

CARLA CRISTINA GONÇALVES ROSADO

**GENÉTICA DA RESISTÊNCIA À MURCHA-DE-CERATOCYSTIS
(*Ceratocystis fimbriata*) EM *Eucalyptus* spp.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R788g
2009

Rosado, Carla Cristina Gonçalves, 1984-
Genética da resistência à murcha-de-ceratocystis
(*Ceratocystis fimbriata*) em *Eucalyptus* spp. / Carla Cristina
Gonçalves Rosado. – Viçosa, MG, 2009.
xii, 56f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Resistência a doenças e pragas.
 2. Eucalipto - Melhoramento genético. 3. Murcha-de-ceratocystis. 4. Locos de caracteres quantitativos.
 5. Mapeamento genético. 6. Marcadores genéticos.
 7. Microssatélites (Genética). 8. Fitopatologia.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

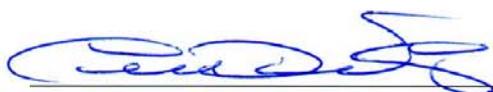
CDD 22. ed. 576.5

CARLA CRISTINA GONÇALVES ROSADO

**GENÉTICA DA RESISTÊNCIA À MURCHA-DE-CERATOCYSTIS
(*Ceratocystis fimbriata*) EM *Eucalyptus* spp.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de fevereiro de 2009.



Prof. Cosme Damião Cruz
(Coorientador)



Pesq. Marcos Deon Vilela Resende
(Coorientador)



Pesq. Lúcio Mauro da Silva Guimarães



Pesq. Everaldo Antônio Lopes



Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

“Seja qual for o grau a que chegamos, o que importa é prosseguir decididamente.” (Fl 3, 16)

Aos meus pais,
Paulo Afonso da Silva Rosado
Maria Elizabete Gonçalves Rosado
Aos meus irmãos,
Carlos Antônio Gonçalves Rosado
Paulo Henrique Gonçalves Rosado
Ao meu grande amor
Marcos Gomide de Andrade

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo durante o curso.

À Veracel S.A., pelo fornecimento dos genitores e progênies para a execução da primeira parte deste trabalho, em especial a David Evandro Fernandes e Sézar Augusto.

À Suzano Papel e Celulose, pelo fornecimento das mudas para a execução de parte deste trabalho, em nome dos engenheiros Edival Zauza e Leandro de Siqueira.

Ao Prof. Acelino Couto Alfenas pela amizade, pelos conselhos, ensinamentos, pela orientação, pelas críticas e sugestões, além do apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Cosme Damião Cruz pelo exemplo como pessoa e profissional, pelo apoio incondicional no meu desenvolvimento acadêmico, pela co-orientação e pelas sugestões na construção dos mapas genéticos e detecção de QTLs.

Ao Dr. Douglas Lau pela amizade, por muito ter me ensinado e pela co-orientação e pelas sugestões.

Ao Dr. Marcos Deon Vilela Resende pela co-orientação, pelas críticas e sugestões a este trabalho.

Ao Dr. Lúcio Mauro Silva Guimarães pela amizade e pelas inúmeras revisões e críticas deste trabalho.

Ao Dr. Dario Grattapaglia e à Dra. Danielle de Assis de Faria da Embrapa/CENARGEN pelas análises moleculares e pela disposição em me ajudar sempre que foi necessário durante o período em que estive em Brasília.

À Dra. Tatiana Rosado, pela amizade, pelos conselhos, pelas críticas e sugestões na realização deste trabalho.

À Márcia Brandão pela amizade, pelo carinho e por ter sido sempre tão eficiente.

Aos meus amigos do Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno – BIOAGRO/UFV pela agradável convivência, em especial a Alexandre, Marisângela, Rodrigo, Talyta e Vanessa.

Aos colegas do Laboratório de Genética Vegetal, Embrapa/CENARGEN, por terem me apoiado e muito me ensinado durante o período em que estive em Brasília, em especial à Juliana Stival, Laís Pinheiro, Leonardo Correia e Marília Pappas.

Aos amigos do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da UFV.

Aos meus avós, tios, padrinhos e queridos primos, pelo carinho, orações e torcida.

Aos meus pais Paulo Afonso e Maria Elizabete e meus irmãos Carlos Antônio e Paulo Henrique, pela amizade, compreensão, estímulo e tantas outras coisas inumeráveis.

À minha sobrinha Elisa Sayegh Arreguy Rosado e meu afilhado Miguel Gomide de Andrade, que mesmo tão pequenos me proporcionam momentos de muita alegria.

Às minhas cunhadas, Cristiana Barbosa e Paloma Sayegh Arreguy Rosado, pela amizade.

Ao meu grande amor, Marcos Gomide de Andrade, por tudo que vivemos juntos, pela nossa cumplicidade, pelo amor incondicional e por sempre acreditar em mim.

Aos meus amigos, que graças a Deus são muitos, que de alguma maneira contribuíram para a realização desta conquista. Em especial à Flaviana Reis Milagres, companheira de longos anos, e Daíse Bernardino, por sempre torcer por mim e me apoiar nas minhas decisões.

BIOGRAFIA

Carla Cristina Gonçalves Rosado filha de Paulo Afonso da Silva Rosado e Maria Elizabete Gonçalves Rosado nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 05 de maio de 1984.

Iniciou o ensino fundamental em 1990 na Escola Estadual Effie Rolfs, onde concluiu o ensino fundamental no ano de 1998 e também o ensino médio em 2001.

Em maio de 2002, ingressou no curso de Engenharia Florestal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), no qual foi bolsista de iniciação científica, sob orientação do Professor Acelino Couto Alfenas. Graduou-se em 16 de março de 2007, obtendo o título de Engenheira Florestal.

Em seguida, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Professor Acelino Couto Alfenas.

Em Fevereiro de 2009, submeteu-se ao exame final de defesa de dissertação para obtenção do título de *Magister Scientiae* em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
ARTIGO 1 - RESISTANCE TO CERATOCYSTIS WILT (<i>CERATOCYSTIS FIMBRIATA</i>) IN PARENTS AND PROGENIES OF <i>EUCALYPTUS GRANDIS</i> X <i>E. UROPHYLLA</i>.....	12
ABSTRACT.....	12
INTRODUCTION.....	13
MATERIAL AND METHODS.....	14
<i>Plant Material</i>	14
<i>Inoculation</i>	14
<i>Data evaluation and analysis</i>	15
RESULTS.....	19
DISCUSSION.....	20
ACKNOWLEDGEMENTS.....	22
REFERENCES.....	22
ARTIGO 2 - MAPEAMENTO GENÉTICO DE QTLs PARA RESISTÊNCIA À MURCHA- DE-CERATOCYSTIS (<i>CERATOCYSTIS FIMBRIATA</i>) EM CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS DE <i>EUCALYPTUS</i> SPP.	32
RESUMO.....	32
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
<i>Material vegetal</i>	34
<i>Inoculação e avaliação</i>	35
<i>Amplificação dos locos microssatélites</i>	35
<i>Geração dos dados genotípicos</i>	36
<i>Mapeamento Genético</i>	36
<i>Deteccção de QTLs</i>	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CONCLUSÕES GERAIS	56
ARTIGO 1:.....	56
ARTIGO 2:.....	56

RESUMO

ROSADO, Carla Cristina Gonçalves. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Genética da resistência à murcha-de-ceratocystis (*Ceratocystis fimbriata*) em *Eucalyptus* spp.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Coorientadores: Cosme Damião Cruz, Douglas Lau e Marcos Deon Vilela Resende.

A murcha-de-ceratocystis (*Ceratocystis fimbriata*) é atualmente uma das principais enfermidades em plantios comerciais de eucalipto no Brasil. Os principais sintomas causados pela doença são murcha, cancro, escurecimento radial do lenho e morte da planta. O uso de genótipos de eucalipto resistentes é a melhor alternativa de controle. Embora existam genótipos resistentes, a base genética da resistência não é conhecida. Sendo assim, no presente trabalho objetivou-se: 1) determinar o nível de resistência de genótipos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* e estimar a possibilidade de transferência da resistência por meio de cruzamentos interespecíficos controlados entre essas duas espécies; 2) construir um mapa genético, detectar e quantificar os efeitos de QTLs para resistência à murcha-de-ceratocystis utilizando marcadores microssatélites em uma família de irmãos completos proveniente de um cruzamento interespecífico. Na primeira parte do trabalho, avaliaram-se cinco genitores de *E. grandis* e 16 de *E. urophylla*, além de 30 progênies *E. grandis* x *E. urophylla* (18 a 25 plantas por progênie). Para a avaliação da resistência foram inoculadas, em condições controladas, cinco réplicas de cada genitor e de cada um dos indivíduos da progênie, com o isolado SBS-1 de *C. fimbriata*. Dos 21 genitores avaliados, 12 foram resistentes e nove suscetíveis, independentemente da espécie. As estimativas das herdabilidades individuais no sentido amplo e restrito equivaleram a 59% e 50%, respectivamente, sugerindo que a resistência genética à murcha-de-ceratocystis apresenta alto grau de controle genético e baixa dominância alélica. Com a seleção dos 50 clones mais resistentes nas famílias avaliadas pode-se obter redução de 74,4% na média da extensão de lesões em relação à população das

progênies. Na segunda parte do trabalho, cinco réplicas de 127 indivíduos da progênie DGxUGL [(*E. dunnii* x *E. grandis*) x (*E. urophylla* x *E. globulus*)] foram avaliadas quanto à resistência à murcha-de-ceratocystis. As inoculações foram realizadas em condições controladas utilizando o isolado SBS-1 de *C. fimbriata*. A resposta da resistência nos indivíduos da progênie seguiu uma variação contínua possibilitando analisar a característica de forma quantitativa. A progênie foi genotipada com 114 marcadores microssatélites, deste total, 110 foram mapeados em 15 grupos de ligação (GL), cujos comprimentos variaram de 12,3 a 191,5 cM. O mapa genético apresentou saturação satisfatória, com comprimento total de 1352,01 cM e intervalo médio de 12,29 cM. Pela análise de marca simples verificou-se que quatro marcadores, localizados nos GL 3, 5, 8 e 10, apresentavam efeito significativo quanto à ligação a QTL de resistência (Teste F; $P \leq 0,05$). O método de Fulker & Cardon confirmou os quatro QTLs encontrados, além de identificar mais um no GL 1, cujas herdabilidades variaram de 9,6 a 34,2.

ABSTRACT

ROSADO, Carla Cristina Gonçalves. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2009. **Genetics of ceratocystis wilt (*Ceratocystis fimbriata*) resistance in *Eucalyptus* spp.** Advisor: Acelino Couto Alfenas. Co-advisors: Cosme Damião Cruz, Douglas Lau and Marcos Deon Vilela Resende.

The ceratocystis wilt (*Ceratocystis fimbriata*) is currently, one of the most important diseases in commercial eucalypt plantations in Brazil. The main symptoms are wilting, canker and wood darkening. The use of resistant *Eucalyptus* genotypes is the best control method. Despite the existence of resistant genotypes, the genetic basis of resistance is unknown. Therefore, the present study aimed to: 1) determine the resistance level of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* genotypes and estimate the possibility to transfer the resistance between these two species through controlled interspecific crosses, 2) build a genetic map, detect and quantify the effects of QTL on ceratocystis wilt resistance using microsatellite markers in an interspecific full sibling family. On the first part of this work five parents of *E. grandis* and 16 *E. urophylla*, and 30 progenies *E. grandis* x *E. urophylla* (18 to 25 plants per progeny) were evaluated. For resistance screening, five replicates of each parent and each individual progeny, were inoculated under controlled conditions with the SBS-1 *C. fimbriata* isolate. From 21 parents assessed, twelve were resistant and nine susceptible, independently on the species. Estimates of individual narrow (50%) and broad (59%) sense heritability suggested a high degree of genetic control and low allelic dominance of the trait. Wide genetic variation among and within families was detected, a fact that contributes to high heritability and genetic gain. A selection of the 50 clones most resistant in the evaluated families, indicated that the average lesion length in the progeny population can be reduced by 74.4%. On the second part, five replicates

of 127 individuals of progeny DGxUGL [(*E. grandis* x *E. dunnii*) x (*E. urophylla* x *E. globulus*)] were evaluated for ceratocystis wilt resistance. The inoculations were conducted under controlled conditions using the *C. fimbriata* isolate SBS-1. The resistance response in individuals of the progeny followed a continuously variable allowing to analyze the characteristic quantitatively. Among the 114 microsatellite markers analysed, 110 were mapped on 15 linkage groups (LG), whose lengths ranged from 12.3 to 191.5 cM genetic distance. The genetic map was satisfactory saturated, with total length of 1352.01 cM and an average interval of 12.29 cM. For the simple mark analysis, four markers found located in the GL 3, 5, 8, and 10, had significant effect on the binding resistance QTL (F test, $P \leq 0.05$). The method of Fulk & Cardon confirmed the four QTLs found and allowed to identify another one in the LG 1, which heritability ranged from 9.6 to 34.2.

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente as espécies do gênero *Eucalyptus* são as essências florestais mais plantadas no mundo, com aproximadamente 18 milhões de hectares (FAO, 2007). O Brasil ocupa lugar de destaque como um dos países de maior área plantada com eucalipto, com aproximadamente 3,75 milhões de hectares. Estima-se que 85% dessa área estejam distribuídos nas regiões Sul e Sudeste, para a produção de madeira para celulose e papel (ABRAF, 2008).

Com a ampliação das áreas plantadas, especialmente em regiões quentes e úmidas, tem sido crescente o surgimento de novas enfermidades que afetam a cultura e causam perdas significativas na produção (ALFENAS et al., 2004). Dentre essas, a murcha-de-ceratocystis, causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted, é uma das mais importantes devido à sua natureza letal, ampla distribuição geográfica, variada gama de hospedeiros e variabilidade genética na população do patógeno (ALFENAS & GUIMARÃES, 2007). *Ceratocystis fimbriata* já foi detectado em 31 espécies de 14 diferentes famílias, entre elas espécies arbóreas, como plátano (*Platanus* spp.), mangueira (*Mangifera indica* L.), gmelina (*Gmelina arborea* Roxb.), cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.), seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. Juss.) Müll. Arg.), espatódea (*Spathodea* sp.), ficus (*Ficus carica* L.), acácia (*Acacia* spp.) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (BAKER et al., 2003). A existência de variabilidade inter e intra-específica para a resistência a essa doença (ZAUZA et al., 2004; ALFENAS et al., 2004) torna a seleção de genótipos resistentes a melhor estratégia de controle. Atualmente, a incorporação de ferramentas e abordagens genômicas nos programas de melhoramento florestal poderá abrir novas perspectivas para a compreensão das relações patógeno-hospedeiro (GRATTAPAGLIA, 2007).

No Brasil, este fungo foi relatado pela primeira vez causando murcha e morte de plantas de *Eucalyptus* spp. no sudeste do Estado da Bahia, em 1997 (FERREIRA et al., 1999). *Ceratocystis fimbriata* é um fungo hemibiotrófico, que vive no solo e na matéria orgânica (FERREIRA, 2006b). Em plantas lenhosas, *C. fimbriata* é típico patógeno de xilema, cujo sintoma marcador é constatável nas secções transversais de órgãos lenhosos, na forma de estrias radiais escuras, da

medula para o exterior do lenho, ou da periferia do lenho para a medula (FERREIRA et al., 2006b). O patógeno penetra na planta por ferimentos nos troncos e pelo contato das raízes, atingindo o coleto e tronco via parênquima medular, de onde, em diversas alturas, surgem estrias escuras, que progridem, via parênquima radial, matando uma porção de câmbio vascular, do floema e da feloderme, resultando numa lesão longitudinal externamente no tronco, contínua ou descontínua, levando à murcha e ao secamento da planta (FERREIRA et al., 2006b).

O controle genético e os mecanismos de resistência do eucalipto à murcha-de-ceratocystis não são conhecidos, sendo esses principalmente estudados em espécies de *Platanus*. A identificação dos genes ou locos que controlam a resistência à murcha-de-ceratocystis são fundamentais para embasar o controle da doença por meio do plantio de genótipos resistentes. Em plátano (*Platanus* sp.) quando se obtêm híbridos entre indivíduos suscetíveis e resistentes é possível encontrar indivíduos altamente resistentes ao cancro provocado por *C. platani*. (VIGOUROUX & OLIVIER, 2004). Genótipos resistentes a *C. platani* acumulam maior concentração de fitoalexinas que os genótipos suscetíveis (EL MODAFAR et al., 1995). Uma glicoproteína isolada do fungo elicita a produção de tais compostos (ALAMI et al., 1998). Em genótipos suscetíveis, a aplicação de ácido jasmônico induziu o acúmulo de fitoalexinas após a inoculação do patógeno ou da molécula elicitora (CLERIVET & ALAMI, 1999). *Ceratocystis platani* produz toxinas que induzem necrose da célula vegetal (PAZZAGLI et al., 1999), essenciais à patogênese. A capacidade da planta em neutralizar tais toxinas pode constituir um importante mecanismo de resistência.

