

## NOTAS CIENTÍFICAS

### Utilização de análise de segregantes agrupados na identificação de marcadores ligados a genes que controlam a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) em *Eucalyptus* sp.

Karina Carnieli Zamprogno<sup>1</sup>, Edson Luiz Furtado<sup>1</sup>, Celso Luiz Marino<sup>2</sup>, Cesar Augusto Bonine<sup>3</sup> e Donizete Costa Dias<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Proteção de Plantas, UNESP/FCA/Botucatu, Fazenda Experimental Lageado. CP 237 CEP 18603-970. <sup>2</sup>UNESP-IB/Botucatu, Distrito de Rubião Jr. <sup>3</sup>Votorantim Celulose e Papel, bolsista CNPq.

Autor para correspondência: Edson Luiz Furtado. elifurtado@fca.unesp.br

Data de chegada: 21/07/2006. Aceito para publicação em: 07/03/2008

1386

#### RESUMO

Zamprogno, K.C.; Furtado, E.L.; Marino, C.L.; Bonine, C.A.; Dias, D.C. Utilização de análise de segregantes agrupados na identificação de marcadores ligados a genes que controlam a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) em *Eucalyptus* sp.. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.3, p.253-255, 2008

Devido a grande importância da cultura de *Eucalyptus* no Brasil, 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. Um exemplo, é a busca por genes de resistência a doenças, principalmente a ferrugem causada por *Puccinia psidii* Winter, que resulta em redução da produtividade em plantas altamente suscetíveis.

No presente trabalho, mudas de *Eucalyptus* pertencentes a uma geração F1, provenientes do cruzamento controlado entre parentais híbridos *E. grandis* X *E. urophylla*, sendo eles resistente e suscetível, foram inoculadas com *Puccinia psidii* em casa de vegetação e

acompanhadas até o aparecimento dos sintomas da ferrugem. Foram classificadas, em dois grupos: resistentes (ausência de sintomas) e suscetíveis (presença de sintomas e esporulação). As amostras de DNA foram comparadas com o uso de marcadores moleculares associado ao método de BSA (Bulked Segregant Analysis). O polimorfismo entre os grupos 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 da população, mostrando-se a uma distância genética estimada de 20 cM em repulsão ao gene de resistência.

**Palavras-chave adicionais:** *Eucalyptus* sp.; *Puccinia psidii*; resistência, análise de segregantes por grupamentos

#### ABSTRACT

Zamprogno, K.C.; Furtado, E.L.; Marino, C.L.; Bonine, C.A.; Dias, D.C. Use of bulked segregant analysis in identification of molecular markers linked to resistance to rust (*Puccinia psidii* winter) in *Eucalyptus* sp. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.3, p.253-255, 2008

Due to the great importance of the *Eucalyptus* crop in Brazil, companies in the forest sector have aimed, through genetic breeding programs, to reduce yield losses and meet the demands of the paper and cellulose market. One example is the search for genes for resistance to diseases, especially the rust caused by *Puccinia psidii* Winter, which results in reduced productivity in highly susceptible plants. 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 repulsion from the resistance gene.

**Additional Keywords:** *Eucalyptus* sp.; *Puccinia psidii*; resistance, Bulked Segregant Analysis

Espécies de eucalipto são utilizadas em larga escala no estabelecimento de florestas industriais no Brasil. O clima tropical ou subtropical na maioria do território brasileiro permite um crescimento ininterrupto e, conseqüentemente, um rápido acúmulo de biomassa. Empresas atuantes na área de papel e celulose e/ou madeira utilizam o eucalipto para o suprimento de matéria-prima, enquanto que empresas de outras áreas plantam o eucalipto principalmente para obtenção de carvão. Devido a esta importante atividade agro-industrial e o apoio

de instituições governamentais de pesquisa e Universidades, o Brasil ocupa uma posição de liderança mundial em silvicultura e melhoramento de eucalipto (5).

A cultura do eucalipto manteve-se livre de doenças por um período de tempo após sua introdução no Brasil, mas com o aumento das áreas plantadas algumas enfermidades foram surgindo e comprometendo essa cultura, sendo uma delas a ferrugem das mirtáceas causada por *Puccinia psidii* Winter (7).

