. O teste leva em conta o tamanho da amostra e os desvios da proporção esperada, é um mecanismo pelo qual os desvios de uma proporção hipotética são reduzidos a um único valor, baseado no tamanho da amostra. Isso permite ao

pesquisador determinar a probabilidade de que uma determinada soma de desvios venha a ocorrer ao acaso. Os valores esperados são obtidos a partir do tamanho total da amostra. Como neste caso, a hipótese foi uma proporção de 1:1, o total foi dividido em duas partes iguais.

Uma fórmula para  $\chi^2$ , desenvolvida para uma amostra que consiste de duas classes pode ser escrita da seguinte forma:

$$\chi^2 = (\mathbf{O}_1 - \mathbf{E}_1)^2 / \mathbf{E}_1 + (\mathbf{O}_2 - \mathbf{E}_2)^2 / \mathbf{E}_2$$

Quadro 1. Cálculo do qui-quadrado.

$\mathbf{O}_1$  é o número observado experimentalmente para a primeira classe e  $\mathbf{E}_1$  é o número esperado para a mesma classe derivada da proporção;  $\mathbf{O}_2$  é o observado para a segunda classe e  $\mathbf{E}_2$  o esperado. Quando cada um destes desvios é elevado ao quadrado e dividido pelo valor esperado (E) para esta classe, as frações resultantes podem ser somadas de modo a dar um único valor de  $\chi^2$ .

$$\chi^2 = \Sigma (\mathbf{O} - \mathbf{E})^2 / \mathbf{E}$$

Quadro 2. Fórmula de qui-quadrado simplificada.

Onde  $(\mathbf{O} - \mathbf{E})$  é o desvio entre cada valor esperado e observado da classe.

Com os dados obtidos após as avaliações, foi possível calcular o desvio padrão e o qui-quadrado em cada situação e analisar se a hipótese é verdadeira.

Fenótipo	Resultados	Resultados	D = O - E	D <sup>2</sup> / E
	Observados	Esperados (1:1)		
Resistente	71	67	4	0,238
Suscetível	63	67	-4	0,238
Total	134	134	0	0,476

Quadro 3. Teste qui-quadrado da segregação da ferrugem em ambiente controlado.

Fenótipo	Resultados	Resultados	D = O - E	D <sup>2</sup> / E
	Observados	Esperados (1:1)		
Resistente	63	66	-3	0,136
Suscetível	69	66	3	0,136
Total	132	132	0	0,272

Quadro 4. Teste qui-quadrado da segregação da ferrugem no campo.

Para este estudo, o grau de liberdade ( $GL = n - 1$ ) onde  $n$  é o número de classes fenotípicas, é igual a 1.

Com auxílio de uma tabela de qui-quadrado (RAMALHO, et al., 1990) o valor 0,476 encontrado em câmara, é maior que 0,20 e menor que 0,50 e o valor 0,272 encontrado no campo é maior que 0,50 e menor que 0,70 indicando que os resultados reais se ajustam muito aproximadamente aqueles esperados com base na hipótese de combinações independentes.

As interações em que a resistência é conferida por genes simples normalmente são interpretadas por uma relação do tipo gene-a-gene, na qual o produto de um gene de avirulência do patógeno (elicitor) é reconhecido pelo produto do gene de resistência

do hospedeiro (receptor), que desencadeia uma resposta de resistência na planta (FLOR, 1971).

Segundo Wilcox et al., 1996, locos de resistência a patógenos em espécies florestais têm apresentado dois padrões de resposta: resistência isolado-específico ou raça-específica, e de amplo espectro, como é o caso do gene Mer em *Populus*, que confere resistência a diversas raças de *Melampsora larici-populina* (CERVERA et al., 1996).

A interação do tipo gene-a-gene normalmente é consequência de uma relação de co-evolução entre patógeno e hospedeiro, que resulta no alto grau de especialização da maioria dos patógenos (TOBIAS, 1996). Nota-se, entretanto, que essa premissa parece não ser válida no patossistema *P. psidii* X *Eucalyptus*. Espécies de *Eucalyptus* são originárias da Austrália e foram introduzidas para plantios comerciais no Brasil apenas no final do século passado (ANDRADE, 1961), enquanto que *P. psidii* é nativo da América do Sul, cujo hospedeiro “principal” são espécies de Myrtaceae e, até o momento, a presença do patógeno não foi constatada no centro de origem do eucalipto (COUTINHO et al., 1998).