Atualmente, avanços na área de ciências genômicas, associados à redução dos custos de tecnologias de genotipagem e o sequenciamento de DNA têm favorecido a aplicação de técnicas moleculares aos programas de melhoramento (GRATTAPAGLIA, 2003, 2004, 2007; MISSIAGGIA, 2005; POKE et al., 2005). Estudos genômicos têm sido direcionados para o sequenciamento de genes expressos, construção de mapas genéticos, mapeamento de locos controladores de características quantitativas, mapeamento de genes de resistência, mapeamento físico, estudos de expressão gênica, desenvolvimento de ferramentas de

bioinformática e genética estatística para integrar e disponibilizar toda a informação visando à seleção de árvores superiores (GRATTAPAGLIA, 2004; POKE et al., 2005).

Marcadores microssatélites são, atualmente, os mais indicados para a construção de mapas genéticos de alta resolução e cobertura em espécies florestais. Os microssatélites caracterizam-se pela natureza multialélica, herança co-dominante, abundância e transferibilidade entre espécies geneticamente relacionadas. A conservação de locos microssatélites entre as espécies do gênero *Eucalyptus* torna possível a geração de mapas “consenso”, permitindo a comparação e integração de informação de mapeamento genético de marcadores, genes e QTLs entre experimentos independentes (GRATTAPAGLIA & KIRST, 2008).

O mapeamento genético em plantas é, geralmente, realizado por meio da análise de meioses geradas a partir de cruzamentos entre linhagens puras. Espécies florestais, em sua grande maioria plantas alógamas, possuem longo ciclo de vida e sofrem alta depressão endogâmica, o que dificulta, ou até impossibilita, a obtenção de linhagens homozigóticas. Portanto, o emprego de delineamentos clássicos de mapeamento não é recomendado, como populações F₂, retrocruzamentos (RC) e linhagens recombinantes endogâmicas (RILs). Uma alternativa para estudos de mapeamento genético é o uso de famílias exogâmicas, seja de meios-irmãos e irmãos completos.

Nas famílias exogâmicas, o número de alelos que segregam por loco marcador e par de genitor poderá variar em até quatro, para uma espécie diplóide. Nestes casos, é necessário empregar delineamentos genéticos apropriados, destacando-se aqueles fundamentados em análise de irmãos obtidos de cruzamentos entre genitores de populações exogâmicas, que estabelecerão famílias de meios-irmãos e, ou, de irmãos completos (CRUZ et al., 2009). Por se tratar de indivíduos heterozigotos, os marcadores segregam com diferentes razões de segregação. Para o caso geral de sistemas multialélicos com até quatro alelos por cruzamento, haverá basicamente, três categorias e sete tipos distintos de acasalamentos ou diferentes tipos de pares de irmãos que caracterizam a herança de marcas individuais (Haseman & Elston, 1972). Assim, considerando-se um

loco A com alelos i, j, k e l, ter-se-ão os seguintes tipos de cruzamentos: cruzamento entre genitores homozigotos (I- $A_iA_i-A_iA_i$, II- $A_iA_i-A_jA_j$), cruzamento entre genitores homozigotos e heterozigotos (III- $A_iA_i-A_iA_j$, IV- $A_iA_i-A_jA_k$) e cruzamento entre genitores heterozigotos (V- $A_iA_j-A_iA_j$, VI- $A_iA_j-A_iA_k$; VII- $A_iA_j-A_kA_l$). O tipo I envolve apenas um alelo, os tipos II, III e V dois alelos, os tipos IV e VI três alelos, e o tipo VII quatro alelos. Na análise de segregação, deve-se considerar que somente acasalamentos que envolvam pelo menos um dos genitores heterozigotos sejam informativos para fins de mapeamento. Dessa forma, apenas cruzamentos dos tipos III, IV, V, VI e VII são informativos.

Além da heterozigosidade observada entre genitores de um cruzamento exogâmico, deve ser verificada, adicionalmente, a existência de indivíduos informativos na progênie. Segundo Da & Lewin (1995), um marcador é considerado informativo quando a origem dos alelos dos indivíduos em uma progênie pode ser inequivocadamente determinada. Baseando-se nesse pressuposto, Lynch & Walsh (1998) propuseram de forma resumida três níveis de informatividade para cruzamentos exogâmicos, de acordo com os genitores envolvidos no cruzamento: Cruzamentos completamente informativos ($A_iA_j \times A_kA_l$); em que a segregação esperada é de 1:1:1:1; cruzamento com um loco informativo ($A_iA_j \times A_kA_k$), a segregação esperada é 1:1 e cruzamentos parcialmente informativos ($A_iA_j \times A_iA_j$), no qual a segregação esperada é de 1:2:1.

Os primeiros mapas genéticos gerados utilizaram um tipo de delineamento de irmãos completos, denominado de pseudo-cruzamento por envolver marcadores dominantes e a segregação ser analisada separadamente para cada genitor (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994). Essa metodologia foi utilizada em diversos outros mapeamentos envolvendo não só *Eucalyptus*, mas também *Pinus* (CARLSON et al., 1991), *Populus* (CERVERA et al., 2001) e outras espécies perenes. No entanto, algumas desvantagens da estratégia de pseudo-cruzamento teste, em relação às metodologias que consideram delineamentos genéticos de populações exogâmicas são: a necessidade de exclusão dos marcadores que segregam na proporção 1:2:1 ou 3:1, problemas na obtenção de

dois mapas para os genitores e a dificuldade de integração dos mesmos em razão de não se ter marcadores comuns (âncoras) aos dois mapas gerados. Atualmente é possível obter mapa único em análise de pseudo-cruzamento teste, por meio da inclusão de marcadores com segregação 3:1, em alguns programas capazes de realizar os cálculos de frequência de recombinação levando em consideração a informação simultânea das meioses dos dois parentais heterozigóticos para produzir um mapa integrado (STAM, 1993; BUTCHER et al., 2002; CRUZ, 2009). No entanto, somente Byrne et al. (1995), Thamarus et al. (2002), Novaes (2006) e Bhering (2008) construíram mapas integrados para ambos os parentais. No trabalho de Bhering (2008), utilizando o procedimento de simulação de dados, o autor concluiu que para locos completamente informativos, é possível calcular a frequência de recombinação entre pares de locos, a partir da frequência gamética de cada genitor, assim como a partir da frequência genotípica da progênie, que é nos cruzamentos tipo VII, a média aritmética da frequência de recombinação obtida com base na frequência gamética ou individual.

É importante ressaltar que, em trabalhos de mapeamento genético envolvendo diferentes espécies de *Eucalyptus*, tem sido observados marcadores com distorção da razão de segregação esperada (DS) em diferentes níveis, geralmente maior para cruzamentos interespecíficos entre indivíduos de espécies puras (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994; MARQUES et al., 1998; MYBURG et al., 2003) em relação a cruzamentos intraespecíficos (BYRNE et al., 1995; THAMARUS et al., 2002). Na maioria desses trabalhos, os marcadores que exibem DS foram descartados da análise de mapeamento (BYRNE et al., 1995; MARQUES et al., 1998; THAMARUS et al., 2002; MYBURG et al., 2003 e NOVAES, 2005). Em plantas, a distorção na razão de segregação de marcadores pode ser atribuída a causas genéticas e fisiológicas como: transmissão diferencial de alelos tanto de linhagens germinativas macho quanto de fêmea, incluindo competição de tubo polínico, pólenes letais, fertilização preferencial e eliminação seletiva de zigotos (LIANG et al., 2006). As distorções proporcionadas por inviabilidade gamética ou genotípica, que ocorre após fertilização, afetam de forma diferencial o mapeamento genético (FERREIRA, 2006a).

Os mapas genéticos, baseados em marcadores moleculares, tem se revelado como recurso analítico de valor inestimável. Por meio deles, torna-se possível identificar regiões genômicas que contenham genes ou seqüências regulatórias envolvidos no controle genético de características quantitativas (QTL) de importância econômica ou adaptativa.

O primeiro trabalho envolvendo mapeamento de QTL em eucalipto foi realizado por Grattapaglia et al. (1994), onde foram detectados QTLs para resposta à micropropagação, capacidade de enraizamento e brotação. Atualmente, existem poucos estudos descritos na literatura que visam mapeamento de QTL relacionados à resistência a doenças em espécies florestais. A maioria destes estudos geralmente restringe-se à ferrugem do eucalipto (*Puccinia psidii*), e, mais recentemente, para a mancha foliar e desfolha de *Teratosphaeria* spp. (= *Mycosphaerella*), não sendo relatado, até o momento, estudos que visam à detecção e ao mapeamento de QTL que conferem resistência à murcha-deceratocystis. Com relação à ferrugem, destacam-se os trabalhos de Junghans et al. (2003), Rosado (2007) e Alves (2008). Junghans et al. (2003) mapearam, por meio de marcadores RAPD, o loco *Ppr1* (*Puccinia psidii* resistance gene 1) responsável por conferir resistência à ferrugem em uma progênie de *E. grandis*. Rosado (2007), por meio de marcadores microssatélites, detectou um QTL posicionado no grupo de ligação 3 que explica 42% da variação fenotípica na progênie segregante de um cruzamento interespecífico (“*urograndis*”). Alves (2008) ao trabalhar com uma família (*E. dunnii* x *E. grandis*) x (*E. urophylla* x *E. globulus*), detectou um QTL de efeito principal que confere resistência à ferrugem e mapeou o gene de resistência no grupo de ligação 3 de *Eucalyptus* spp. O autor concluiu que a identificação de um QTL de efeito principal para a resistência à ferrugem não exclui a possibilidade de existência de outros locos de efeito secundário. Freeman et al. (2008), trabalhando com os dados de infecção natural, detectaram dois QTLs de efeito principal que explicam uma grande proporção da variância fenotípica para resistência a *Teratosphaeria cryptica* em *E. globulus*, concluindo que existe controle oligogênico para a característica estudada. No entanto, os resultados desse trabalho são inconclusivos, pois foram empregados

dados de infecção natural, onde pode haver plantas escapes e a infecção por mais de uma espécie de *Teratosphaeria*.

Assim, frente à importância recentemente atribuída à murcha-de-ceratocystis nos programas de melhoramento do eucalipto, há a necessidade de mapeamento de QTLs que controlam a resistência a essa doença, por meio de marcadores microssatélites para que a prática de Seleção Assistida por Marcadores (SAM) possa ser efetivamente implementada, e também a identificação da função de genes, possibilitando assim entender o controle genético dos caracteres sob estudo, no sentido de potencializar o uso da manipulação genética no melhoramento da espécie.

Sendo assim, no presente trabalho objetivou-se: 1) determinar o nível de resistência de genótipos de *E. grandis* e *E. urophylla* e estimar a possibilidade de transferência da resistência por meio de cruzamentos interespecíficos controlados entre essas duas espécies; 2) construir um mapa genético, utilizando marcadores microssatélites, para uma família derivada de um cruzamento entre quatro espécies, sendo um genitor híbrido de *E. dunnii* x *E. grandis* e outro de *E. urophylla* x *E. globulus*, 3) detectar, mapear e quantificar o efeito e a importância de QTLs para resistência à murcha-de-ceratocystis, utilizando marcadores microssatélites em uma família interespecífica de irmãos completos de *Eucalyptus* spp.

Esta dissertação encontra-se dividida em dois artigos:

- Artigo 1: Resistance to ceratocystis wilt (*Ceratocystis fimbriata*) in parents and progenies of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*
- Artigo 2: Mapeamento genético de QTLs para resistência à murcha-de-ceratocystis (*Ceratocystis fimbriata*) em cruzamentos interespecíficos de *Eucalyptus* spp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF: ano base 2007 /ABRAF**. Brasília: ABRAF, 2008. 90p.
- ALAMI, I., MARI, S. & CLERIVET, A. A glycoprotein from *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* triggers phytoalexin synthesis in *Platanus x Acerifolia* cell suspension cultures. **Phytochemistry** 48:771-776. 1998.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Ed. Viçosa MG. UFV. 2004.
- ALFENAS, A. C. & GUIMARÃES, L. M. S. Resistência Genética em Patossistemas Florestais. *Fitopatologia Brasileira* 32 (Supl.): 89-91. 2007. (Resumo)
- ALVES A.A. **Herança e mapeamento genético da resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em cruzamentos interespecíficos de *Eucalyptus***. Dissertação Mestrado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2008.
- BAKER, C.J., HARRINGTON, T.C., KRAUSS, U. & ALFENAS, A.C. Genetic variability and host specialization in the Latin American Clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology** 93:1274-1284. 2003.
- BHERING L.L. **Mapeamento genético em famílias simuladas de irmãos completos**. Tese Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2008.
- BUTCHER, P.A., WILLIAMS, E.R., WHITAKER, D., LING, S., SPEED, T.P. & MORAN, G.F. Improving linkage analysis in outcrossed forest trees - an example from *Acacia mangium*. **Theoretical and Applied Genetics** 104:1185-1191. 2002.
- BYRNE, M., MURRELL, J.C., ALLEN, B. & MORAN, G.F. An integrated linkage genetic linkage map for *Eucalyptus* using RFLP, RAPD and isozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics** 91:869-875. 1995.
- CARLSON, J.E., TULSIERAM, L.K., GLAUBITZ, J.C., LUK, V.W.K., KAUFFELDT, C. & RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. **Theoretical and Applied Genetics** 83:194-200. 1991.
- CERVERA, M.T., STORME, V., IVENS, B., GUSMÃO, J., LIU, B.H., HOSTYN, V., SALYEKEN, J.V., MONTAGU, M.V. & BOERJAN, W. Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. **Genetics** 158:787-809. 2001.

CLERIVET, A. & ALAMI, I. Effects of jasmonic acid and of an elicitor from *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* on the accumulation of phytoalexins in leaves of susceptible and resistant plane trees. **Plant Science** 148:105-110. 1999.

CRUZ, C.D., GOD, P.I.V.G. & BHERING, L.L. Mapeamento de QTLs em populações exogâmicas. In: Borém, A. (Ed.) **Marcadores moleculares**. 2ª ed. Viçosa MG. Editora UFV. 2009. pp. 443-481.

Cruz, C.D. **GQMOL**: Programa para análise de genética quantitativa molecular. Versão 2007.2.1. Desenvolvido pelo setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm

DA, Y. & LEWIN, H. A. Linkage information content and efficiency of full-sib and half-sib designs for gene mapping. **Theoretical and Applied Genetics** 90:699-706. 1995.

EL MODAFAR, C., CLERIVET, A., VIGOUROUX, A. & MACHEIX, J.J. Accumulation of phytoalexins in leaves of plane tree (*Platanus* spp.) expressing susceptibility or resistance to *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. **European Journal of Plant Pathology** 101:503-509. 1995.

FAO. **Global forest resources assessment 2007** - Main report. FAO Forestry paper. ISSN 0258-6150, 2007. 479 p. Disponível em: www.fao.org/forestry/fo/fra/main/index.jsp.

FERREIRA A. **Mapeamento genético utilizando marcadores moleculares com distorção de segregação gamética e genotípica**. Tese Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2006a.

FERREIRA, F.A., MAFFIA, L.A., BARRETO, R.W., DEMUNER, N.L. & PIGATTO, S. Sintomatologia de marcha de *Ceratocystis fimbriata* em Eucalipto. **Revista Árvore** 30:155-162. 2006b.

FERREIRA, F.A., DEMUNER, A.M. & PIGATTO, S. Murcha-de-ceratocystis em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 32 (Supl.):284. 1999. (Resumo)

FREEMAN, J.S., POTTS, B.M. & VAILLANCOURT, R.E. Few Mendelian genes underlie response of a forest tree, *Eucalyptus globules*, to a natural fungal epidemic. **Genetics** 178:563-571. 2008.

GRATTAPAGLIA, D. Mapas Genéticos e Seleção Assistida por Marcadores Moleculares. In: Borém, A. (Ed.) **Biotecnologia Florestal**. Viçosa MG. Editora UFV. 2007. pp. 201-230.

GRATTAPAGLIA, D. Integrating Genomics into *Eucalyptus* breeding. **Genetics and Molecular Research** 3:369-379. 2004.

GRATTAPAGLIA, D. Genolyptus. In: Borém, A., Giudice, M. & Sedyama, T. (Eds.) **Melhoramento Genômico**. Viçosa MG. Editora UFV. 2003. pp. 51-71.

GRATTAPAGLIA, D. & KIRST, M. Eucalyptus applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist** 179:911-929. 2008.

GRATTAPAGLIA, D. & SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics** 137:1121-1137. 1994.

HASEMAN, J.K. & ELSTON, R.C. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. **Behav. Genetics** 2:3-19. 1972.

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

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

LYNCH, M. & WALSH, B. Genetics and analysis of quantitative traits. Inc. Ed. Sunderland MA. Sinauer Associates. 1998.

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

MISSIAGGIA A.A. Mapeamento Genético de QTL para qualidade da madeira e florescimento precoce e, estudos de expressão gênica alelo específica em *Eucalyptus* spp. Tese Doutorado. Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 2005.

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

NOVAES E. Mapeamento de QTLS para qualidade da madeira em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e ancoragem de clones BAC no mapa genético. Dissertação Mestrado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2006.

PAZZAGLI, L., CAPPUGI, G., MANAO, G., CAMICI, G., SANTINI, A., SCALA, A. Purification, characterization, and amino acid sequence of ceratoplatenin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. **The Journal of Biological Chemistry** 274:24959-24964. 1999.