Empresas do setor florestal vêm nos últimos anos desenvolvendo programas de melhoramento objetivando a obtenção de materiais vegetais resistentes à 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 ASA (Análise de Segregantes Agrupados). Trata-se de um método introduzido por Michelmore *et al.* (1991)(2), 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 (1).

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

O material genético utilizado é oriundo do programa de melhoramento do Setor Florestal da Votorantim Celulose e Papel (VCP), proveniente de um cruzamento entre um clone resistente e outro suscetível, que já vinham sendo testados pela área de Patologia Florestal do Departamento de Produção Vegetal (DPV), na Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu.

Este cruzamento gerou 145 plantas (F1), que foram clonadas através de cultura de tecido, resultando em 60 réplicas de cada indivíduo. Foram inoculadas 10 réplicas de cada e as demais foram plantadas no campo experimental da VCP localizado em Jacareí, de ocorrência natural da doença, no espaçamento 1m X 1m, no delineamento em blocos casualizados.

A inoculação foi realizada em câmara de ambiente controlado, com temperatura de 22°C e umidade relativa em torno de 80%. A concentração da suspensão de esporos foi ajustada para 100.000 esporos/ml.

Para avaliação no campo utilizou-se uma escala de notas modificadas de Takahashi, 2002 (6). As plantas foram avaliadas aos quatro e seis meses de idade.

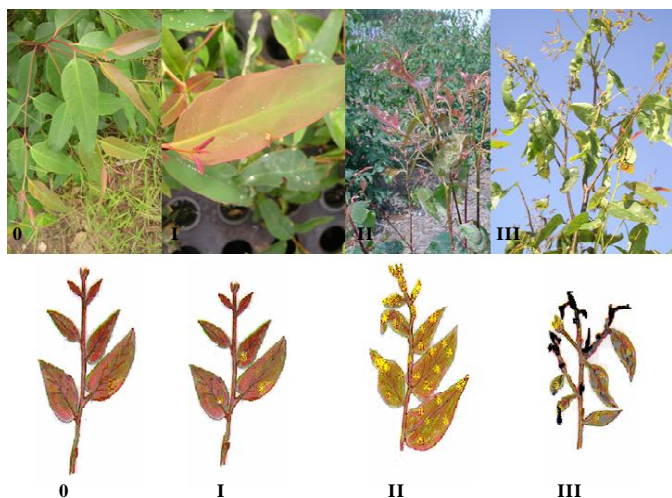


Figura 1. Escala de avaliação de ferrugem modificada de Takahashi, 2002.

Nas avaliações em ambiente controlado a escala sugerida por Takahashi foi modificada e recebeu um novo nível de severidade apresentando, portanto, os seguintes conceitos: **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. As foram realizadas 15, 21 e 30 dias após a inoculação.

Para a composição dos conjuntos de DNA das plantas, foram escolhidos aqueles que apresentaram suscetibilidade ou resistência em seu maior nível e que tiveram resultados compatíveis na situação de campo e controlada.

Os conjuntos foram constituídos ao se misturar 20µl de DNA na concentração de 5ng/µg de cada indivíduo selecionado com base na expressão fenotípica do caráter, isso implica em 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 os Kits de marcadores da “Operon Technologies” (OPA 01-20 até OPZ 01-20 e os kits OPAA 01-20, OPAB, OPAC, OPAD, OPAE, OPAF, OPAG, OPAH, OPAJ e OPAK totalizando 720 marcadores. Aqueles que apresentaram polimorfismo entre as amostras agrupadas foram selecionados e utilizados na amplificação individual.

O cálculo da distância entre o loco de resistência e o marcador encontrado baseou-se na porcentagem de indivíduos recombinantes (10). Dessa forma, assumiu-se que 1% de indivíduos recombinantes equivale a 1cM de distância entre o marcador e o loco.

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 (Tabelas 1 e 2).