Paralelamente ao verificado no patossistema *P. psidii* X *Eucalyptus*, há relatos em espécies florestais de resistência monogênica sem co-evolução patógeno-hospedeiro, como ocorre em *Pinus* e *Populus*. No entanto, a resistência nesses casos pode ser conferida por genes de resistência a patógenos similares, encontrados no local de origem do hospedeiro em questão. A resistência monogênica a *Cronartium ribicola* identificada em *P. lambertiana* por Devey et al., 1995, parece ser o primeiro caso em patossistema não co-evoluído, em que o hospedeiro é nativo dos EUA e o patógeno foi introduzido naquele país no início do século XX (STEWART, 1906; MIELKE, 1943), mas, há um histórico de co-evolução entre *Pinus* e *Cronartium*, no norte da Ásia Central (LEPPIK, 1970). Dessa forma, o gene de resistência em *P. lambertiana* pode ter sido selecionado a partir de espécies de *Pinus* pertencentes ao mesmo subgênero, como *P. monophyla* Torr. & Frem. e *P. edulis* Engelm. Essa hipótese é confirmada pelas maiores frequências alélicas desse gene em populações naturais de *P. lambertiana* geograficamente próximas a populações de *P. monophyla* (KINLOCH, 1992).

A resistência conferida pelo gene Mmd1 de *Populus trichocarpa* à ferrugem, causada por *Melampsora medusae*, é um caso semelhante, pois, apesar de o patógeno não ser encontrado no noroeste dos EUA, área de ocorrência natural do hospedeiro, uma espécie

congenérica de ferrugem, *M. occidentalis* Jacks., normalmente ataca *P. trichocarpa* (NEWCOMBE et al., 1996). É possível, portanto, que o gene Mmd1 seja membro de um loco que confere resistência a *M. occidentalis*. Também, Newcombe & Bradshaw (1996) encontraram três regiões genômicas (QTL's) em *P. deltoides* que conferem resistência à mancha foliar de *Septoria populicola* Peck. Apesar de *P. deltoides* ser natural do leste norte-americano, onde não existe *S. populicola*, nessa mesma região é encontrado *S. musiva*, causador da mancha foliar em *P. deltoides*. Outros exemplos ocorrem em híbridos de *P. trichocarpa* com *P. deltoides* (VILLAR et al., 1996) e *P. deltoides* com *P. nigra* L. (CERVERA et al., 1996), resistentes a *Melampsora larici-populina* Kleb., patógeno de ocorrência restrita à Europa e Ásia.

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

Mesmo tendo sido obtida uma segregação que se ajusta à proporção mendeliana, a variação fenotípica encontrada na resposta de resistência pode indicar que a resistência à ferrugem é conferida por genes de efeito principal, com penetrância dependente de genes de efeito secundário. Isso explicaria porque uma classificação em quatro níveis de severidade da doença. Plantas com o gene de efeito principal e uma combinação favorável de genes de efeito secundário apresentariam fenótipo nível 0, enquanto que plantas sem o gene de efeito principal da resistência, mas com combinação favorável de genes de efeito secundário, poderiam apresentar um fenótipo tipo I.

A existência desses genes de efeito secundário é substanciada pelas variações no período latente médio da ferrugem observadas em outros trabalhos (CASTRO et

al., 1985; RUIZ et al., 1989a; JUNGHANS, 2000) em razão da combinação genótipo do hospedeiro e genótipo do patógeno, das condições ambientes e da metodologia de avaliação.

#### 4.2. Composição dos “bulks” e distância do marcador

Os “bulks” foram constituídos por materiais contrastantes e classificados nos níveis de severidade da escala citada anteriormente (Figura 3). Os resultados obtidos pela infecção natural no campo apesar de terem sido avaliados por escala de notas desigual, puderam ser aproveitados, pois, considerou-se apenas os resultados extremos, ou seja, indivíduos absolutamente resistentes (N1) e indivíduos extremamente suscetíveis (N3).