POKE, F.S., VAILLANCOURT, R.E., POTTS, B.M. & REID, J.B. Genomic research in *Eucalyptus*. **Genetica** 125:79-101. 2005.

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

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

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

VIGOUROUX, A. & OLIVIERE, R. First hybrid plane trees to show resistance against canker stain (*Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*). **Forest Pathology** 34:307-319. 2004.

ZAUZA, E.A.V., ALFENAS, A.C., HARRINGTON, T.C., MIZUBUTI, E.S. & SILVA, J.F. Resistance of *Eucalyptus* clone to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease** 88:758-760. 2004.

**RESISTANCE TO CERATOCYSTIS WILT (*CERATOCYSTIS
FIMBRIATA*) IN PARENTS AND PROGENIES OF *EUCALYPTUS
GRANDIS* X *E. UROPHYLLA***

Carla Cristina Gonçalves Rosado¹, Lúcio Mauro da Silva Guimarães¹, Miranda Titon¹,
Douglas Lau², Leonardo Rosse³, Marcos Deon Vilela de Resende⁴ and Acelino Couto
Alfenas^{1*}

¹Departamento de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-000,
Viçosa, MG, Brazil. *Corresponding author: Acelino Couto Alfenas, E-mail: aalfenas@ufv.br,
Telephone: +55 (31) 3899-2939.

²EMBRAPA Trigo, Rodovia BR 285, Km 294, 99001-970, Passo Fundo, RS, Brazil.

³VERACEL S.A. Rodovia BA-275, Km 24, 45820-970, Eunápolis, BA, Brazil.

⁴EMBRAPA Florestas, Estrada da Ribeira, Km 111, 83411-000, Colombo, PR, Brazil.

Para submissão na revista *Silvae Genetica*

ABSTRACT - *Ceratocystis wilt*, caused by *Ceratocystis fimbriata*, is one of the most damaging diseases in eucalyptus plantations worldwide. Although there are resistant genotypes, the genetic basis of resistance is still poorly understood. In this paper we studied the resistance level by a stem inoculation experiment of genotypes of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* and estimated the heritability and gains of selection in families derived from controlled interspecific crosses. In both species, highly resistant as well as highly susceptible genotypes to *Ceratocystis wilt* were found. Out of 21 parents assessed, twelve were resistant and nine susceptible. Estimates of individual narrow (50%) and broad (59%) sense heritability suggested a high degree of genetic control and low allelic dominance of the trait. There was great genetic variation among and within families, a fact that contributes to high heritability and genetic gain. A genetic gain in lesion size of up to -74.4% was obtained from selection of the 50 best clones in the evaluated families, i.e., the mean lesion length in the progeny population can be reduced by 74,4%.

Key words: Genetic parameters, genetic resistance, forest pathology.

INTRODUCTION

Due to its lethal nature, broad range of hosts and wide geographical distribution, the Ceratocystis wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted is currently one of the most damaging diseases of eucalyptus plantations in Brazil (ALFENAS et al., 2004). Besides eucalyptus, *C. fimbriata* also infects other crops of economic importance, such as mango (*Mangifera indica* L.) (VIEGAS, 1960), coffee (*Coffea arabica* L.) (MARIN, 2003), black-wattle (*Acacia mearnsii* of Wild.) (RIBEIRO and ITO, 1988; SANTOS and FERREIRA, 2003), taro (*Colocasia esculenta*) (HARRINGTON et al., 2005) and crotalaria (*Crotalaria juncea* L.) (RIBEIRO et al., 1977). The main symptoms caused by *C. fimbriata* in eucalyptus are wilting, canker and wood darkening. The pathogen penetrates the plant through fresh wounds on the stem and root contact and attains the stem and trunk via medullar parenchyma. Dark stripes originates from the medulla spread through the radial parenchyma up to different heights and may reach in the stem. The fungus also kills partially of the vascular cambium, the phloem and pheloderm, resulting in longitudinal, continuous or interrupted lesions on the outer part of the trunk, which cause tree wilting and death (FERREIRA et al., 2006).

Besides *C. fimbriata*, other species such as *C. eucalypti*, *C. moniliformis*, *C. moniliformopsis* and *C. pirilliformis* have been reported in eucalyptus (BARNES and ROUX, 2003). Of these, only *C. fimbriata* is known to be pathogenic and was reported for the first time causing wilting and plant death of *Eucalyptus* spp. in the Southeast of the State of Bahia in 1997 (FERREIRA et al., 1999). *Ceratocystis fimbriata* has also been reported in eucalyptus in Uruguay (BARNES et al., 2003), in the Republic of Congo (ROUX et al., 2000), in Uganda (ROUX et al., 2001) and in the South Africa (ROUX et al., 2004).

Although genetic resistance is the best control strategy (ZAUZA et al., 2004), the inheritance pattern and mechanisms involved in resistance have not yet been determined. However this information is essential to guide the use of resistance sources in genetic breeding programs of eucalyptus. The purpose of this study was to determine the resistance level of *E. grandis* and *E. urophylla*

genotypes and to estimate the possibility of resistance transferring through controlled interspecific crosses between these two species.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material

The resistance to ceratocystis wilt of five elite genotypes of *E. grandis* (G39, G45, G58, G93 and G547) and 16 of *E. urophylla* (U1072, U1177, U1179, U1183, U1185, U1237, U1275, U1282, U1286, U1305, U1310, U1313, U1316, U1392, U1450, and U1455) was assessed. Segregation in 30 hybrid progenies derived from controlled *E. grandis* x *E. urophylla* crosses was also evaluated. Five replicates of each parent and 18 to 25 plants per progeny were inoculated, depending on the cross (Table 2). Not all parents of the evaluated progenies were inoculated, since they would not be propagated by rooted cuttings. However these progenies were used to estimate the genetic gains. The rooted cuttings and seedlings (90 days old) were transplanted to 2L pots, containing a mixture of soil:sand:manure (3:1:1). Ouro Verde® fertilizer (15-15-20 NPK and low quantities of Ca, S, Mg, Zn, B, Fe, and Mn) was applied twice a week (100mL/plant at 7,5g/L) until the plants reached an adequate development stage for inoculation, 60 days after transplanting (plants of 1.5 to 2.0 cm diameter and 60 cm high). Daily mean temperature in the period was of $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Irrigation was conducted 2-3 times a day according to the plant needs.

Inoculation

In the experiment, it was used a culture medium (SBS-1) of *C. fimbriata*, isolated from plants of a hybrid clone *E. grandis* x *E. urophylla* with wilting symptoms, from the region of Teixeira of Freitas (BA). This isolate has been routinely used in our laboratory for screening for host resistance. The fungus was grown in Petri dishes (9 cm diameter) containing MYEA (2% malt extract, 0.2% yeast extract, and 2% agar) for eight days at $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and 12 h photoperiod under a light intensity of $40 \mu\text{ mol. s}^{-1}.\text{m}^{-2}$. For the spore collection (conidia + ascospores), sterilized distilled water was added to the dishes and, after scraping off the colony surface with Drigalski spatula, the spore suspension was filtered through double gaze and calibrated at 2.5×10^6 spores mL⁻¹ (ZAUZA et al., 2004).

A cut lengthwise approximately 2 cm length was made on the stem (about 3 cm above soil surface) and 0.5 mL of the spore suspension was deposited and the inoculation area was covered with plastic film. Ten replicates of each of the clones HRC2277 (natural hybrid of *E. grandis* x *E. urophylla*) and HGU1172 (hybrid *E. grandis* x *E. urophylla*) were used as resistant and susceptible controls, respectively.

Data evaluation and analysis

The lesion length on the xylem was determined 60 days after inoculation and the data were analyzed using the programs Statistica ® version 5.0 (StatSoft), Genes ® version 2007.0.0 (CRUZ, 1997) and Selegen-Reml/Blup ® (RESENDE, 2002; DUNLOP et al., 2005). The Scott & Knott grouping test ($p \leq 0.01$) was used to classify the parents as resistant or susceptible.

The phenotypic, genetic and environmental variances were estimated for each family, based on the procedure for families with intercalated controls (CRUZ, 1997), the adjusted analysis model and parameters estimated by the methodology of mixed linear models (REML - residual maximum likelihood and BLUP - best linear unbiased prediction). Five replications of each resistant and susceptible clone were employed as intercalated control. The REML/BLUP method was fitted based on the following mixed model: $y = Xf + Zg + e$, where: y , f , g and e are vectors of data, of fixed effects (means of controls and the progeny population), genotypic effects of families and parents (random) and random errors, respectively, and X and Z : incidence matrices for f and g , respectively.

From the fitting of the model for the experiment with families and also for the experiment with parents, estimates of variance components (via REML) and the heritability in the narrow and broad sense were obtained. Genotypic values for each individual of the hybrid families were also predicted and gains with genetic selection estimated within families and also in the hybrid population as a whole. The prediction of gains with selection (GS) was based on the selection of the 50 best plants of the progeny population (F1).

The first cross between two distinct populations is not in equilibrium and its total genetic variance is not linearly related to any of the parent populations.

However, total genetic variance can be partitioned into additive and dominance components as follows (Hallauer and Miranda, 1988; Gallais, 1989; Comstock, 1996):

$$\sigma_{A(12)}^2 = pq[a + (r - s)d]^2 + rs[a + (q - p)d]^2 = \sigma_{A12}^2 + \sigma_{A21}^2$$

$$\sigma_{D12}^2 = 4p(1 - p)r(1 - r)d^2 = 4pqrsd^2, \text{ where:}$$

$\sigma_{A(12)}^2$: total additive genetic variance in the crossed population.

σ_{A12}^2 : additive genetic variance when plants of the population 1 are used as female parents.

σ_{A21}^2 : additive genetic variance when plants of the population 2 are used as female parents.

σ_{D12}^2 : dominance genetic variance in the crossed population.

The quantities p and q are the allelic frequencies in the population 1 and r and s are the allelic frequencies in the population 2. The quantities a and d are the effects of the genotypes homozygous favorable and heterozygous, respectively.

The components $\sigma_{A(12)}^2$ and σ_{D12}^2 are called homologous of the additive and dominance variances as defined for one population, i.e., σ_A^2 and σ_D^2 . In fact they equal σ_A^2 and σ_D^2 when p = r, i.e., when both populations have the same allelic frequency.

When the crossed population is in a full-sib family structure, the genetic variance among full sib (FS) families is given by

$$\begin{aligned} \sigma_{FS(12)}^2 &= (1/2)pq[a + (1 - 2r)d]^2 + (1/2)rs[a + (1 - 2p)d]^2 + pqrsd^2 \\ \sigma_{FS(12)}^2 &= (1/2)\sigma_{A(12)}^2 + (1/4)\sigma_{D12}^2 \end{aligned}$$

which is analogous to $\sigma_{FS}^2 = (1/2)\sigma_A^2 + (1/4)\sigma_D^2$, the variance among full-sib families for one population.

The quantity $\sigma_{A(12)}^2$ can be used as the numerator of an inter-population narrow sense heritability and the components $\sigma_{A(12)}^2$ and σ_{D12}^2 can be used as the numerator of an inter-population broad sense heritability. Such components $\sigma_{A(12)}^2$ and σ_{D12}^2 are called inter-population additive and dominance variance and are routinely estimated in maize breeding programs (Hallauer and Miranda, 1988; Coors and Pandey, 1999), without assuming alleles at frequency of 0.5. Selection of F1 hybrid individuals for cloning can be predicted by using this defined inter-population broad sense heritability. Estimates of the heritabilities on full-sib family means were also obtained associated with family selection.

Considering separated analysis for the full-sib experiment the following variance structures and relations are obtained:

$$\text{Genetic variance among full-sib families: } \sigma_{FS}^2 = (1/2)\sigma_{A(12)}^2 + (1/4)\sigma_{D12}^2 .$$

Full-sib family mean heritability: $h_{FSM}^2 = \sigma_{FS}^2 / (\sigma_{FS}^2 + \sigma_{WFS}^2 / 18)$, where σ_{WFS}^2 is the within family individual phenotypic variation.

$$\text{Accuracy of family selection: } (h_{FSM}^2)^{1/2} .$$

Coefficient of genotypic variation among progenies:
 $CVg\% = 100 * (\sigma_{FS}^2)^{1/2} / (GeneralMean)$

$$\text{Coefficient of residual variation: } CVe\% = 100 * (\sigma_{WFS}^2)^{1/2} / (GeneralMean)$$

Within full-sib family individual broad sense heritability:
 $h_{WFS}^2 = \sigma_{FS}^2 / \sigma_{WFS}^2$, assuming that between and within family genetic variances are approximately the same. That is correct for traits with low dominance.

Considering separated analysis for the cloned parents experiment the following variance structures and relations are obtained:

$$\text{Genetic variance among cloned parents: } \sigma_{CP}^2 = \sigma_A^2 + \sigma_D^2 .$$

Individual broad sense heritability: $h_b^2 = \sigma_{CP}^2 / \sigma_{FCP}^2$, where σ_{FCP}^2 is the individual phenotypic variation for parents.

Considering the joint analysis for both experiments (cloned parents and full-sib families) and assuming the average allelic frequency in each population as approximately the same, i.e., p close to r, it was possible to estimate the additive genetic variance (σ_A^2) by isolating it from the sum of itself and the dominance variance. The three types of covariance between relatives (full-sibs, cloned parents and parent-offspring) were used simultaneously for estimating σ_A^2 , by using residual maximum likelihood (REML). This assumption (p close to r) was made only for estimation of this parameter σ_A^2 . We consider and believe that such assumption approximately holds for a quantitative trait (controlled by many genes) in two non-improved populations. The following estimates were obtained:

Additive genetic variance from the joint analysis: $\hat{\sigma}_A^2 = 75.8103$.

Dominance genetic variance from the joint analysis: $\hat{\sigma}_D^2 = 11.2846$.

Narrow-sense individual heritability: $h_n^2 = \hat{\sigma}_A^2 / \sigma_{FJA}^2$, where $\sigma_{FJA}^2 = 151.3784$ is the individual phenotypic variation from the joint analysis.

Broad-sense individual heritability from the joint analysis: $h_{bj}^2 = (\hat{\sigma}_A^2 + \hat{\sigma}_D^2) / \sigma_{FJA}^2$, where $\sigma_{FJA}^2 = 151.3784$ is the individual phenotypic variation from the joint analysis.

The standard errors for the estimated variance component were obtained through the inverse of the second derivatives matrix (Hessian matrix) of the residual likelihood function with respect to the variance components. The standard errors estimated for the heritabilities were obtained by the delta technique described by Bulmer (1980).

RESULTS

Out of the 21 parents assessed, 12 were resistant (R), seven were susceptible (S) and two were highly susceptible (HS) (Figure 1). Necrosis was observed on the bark of all five plants of the susceptible clone (HGU1172). Of the S and HS parents only for U1275 (S) we observed wilt. In the others S and HS parents external cankers and radial wood darkening were observed. In the resistant genotypes U1450, G547, G58, U1455 and HRC2277 (control) no wood lesions were observed.

The individual inheritability in the narrow and broad sense was estimated at 50% and 59%, respectively, and the heterosis value in progenies was -3% (Table 1). A wide genotypic variation (39%) between families was found, which allowed high heritability (88%) and accuracy (94%) for the selection of families. The genetic variability for selection within families was also high, as showed by the high heritability estimate (38%) for selection within families (Table 1).

Results of the genetic means (predicted genotypic values) of the progenies and checks were compared (Table 2). Out of parents assessed, G39, classified as R, was involved in a considerable number of crosses [G39 x U1450 (R), x U1282 (R), x U1183 (R), x U1072 (S), x U1313 (S), X U1275 (S), x U1305 (S), x U1034 ex U1206]. The mean lesion length in progenies derived from parent G39 increased according to the increasing susceptibility of the parents used in the cross (Figure 2).

A genetic gain of -74.4% can be obtained with the selection of the 50 best potential clones in the families assessed. Six individuals (U1392 x G82, G91 x U1274, U1185 x G99, G47 x U1455, U1179 x G547 and G39 x U1450) of rather resistant families were used in this selection (Table 3). A genetic gain of -79.4% by selection of the 10 best individuals can be achieved, i.e., a reduction of 79.4% in mean lesion length, compared to the progeny population. In this case, the genotypic value or expected genetic mean for lesion length of the best clones would be 2.16 cm (Table 3), which is less than half the lesion length (4.5 cm) of the resistant control, in other words, a genetic gain of -52% (52% reduction in the lesion length) over the resistant control.

The analysis of the frequency distribution of disease severity (Figure 3) shows the presence of several intermediate resistance levels and transgressive segregation in the F₁ population, indicating the possibility that susceptible parents have other resistance genes than the resistant parents.

DISCUSSION

The phenotypic analyses indicated the existence of a high genetic variability for resistance to *Ceratocystis fimbriata* wilt in *E. grandis* and *E. urophylla* as previously reported by ZAUZA et al. (2004) in others clones of the same species. Genetic variability for resistance to *Ceratocystis* wilt has also been described in other species as *Mangifera indica* (RIBEIRO et al., 1984; RIBEIRO et al., 1986; RIBEIRO et al., 1995; ROSSETTO et al., 1997), *Coffea arabica* (CASTILLA, 1982) and *Crotalaria* spp. (RIBEIRO et al., 1977). Our results indicate that it is possible to select *Eucalyptus* spp. genotypes resistant to *Ceratocystis* wilt for planting.

