

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

PAULA MIKAELY HENRIQUE VIEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE GENES DE RESISTÊNCIA A
PATÓGENOS EM EUCALIPTO E SOJA POR RGA**

**ALEGRE
2015**

PAULA MIKAELY HENRIQUE VIEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE GENES DE RESISTÊNCIA A
PATÓGENOS EM EUCALIPTO E SOJA POR RGA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de mestre em Genética e Melhoramento, na área de concentração Biotecnologia.

Orientadora: Marcia Flores da Silva
Ferreira

ALEGRE
2015

PAULA MIKAELY HENRIQUE VIEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE GENES DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS
EM EUCALIPTO E SOJA POR RGA**

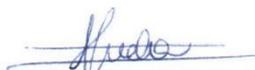
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento, na área de concentração de Biotecnologia.

Aprovada: 27 de Julho de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA



Maria Andréia Corrêa Mendonça
Instituto Federal Goiano



Liana Hilda Golin Mengarda
Universidade Federal do Espírito
Santo



Adésio Ferreira
Universidade Federal do Espírito
Santo
Coorientador



Willian Bucker Moraes
Universidade Federal do Espírito
Santo



Marcia Flores da Silva Ferreira
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Dedico

Á minha amada mãe Regina e minha avó Luzia, exemplos de vida e base do meu viver. A minha irmã Diocélia, pelo grande incentivo, força e apoio incondicional.

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil, e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus!

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Aos órgãos financiadores de pesquisa, CNPq, CAPES e FAPES, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

À minha querida orientadora Marcia Flores pela orientação, pela paciência, pelo carinho e incentivo, pelo apoio, pelos conselhos e amizade e por ser para mim fonte de inspiração e maior exemplo de profissional apaixonada pela pesquisa!

Ao Coorientador Professor Adésio Ferreira, pelo apoio, auxílio no desenvolvimento dessa pesquisa e disponibilidade sempre prestadas.

À Liana por todo ensinamento, paciência, dedicação e competência.

Ao professor Willian Bucker pela disponibilidade, pelo conhecimento passado e pela colaboração.

À professora Maria Andréia pela prontidão e apoio em contribuir com a dissertação.

À professora Tatiana Souza e ao professor Wellington Clarindo por disponibilizarem os laboratórios de Anatomia e Citogenética.

À Liziane e Regina pela imensa ajuda no desenvolver do experimento.

À minha família, pelos princípios ensinados, pelo amor, incentivo, compreensão e valores transmitidos., pelo exemplo de vida, por serem a base de todo o meu viver e fonte de força e coragem nos momentos mais difíceis.

Aos meus grandes amigos Mariana Milião e Luciano Portugal, que sempre estiveram comigo apesar da distância.

Às minhas queridas amigas Thais Lazarino, Paula Mauri, Marina, Carolina, Jessica e Luina, que não deixaram que um dia se passasse sem que uma risada fosse dada, estarão sempre no meu coração!

Aos amigos:, Stéfanie, Séphora, Tiago, José Henrique, Drielli, Eduardo, Amanda, Wagner, Iana, Angélica, Kati, Rodrigo, Amélia pelo convívio agradável, pelo apoio e companheirismo e por tornarem os dias mais leves.

BIOGRAFIA

PAULA MIKAELY HENRIQUE VIEIRA, filha de Regina Célia Henrique Vieira e Diocélio Vieira, nasceu em 19 de março de 1991, na Cidade de Manhumirim, Estado de Minas Gerais. Em 2009, ingressou no curso de Bacharel em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, vindo a se graduar em julho de 2013, recebendo o título de Bacharel em Biologia. Em agosto de 2013, ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA– UFES/Alegre), submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2015.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Estruturas de inoculação das moléculas efetoras de bactéria Gram-negativa, oomiceto, fungos e nematóides na célula vegetal	18
Figura 2. Modelo em zigue-zague do rendimento quantitativo da evolução do sistema imune de plantas. Fonte: Jones e Dangl, 2006	20
Figura 3. As sequências dos iniciadores desenhados com base na ansa P e cinase-2 de domínio de NBS. Fonte: Lei, 2014	22
Figura 4. Classe dos genes de resistência de plantas, baseado no arranjo dos domínios funcionais. Fonte: GURURANI et al., 2012	23