<b>Escala de Notas</b>	<b>Clones Avaliados</b>
<b>N1</b>	6, 8, 9, 11, 14, 15, 18, 19, 22, 26, 27, 33, 34, 39, 40, 45, 46, 48, 52, 54, 55, 58, 59, 60, 62, 68, 71, 77, 81, 82, 83, 86, 87, 88, 92, 96, 101, 102, 105, 106, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 125, 126, 127, 129, 132, 133, 135, 136, 139, 140, 141, 142, 143, 145.
<b>N2</b>	2, 5, 7, 10, 12, 13, 16, 20, 21, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 47, 49, 50, 51, 53, 56, 61, 63, 64, 65, 67, 69, 70, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 80, 84, 89, 90, 91, 93, 94, 95, 97, 99, 100, 104, 108, 110, 111, 128, 131, 138.
<b>N3</b>	1, 4, 17, 32, 36, 66, 79, 103, 134, 137.

Quadro 5. Classificação das plantas nos níveis de severidade da doença, segundo avaliação no campo.

<b>Escala de Notas</b>	<b>Clones Avaliados</b>
<b>0</b>	2, 5, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 27, 29, 30, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 49, 50, 51, 57, 58, 60, 61, 62, 68, 70, 72, 73, 74, 78, 80, 81, 83, 84, 87, 93, 95, 96, 100, 101, 102, 104, 106, 108, 109, 112, 116, 118, 120, 121, 122, 123, 125, 126, 127, 128, 129, 131, 135, 138, 139, 142, 143, 144 e 145.
<b>I</b>	4, 10, 11, 18, 22, 23, 31, 32, 33, 37, 44, 47, 48, 52, 55, 63, 67, 69, 79, 82, 85, 86, 88, 92, 97, 110, 111, 113, 115, 117, 133 e 136.
<b>II</b>	6, 7, 19, 24, 25, 36, 46, 54, 56, 59, 64, 65, 71, 76, 90, 91, 94, 98, 105, 107, 114, 124, 130, 140 e 141.
<b>III</b>	1, 66, 99, 103, 134 e 137.

Quadro 6. Classificação das plantas nos níveis de severidade da doença, segundo avaliação na câmara.

O “bulk” de DNAs resistentes foi constituído apenas de plantas do nível 0, e no “bulk” de DNAs suscetíveis empregaram-se apenas plantas do nível III. Utilizou-se na composição dos “bulks” somente indivíduos que tiveram respostas iguais em ambiente controlado e no campo. Os “bulks” foram compostos por 5 indivíduos cada.

“bulk” Resistente	“bulk” Suscetível
<b>14</b>	01
<b>15</b>	66
<b>58</b>	103
<b>60</b>	134
<b>129</b>	137

Quadro 7. Indivíduos componentes dos “bulks” contrastantes.

A técnica de BSA apresenta a vantagem de agrupar indivíduos contrastantes para o fenótipo de interesse, podendo ser realizada quase que instantaneamente para qualquer população segregante e qualquer região do genoma para a qual exista um marcador.

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

Dos 720 "primers" testados, 19 deles revelaram polimorfismo entre os dois "bulks" (Figura 5) e foram utilizados na amplificação do DNA de cada um dos indivíduos que originaram os "bulks" (Quadro 8).

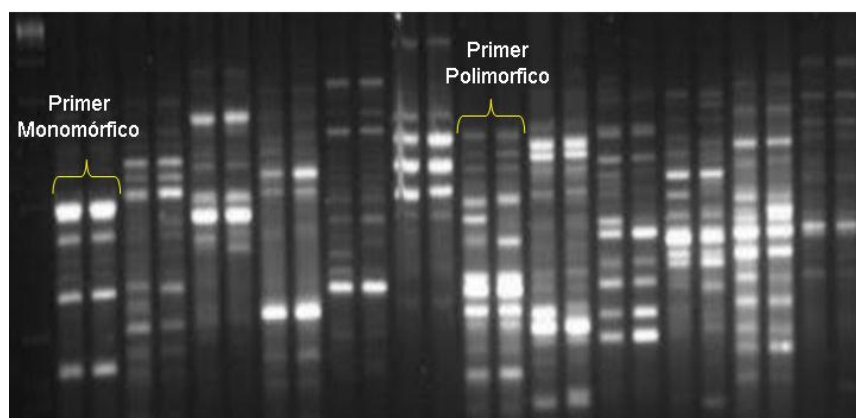


Figura 5. Teste de polimorfismo dos "primers" utilizando os "bulks" resistente e suscetível.