In some pathosystems, the genetic basis of disease resistance formerly considered polygenic or unknown, proved to have a simple inheritance model when detailed studied (KINLOCH et al., 1970; NEWCOMBE et al., 1996; VILLAR et al., 1996; WILCOX et al., 1996; JUNGHANS et al., 2003). In the present work, the genetic parameters estimated allowed the following conclusions: (i) due to the high inheritability (50 and 59% in the narrow and broad sense, respectively) the degree of genetic control of the trait is high and probably controlled by a small number of genes, (ii) the allelic dominance of the trait is low, since the two values of heritability are very close. The determination coefficient of additive genetic resistance is therefore 50% and the determination degree of genetic dominance is only 9%. The strong additive genetic control and low dominance of the trait were confirmed by virtually nil heterosis (-3%), estimated when comparing the progeny performance with the mean performance of their parents.

The additive effect can be defined as a linear relationship between the genotypic values of individuals of a population and the number of favorable alleles they have (CRUZ and REGAZZI, 1997). The prevalence of additive effects

in the genetic control of Ceratocystis wilt resistance is therefore an indication of an easy identification of superior genotypes with a high concentration of favorable alleles, suitable for breeding. High narrow sense (65-77%) heritability values were also found by BORGES and BRUNE (1981) in the *E. grandis* x *Chrysoporthe cubensis* pathosystem.

The linear adjustment of the response found in the crosses involving the resistant parent G39 and several *E. urophylla* parents along with the high correlation coefficient of 81% between the progeny and parent performances confirmed the strong additive genetic control of the trait. This correlation estimate is strongly associated with inheritability in the narrow sense. The analysis of the other progenies showed that none was more susceptible than the susceptible control and that eight of them were more resistant than the resistant control, which is favorable for selection. In addition, the coefficients of phenotypic variation within families were also high (except cross G39 x U1450) indicating a great potential for selection within families as well.

In fact, the combination of the variability among and within progenies makes possible the selection of highly resistant plants. High genetic gains (up to 79%) can be obtained through selection of transgressive individuals in the F₁ generation as well as in the controlled crosses. It is worth highlighting that the controlled inoculation conditions are crucial for an efficient implementation of selection. Moreover, one should consider the possibility of genetic variability in the pathogen population and its interaction with differential host genotypes. A *C. fimbriata* isolate obtained from the areas chosen for commercial clone planting must therefore be used in resistance evaluations.

The evaluations carried out here were effective tools in the selection of superior parents for breeding programs as well as of promising hybrids; after evaluation of growth, adaptability, wood quality and resistance to other pathogens these may be indicated for planting at a commercial scale.

ACKNOWLEDGEMENTS

The National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) supported the first author in an undergraduate student research program and the last author with a research fellowship. The company Veracel SA for providing the parents and progenies as well as financial support for this work. The authors are indebted to David Evandro Fernandes and S ezar Augusto, who made possible the development of this study.

REFERENCES

- ALFENAS, A. C., E. A. V. ZAUZA, R. G. MAFIA, and T. F. ASSIS (2004): Clonagem e doenças do eucalipto. Editora UFV, Viçosa.
- BARNES, I., J. ROUX, B. D. WINGFIELD, M. O'NEILL and M. J. WINGFIELD (2003): *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. Australian Plant Pathology **32**: 361-366.
- BARNES, I. and J. ROUX (2003): *Ceratocystis pirilliformis*, a new species from *Eucalyptus nitens* in Australia. Micologia **95**: 865-871.
- BORGES, R. C. G. and A. BRUNE (1981): Estudo de herdabilidade quanto   resistência a *Diaporthe cubensis* Bruner em *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. Revista  rvore **5**: 115-120.
- CASTILLA, Z. J. (1982): Producción de una selección resistente a llaga macana *Ceratocystis fimbriata* (Ell. and Halst.) Hunt con relación a las variedades Tipica y Bordon. Cenicafe **33**: 53-66.
- COORS, J. G., S. PANDEY (1999): *The genetics and exploitation of heterosis in crops*. ASA / CSSA, Madison.
- COMSTOCK, R. E. (1996): *Quantitative genetics with special reference to plants and animal breedings*. Iowa State University Press, Ames.
- CRUZ, C. D. (1997): Programa Genes: Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. Editora UFV, Viçosa.
- CRUZ, C. D. and A. J. REGAZZI (1997): Modelos biom tricos aplicados ao melhoramento genético. Editora UFV, Viçosa.
- DUNLOP, R. W., M. D. V. RESENDE and S. L. BECK (2005): Early assessment of first year height data from five *Acacia mearnsii* (black wattle) sub-populations in South Africa using REML/BLUP. Silvae Genetica **54** (4-5): 166-174.

- FERREIRA, F. A., L. A. MAFFIA, R. W. BARRETO, N. L. DEMUNER and S. PIGATTO (2006): Sintomatologia da Murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. *Revista Árvore* **30**: 155-162.
- FERREIRA, F. A., A. M. DEMUNER, N. L. DEMUNER and S. PIGATTO (1999): Murcha-de-ceratocystis em eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* **24(S)**: 284.
- GALLAIS, A. (1989): *Théorie de la sélection en amélioration des plantes*: Ed. Masson, Paris.
- HALLAUER, A.R.; J.B. Miranda Filho (1988): Quantitative genetics in maize breeding. 2nd ed. Iowa State University Press, Ames.
- HARRINGTON, T. C., D. J. THORPE, V. L. A. MARINHO and E. L. FURTADO (2005): First report of black rot of *Colocasia esculenta* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* **30**: 88-89.
- JUNGHANS, D. T., A. C. ALFENAS, S. H. BROMMONSCHENKEL, S. ODA, E. J. MELLO and D. GRATTAPAGLIA (2003): Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major effect locus with RAPD markers. *Theoretical Applied Genetics* **108**: 175-180.
- KINLOCH, B. B., G. K. PARKS and C. W. FOWLER (1970): White pine blister rust: simply inherited resistance in sugar pine. *Science* **167**: 193-195.
- MARIN, M., B. CASTRO, A. GAITAN, O. PREISIG, B. D. WINGFIELD and M. J. WINGFIELD (2003): Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates from Colombian coffee-growing regions based on molecular data and pathogenicity. *Phytopathology* **151**: 395-405.
- NEWCOMBE, G., H. D. BRADSHAW, G. A. CHASTAGENER and R. F. STETTLER (1996): A major gene for resistance to *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae* in a hybrid poplar pedigree. *Phytopathology* **86**: 87-94.
- RESENDE, M. D. V. (2002): Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.
- RIBEIRO, I. J. A., C. J. ROSSETTO, L. C. DONADIO, J. C. SABINO, A. L. M. MARTINS and P. B. GALLO (1995): Mango wilt. XIV Selection of mango (*Mangifera indica* L.) rootstocks resistant to the mango wilt fungus *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. *Acta Horticulturae* **370**: 159-161.
- RIBEIRO, I. J. A. and M. F. ITO (1988): Gomose da acácia-negra causada por *Ceratocystis fimbriata*. *Bragantia* **47**: 71-74.
- RIBEIRO, I. J. A., C. J. ROSSETTO, J. C. SABINO and P. B. GALLO (1986): Seca da mangueira: VIII. Resistência de porta-enxertos de mangueira ao fungo *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. *Bragantia* **45**: 317-322.

- RIBEIRO, I.J.A., A. L. LOURENÇÃO, O. PARADELA FILHO and N.B. SOARES (1984): Seca da mangueira. VII. Resistência de cultivares de mangueira ao fungo *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. *Bragantia* **43**: 237-243.
- RIBEIRO, I. J. A., M. A. C. MIRANDA, E. A. BULISANI, L. D. A. ALMEIDA, L. A. C. LOVADINI, M. H. SUGIMORI and O. PARADELA FILHO (1977): Breeding *Crotalaria*. I. Self compatibility and resistance to wilt caused by *Ceratocystis fimbriata*. *Bragantia* **36**: 291-295.
- ROSSETTO, C. J., I. J. A. RIBEIRO, P. B. GALLO, N. B. SOARES, J. C. SABINO, A. L. M. MARTINS, N. BORTOLETTO and E. M. PAULO (1997): Mango breeding for resistance to diseases and pests. *Acta Horticulturae* **455**: 299-304.
- ROUX, J., M. VAN WYK, H. HATTING and M. J. WINGFIELD (2004) *Ceratocystis* species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. *Plant Pathology* **53**: 414–421.
- ROUX, J., T. A. COUTINHO, D. MUJUNI BYABASHAJA and M. J. WINGFIELD (2001): Diseases of plantation *Eucalyptus* in Uganda. *South African Journal of Science* **97**: 16-18.
- ROUX, J., M. J. WINGFIELD, B. D. WINGFIELD, J. P. BOUILLETT and A. C. ALFENAS (2000): A serious new disease of *Eucalyptus* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Central Africa. *Forest Pathology* **30**: 175–184.
- SANTOS, A. F. and F. A. FERREIRA (2003): Murcha-de-ceratocystis em acácia-negra no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* **28**: 325.
- VIEGAS, A. P. (1960): Seca da mangueira. *Bragantia* **19**: 163-182.
- VILLAR, M., F. LEFEVRE, H. D. BRADSHAW-Jr and E. T. DU-CROS (1996): Molecular genetics of rust resistance in poplars (*Melampsora larici-populina* Kleb/*Populus* sp.) by Bulk segregant analysis in a 2 X 2 factorial mating design. *Genetics* **143**: 531-536.
- WILCOX, P.L., H. V. AMERSON, E. G. KUHLMAN, B. LIU, D. M. O'MALLEY and R. R. SEDEROFF (1996): Detection of a major gene for resistance to fusiform rust disease in loblolly pine by genomic mapping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 3859-3864.
- ZAUZA, E. A. V., A. C. ALFENAS, T. C. HARRINGTON, E. S. MIZUBUTI and J. F. SILVA (2004): Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. *Plant Disease* **88**: 758-760.

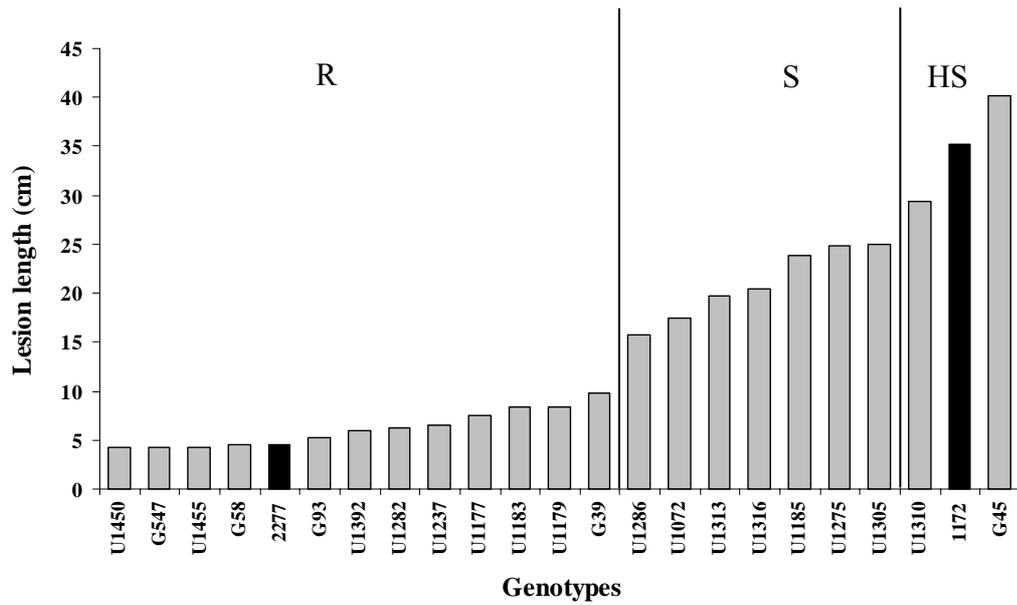


Figure 1. Mean lesion length on the wood of *Eucalyptus grandis* (G) and *E. urophylla* (U) genotypes and in control clones HRC2277 and HGU1172 (highlighted columns), evaluated for resistance to *Ceratocystis fimbriata*. The genotypes were grouped in three classes (R = resistant; S = susceptible and HS = highly susceptible) based on the Scott - Knott test ($P \leq 0.01$).

Table 1. Estimates of variance components and genetic parameters (heritability and coefficients of genetic variation) associated with *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* families, evaluated for resistance to *Ceratocystis fimbriata* based on the lesion length on the wood (cm)

Genetic parameters	Values
Genotypic variance among full sib families	43.7642
Genotypic variance among cloned parents	83.5509
Individual phenotypic variation for progenies	158.8642
Individual phenotypic variation for parents	139.6864
Narrow-sense individual heritability	0.50 ± 0.11
Broad-sense individual heritability	0.59 ± 0.22
Individual phenotypic variation within family	115.0958
Individual heritability within family	0.38
Heritability of family means	0.88
Accuracy of family selection	0.94
Coefficient of genotypic variation among progenies (CVg, in %)	39.33
Coefficient of residual variation (CVe, in %)	64.10
Coefficient of relative variation (CVg/CVe in %)	0.61

Table 2. Estimates of the genotypic values (GV or genotypic means) of the family, of the mean family heritability (MFH₂), phenotypic variation within each family (PVF), coefficient of phenotypic variation within each family (CPVF) and the phenotypic value (PV or phenotypic mean) of each family of *Eucalyptus grandis* (G) x *E. urophylla* (U), evaluated for resistance to *Ceratocystis fimbriata* based on the lesion length on the wood (cm)

Progeny*	No. of plants	Genetic parameters				
		PV	GV	MFH ₂	PVF	CPVF (%)
U1392 (R) x G82	23	2.34	3.19	0.87	0.52	30.82
U1274 x G91	19	2.47	3.46	0.85	4.51	85.98
U1185 (S) x G99	19	3.05	3.97	0.85	0.89	30.93
G47 x U1455 (R)	18	3.33	4.26	0.84	4.44	63.28
U1179 (R) x G547 (R)	19	3.51	4.37	0.85	3.70	54.80
U1185 (S) x G51	21	3.62	4.39	0.86	1.97	38.77
G39 (R) x U1450 (R)	23	4.02	4.69	0.87	0.31	13.85
U1185(S) x G47	20	4.34	5.06	0.85	5.18	52.44
Resistant control	10	-	4.50	-	-	-
G45 (HS) x U1450 (R)	24	4.67	5.25	0.87	9.12	64.67
U1310 (HS) x G51	20	5.20	5.82	0.85	30.22	105.72
U1237 (R) x G93 (R)	20	5.48	6.07	0.85	19.09	79.73
U1286 (S) x G99	24	7.85	8.12	0.87	26.51	65.59
U1310 (HS) x G58 (R)	19	8.37	8.63	0.85	186.44	163.13
G99 x U1316 (S)	20	8.80	9.00	0.85	86.91	105.94
U1179 (R) x G549	23	8.87	9.04	0.87	98.30	111.78
G39 (R) x U1183(R)	20	9.10	9.27	0.85	187.12	150.32
G45 (HS) x U1177 (R)	24	10.33	10.35	0.87	88.71	91.18
G39 (R) x U1034	19	10.55	10.55	0.85	93.41	91.61
G39 (R) x U1206	18	11.67	11.52	0.84	131.00	98.08
U1310 (HS) x G91	19	12.76	12.49	0.85	170.37	102.29
U1185 (S) x G83	20	13.13	12.82	0.85	82.02	68.98
G39 (R) x U1282 (R)	18	14.17	13.70	0.84	550.09	165.52
U1310 (HS) x G93 (R)	24	14.63	14.21	0.87	146.68	82.78
U1310 (HS) x G547 (R)	20	15.33	14.76	0.85	143.80	78.22
G39 (R) x U1313 (S)	20	15.55	14.96	0.85	99.10	64.02
U1286 (S) x G504	25	15.56	15.07	0.87	170.40	83.89
U1412 x G549	25	20.86	19.87	0.87	488.28	105.93
G39 (R) x U1275 (S)	19	21.11	19.81	0.85	191.32	65.52
G39 (R) x U1072 (S)	20	27.15	25.20	0.85	190.98	50.90
G39 (R) x U1305 (S)	19	27.47	25.39	0.85	283.29	61.27
Susceptible control	10	-	35.20	-	-	-

*Parents evaluated and classified as R = resistant; S = susceptible and HS = highly susceptible based on the grouping test of Scott and Knott (P≤0.01).