CAPÍTULO I

Figura 1. Dendrograma de agrupamento dos 22 genótipos de eucalipto	48
Figura 2. <i>Heatmap</i> gerado pelos amplicons obtidos das amplificações de combinações de <i>primers</i> RGAs de 22 genótipos de eucalipto	50
Figura 3. a-f – Secções transversais de raiz secundária de genótipos de eucalipto:	54
Figura 3. g-l Secções transversais de raiz secundária de genótipos de eucalipto	55
Figura 3. m-n Secções transversais de raiz secundária de genótipos de eucalipto	56
Figura 3. o-r Secções longitudinais de raiz secundária de genótipos de eucalipto	56
Figura 3 s-x Secções longitudinais de raiz secundárias de genótipos de eucalipto	57
Figura 3. y-ad Secções longitudinais de raiz secundária de genótipos de eucalipto	58

CAPÍTULO II

Figura 1. Agrupamento dos 46 genótipos de soja mediante dados gerados por marcadores RGAs	78
Figura 2. Agrupamento dos genótipos de acordo com A) Primers que abrangiam apenas motivos P-loop.B) Primers que abrangiam motivos P-loop e GLPL	80
Figura 3. Gráfico gerado a partir de dados RGAs pelo programa Structure 2.3.4. K:3.	81
Figura 4. Agrupamento de 25 genótipos de soja de acordo com A) Marcadores SSR e B) Marcadores RGAs.	82
Figura 5. <i>Heatmap</i> dos dados obtidos por RGA amplificados em 46 genótipos de soja com diferentes resistências a nematóides de cisto e galha	84

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

<u>Tabela 1. Famílias das proteínas relacionadas á patogênese, segundo Van Lonn et al., (1994).</u>	<u>25</u>
---	-----------

CAPÍTULO I

Tabela 1. Identificação dos genótipos de eucalipto e relação com a doença ocasionada pelo fungo <i>Ceratocystis .fimbriata</i>	42
---	----

Tabela 2. <i>Primers</i> RGAs degenerados, utilizados para amplificar motivos do domínio NBS, e <i>primers</i> ISSR.....	44
---	----

<u>Quadro 3. Resumo da análise descritiva da anatomia de raiz de sete genótipos de eucalipto.</u>	<u>52</u>
---	-----------

CAPÍTULO II

Tabela 1. Caracterização dos genótipos de soja quanto a resistência a nematoide.	74
---	----

<u>Tabela 2. Caracterização dos primers RGAs utilizados oriundos do domínio NBS.</u>	<u>76</u>
---	-----------

LISTA DE ABREVIÇÕES

<i>avr</i>	<i>Gene Avirulence</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
CC	<i>Coiled Coils</i>
DAMPS	Padrões moleculares associados a danos
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECS	Endocytosis Cell Signaling
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ETS	<i>Susceptibility Triggered Effectors</i>
ETI	<i>Immunity Triggered Effectors</i>
FAA	Formaldeído/Ácido acético glacial/Álcool
Fd	Feloderme
Genes R	Genes de resistência
GTP	Guanosine
	<i>triphosphate</i>
HAMP's	Padrão molecular associados a herbívoros
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>
LLR	<i>Leucine Rich Repeat</i>
LZ	<i>Leucine Zipper</i>
MAMP's	Padrões moleculares associados à microorganismos
MAPK's	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
<i>M. e.</i>	<i>Meloidogyne enterolobii</i>
<i>M. i.</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>
<i>M.j.</i>	<i>Meloidogyne javanica</i>
NBS	<i>Nucleotide Binding Site</i>
NCS	Nematoide de cisto da soja
NILS	Nuclear localization signal
PAMP's	Padrão molecular associados a herbívoros
PCD	<i>Programmed cell death</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pd	Periderme
PEST	<i>Protein degradation domain (proline-glycine-serine-threonine)</i>
PI's	<i>Plant Introductions</i>

PRR'S	Receptores de reconhecimento de padrões
PTI	<i>Immunity triggered PAMPS</i>
QTL	<i>Trait Quantitative loci</i>
RGA	<i>Resistance Gene Analog</i>
RP	Genes/ proteínas relacionadas à patogênese
RR	Genes/ proteínas relacionadas à resistência
S	Súber
SSR	<i>Simple sequence repeat</i>
Taq	Taq DNA polimerase
TIR	<i>Toll/Interlekin -1 receptor</i>
TM	transmembrane domain
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
X	Xilema primário
X*	Xilema secundário
WRKY	DomínioTriptofano-arginina-lisina-tirosina