Primer	Seqüência
AA02	5' GAGACCAGAC 3'
AC03	5' CACTGGCCCA 3'
AD01	5' CAAAGGGCGG 3'
AD06	5' AAGTGCACGG 3'
AD16	5' AACGGGCGTC 3'
AE18	5' CTGGTGCTGA 3'
AG19	5' AGCCTCGGTT 3'
AH18	5' GGGCTAGTCA 3'
AJ11	5' GAACGCTGCC 3'
AJ13	5' CAGCCGTTCC 3'
AK01	5' TCTGCTACGG 3'
K01	5' CATTTCGAGCC 3'
M07	5' CCGTGACTCA 3'
N11	5' TCGCCGCAAA 3'
S02	5' CCTCTGACTG 3'
S09	5' TCCTGGTCCC 3'
T06	5' CAAGGGCAGA 3'
X01	5' CTGGGCACGA 3'
W04	5' CAGAAGCGGA 3'

Quadro 8. *Primers* polimórficos e suas seqüências.

Apenas o marcador AK01 manteve-se presente quando testado entre os indivíduos integrantes do “bulk” e no restante da população.

O cálculo da distância entre o gene e o marcador encontrado baseou-se na porcentagem de indivíduos recombinantes. Desta forma, assumiu-se que 1% de indivíduos recombinantes equivale a 1cM de distância entre o marcador e o gene. Portanto, quanto menor o número de indivíduos recombinantes, mais proximamente o gene e o marcador estão ligados.

O marcador AK01 mostrou-se localizado a uma distância genética estimada de 20cM do gene de interesse. Essa distância foi mantida quando testado nos demais indivíduos da população.

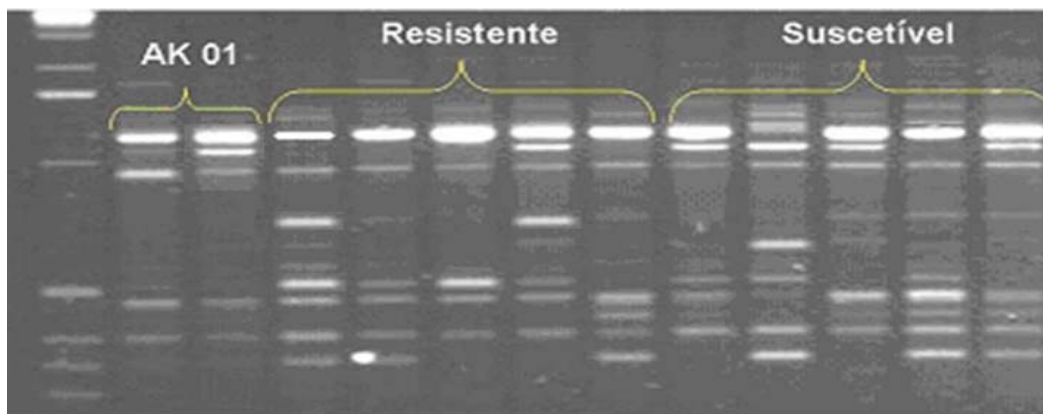


Figura 6. Amplificação dos indivíduos componentes dos “bulks” com o primer AK 01.

Em espécies florestais, mapas genéticos são construídos pela análise de co-segregação dos marcadores genéticos nos produtos da meiose, normalmente em progênies de meios-irmãos ou irmãos-completos. Marcadores localizados em diferentes cromossomos devem segregar independentemente, mas os marcadores localizados no mesmo cromossomo são transmitidos conjuntamente, a menos que essa ligação seja quebrada por recombinação (O’MALLEY & WHETTEN, 1997). Em espécies alógamas, como as de *Eucalyptus*, são encontrados altos níveis de heterozigose na maioria dos locos, o que permite a identificação de vários marcadores polimórficos úteis na construção de mapas. Nessas espécies, o cruzamento entre duas árvores pode ser facilmente realizado, e a progênie F1 é geneticamente heterogênea, segregando na proporção de 1:2:1 ou 3:1, quando ambos os genitores forem heterozigotos e os marcadores forem co-dominantes e dominantes, respectivamente, ou segregando a 1:1 se um deles for heterozigoto e o outro homozigoto, independentemente do tipo de marcador.