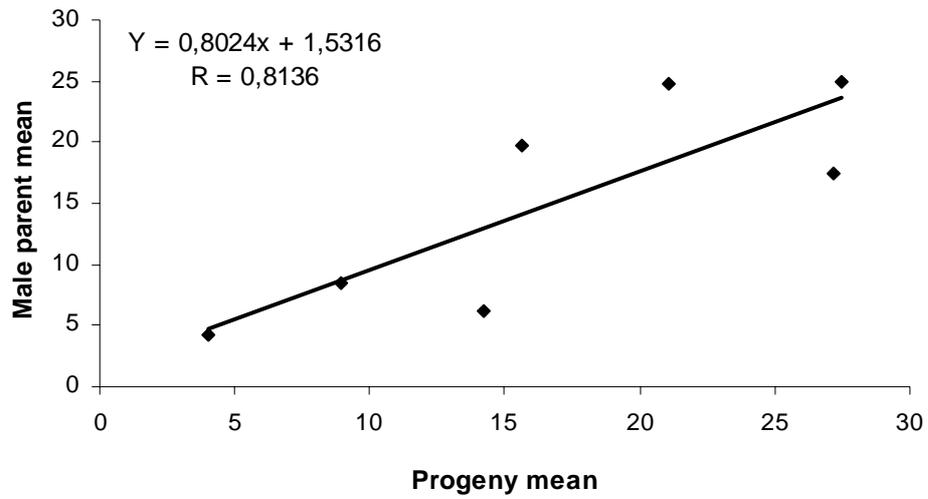


Figure 2. Regression of the lesion length on the xylem (cm), observed between the progenies and the different male parents of *Eucalyptus urophylla*, involved in the crosses with the female parent G39 of *E. grandis*.

Table 3. Estimates of genotypic values and genetic gains involving trees of families of *Eucalyptus grandis* (G) x *E. urophylla* (U), evaluated for resistance to *Ceratocystis fimbriata* based on the lesion length on the wood (cm)

Family	Plant	Phenotypic value	Genotypic value	Genotypic effect below the mean	Genetic gain (%)
U1274 x G91	1	1	2.16	-8.3457	-79.42
U1274 x G91	3	1	2.16	-8.3457	-79.42
U1274 x G91	5	1	2.16	-8.3457	-79.42
U1274 x G91	8	1	2.16	-8.3457	-79.42
U1274 x G91	9	1	2.16	-8.3457	-79.42
U1274 x G91	10	1	2.16	-8.3457	-79.42
U1274 x G91	14	1	2.16	-8.3457	-79.42
U1274 x G91	15	1	2.16	-8.3457	-79.42
U1274 x G91	18	1	2.16	-8.3457	-79.42
U1274 x G91	19	1	2.16	-8.3457	-79.42
U1392 x G82	3	1.5	2.30	-8.2119	-78.14
U1392 x G82	13	1.5	2.30	-8.2119	-78.14
U1274 x G91	7	1.5	2.43	-8.0822	-76.91
U1392 x G82	8	1.8	2.46	-8.0538	-76.64
U1392 x G82	1	2	2.56	-7.9484	-75.63
U1392 x G82	4	2	2.56	-7.9484	-75.63
U1392 x G82	6	2	2.56	-7.9484	-75.63
U1392 x G82	7	2	2.56	-7.9484	-75.63
U1392 x G82	12	2	2.56	-7.9484	-75.63
U1392 x G82	16	2	2.56	-7.9484	-75.63
U1392 x G82	17	2	2.56	-7.9484	-75.63
U1392 x G82	18	2	2.56	-7.9484	-75.63
U1392 x G82	19	2	2.56	-7.9484	-75.63
U1392 x G82	21	2	2.56	-7.9484	-75.63
U1392 x G82	5	2.5	2.82	-7.6849	-73.13
U1392 x G82	9	2.5	2.82	-7.6849	-73.13
U1392 x G82	10	2.5	2.82	-7.6849	-73.13
U1392 x G82	11	2.5	2.82	-7.6849	-73.13
U1392 x G82	22	2.5	2.82	-7.6849	-73.13
U1392 x G82	23	2.5	2.82	-7.6849	-73.13
U1185 x G51	16	1.5	2.87	-7.6407	-72.71
U1185 x G99	3	2	2.93	-7.5784	-72.11
U1185 x G99	10	2	2.93	-7.5784	-72.11
U1185 x G99	17	2	2.93	-7.5784	-72.11
U1274 x G91	2	2.5	2.95	-7.5552	-71.89
G47 x U1455	3	2	3.07	-7.4418	-70.81
G47 x U1455	6	2	3.07	-7.4418	-70.81
G47 x U1455	8	2	3.07	-7.4418	-70.81
G47 x U1455	9	2	3.07	-7.4418	-70.81
G47 x U1455	11	2	3.07	-7.4418	-70.81
G47 x U1455	14	2	3.07	-7.4418	-70.81

Family	Plant	Phenotypic value	Genotypic vaue	Genotypic effect below the mean	Genetic gain (%)
U1392 x G82	2	3	3.09	-7.4214	-70.62
U1392 x G82	14	3	3.09	-7.4214	-70.62
U1392 x G82	20	3	3.09	-7.4214	-70.62
U1179 x G547	1	2	3.12	-7.3884	-70.31
U1179 x G547	9	2	3.12	-7.3884	-70.31
U1179 x G547	14	2	3.12	-7.3884	-70.31
U1179 x G547	17	2	3.12	-7.3884	-70.31
U1179 x G547	19	2	3.12	-7.3884	-70.31
U1185 x G51	20	2	3.13	-7.3772	-70.20
Overall gain	-	-	-	-7.82	-74.37

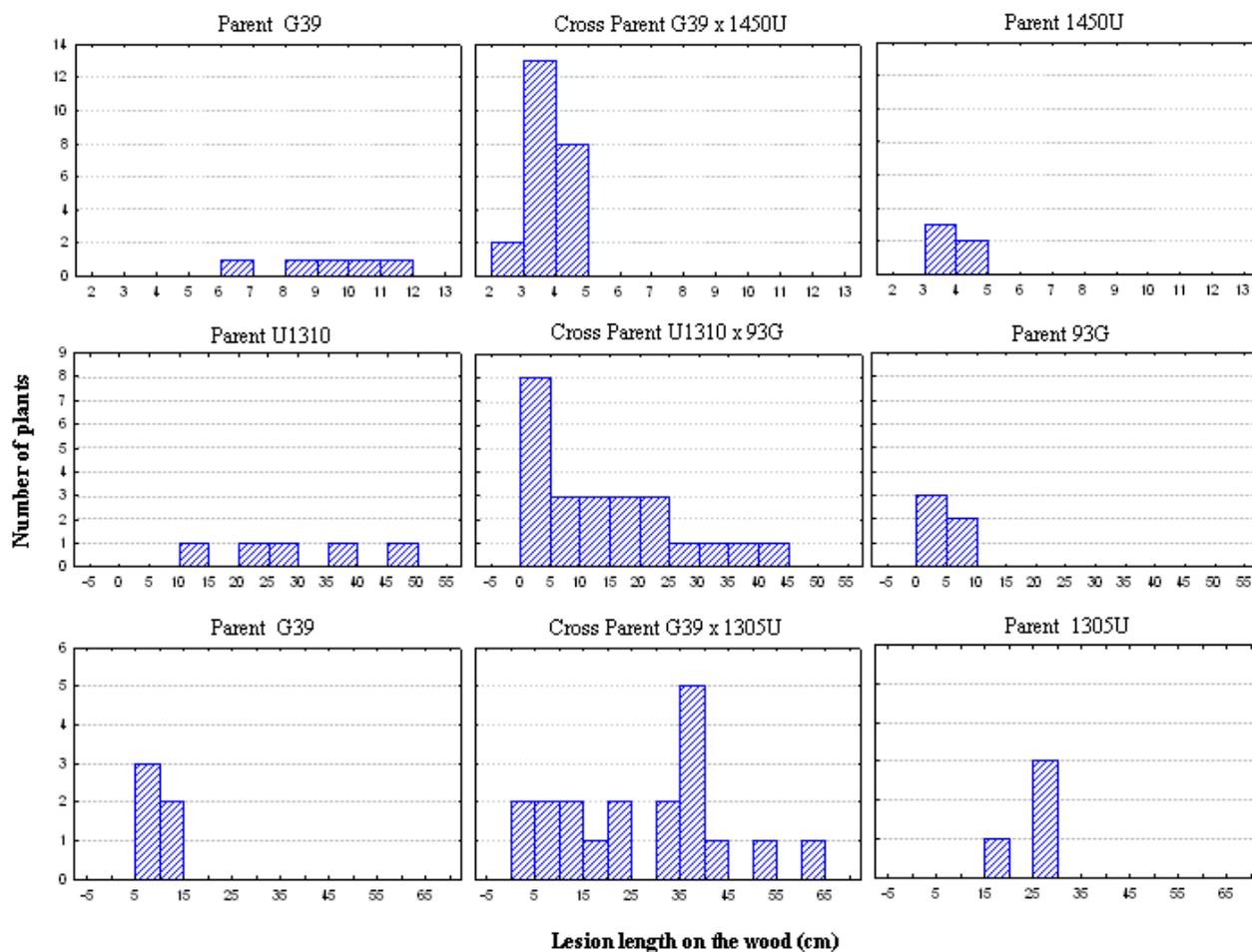


Figure 3. Frequency distribution based on the lesion length on the wood of parents and three progenies of *Eucalyptus grandis* (G) x *E. urophylla* (U) evaluated for resistance to *Ceratocystis* wilt, caused by *Ceratocystis fimbriata*. Different intermediate resistance levels and transgressive segregations were observed in the F₁ population.

MAPEAMENTO GENÉTICO DE QTLs PARA RESISTÊNCIA À MURCHA-DE-CERATOCYSTIS (*Ceratocystis fimbriata*) EM CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS DE *Eucalyptus* spp.

RESUMO

Atualmente, a murcha-de-ceratocystis (*Ceratocystis fimbriata*) é uma das principais enfermidades em plantios comerciais de eucalipto no Brasil. Os principais sintomas causados pela doença são murcha, cancro e escurecimento radial do lenho. O plantio de genótipos de eucalipto resistentes tem sido empregado como a melhor alternativa de controle. No entanto pouco se sabe sobre o controle genético da resistência, cujo conhecimento poderá facilitar a seleção de materiais superiores para plantio. Assim, o presente trabalho objetivou mapear QTLs envolvidos na resistência à murcha-de-ceratocystis em uma progênie derivada do cruzamento interespecífico entre (*E. dunnii* x *E. grandis*)x(*E. urophylla* x *E. globulus*). Foram avaliados 127 indivíduos em delineamento inteiramente casualizado com cinco réplicas por indivíduo. As inoculações foram realizadas em condições controladas com um isolado monospórico de *C. fimbriata* (SBS-1). A resposta da resistência nos indivíduos da progênie seguiu uma variação contínua possibilitando analisar a característica de forma quantitativa. A progênie foi genotipada com 114 marcadores microssatélites, sendo que 89 foram completamente informativos, seis informativos apenas no parental masculino e 19 apenas no parental feminino. Dentre os marcadores analisados, 21,8% apresentaram distorção de segregação (DS) nas proporções genotípicas esperadas, segundo a primeira Lei de Mendel. Verificou-se que as distorções gaméticas ocorriam, em maior porcentagem, no parental masculino em relação ao feminino, sugerindo que a DS encontrada seja devido a causas genéticas. Do total dos marcadores, 110 foram mapeados em 15 grupos de ligação (GL), cujos comprimentos variaram de 12,3 a 191,5 cM. O mapa genético apresentou saturação satisfatória, com comprimento total de 1352,01 cM e intervalo

médio de 12,29 cM. Pela análise de marca simples verificou-se que quatro marcadores, localizados nos GL 3, 5, 8 e 10, apresentavam efeito significativo quanto à ligação a QTL de resistência (Teste F; $P \leq 0,05$). Pelo método de Fulker & Cardon confirmaram-se os quatro QTLs encontrados, além de identificar mais um no GL 1, cujas herdabilidades variaram de 9,6 a 34,2.

Palavras chaves: Mapeamento genético, detecção de QTL, *Eucalyptus*, populações exogâmicas, Regressão Fulker & Cardon, distorção de segregação.

INTRODUÇÃO

Espécies de *Eucalyptus* constituem a principal base florestal de alta produtividade no Brasil em virtude de sua alta adaptabilidade em diferentes condições edafoclimáticas, crescimento rápido, alta capacidade de rebrota, produção de madeira para diferentes fins (carvão, celulose, papel, postes, moirões, chapas de fibras, etc) (Alfenas et al., 2004). Para suprir a falta de madeira no mercado interno e externo, têm aumentado significativamente as plantações de eucalipto no país. Entretanto, paralelamente à expansão das áreas plantadas e os ciclos sucessivos da cultura numa mesma área de plantio, várias epidemias de grande impacto econômico têm surgido nessas regiões, cujos agentes etiológicos encontravam-se endemicamente presentes ou foram acidentalmente introduzidos (Alfenas & Guimarães, 2007). Dentre essas, a murcha causada por *Ceratocystis fimbriata* Ellis e Halsted, é atualmente, uma das principais doenças na eucaliptocultura.

Ceratocystis fimbriata é um patógeno tipicamente de xilema cujo sintoma marcador é constatável nas secções transversais de órgãos lenhosos, na forma de estrias radiais escuras. O patógeno penetra na planta por ferimentos recentes no tronco e nas raízes, atingindo o lenho via parênquima medular levando à murcha, ao secamento e à morte da planta (Ferreira et al., 2006). Além do eucalipto, esse fungo afeta espécies lenhosas de importância econômica, como mangueira, plátano, gmelina, cafeeiro, seringueira, espatódea, fícus e acácia (Baker et al., 2003).

A existência de variabilidade genética inter e intraespecífica para resistência à murcha-de-ceratocystis (Zauza et al., 2004) faz do plantio de genótipos resistentes a melhor estratégia de controle da doença (Alfenas et al., 2004). Entretanto, a seleção de plantas resistentes é laboriosa e demorada. Assim, o mapeamento de QTLs (*Quantitative trait locus*) que conferem resistência pode ser uma ferramenta potencialmente útil para a seleção assistida por marcadores (SAM). Uma vez detectadas marcas ligadas aos QTLs, que conferem resistência, estas podem ser usadas para seleção precoce de genótipos resistentes, assim como guias para clonagem de genes de resistência visando à sua incorporação em genótipos suscetíveis.

Além da possibilidade de implementação da SAM, a incorporação de ferramentas e abordagens genômicas nos programas de melhoramento florestal tem aberto perspectivas para a compreensão das relações complexas entre variabilidade genética e diversidade fenotípica relevantes no processo produtivo. Contudo, são escassos os estudos sobre mapeamento de QTL relacionados à resistência a doenças em eucalipto, restringindo-se aos patossistemas *Eucalyptus* x *Puccinia psidii* (Junghans et al., 2003) e a *E. globulus* x *Teratosphaeria nubilosa* (Freeman et al., 2008), não sendo relatado, até o momento, estudos que visam à detecção e ao mapeamento de QTL que conferem resistência à murcha-de-ceratocystis. Deste modo, no presente trabalho objetivou-se construir um mapa genético, detectar e quantificar os efeitos de QTLs para resistência à murcha-de-ceratocystis utilizando marcadores microssatélites em uma família de irmãos completos obtida através do cruzamento interespecífico duplo híbrido contendo as espécies *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. globulus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Utilizou-se uma família, denominada DGxUGL, selecionada no âmbito do Projeto Genolyptus (Grattapaglia, 2003) e desenvolvida a partir de um cruzamento de duplo híbrido: [*E. dunnii* (D) x *E. grandis* (G)] x [*E. urophylla* (U) x *E. globulus* (GL)]. Foram obtidos 346 indivíduos da família, sendo amostrados aleatoriamente 127 para fenotipagem, os quais foram clonados a fim de possibilitar a inoculação de cinco réplicas por indivíduo. As mudas clonais com 90 dias de idade foram

transplantadas para vasos de 2 L de capacidade contendo uma mistura de solo: areia: esterco (3:1:1) e mantidas em condições de casa de vegetação, sendo adubadas uma vez por semana com 100 mL de Ouro Verde® (15-15-20 NPK) a 7,5 g L⁻¹ até 60 dias após o transplante, quando atingiram o estágio de desenvolvimento adequado para a inoculação.

Inoculação e avaliação

Utilizou-se uma cultura monospórica SBS-1 de *C. fimbriata*, isolada de plantas de um clone híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* com sintomas de murcha, na região de Teixeira de Freitas, BA. A produção do inóculo e inoculação foi realizada como previamente descrito (Zauza et al., 2004). Para o preparo do inóculo (conídios + ascósporos), adicionou-se água destilada esterilizada às placas e, após raspagem da superfície da colônia com alça de Drigalski, filtrou-se a suspensão em camada dupla de gaze e ajustou-se a concentração para 2,5 x 10⁶ esporos mL⁻¹. Com o auxílio de um bisturi, foi feito um corte superficial longitudinal de, aproximadamente, 2 cm de comprimento, no caule das plantas, onde se depositou 0,5 mL da suspensão de inóculo. Em seguida, o ferimento foi coberto com filme de PVC. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação. Cinco plantas do clone HGU1172 (híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*) foram utilizadas como comparador suscetível. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por uma réplica clonal. Aos 60 dias após a inoculação, avaliaram-se a altura das plantas e o comprimento da lesão no lenho. A partir desses dados, calculou-se severidade da doença, dividindo o comprimento da lesão pela altura da planta e multiplicando por 100. Para a análise de QTL foi utilizado somente os dados de média de severidade individual.