SUMÁRIO

<u>RESUMO</u>	<u>XIII</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>XIV</u>
<u>1 INTRODUÇÃO</u>	<u>XIV</u>
<u>2 REVISÃO DE LITERATURA</u>	<u>17</u>
<u>Mecanismos de resistência em plantas</u>	<u>17</u>
<u>2.1.1 Genética da resistência</u>	<u>21</u>
<u>Marcadores moleculares na identificação de genes de resistência</u>	<u>26</u>
<u>Eucalipto e soja: culturas modelos para estudos de RGA</u>	<u>27</u>
<u>3 OBJETIVO GERAL</u>	<u>29</u>
<u>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>30</u>
<u>CAPÍTULO I</u> <u>Comparação molecular e anatômica de genótipos de <i>Eucalyptus</i> spp. resistentes e suscetíveis a <i>Ceratocystis fimbriata</i></u>	<u>35</u>
<u>RESUMO</u>	<u>35</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>36</u>
<u>1 INTRODUÇÃO</u>	<u>37</u>
<u>2 MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>41</u>
<u>Material Vegetal</u>	<u>41</u>
<u>Extração de DNA e análise de marcadores RGAs e ISSR</u>	<u>41</u>
<u>Anatomia da raiz</u>	<u>45</u>
<u>3 RESULTADOS</u>	<u>47</u>
<u>Análises de marcadores RGAs e ISSR</u>	<u>47</u>
<u>Análises da Anatomia da raiz secundária</u>	<u>51</u>
<u>4 DISCUSSÃO</u>	<u>59</u>
<u>Marcadores RGA e ISSR</u>	<u>59</u>
<u>Análise prospectiva de marcadores morfológicos de anatomia da raiz</u>	<u>62</u>
<u>5 CONCLUSÃO</u>	<u>66</u>
<u>6 REFERÊNCIAS</u>	<u>67</u>
<u>CAPÍTULO II</u> <u>Prospecção de genes de resistência à <i>Heterodera glycines</i> e <i>Meloidogyne</i> sp em soja</u>	<u>70</u>
<u>RESUMO</u>	<u>70</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>71</u>

<u>1 INTRODUÇÃO</u>	<u>72</u>
<u>2 MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>74</u>
<u>Material vegetal</u>	<u>74</u>
<u>Análises moleculares</u>	<u>75</u>
<u>Análises de dados</u>	<u>77</u>
<u>3 RESULTADOS</u>	<u>78</u>
<u>Análise de RGA</u>	<u>78</u>
<u>4 DISCUSSÃO</u>	<u>85</u>
<u>5 CONCLUSÃO</u>	<u>90</u>
<u>6 REFERÊNCIAS</u>	<u>91</u>
<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	<u>93</u>
<u>APENDICE</u>	<u>94</u>

VIEIRA Paula Mikaely Henrique M. Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, julho 2015. **Prospecção de genes de resistência em eucalipto e soja por meio de RGA.** Orientador: Marcia Flores da Silva Ferreira. Coorientador: Adésio Ferreira.

RESUMO

Ao longo da evolução as plantas desenvolveram um sofisticado mecanismo de defesa contra o ataque de fitopatógenos, conhecido como defesa pós-formada. Este sistema compreende uma complexa rede de sinalização bioquímica comandada por genes de resistência, os genes R. A identificação destes genes em culturas de interesse agrônomo como a soja e o eucalipto amplia a base genética da resistência, o que torna as plantas menos vulneráveis aos ataques de patógenos. Os genes R codificam proteínas com domínios conservados. A presença desses domínios permite o uso de técnicas de PCR visando o isolamento do DNA e a clonagem de sequências análogas de genes de resistência (RGA) mediante o uso de oligonucleotídeos degenerados específicos para as regiões conservadas. Objetivou-se neste trabalho: 1) avaliar a presença de fragmentos associados à resistência a *Ceratocystis fimbriata* em genótipos de eucalipto; 2) mensurar a diversidade entre genótipos de eucalipto; 3) Identificar fragmentos relacionados à resistência aos nematóides *Heterodera glycines* e *Meloidogyne* spp em genótipos de soja e; 4) realizar uma análise comparativa dos dados obtidos por RGAs com marcadores SSR que contemplam QTLs de resistência. As análises de agrupamento realizadas com dados de RGA e SSR permitiram distinguir grupos de genótipos resistentes e suscetíveis a *C. fimbriata* e revelou a diversidade existente entre os indivíduos estudados, o gráfico de *Heatmap* permitiu identificar fragmentos associados à resistência à *C. fimbriata* em cultivares de eucalipto. Os marcadores RGAs aplicados em soja foram eficientes em discriminar genótipos de soja resistentes e suscetíveis aos nematóides em estudo, sendo importante associar a estes o uso de marcadores SSR por serem potentes em amplificar e discriminar genótipos quanto a raça especificidade do patógeno.