Com a identificação deste marcador ligado a região do genoma que participa no processo de defesa da planta contra a ferrugem, nessa população teste, abre a perspectiva da utilização desta marca, ou etiqueta, em outras populações segregantes.

Mesmo considerando que a distancia entre a marca e o gene, seja razoavelmente grande, pode-se monitorar uma região do genoma a ser utilizada em trabalhos futuros como a identificação e a clonagem desta região. Para posteriormente, avaliar populações com diferentes “background” genético e validar a utilização desta marca para auxiliar os programas de melhoramento voltados à resistência a ferrugem, esse marcador (RAPD) será transformado em um marcador mais robusto, do tipo “scar”.

## 5. CONCLUSÕES

- A seleção de genótipos resistentes à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus* sp. pode ser feita, tanto por meio de inoculação artificial, quanto em condições de infecção natural, desde que haja disponibilidade de inoculo e condições favoráveis do ambiente para o desenvolvimento do patógeno;
- Deve-se considerar a existência de especificidade fisiológica em *Puccinia psidii*;
- A combinação de marcadores RAPD com a técnica de BSA é aplicável na identificação de genes de interesse em espécies florestais, como *Eucalyptus* sp. que não possui mapa genético disponível;
- A segregação da ferrugem obtida neste estudo permite concluir que o caráter “resistência à ferrugem”, na população avaliada, é de controle monogênico governado por um alelo recessivo.

- O “primer” AK01 gerou um fragmento a uma distância genética de 20cM do gene de resistência a ferrugem nesta população podendo ser utilizado em trabalhos futuros para auxiliar nos programas de melhoramento voltados à resistência a ferrugem.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOOR, R. V.; BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree data. *Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto, 18:265-273, 1995.

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

ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; MACABEU, A. J; SARTÓRIO, R. C. Eficiência de triadimenol, oxicarboxin e diniconazole para o controle da ferrugem (*Puccinia psidii*) em brotações de *Eucalyptus cloeziana*, em condições de campo. *Revista Árvore* 17:247-263. 1993.

AMARAL, W. A. N. Manejo e uso da variabilidade genética: novas ferramentas e novos desafios para um velho problema. *Estratégias de melhoramento florestal*, módulo I, Piracicaba, IPEF. 1997.

AMORIN, E. P. R. et al. Patogenicidade e ação hiperparasítica de *Fusarium decemcellulare* sobre *Puccinia psidii* em goiabeira (*Psidium guajava*). *Fitopatologia brasileira*, v. 18. 1993. p. 226-9.

ANDRADE, E. N. *O Eucalipto*. Edição Comemorativa (2a. ed). São Paulo, 1961. 677p.

BARIL, C. P. et al. Structure of the specific combining ability between two species of *Eucalyptus* : 1 – RAPD. *Theoretical applied genetics*, v. 94. 1997. p. 796-803.

BARUA, U. M. et al. Identification of random amplified polymorphic markers linked to a *R. secalis* resistance locus in barley using near isogenic lines and bulked segregant analysis . *Heredity*, 71, 177-184. 1993.

BENET, H.; GURIES, R. P.; BOURY, S.; SMALLEY, E. B. Identification of RAPD markers linked to a black leaf spot resistance gene in Chinese elm. *Theor. Appl. Genet.*, 90:1068-1073. 1995.

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.

BRACELPA. *Informes anuais*: atuação setorial. Disponível em:  
<[http://www.bracelpa.org.br/informes\\_anuais/panorama\\_economico.htm](http://www.bracelpa.org.br/informes_anuais/panorama_economico.htm)>. Acesso em: 15 de maio de 2005.

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.

CARVALHO, A. O. et al. Resistência de espécies, progênes e procedências de *Eucalyptus* à ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33:139-147. 1998.

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.