Amplificação dos locos microssatélites

O DNA dos parentais e dos 346 genótipos da família DGxUGL foi extraído segundo o protocolo proposto por Grattapaglia & Sederoff (1994) e, a seguir, foi ressuspensão em 50 µL de água MiliQ autoclavada, quantificado e a concentração ajustada para 1 ng/µL. As amplificações via PCRs dos locos microssatélites foram conduzidos em sistemas de multiplex contendo seis locos por sistema. Os locos foram selecionados pelo tamanho esperado, baseado em informações de mapas

anteriores e pela fluorescência com a qual foram marcados (FAM, HEX, NED). Cada reação de PCR foi conduzida utilizando o Kit Multiplex PCR (Qiagen®) e continha: 2,5 µL de *PCR Master Mix*; 0,5 µL de *Q-Solution*; 0,1 µL de uma solução contendo os *primers* direto e reverso juntos a 10 µM; 0,4 µL de *RNase-free water* e 1,0 µL de DNA (2 ng/µL) para um volume final de 5 µL. A PCR foi realizada utilizando um programa que apresenta uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 15 min, seguidos de 35 ciclos envolvendo uma etapa inicial de desnaturação (95 °C por 30 seg), uma de anelamento dos primers (57 °C por 90 seg) e uma de extensão (72°C por 1 min), finalizando com uma etapa única de extensão final a 72 °C por 30 min. O produto da PCR foi diretamente submetido à eletroforese capilar.

Geração dos dados genotípicos

Após a reação de PCR, 1 µL da reação foi adicionada a 8 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e 1 µL do padrão de tamanho em pares de base marcado com fluorescência ROX (Brondani & Grattapaglia, 2001). O DNA das amostras foi desnaturado (95 °C por 5 min) e colocado imediatamente no gelo. Posteriormente, a reação foi submetida à eletroforese capilar em seqüenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo padrão utilizado no laboratório para detecção dos fragmentos. Os programas GenScan e Genotyper, ambos da Applied Biosystems, foram utilizados para analisar os dados brutos gerados (eletroferogramas). Os dois programas permitem a obtenção das planilhas com tamanho estimado dos alelos a cada loco. Essas planilhas foram submetidas, posteriormente, ao programa Allelobin (Indury & Cardon, 1997), para que o valor em pares de base de cada alelo fosse arredondado, levando-se em consideração o motivo de repetição de cada loco.

Mapeamento Genético

Efetuuou-se a verificação das pressuposições de segregação mendeliana da segregação dos marcadores por meio do teste de qui-quadrado (χ^2), a 20% de probabilidade para todo o genoma (“experiment wise”) utilizando, para estabelecimento do nível crítico do teste individual, a proteção de Bonferroni a partir dos múltiplos testes. Os locos foram mapeados integrando as informações das meioses de ambos os genitores. O mapa integrado foi construído com o auxílio do

programa QMOL (Cruz, 2008, <http://www.ufv.br/dbg>). A máxima frequência de recombinação de 30 % e o valor mínimo de LOD score (logaritmo da razão de verossimilhança) de 3,0 foram os parâmetros utilizados para determinar a ligação entre marcadores. As distâncias entre marcadores, em cM, foram calculadas por meio da função de mapeamento de Haldane.

Deteção de QTLs

Nos mapas previamente construídos foram realizadas buscas por QTLs por meio dos seguintes métodos:

- *Marca Simples (ANOVA e Contraste entre Médias)*

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para verificar a existência de diferença significativa em relação às médias dos indivíduos na descendência, agrupados segundo as classes genótípicas do marcador. Na deteção de QTLs por meio da ANOVA foi empregado o seguinte modelo linear simples com apenas um fator para decompor a variação entre e dentro das classes genótípicas dos marcadores:

$$y_{ij} = \mu + M_i + \varepsilon_{ij}$$

em que,

y_{ij} : valor da característica no j -ésimo indivíduo ($j=1,2,\dots,n_i$) portador do i -ésimo genótipo do marcador ($i=1,2,3,4$ – para famílias completamente informativas);

μ : média da população;

M_i : efeito do i -ésimo alelo do marcador;

ε_{ij} : erro aleatório $\sim N(0, \sigma^2)$.

O contraste entre médias, baseado na estatística t, foi utilizado para avaliar a existência de diferença significativa entre médias de indivíduos portadores de alelos específicos. Para tanto, foram considerados os diferentes tipos de configuração e de informatividade, de cada loco marcador para formação dos contrastes. Dessa forma, a descendência do cruzamento, irmãos completos, entre os genitores DG e UGL gerou diferentes configurações de médias associados a diferentes probabilidades condicionais $P(Q_j|M_i)$. As médias esperadas de cada classe de marcador foram obtidas multiplicando-se o valor genotípico médio do QTL pela sua probabilidade condicional, somando-se todas as ocorrências dentro de cada classe genotípica, para

cada loco marcador analisado. Para verificar a ligação entre o QTL (Q) e cada marcador (A) as médias dos indivíduos com os diferentes alelos para cada loco marcador foram agrupadas de modo a formar um grupo de médias de alelos para o genitor feminino (μ_1 e μ_2) e para o genitor masculino (μ_3 e μ_4) e dessa forma, estabelecer o contraste entre alelos de um dado genitor.

Tomando como exemplo uma população totalmente informativa para loco marcador e para o QTL, o seguinte contraste pode ser estabelecido, para o genitor 1:

$$\delta = \mu_1 - \mu_2 = (1 - 2r) \left(\frac{\mu_{Q1Q3} + \mu_{Q1Q4}}{2} - \frac{\mu_{Q2Q3} + \mu_{Q2Q4}}{2} \right)$$

Os valores estimados dos contrastes foram obtidos a partir dos seguintes estimadores:

$\hat{\mu}_1 = \hat{\mu}_{A1}$: correspondente à média da característica quantitativa dos indivíduos portadores do alelo A₁ do genitor 1.

$\hat{\mu}_2 = \hat{\mu}_{A2}$: correspondente à média da característica quantitativa dos indivíduos portadores do alelo A₂ do genitor 1.

Assim, o contraste estimado é obtido por:

$$\hat{\delta} = \hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2$$

As médias dos genótipos relativos ao loco Q foram expressas em função dos efeitos aditivos (α_i) e devido à dominância ($\delta_{ii'}$), como se segue:

$$\delta = (1 - 2r) \left[(\alpha_1 - \alpha_2) + \frac{\delta_{13} + \delta_{14}}{2} - \frac{\delta_{23} + \delta_{24}}{2} \right]$$

Para avaliar $H_o : \delta = 0$ utilizou-se a estatística t definida pela expressão:

$$t = \frac{\hat{\delta}}{\sqrt{\hat{V}(\hat{\delta})}} = \frac{\hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2}{\sqrt{\hat{V}(\hat{\mu}_1) + \hat{V}(\hat{\mu}_2)}} \text{ associada a } n_1 + n_2 - 2 \text{ graus de liberdade}$$

sendo:

n_1 : número de indivíduos da FIC que apresentam alelo A₁;

n_2 : número de indivíduos da FIC que apresentam alelo A₂.

De forma análoga foi avaliado o contraste considerando as informações do genitor 2, dado por:

$$\delta = \mu_3 - \mu_4 = (1 - 2r) \left(\frac{\mu_{Q1Q3} + \mu_{Q2Q3}}{2} - \frac{\mu_{Q1Q4} + \mu_{Q2Q4}}{2} \right)$$

A avaliação de detecção de QTL utilizando os métodos de marcas simples foi realizado por meio do aplicativo computacional GQMOL (Cruz, 2008) desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa e disponível em <http://www.ufv.br/dbg>.

- *Intervalo Simples – Regressão de Fulker & Cardon (1994)*

Para utilizar este método, a proporção IBD (alelos idênticos por ascendência) de marcas adjacentes em um grupo de ligação foi usada para estimar a proporção de alelos IBD de um possível QTL ao longo do intervalo entre as marcas. A posição que confere um melhor ajuste da regressão foi tomada como a posição estimada do QTL no grupo de ligação. Assim, foi possível obter estimativas do efeito do QTL sobre a variância genética aditiva e de sua posição separadamente (Cruz et al., 2009). Essa metodologia fundamenta-se nas estimativas de IBD de dois marcadores ligados M_1 e M_2 a r_{12} centimorgans, denotadas $\hat{\pi}_{1j}$ e $\hat{\pi}_{2j}$, para estimar os valores da taxa de alelos IBD entre os pares de irmãos para o loco Q, definido por π_{qj} . A estimação de π_{qj} é feita por meio da equação de regressão:

$$\hat{\pi}_{qj} = \beta_0 + \beta_{\pi_1} \hat{\pi}_{1j} + \beta_{\pi_2} \hat{\pi}_{2j} + \varepsilon_j$$

A solução para o sistema é dada por:

$$\hat{\beta}_{\pi_1} = \frac{(1 - 2r_1)^2 - (1 - 2r_{12})^2 (1 - 2r_2)^2}{1 - (1 - 2r_{12})^4}$$

$$\hat{\beta}_{\pi_2} = \frac{(1 - 2r_2)^2 - (1 - 2r_{12})^2 (1 - 2r_1)^2}{1 - (1 - 2r_{12})^4} e$$

$$\hat{\beta}_0 = \bar{\pi}_q - \hat{\beta}_{\pi_1} \bar{\pi}_1 - \hat{\beta}_{\pi_2} \bar{\pi}_2 = (1 - \hat{\beta}_{\pi_1} - \hat{\beta}_{\pi_2}) / 2$$

Após obtida a estimativa de $\hat{\pi}_{qj}$ para uma determinada posição do loco Q, este valor é utilizado como variável independente no modelo de regressão $Y_j = \beta_0 + \beta_q \pi_{qj}$. Neste modelo Y_j representa o quadrado da diferença fenotípica entre dois irmãos. Ressalta-se que, para uma determinada posição entre M_1 e M_2 ,

devem ser obtidas estimativas de $\hat{\pi}_{qj}$ para C_n^2 combinações de pares de irmãos. Dessa forma, é possível realizar a regressão com base nos valores de Y_j e $\hat{\pi}_{qj}$ estimados para cada par de irmãos.

Para cada valor de r_1 e r_2 , assumido dentro do intervalo r_{12} para a posição de Q, será obtida uma estimativa de $\hat{\beta}_q$ com base no modelo $Y_j = \beta_0 + \beta_q \pi_{qj}$. Se este intervalo é dividido k vezes, haverá k conjuntos de estimativas de $\hat{\beta}_q$. Desse modo é possível realizar k regressões, permitindo escolher a equação dentro do intervalo que apresente a menor soma de quadrados residuais ou com maior ajuste R^2 . Nessa posição a estimativa de $\hat{\beta}_q$, que corresponde ao critério ótimo de escolha da equação de regressão, permite determinar a posição do QTL e o valor da contribuição dada pelo QTL para a variância aditiva σ_A^2 do caráter, estimada por $-\frac{\beta_q}{2}$.

A herdabilidade do QTL foi estimada pela expressão: $h^2 = \frac{\hat{\sigma}_A^2}{2\hat{\sigma}_F^2}$, sendo $\hat{\sigma}_F^2$

a variância fenotípica e $\hat{\sigma}_A^2$ a variância aditiva da característica estudada. A avaliação de detecção de QTL utilizando a metodologia de regressão de Fulker & Cardon (1994) foi realizada por meio do aplicativo computacional GQMOL (Cruz, 2008, <http://www.ufv.br/dbg>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A família DGxUGL apresentou uma média de severidade de 12,26%, com a média de severidade máxima e mínima por genótipo iguais a 44,5 e 4%, respectivamente. O comparador suscetível (clone HGU1172) apresentou média de severidade de 47%, pouco acima da máxima encontrada pelas plantas da família DGxUGL, o que indica que as condições foram favoráveis à infecção. A severidade mínima encontrada (4%) em algumas plantas equivale à lesão causada como resposta ao ferimento realizado no ato de inoculação. As plantas com severidade média acima de 4% exibiram sintomas típicos causados por *C. fimbriata*, como lesão

escura no sentido longitudinal do lenho e, em algumas plantas com severidades maiores foram observados também murcha apical progredindo para murcha generalizada da planta. A variação de resposta quanto à resistência à murcha-deceratocystis na família DGxUGL foi contínua, não havendo uma clara separação entre plantas resistentes e suscetíveis, sugerindo que a resistência possa ser analisada como uma característica quantitativa (Figura 1).

Foram genotipados 114 marcadores microssatélites, sendo que 89 foram completamente informativos (segregação 1:1:1:1), seis informativos apenas no genitor masculino UGL (segregação 1:1) e 19 apenas no genitor feminino DG (segregação 1:1). Constatou-se, por meio da estatística χ^2 , que 24 dos 110 marcadores avaliados (21,8%) apresentaram distorção de segregação (DS) nas proporções genotípicas esperadas, segundo a primeira Lei de Mendel. Desses, nove apresentaram distorção gamética para os dois parentais e, ou para o parental no qual era informativo. Os outros 15 apresentaram distorção gamética apenas para um dos parentais, sendo dois marcadores com distorção nos gametas provenientes do parental feminino e 13 do masculino (Tabela 1). O teste de segregação gamética nos marcadores com DS evidencia que essa ocorre, em maior porcentagem, no parental masculino em relação ao feminino (86,6 e 13,4%, respectivamente), quando se considera apenas os marcadores totalmente informativos (Tabela 1). Esse resultado sugere que a DS encontrada seja devido a causas genéticas.

Segundo Ky et al. (2000) os híbridos interespecíficos, como no caso deste estudo, possuem taxa de DS mais elevada em comparação aos intraespecíficos, devido a possíveis problemas de pareamento dos cromossomos homólogos das espécies durante a meiose no híbrido. De fato, o número de marcadores com DS, observado em trabalhos de construção de mapas genéticos para espécies de *Eucalyptus*, são mais elevados para cruzamentos interespecíficos (Marques et al., 1998; Myburg et al., 2003) em relação aos cruzamentos intraespecíficos (Byrne et al., 1995; Thamarus et al., 2002). As proporções de marcadores com DS estimada neste trabalho, 21,8%, com marcadores microssatélites, foram superiores às relatadas para no mapeamento de híbridos *E. grandis* x *E. urophylla* (Rocha et al., 2007; Campinhos, 2005 e Verhaegen & Plomion, 1996). Uma possível explicação para o maior número de marcadores com DS neste trabalho se deve ao fato de se ter

utilizado um duplo híbrido com quatro espécies distintas (*E. dunnii*, *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. globulus*) aumentando a chance de ocorrer problemas de pareamento dos cromossomos durante a meiose. Para confecção do mapa genético optou-se por deixar os marcadores que apresentaram DS destacando-os no mapa com asterisco. Já os QTLs ligados a esses marcadores foram desconsiderados. Foram mapeados 110 marcadores, possibilitando a confecção do mapa genético, sendo obtidos 15 grupos de ligação (GL), cujos comprimentos variaram de 12,3 a 191,5 cM (Figura 2). A maior distância entre dois marcadores ("gap") foi de 43,14 cM e ocorreu entre o Embra53 e o Embra696 em uma das extremidades do GL8. Este valor, transformado em unidades de mapeamento pela função de Haldane, corresponde a 28,9 cM e, portanto, valor abaixo do limite máximo do critério utilizado para declarar dois marcadores ligados, 30 cM. O comprimento total do mapa foi de 1352,01 cM, com intervalo médio de 12,29 cM entre marcadores.

Para o mapa gerado neste estudo empregou-se uma análise conjunta, em que tanto a informação de marcadores completamente informativos quanto a de marcadores não completamente informativos foram utilizados na análise, gerando um único mapa para os dois genitores. Segundo Cruz et al. (2009) quando são gerados mapas genéticos separados para cada genitor os marcadores não completamente informativos são excluídos da análise, diminuindo a acurácia e a saturação dos grupos de ligações. O comprimento total do mapa gerado pela análise conjunta (1352,01 cM) para a família DGxUGL foi semelhante aos mapas gerados por Faria (2008) para essa mesma família. Esta autora gerou dois mapas genéticos, utilizando a metodologia de pseudo-cruzamento teste, de tamanho iguais a 1225,1 e 1522,5 cM, para os genitores feminino (DG) e masculino (UGL), respectivamente. Novaes (2006) obteve comprimento total de mapa igual a 950,8 cM. em famílias de irmãos-completos proveniente de um cruzamento entre *E. grandis* x *E. urophylla*. Essas diferenças entre comprimentos totais dos mapas são aceitáveis, uma vez que, a família utilizada por Novaes (2006) é diferente da utilizada neste trabalho.

A ocorrência de quatro grupos de ligação adicionais em relação ao número haplóide de cromossomos de *Eucalyptus* spp. e em relação ao mapa referência de *Eucalyptus* desenvolvido por Brondani et al. (2006) pode ser atribuída à ausência de

marcadores para unir todos os locos microssatélites componentes desses grupos. No entanto, isso não prejudicou a fidelidade do mapa gerado nesse estudo, uma vez que a ordem dos marcadores foi mantida em relação ao mapa referência para a espécie (Brondani et al., 2006). Ademais, a acurácia do mapeamento pode ser considerada satisfatória, tendo em vista o tamanho e o tipo de população estudada. Apesar de existirem outros mapas genéticos em eucalipto, as informações adicionais geradas nesse estudo, utilizando outro tipo de população serão importantes para o estabelecimento de mapas consensos para essa espécie. Adicionalmente, novos marcadores poderão ser integrados a mapas anteriores, permitindo maior saturação e entendimento do genoma de *Eucalyptus*.