Palavras-chaves: resistência, Análogos de genes de resistência, nematóides, fungos.

VIEIRA Paula Mikaely Henrique M. Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, July 2015. **Prospecting resistance genes in eucalyptus and soybean using RGA.**
Adviser: Marcia Flores da Silva Ferreira. Co- Adviser: Adésio Ferreira

ABSTRACT

Along the evolution the plants developed a sophisticated mechanism of defense against the attack of phytopathogens, known as pre-formed defense. This system comprehends a complex net of biochemical signalization, commanded by resistance genes, the R genes. The identification of these genes in cultures of agronomic interest as soybean and eucalyptus amplifies the genetic basis of resistance, what makes the plants less vulnerable to the attack of pathogens. The R genes codify proteins with conserved domains. The presence of these domains allows the use of PCR technics aiming the DNA isolation and the cloning of analogous sequences of resistance genes (RGA) by means of the use of specific degenerated oligonucleotides for the conserved regions. It was aimed with this work: 1) to evaluate the presence of fragments associated to the resistance to *Ceratocystis fimbriata* in genotypes of eucalyptus; 2) to measure the diversity among eucalyptus genotypes; 3) to identify fragments related to the resistance to the nematodes *Heterodera glycines* and *Meloidogyne* spp in soybean genotypes and; 4) to carry out a comparative analysis of the data obtained by RGAs with SSR markers that contemplate QTLs of resistance. The cluster analyses carried out with the data of RGA and SSR allow distinguishing groups of genotypes that are resistant and susceptible to *C. fimbriata* and revealed the diversity existent among the studied individuals, the heatmap graphic allowed identifying fragments associated to the resistance to *C. fimbriata* in eucalyptus cultivars. The RGA markers applied in soybean were efficient in discriminating soybean genotypes that were resistant and susceptible to the nematodes in study, and it is important to associate to these the use of SSR markers because they are powerful in amplifying and discriminating genotypes according to the race and specificity of the pathogen.

Keywords: resistance, Analogous of resistance genes, nematodes, fungi.

1 INTRODUÇÃO

Culturas de importância econômica como a soja, *Glycine max* (L) Merrill uma espécie anual, uma das mais importantes leguminosas mais importantes cultivadas no mundo (GUO, 2011), e o eucalipto, perene, do gênero *Eucalyptus* spp., arbórea extensamente distribuída e útil devido sua plasticidade como matéria-prima (MYBURG, 2014), são acometidos por um grande número de patógenos, dentre eles fungos e nematoides (ALFENAS, 2009 SUZUKI, 2012).

Visando contornar este problema agricultores e programas de melhoramento optam pelo uso e pela intensiva busca de cultivares resistentes, os quais possuem em seu genoma genes responsáveis pela resistência (KUSHALAPPA, 2014). Estes genes dividem-se em categorias, podendo ser de efeito quantitativo ou qualitativo. Os genes de efeito qualitativo, os genes de resistência ou genes R, são ativados mediante reconhecimento do parasita durante a interação planta-patógeno, um sistema coevolutivo altamente sofisticado e específico que resulta na resposta de hipersensibilidade e consequente defesa do hospedeiro (JONES, 2006).

Diante disso, os genes R têm sido amplamente estudados em inúmeras espécies, dentre elas *Arabidopsis thaliana*, tabaco, tomate e soja (SORIANO, 2006; WILLIANSO, 2005). A identificação destes genes no genoma de variadas espécies contribui significativamente com programas de melhoramento por enriquecer seus bancos de dados com subsídios para a engenharia genética e na seleção de genótipos para cruzamentos.