CASTRO, H. A.; BERGAMIN FILHO, A.; KRUGNER, T. L. Padrão de produção de uredósporos em mudas de *Eucalyptus* spp. inoculadas artificialmente com *Puccinia psidii*. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v. 10, n. 1, p. 155-170, 1984.

CASTRO, H. A.; KRUGNER, T. L.; BERGAMIN FILHO, A. Especialização fisiológica no sistema *Eucalyptus grandis* – *Puccinia psidii* Winter. *Ciência e Prática Lavras*, 9:80-92. 1985.

CERVERA, M. T.; et al. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. *Theor. Appl. Genet.* 93:733-737. 1996.

CHEN, D.M. & DE FILIPPIS, L.F. Application of Genomic DNA and RAPD-PCR in Genetic Analysis and Fingerprinting of Various Species of Woody Trees. *Aus. Forest.* 59:46-55. 1996.

COELHO, L. Variabilidade fisiológica de *Puccinia psidii* Winter – Ferrugem do eucalipto. 1988. Universidade Federal de Viçosa (*Tese de Mestrado*). Viçosa. UFV. 1988.

COFFEY, M. B. Obligate parasites of higher plants, particularly rust fungi. *Symp. Soc. Exp. Biol.* v.29. 1975. p. 297-323.

COUTINHO, L.M.; FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre especializações fisiológicas em *Puccinia psidii* Winter. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v.10, n.1. 1984. p.55-56.

COUTINHO, T.A; et al. Eucalyptus rust: a disease with the potential for serious D.T. Junghans *et al.* international implications. *Plant Disease*, 82:819-925. 1998.

CUTTER JR., V. M. Studies on the isolation and growth of plant rusts in host tissue cultures and upon synthetic media I Gymnosporangium. *Mycologia*, v. 51. 1959. p.248-295.

DAVIDSON, J. Domestication and breeding programme for *Eucalyptus* in the Asia- Pacific region. *Field Document*. n. 25. 1998.

DEVEY, M. E. et al. Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:2066-2070. 1995.

DEMUNER, N. L. & ALFENAS, A. C. Fungicidas sistêmicos para o controle da ferrugem, causada por *Puccinia psidii*, em *Eucalyptus cloeziana*. *Fitopatologia brasileira*, v. 16. 1991. p. 174-7.

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

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

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

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

ELLIS, J.; DODDS, P.; PRYOR, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Plant Biol.* 3:278-284. 2000.

FERREIRA, M.; ARAUJO, A. J. de. *Procedimentos e recomendações para testes de procedências*. Curitiba: EMBRAPA-URPFCS, 1981. 28 p.

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

FERREIRA, F. A. Ferrugem do eucalipto. *Revista Árvore* 7:91-109. 1983.

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, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília, EMBRAPA – CENARGEN. 1995. 220p.

FIGUEIREDO, M. B.; COUTINHO, L. N.; HENNEN, J. F. Estudos para determinação do ciclo vital de *Puccinia psidii*. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v. 10, n. 1, p. 53-54, 1984.

FIGUEIREDO, M. B. & CARVALHO JR., A. A. Efeito da lavagem de soros na germinação dos soros telióides de *Puccinia pampeana*. *Summa Phytopatol.*, v. 20. 1994. p. 101-104.

FLYNN, R. *Eucalyptus: Progress in higher value utilization - a global review*. Washington, 1999. 212 p.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 9:275-296. 1971.

GAIOTTO, F. A. Estimativa de recombinação e estrutura genética em uma população de melhoramento de *Eucalyptus urophylla* com marcadores RAPD e AFLP. 1996. (*Dissertação de Mestrado*) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, 1996. 66p.

GONÇALVES, S. *Lista preliminar das doenças das plantas do Estado do Espírito Santo*. Rio de Janeiro. Ministério da Agricultura. 1929. p 1-12.

GONZALES, E.R. et al. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using the sonicationassisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. *Functional Plant Biology*, v. 29. 2002. p. 97-102.

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

HARDNER, C. M. & POTTS, B. M. Inbreeding depression and changes in variation after selfing in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus*. *Silvae Genet.*, 44:46-54. 1995.