Pela análise de variância verificou-se que quatro marcadores (Eg98, Embra22, Embra388 e Embra674) tiveram efeito significativo, pelo teste F ($P \leq 0,05$), quanto à ligação a QTLs de resistência à murcha-de-ceratocystis no cruzamento analisado. Desses marcadores, de acordo com as análises pelo método de contraste entre média, dois (Eg98 e Embra388) apresentaram associação significativa apenas no parental feminino (DG) e dois (Embra22 e Embra674) apenas no genitor masculino (UGL) (Tabela 2). Esses resultados sugerem que os dois parentais (DG e UGL) contribuem com alelos para resistência à murcha-de-ceratocystis. Entretanto, devido a impossibilidade de clonagem, não se inocularam os parentais, o que poderia confirmar essa hipótese.

A metodologia de marca simples (ANOVA) permitiu a identificação de marcadores associados a QTLs responsáveis pela resistência à murcha-de-ceratocystis, porém foi possível identificar qual dos genitores possuem alelos favoráveis à manifestação do caráter. Dessa forma, a estratégia adicional de análise de QTLs por contraste de médias foi necessária visando identificar a influência dos alelos de cada genitor sobre a resistência. O mapeamento baseado em marca simples permitiu estimar a associação entre um determinado marcador e o QTL, mas não foi possível determinar a posição do QTL em relação ao marcador testado e nem o seu efeito. Isto significa que não é possível determinar se a ligação detectada entre o QTL e o marcador deve-se a um QTL de grande efeito localizado longe do marcador, ou devido a um QTL de pequeno efeito, mas muito próximo ao loco marcador. Apesar do confundimento entre efeito e posição, a metodologia de

mapeamento por marca simples, por não necessitar da informação prévia de ordenamento das marcas ao longo dos grupos de ligação, foi útil como uma primeira análise exploratória, fornecendo informações importantes, tais como, a detecção, as médias de cada classe genotípica e alélica, além de evidenciar a distorção de segregação dos marcadores pela informação do número de indivíduos associados a cada classe de marcadores.

O método de Fulker & Cardon, além de permitir a identificação do efeito do QTL sobre variância aditiva também possibilitou identificar a posição do QTL nos grupos de ligação (Tabela 3 e Figura 3). Por meio deste método, confirmou-se a existência dos quatro QTLs identificados pelo método de marca simples, além de identificar mais um QTL no GL1, associado ao marcador En6.

No GL 1, o QTL foi encontrado entre os marcadores En06 e Embra11, a 0,09 cM do marcador En06, com herdabilidade (h^2) de 11,4% e variância aditiva ($\hat{\sigma}_A^2$) de 14,7. O efeito do alelo A1A2 do genitor feminino, para este loco foi de 1,84 e para o alelo A3A4 do genitor masculino, 0,09. Ou seja, este alelo contribui em média para aumento da lesão em 1,84 e 0,09 cm, dependendo do genitor. No GL 3, o QTL foi encontrado entre os marcadores Embra1656 e Eg98, sendo este o QTL com o valor de LR mais elevado (LR=62,0), tendo também o maior valor de h^2 , 34,2%, e de variância aditiva, 44,2. O efeito do alelo B1B2 do genitor feminino para este loco foi de -4,53. Ou seja, este alelo contribui em média com a redução da lesão em 4,53 cm. O QTL encontrado no GL 5, localiza-se entre os marcadores Embra388 e Embra41, a 0,04 cM do Embra388, com h^2 de 15,8% e variância aditiva de 20,5. O efeito do alelo C1C2 do genitor feminino, para este loco, foi de 3,89 e para o alelo C3C4, do genitor masculino, de 0,12. O QTL encontrado no GL 8 está entre os marcadores Embra674 e Embra203, a 0,11 cM do Embra674, com h^2 de 9,6% e variância aditiva de 12,4. O efeito do alelo D2D1 do genitor masculino, para este loco, foi de -3,19. Por fim, o QTL no GL 10 foi encontrado entre os marcadores Embra22 e Embra127, a 0,01 cM do Embra22, com h^2 de 11,2% e variância aditiva de 14,6. O efeito do alelo E1E2 do genitor feminino, para este loco, foi de -1,42 e para o alelo E3E4, do genitor masculino, de -4,37.

A metodologia de regressão de Fulker & Cardon (1994) possibilitou a detecção e localização precisa dos cinco QTL para resistência à murcha-de-

ceratocystis. Outros trabalhos empregaram essa metodologia em diferentes estudos. Novaes (2006) comparou a estratégia de regressão de Fulker & Cardon com a estratégia de pseudo-cruzamento teste para quatro caracteres de importância em *Eucalyptus*. De acordo com esse estudo, os QTLs de maior significância foram identificados de forma precisa com as duas estratégias, sendo que alguns QTLs identificados pela estratégia de Fulker & Cardon só puderam ser localizados pela estratégia de pseudo-cruzamento teste com a inclusão de co-fatores no mapeamento. Recentes trabalhos têm utilizado essa metodologia com sucesso na detecção de QTLs de resistência à ferrugem do eucalipto (Alves, 2008; Rosado, 2007).

As metodologias utilizadas neste trabalho para populações exogâmicas foram eficientes na detecção do QTL para resistência à murcha-de-ceratocystis e diferentemente de metodologias que tratam a população de *Eucalyptus* como endogâmica elas catalisaram toda a informação genética disponível. Isso se deve ao fato de que em populações exogâmicas, como é o caso da maioria das espécies florestais, pode estar segregando até quatro alelos do QTL e não apenas dois como em populações endogâmicas (Cruz et al., 2009).

A detecção de QTLs com grande significância estatística e que explicam grande porção da variabilidade fenotípica fazem com que nesse cruzamento seja potencialmente interessante a realização de um mapeamento de maior resolução, diminuindo as distâncias entre marcadores e regiões genômicas de interesse para eventuais clonagens posicionais de genes. Além disso, os QTLs encontrados neste trabalho devem ser validados em outros *pedigrees* e outros ambientes antes da sua utilização em larga escala no melhoramento florestal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A.C., Zauza, E.A.V., Mafia, R.G. & Assis, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Ed. Viçosa MG. UFV. 2004.
- Alfenas, A.C. & Guimarães, L.M.S. Resistência Genética em Patossistemas Florestais. **Fitopatologia Brasileira** 32:89-91. 2007.
- Alves A.A. Herança e mapeamento genético da resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em cruzamentos interespecíficos de *Eucalyptus*. Dissertação de Mestrado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 58 p. 2008.
- Baker, C.J., Harrington T.C., Kraus U. & Alfenas, A.C. Genetic variability and host specialization in the Latin American Clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology** 93:1274-1284. 2003.
- Brondani, R.P.V., Williams, E.R., Brondani, C. & Grattapaglia, D. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. **BMC Plant Biology** 6:1-16. 2006.
- Brondani, R.P.V. & Grattapaglia, D. Cost-effective method to synthesise a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. **Biotechniques** 31 :793-795. 2001.
- Byrne M., Murrell J.C., Allen, B. & Moran, G.F. An integrated linkage genetic map for *Eucalyptus* using RFLP, RAPD and isozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics** 91:869-875. 1995.
- Campinhos, E.N., Laia, M.L., Grattapaglia, D., Bertolucci, F.L., Alfenas, A.C., Picoli, E.A.T. Localized mapping of RAPD markers in *Eucalyptus grandis*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 5: 91-98, 2005.
- Cruz, C.D. GQMOL: Programa para análise de genética quantitativa molecular. Versão 2008.6.1. Desenvolvido pelo setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>. 2008.
- Cruz, C.D., God, P.I.V.G. & Bhering, L.L. Mapeamento de QTLs em populações exogâmicas. In: Borém, A. (Ed.) Marcadores moleculares. Viçosa MG. UFV. pp. 443-481. 2009.
- Faria D.A. Estudos genômicos em *Eucalyptus*: Mapeamento de genes candidatos e QTLs, estimativas de desequilíbrio de ligação e análise de estrutura de populações. Tese de Doutorado. Brasília DF. Universidade Católica de Brasília 2008.
- Ferreira, F.A., Maffia, L.A., Barreto, R.W., Demuner, N.L. & Pigatto, S. Sintomatologia de murcha de *Ceratocystis fimbriata* em Eucalipto. **Revista Árvore** 30:155-162. 2006.

- Freeman, J.S., Potts, B.M. & Vaillancourt, R.E. Few Mendelian genes underlie response of a forest tree, *Eucalyptus globules*, to a natural fungal epidemic. **Genetics** 178:563-571. 2008.
- Fulker, D.W. & Cardon, L.R. A sib-pair approach to interval mapping of quantitative trait loci. **Am. J. Hum. Genet.** 5:1092-1103. 1994.
- Grattapaglia, D. Genolyptus. In: Borém, A., Giudice, M. & Sedyama, T. (Eds.) Melhoramento Genômico. Viçosa MG. UFV. 2003. pp. 51-71.
- Grattapaglia, D. & Sederoff, R.R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics** 137:1121-1137. 1994.
- Indury, R.M. & Cardon, L.R. A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. **Genome Research** 7:1104-1109. 1997.
- Junghans, D.T., Alfenas, A.C., Brommonschenkel, S.H., Oda, S., Mello, E.J. & Grattapaglia, D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics** 108:175-180. 2003.
- Ky, C.L., Barre, P., Lorieux, M., Trouslot, P., Akaffou, S., Louarn, J., Charrier, A., Hamon, S., Noirot, M. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). **Theoretical and Applied Genetics** 101:669-676. 2000.
- Marques, C.M., Araujo, J.A., Ferreira, J.G., Whetten, R., O'malley, D.M., Liu, B.H. & Sederoff, R. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. **Theoretical and Applied Genetics** 96:727-737. 1998.
- Myburg, A.A., Griffin, A.R., Sederoff, R.R. & Whetten, R.W. Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F1 hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach. **Theoretical and Applied Genetics** 107:1028-1042. 2003.
- Novaes E. Mapeamento de QTLs para qualidade da madeira em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e ancoragem de clones BAC no mapa genético. Dissertação de Mestrado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2006.
- Rocha, R.B., Barros, E.G., Cruz, C.D., Rosado, A.M. & Araújo, E.F. Mapping of QTLs related with wood quality and developmental characteristics in hybrids (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). **Rev. Árvore** [online]. 2007, vol.31, n.1, pp. 13-24. ISSN 0100-6762.
- Rosado T.B. Mapeamento de gene letal, responsável pela distorção da segregação e detecção de QTL para a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus* spp. Tese de Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2007.

Thamarus, K.A., Groom, K., Murrell, J., Byrne, M. & Moran, G.F. A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre, and floral traits. **Theoretical and Applied Genetics** 104:379-387. 2002.

Van Wyk, M., Van Der Merwe, N.A., Roux J., Wingfield, B.D., Kamgan, G. & Wingfield, M.J. Population genetic analyses suggest that the *Eucalyptus* fungal pathogen *Ceratocystis fimbriata* has been introduced into South Africa. **South African Journal of Science** 102:259-263. 2006.

Verhaegen, D.; Plomion, C. Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers. **Genome** 39:1051-1061. 1996.

Zauza, E.A.V., Alfenas, A.C., Harrington, T.C., Mizubuti, E.S. & Silva, J.F. Resistance of *Eucalyptus* clone to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease** 88:758-760. 2004.

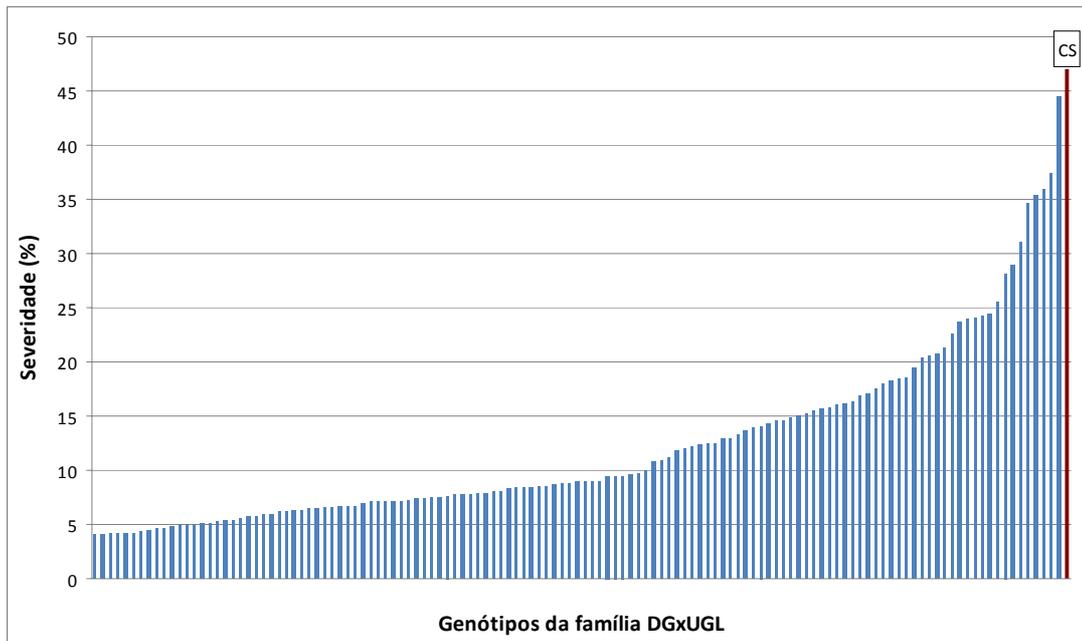


Figura 1. Severidade média de cinco réplicas para os 127 genótipos da família DGxUGL [*E. dunnii* (D) x *E. grandis* (G)] x [*E. urophylla* (U) x *E. globulus*] inoculados em condições controladas com o isolado SBS1 de *Ceratocystis fimbriata*. Cada barra representa a média de severidade de um genótipo. Barra vermelha (CS) corresponde ao comparador suscetível HGU1172.

Tabela 1. Teste de segregação gamética dos marcadores microssatélites amplificados em 346 indivíduos da família DG x UGL que apresentaram distorção de segregação

Marcador	Genitor	Gameta T1	Gameta T2	χ^2	Probabilidade
Eg24	♀ 11 ¹	335	-	-	-
	♂ 12	138	197	10.39	0.0012663 **
Embra28	♀ 12	163	130	3.72	0.05387 ns
	♂ 34	99	194	30.80	0.0 **
Embra37	♀ 12	102	201	32.35	0.0 **
	♂ 34	159	144	0.74	0.3888375 ns
Embra42	♀ 12	190	120	15.81	0.0000702 **
	♂ 34	143	167	1.86	0.1728484 ns
Embra44	♀ 11	247	-	-	-
	♂ 23	191	56	73.79	0.0 **
Embra53	♀ 12	224	96	51.20	0.0 **
	♂ 34	139	181	5.51	0.018881 *
Embra58	♀ 12	116	191	18.32	0.0000186 **
	♂ 34	158	149	0.26	0.6074917 ns
Embra111	♀ 12	200	111	25.47	0.0000004 **
	♂ 34	172	139	3.50	0.0613093 ns
Embra128	♀ 12	151	102	9.49	0.0020658 **
	♂ 34	138	115	2.09	0.1481779 ns
Embra155	♀ 12	208	129	18.52	0.0000168 **
	♂ 13	162	175	0.50	0.4788489 ns
Embra168	♀ 12	115	200	22.94	0.0000017 **
	♂ 34	150	165	0.71	0.3980247 ns
Embra202	♀ 12	207	97	39.80	0.0 **
	♂ 34	138	166	2.58	0.1082937 ns
Embra204	♀ 12	185	143	5.38	0.0203917 *
	♂ 34	193	135	10.26	0.0013623 **
Embra205	♀ 12	132	166	3.88	0.048888 *
	♂ 34	170	128	5.92	0.0149745 *
Embra208	♀ 12	85	195	43.21	0.0 **
	♂ 34	151	129	1.73	0.1885935 ns
Embra209	♀ 12	223	105	42.45	0.0 **
	♂ 34	152	176	1.76	0.185112 ns
Embra214	♀ 12	234	87	67.32	0.0 **
	♂ 34	164	157	0.15	0.6960176 ns
Embra390	♀ 12	119	198	19.69	0.0000091 **
	♂ 34	123	194	15.90	0.0000667 **
Embra651	♀ 12	220	80	65.33	0.0 **
	♂ 34	165	135	3.00	0.0832645 ns
Embra668	♀ 12	114	99	1.06	0.3040519 ns
	♂ 34	78	135	15.25	0.000094 **
Embra954	♀ 11	341	-	-	-
	♂ 12	213	128	21.19	0.0000042 **
Embra979	♀ 12	197	117	20.38	0.0000063 **
	♂ 34	167	147	1.27	0.2590391 ns
Embra1114	♀ 11	293	-	-	-
	♂ 12	120	173	9.59	0.0019596 **
Embra1851	♀ 11	328	-	-	-
	♂ 23	193	135	10.26	0.0013623 **