Apesar do avanço das pesquisas na área, culturas de interesse são acometidas por um grande número de patógenos, o que amplia a área de estudo e a necessidade de informações específicas sobre a base genética da resistência da planta para cada agente patogênico em específico.

O eucalipto, como espécie de interesse, é severamente acometido por fungos da espécie *Ceratocystis fimbriata*, causadores de grandes danos às lavouras e prejuízos econômicos (ZAUZA, 2004). Apesar da relevância deste fungo para a cultura do eucalipto, o número de trabalhos voltados para esta espécie é muito escasso, o que limita o conhecimento das fontes de resistência ao fungo e consequente uso de genótipos favoráveis para o cultivo.

Da mesma forma a cultura da soja é potencialmente ameaçada por nematóides, dentre eles destacam-se *Heterodera glycines*, o nematóide de cisto da soja, e espécies do gênero *Meloidogyne* spp, os nematoides de galhas (THAKUR, 2013; BENEVENT,2013).

A estreita base genética da resistência em soja é fator preocupante na resistência desta cultura a grande quantidade de raças fisiológicas de *Heterodera glycines*, a mesma preocupação se estende para *Meloidogyne* spp. Dado isso, o conhecimento e incorporação de novas fontes de resistência em cultivares comerciais é o objetivo principal do melhoramento (DIAS, 2010). Diante disso, o uso de técnicas da biologia molecular, tal como os marcadores moleculares permitem aos programas de pré-melhoramento selecionar genótipos vantajosos, sejam eles de origem exótica, material elite, ou comercial.

Dentre os marcadores moleculares utilizados na prospecção de genes de resistência estão os RGAs (*Resistance Gene Analog*). Este marcador está intimamente associado a sequências de resistência no genoma das plantas e tem sido amplamente utilizado para uma grande número de espécies tal como soja, damasco, morango, girassol e batata (SORIANO, 2006; WILLIANSO, SANSEVERINO, 2011).

Além dos RGAs o uso de marcadores do tipo SSR (*Simple sequence repeat*) tem sido de grande utilidade no estudo da resistência. Estes marcadores têm sido utilizados na identificação de QTLs (*Quantitative trait loci*) de resistência a patógenos permitindo uma abordagem quantitativa nos estudos de resistência (SANTANA, 2008).

O objetivo deste trabalho foi identificar por meio de marcadores RGAs sequências relacionadas à resistência ao fungo *Ceratocystis fimbriata* e aos nematóides de cisto e de galha no genoma de eucalipto e soja respectivamente. Além disso, fazer comparações dos dados de RGA com marcadores SSR para a resistência em genótipos de soja, e avaliar a diversidade dos genótipos de eucalipto por meio de marcadores ISSR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mecanismos de resistência em plantas

As plantas são constantemente expostas ao ataque de inúmeros patógenos (LEI, 2014), nesta condição tornou-se necessário o desenvolvimento de um sistema de defesa multicompetente e eficaz a esta variedade de predadores. Tal sistema é dado por diferentes estratégias que variam desde mecanismos basais, a defesa pré-formada, até mecanismos mais complexos e elaborados, a defesa pós-formada (AGRIOS, 2005).

O investimento em defesa por plantas é uma atividade de alto custo, que pode comprometer o *fitness* dos vegetais. Dado isso, presume-se que a seleção natural tenha favorecido os mecanismos de defesa pós-formados. Este tipo de defesa é ativado apenas na presença do agressor e por consequência, impede desperdícios de energia decorrentes do investimento em proteção. Contudo é importante que as plantas respondam rapidamente ao ataque de patógenos (THALER, 2012). Com isso, faz-se necessário a uso da defesa pré-formada ou constitutiva. Este tipo de defesa está presente nas plantas antes mesmo da interação desta com o patógeno, e é uma importante barreira à entrada dos agentes infecciosos (AGRIOS, 2005). Os mecanismos de defesa pré-formados ou constitutivos e os mecanismos pós-formados ou induzidos são divididos em duas categorias: estrutural e bioquímica (BARI, 2009).