JOFFILY, J. Ferrugem do eucalipto. *Bragantia*, 4:475-487. 1944.

JUNGHANS, D.T. et al. Distâncias genéticas entre clones de *Eucalyptus grandis* resistentes e suscetíveis à ferrugem (*Puccinia psidii*) estimadas por meio de marcadores RAPD. In: *Anais do V Encontro Mineiro de Geneticistas*. Viçosa, MG. SBG/UFV. (Resumo 31). 1998. p. 74.

JUNGHANS, D. T. Quantificação da severidade, herança da resistência e identificação de marcadores rapd ligados à resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis*. 2000. Tese apresentada a Universidade Federal de Viçosa, como para obtenção do título de *Doctor Scientiae*. Viçosa. 2000.

KINLOCH, B. B. Distribution and frequency of a gene for resistance to white pine blister rust in natural populations of sugar pine. *Can. J. Bot.* 70:1319-1323. 1992.

KUTCHER, H.R. et al. Identification of RAPD markers for common root rot and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) resistance in barley. *Genome*, v.39, n.1. 1996. p.206-215.

KRÜGNER T.L. Doenças do eucalipto. In: GALLI, F. (Coord.). *Manual de fitopatologia*. 2.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v.2, p.275-296.

LANGE, T.; HEDDEN, P.; GRAEBE, J. E. Biosynthesis of 12a - and 13-hydroxylated gibberellins in a cell-free system from *Cucurbita maxima* endosperm and the identification of new endogenous gibberellins. *Planta* 189: 340-349.1993.

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

LEITE, S. M. M. Variabilidade genética em uma população- base de *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden através do marcador RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao acaso). 1998. (*Dissertação de Mestrado*) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, 1998. 84p.

LEPPIK, E. E. Gene centers of plants as sources of diseases resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 8:323-344. 1970.

LIU S. Z.; CAI L.; SUN S. Q. Induction of a cytogenetic adaptive response by exposure of rabbits to very low dose-rate gamma-radiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, 62,187-90. 1992.

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.

MARTINS, E. M. F., CARVALHO JR., A. A. & FIGUEIREDO, M. B. Obtenção de culturas axênicas esporulantes de *Melampsora eptea* Thum, ferrugem do chorão (*Salix* sp), a partir de urediniósporos puros. *Arq. Inst. Biol.*, v. 62. São Paulo, 1995. p. 58.

MEKSEM, K. et al. Clustering among loci underlying soybean resistance to *Fusarium solani*, SDS and SCN in near-isogenic lines. *Theor. Appl Genet.*, 99:1131-1142. 1999.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by “bulk”ed segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88. 1991. p. 9828-9832.

MIELKE, J. L. White pine blister rust in western North America. Yale University School of Forest, *New Haven. Bull.* v. 52. 1943.

MOLNAR, S. J.; JAMES, L. E ; KASHA, K. J. Inheritance and RAPD tagging of multiple genes for resistance to net blotch in barley. *Genome*, v.43, n.2. 2000. p.224-231.

MULLIS, K. & FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro by a polymerase chain reaction. *Methods Enzymol.*, v. 55. 1987. p.335-350.

NESBITT, K. A. et al. Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Heredity*, v.74. 1995. p.628-637.

NEWBURRY, H. J. & FORD-LLYD, B. V. The use of RAPd for assessing variation in plants. *Plant Growth Regul.*, v. 12. 1993. p. 43-51.

NEWCOMBE, G & BRADSHAW Jr., H. D. Quantitative trait loci conferring resistance in hybrid poplar to *Septoria populicola*, the cause of leaf spot. *Can. J. For. Res.* 26:1943-1950. 1996.

NEWCOMBE, G. et al. A major gene for resistance to *Melampsora medusae* f.sp. deltoideae in a hybrid poplar pedigree. *Phytopathology*, 86:87-94. 1996.

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

PARIS, A. Caracterização molecular de clone de *Eucalyptus sp* utilizando a técnica de RAPD. 1997. (Monografia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, 1997. 41p.

PARIS, A. Caracterização molecular de clones de *Eucalyptus sp*. 2000. (*Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Genética*) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2000. 90p.

PARNISKE, M. et al. Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the Cf-4-9 locus of tomato. *Cell*, 91:821-832. 1997.