* / **: Valor abaixo do nível crítico significativo de 5% e 1%, respectivamente; ns: valor não significativo; ¹: Configuração alélica

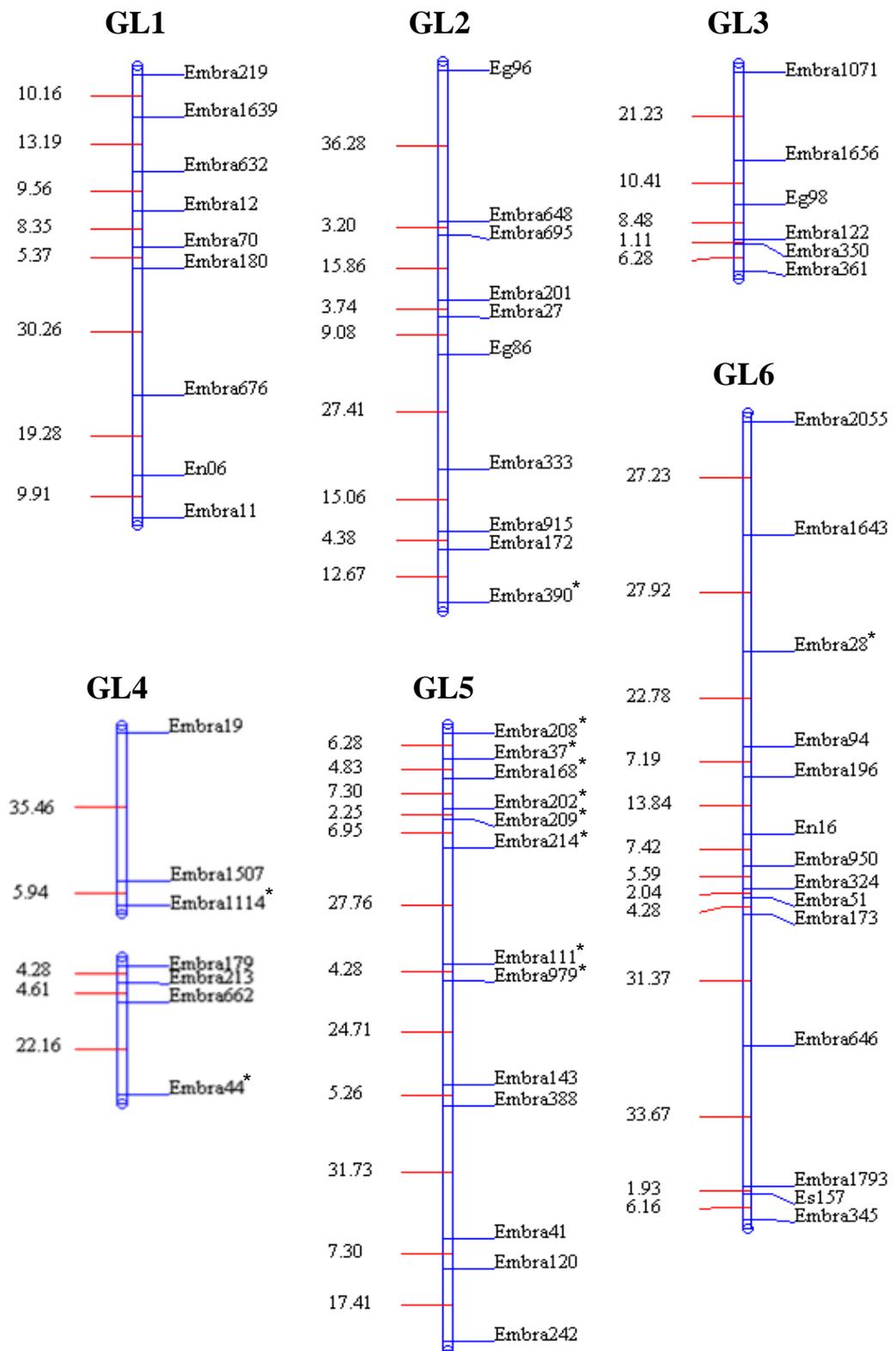


Figura 2. Mapa integrado com 110 marcadores moleculares microssatélites na família DGxUGL, obtida a partir do cruzamento interespecífico entre [*E. dunni* (D) x *E. grandis* (G)] x [*E. urophylla* (U) x *E. globulus*]. A ordem dos grupos de ligação foi baseado no mapa de Brondani et al. (1996). Distâncias em cM calculadas a partir da função de mapeamento de Haldane. Em asteriscos marcadores que apresentaram distorção de segregação.

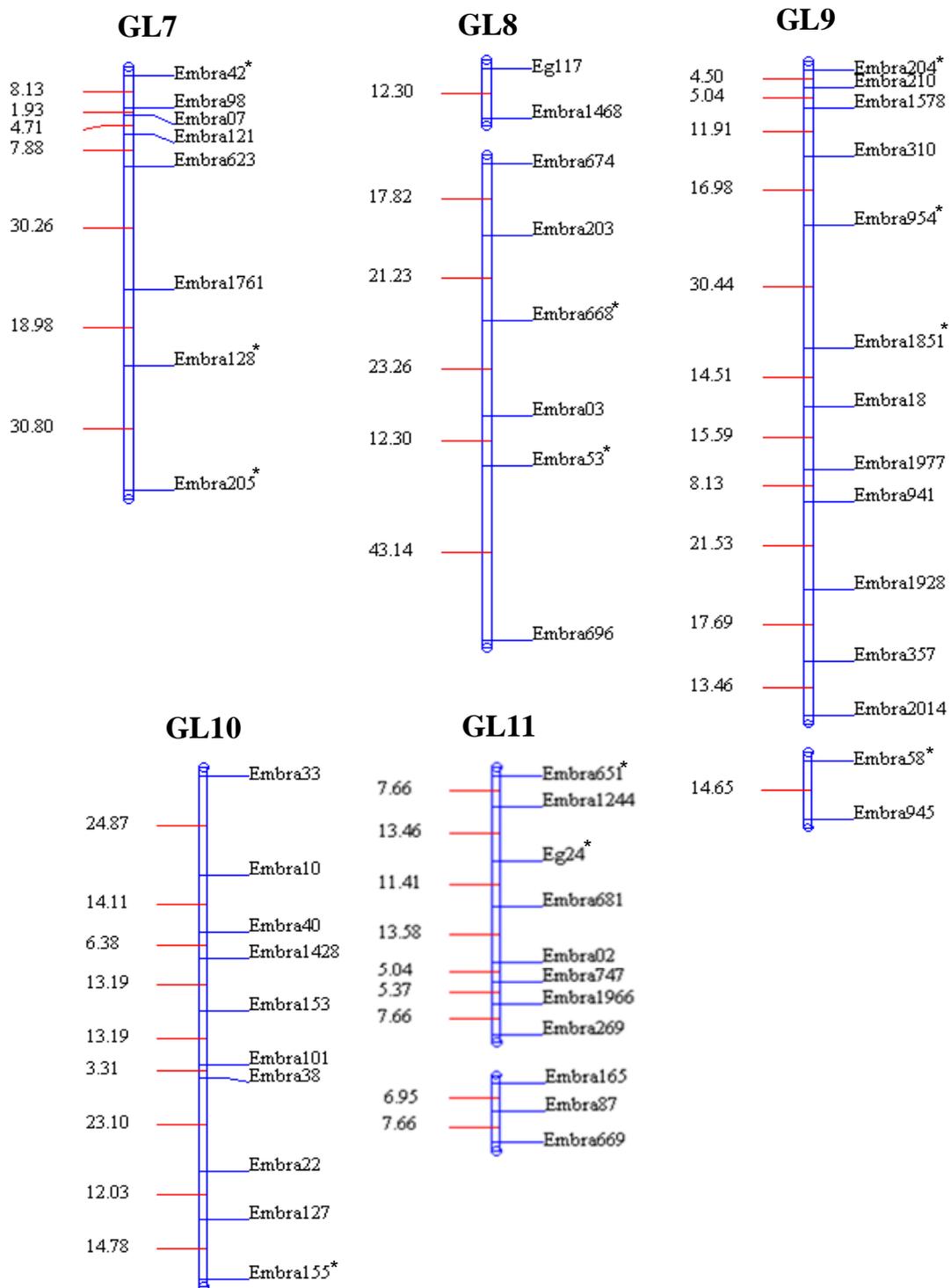


Figura 2 (Cont.). Mapa integrado com 110 marcadores moleculares microssatélites na família DGxUGL, obtida a partir do cruzamento interespecífico entre [*E. dunni* (D) x *E. grandis* (G)] x [*E. urophylla* (U) x *E. globulus*]. A ordem dos grupos de ligação foi baseado no mapa de Brondani et al. (1996). Distâncias em cM calculadas a partir da função de mapeamento de Haldane. Em asteriscos marcadores que apresentaram distorção de segregação.

Tabela 2. Análise de contraste entre médias para os marcadores derivadas do cruzamento entre o genitor feminino DG [*E. dunni* (D) x *E. grandis* (G)] e o genitor masculino UGL [*E. urophylla* (U) x *E. globulus*]

Marcador	Parentais	N1	N2	Média (μ_1)	Média (μ_2)	V(M ₁)	V(M ₂)	t	P
Eg98	♀ 12x22	65	44	10.28	14.81	0.56	2.35	-2.66	0.88 **
Embraz22	♀ 12x34	55	58	11.30	12.72	0.89	1.27	-0.97	66.27 ns
Embraz22	♂ 12x34	66	47	10.21	14.58	0.63	1.70	-2.86	0.50 **
Embraz388	♀ 12x34	54	62	14.34	10.45	1.55	0.80	2.54	1.19 *
Embraz388	♂ 12x34	62	54	12.31	12.19	0.87	1.61	0.08	93.70 ns
Embraz674	♂ 11x21	28	33	7.98	11.17	0.56	1.68	-2.13	3.51 *

Valor abaixo do nível crítico especificado (5%), ** Valor abaixo do nível crítico especificado (1%); N₁ e N₂: número de indivíduos da família de irmãos completos que apresentam alelo M1 e M2, respectivamente; μ_1 e μ_2 : Médias dos indivíduos que apresentam alelo M1 e M2, respectivamente; V(M₁) e V(M₂): Variância dos indivíduos que apresentam alelo M1 e M2, respectivamente.

Tabela 3. Descrição dos QTLs para resistência a murcha-de-ceratocystis (*Ceratocystis fimbriata*) mapeados na família DGxUGL, obtida a partir do cruzamento interespecífico entre [*E. dunni* (D) x *E. grandis* (G)] x [*E. urophylla* (U) x *E. globulus* (GL)].

GL	Marcador Associado	Posição	Marcadores Flaqueadores do QTL	LR -ln(1-R ²)				Efeito no alelo ♀	Efeito no alelo ♂	Genótipo ♀x♂
1	En06	0.09	En06 – Embra11	13.8	-29.4	14.7	11.4	1.84	0.09	A1A2xA3A4
3	Eg98	0.00	Embra1656 - Eg98	62.0	-88.4	44.2	34.2	-4.53	-	B1B2xB2B2
5	Embra388	0.04	Embra388 – Embra41	22.9	-41.0	20.5	15.8	3.89	0.12	C1C2xC3C4
8	Embra674	0.11	Embra674 – Embra203	14.6	-24.9	12.4	9.6	-	-3.19	D1D1xD2D1
10	Embra22	0.01	Embra22- Embra127	13.6	-29.1	14.6	11.2	-1.42	-4.37	E1E2xE3E4

GL: Grupo de ligação baseado no mapa Brondani et al. (1996). σ_A^2 : Variância aditiva. h_Q^2 : Herdabilidade do QTL.

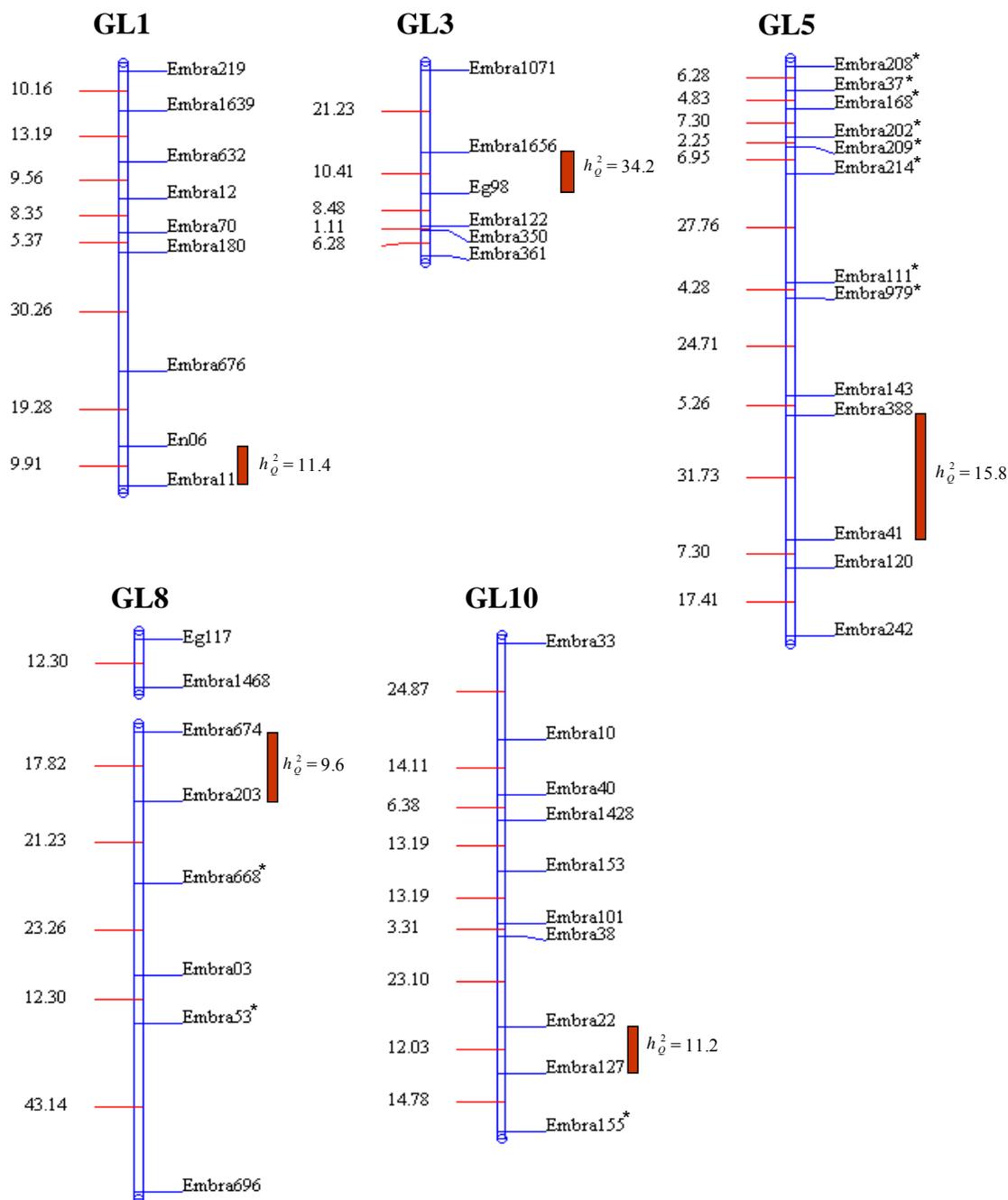


Figura 3. Grupos de ligação que apresentaram QTLs para resistência a murcha-de-ceratocystis (*Ceratocystis fimbriata*) na família DGxUGL, obtida a partir do cruzamento interespecífico entre [*E. dunni* (D) x *E. grandis* (G)] x [*E. urophylla* (U) x *E. globulus* (GL)]. Barras vermelhas indicam a localização do QTL no grupo de ligação, e h^2_Q a herdabilidade da característica. Distâncias em cM calculadas a partir da função de mapeamento de Haldane.

CONCLUSÕES GERAIS

Artigo 1:

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que:

- Genótipos altamente resistentes e suscetíveis à murcha-de-ceratocystis foram encontrados, sendo que dos 21 genitores avaliados, 12 foram resistentes, sete suscetíveis e dois altamente suscetíveis;
- As estimativas das herdabilidades individuais no sentido restrito e amplo equivaleram a 50% e 59%, respectivamente, sugerindo que o caráter apresenta alto grau de controle genético e baixa dominância alélica;
- Com a seleção dos 50 melhores clones nas famílias avaliadas pode-se obter um ganho genético de até -74,4%, ou seja, uma redução equivalente a este valor na média da extensão de lesões em relação à população das progênies.

Artigo 2:

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que:

- A resposta da resistência nos indivíduos da progênie seguiu uma variação contínua possibilitando analisar a característica de forma quantitativa;
- O mapa genético apresentou saturação satisfatória, com comprimento total, utilizando a função de mapeamento Haldane, de 1352,01 cM, e intervalo médio de 12,29 cM entre marcadores;
- Foram detectadas associações entre marcadores com os locos controladores da resistência à murcha-de-ceratocystis;
- Os QTLs detectados foram mapeados nos grupos de ligação 1, 3, 5, 8 e 10, cujas herdabilidades variaram de 9,6 a 34,2.