Dos 720 marcadores testados, 19 revelaram polimorfismo entre os conjuntos e foram utilizados na amplificação do DNA de cada um dos indivíduos da população. Apenas o marcador AK01 manteve-se presente quando testado no restante da população.

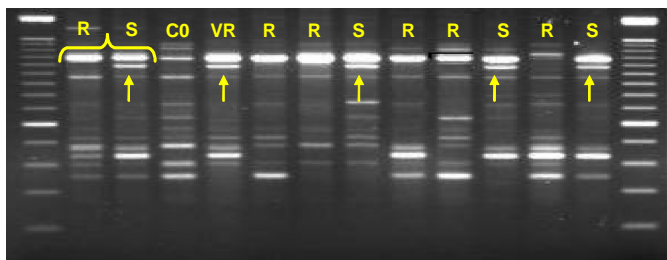
O marcador AK01 mostrou-se localizado a uma distância genética estimada de 20cM do gene de interesse. Na população avaliada, observou-se que a segregação do caráter resistência a ferrugem, é

Tabela 1. Teste Qui-quadrado para os indivíduos inoculados.

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

Tabela 2. Teste Qui-quadrado para os indivíduos infectados no campo.

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



**Figura 2.** Gel de agarose com as marcas encontradas utilizando o marcador AK01.

governado por um alelo recessivo e, portanto, o marcador encontra-se ligado em repulsão ao gene.

Um par de marcadores mais robusto, do tipo “SCAR” (Região amplificada de seqüência caracterizada) (8), foram desenhados com o auxílio do programa GeneRunner (4) e confeccionados pela INVITROGEN com as seguintes sequencias: 5’TTCTGCTACGGCTGCCTAGGAT3’ e 3’CAACAATCCGAGCAAACCTCAA5’.

Marcadores localizados em diferentes cromossomos devem segregar independentemente, mas marcadores localizados no mesmo cromossomo são transmitidos conjuntamente, a menos que esta ligação seja quebrada por recombinação, portanto, com a identificação deste marcador ligado a região do genoma que participa no processo de defesa da planta contra ferrugem, nessa população teste, abre-se a perspectiva da utilização desta marca ou etiqueta m outras populações segregantes e futuro mapeamento. A sequencia originada pelo SCAR foi comparada através de BLAST (3) com outras sequencias depositadas no GeneBank e não apresentou homologia com nenhum gene ou proteína de função conhecida. No presente estudo pode-se verificar que: 1)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; 2)Deve-se considerar a existência de especificidade fisiológica em *Puccinia psidii*; e 3)A combinação de marcadores RAPD com a técnica de ASA é aplicável na identificação de genes de interesse em espécies florestais, como *Eucalyptus* sp. que não possui mapa genético disponível, sendo que a utilização de técnicas mais modernas como os microssatélites, poderão substituí-la com maior eficiência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília, EMBRAPA - CENARGEN, 1995, 220p.
2. Michelmore, R.W., Paran, I., Kesseli, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 9828-9832, 1991.
3. NCBI / BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Acesso em Agosto de 2006.
4. Programa *GeneRunner* para desenho de marcadores moleculares - [www.generunner.net/](http://www.generunner.net/). Acesso em aril de 2006.
5. Squiali, M.G. A Importância do Eucalipto. *Melhoramento de Plantas/Embrapa Tabuleiros Costeiros – UEP. Rio Largo – AL*. 2006. Disponível em: [www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=artigos&artigo=955](http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=artigos&artigo=955). Acesso em 20 de Setembro de 2006.
6. Takahashi, S. S. Ferrugem do eucalipto: Índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionadas ‘a intensidade da doença no campo. 2002. (*Dissertação de mestrado*) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. Botucatu. UNESP. 2002. 101 p.
7. Teixeira, D.A., Alfenas, A.C., Mafia, R.G., Maffia, L.A. & Ferreira, E.M.. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. *Fitopatologia Brasileira* 30: 350-356 2005.
8. Weng, C.; Kubisiak, T.L.; Stine, M. SCAR markers in a longleaf pine x slash pine F1 family. *Forest Genetics*, Zvolen, v.5, n.4, p.239-247, 1998.