PECCININ, E. & PASCHOLATI, S. F. Doenças da goiabeira. In: *Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p.335-7.

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

RAMALHO, M.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. B. *Genética na agropecuária*. São Paulo: ed. Globo. 1990.

RAYACHHETRY, M. B.; ELLIOTT, M. T.; VAN, T. K. Natural epiphytotic of the rust *Puccinia psidii* in *Malaleuca quinquenervia* in Florida. *Plant Dis.*, 81:831. 1997.

RICHTER, T. E. & RONALD, P. C. The evolution of disease resistance genes. *Plant Mol. Biol.*, 42:195-204. 2000.

RUIZ, R. A. R. et al. Fungicidas protetores e sistêmicos para o controle da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*. *Revista Árvore*, 11:56-65. 1987.

RUIZ, R. A. R. et al. Influência de temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. *Fitopatologia Brasileira*, 14:55-61. 1989a.

RUIZ, R. A. R.; ALFENAS, A. C. & FERREIRA, F. A. Influência de temperatura, luz e origem do inóculo sobre a produção de uredíniosporos e teliosporos de *Puccinia psidii*. *Fitopatologia Brasileira*, 14:70-73. 1989b.

RUIZ, R. A. R. et al. Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, em condições de campo. *Fitopatol. Bras.*, 14:73-81. 1989c.

- SANTOS, C. C. F. et al. Sensibilidade « in vitro » de urediniósporos de *Puccinia psidii* a *Bacillus subtilis*. *Summa phytopat.*, v. 24. 1998. p. 183-5.
- SILVA, J. de C. *Vantagens comparativas e competitivas da madeira de eucalipto*. 2004. Disponível em: <<http://www.amda.org.br/downloads/21SILVA.doc>>. Acesso em: 21 de Junho de 2005.
- SHIVAS, R. G & WALKER, J. *Puccinia cygnorum* sp. nov. on *Kunzea ericifolia* in Australia. *Mycol. Res.*, 98:22-24. 1994.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. *Participação do Brasil no mercado internacional* (<http://www.sbs.org.br/estatisticas.html>). 2004.
- STEWART, F. C. An outbreak of the European currant rust (*Cronartium ribicola* Dietr.). N.Y. *Agr. Exp. Sta. Geneva Tech. Bull.*, 2:61-74. 1906.
- 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. 1997a. p. 313-4.
- TAKAHASHI, S. S. Ferrugem do eucalipto: Índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionadas à intensidade da doença no campo. 2002. (*Dissertação de mestrado*) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. Botucatu. UNESP. 2002. 101 p.
- TOBIAS, C. M. A kinase suicide squad in tomato. *Trends Plant Sci.*, 1:133-134. 1996.
- VASCONCELOS, M.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. e VIEIRA, C. Genetic diversity of the common bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA-based molecular markers. *Brazil. J. Genetics*, 19:447-451. 1996.
- VERHAEGEN, D. & PLOMION, C. Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers. *Genome*, 39 : 1051-1061. 1996.

VILLAR, M. et al. Molecular genetics of rust resistance in poplar (*Melampsora laricipopulina* Kleb/ *Populus* sp.) by bulked segregant analysis in a 2 x 2 factorial design. *Genetics*, 143:531-536. 1996.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18:7213-7218. 1990.

VERHAEGEN, D. et al. Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers: 1- detection of QTL in interespecific hybrid progeny, stability of QTL, expression across different ages. *Theoretical applied genetics*, v. 95. 1997. p. 597-608.

WAUGH, G. Sawing of young fast-grow eucalypts. In: Seminário internacional sobre produtos sólidos de madeira de alta tecnologia.. *Anais*. Belo Horizonte. 1998. p. 69-81.

WICHMANN, R. & BETTIOL, W. Efeito de *Bacillus subtilis* e vinagre para o controle da ferrugem da goiabeira (*Puccinia psidii*). *Fitopatologia Bras.*, v. 19. 1994. p.290.

WILCOX, P. L. et al. Detection of a major gene for resistance to fusiform rust disease in loblolly pine by genomic mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3859-3864. 1996.

WILLIAMS, J.G.K et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18:6531-6535. 1990.