A defesa pré-formada é a primeira linha de defesa da planta. Nela a resposta estrutural é dada por componentes como a cutícula, cera, tricomas, estômatos, parede celular, fibras e vasos condutores (PASCHOALATI, 2011). Estas estruturas têm como função impedir a invasão dos hospedeiros por patógenos e podem ser facilmente identificadas na anatomia de genótipos resistentes. As respostas bioquímicas da defesa pré-formada são dadas por compostos como fenóis, alcaloides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos, quitinases e β -1,3 glucanases, ácido protocatecólico, ácido clorogênico, ácido quínico, dentre outros (STANGARLING, 2011). Para que esta forma de defesa seja eficiente é necessário que os compostos estejam presentes no

local da infecção e em quantidades suficientes, de forma a expressar a toxicidade para o patógeno criando condições adversas ao crescimento deste no interior da planta hospedeira (PASCHOALATI, 2011).

A defesa pós-formada envolve um complexo reconhecimento do patógeno pela planta hospedeira (Figura 1), a transdução de sinais e a expressão de vários genes de resistência (FALEIRO, 2011). Em um primeiro momento, o sistema imune basal das plantas reconhece padrões moleculares associados à patógenos ou microorganismos (PAMPS/MAMPS) por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs – *pattern recognized receptors*). A este sistema de defesa dá-se o nome de Imunidade disparada por PAMPS (PTI).

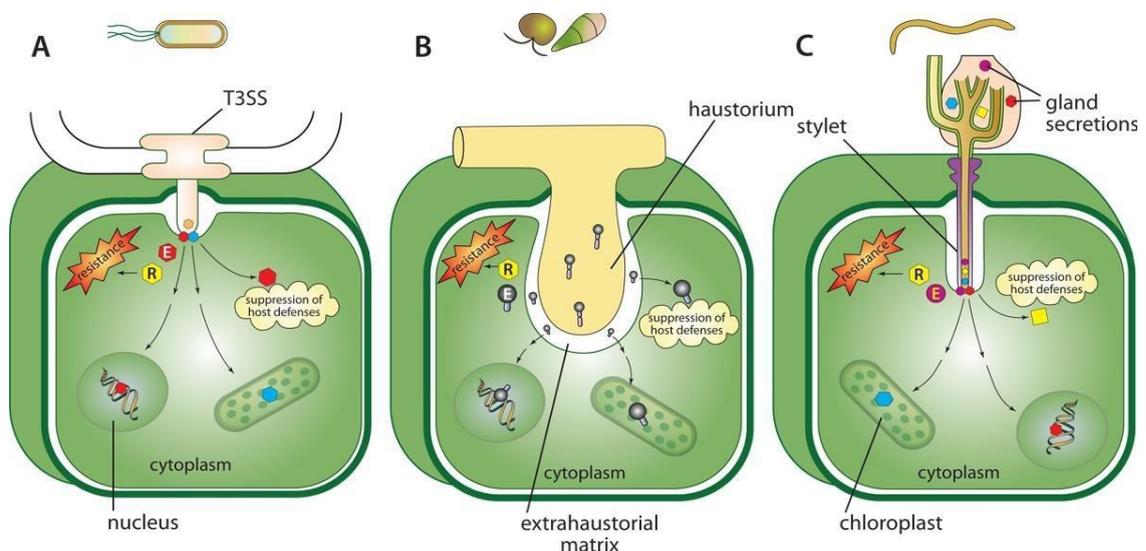


Figura 1. Estruturas de inoculação das moléculas efetoras de bactéria Gram-negativa, oomiceto, fungos e nematóides na célula vegetal. (A) sistema de secreção de tipo III em bactéria Gram-negativa. (B) O haustório em agentes patogênicos filamentosos biotróficos e hemibiotróficos é o possível local de libertação do efector na célula hospedeira. (C) secreções glandulares, que incluem efetores, são injetados na célula da planta através do estilete do nematóide. Uma vez no interior da célula vegetal os efetores (E) podem ativar as defesas do hospedeiro (ETI) pelo reconhecimento por proteínas (R) de resistência, a resposta de defesa inclui a morte celular programada (PCD). Reconhecimento dos efetores pela proteínas R pode ocorrer diretamente ou indiretamente como resultado da interação dos efetores com outras proteínas do hospedeiro (s). Fonte: Torto-Alalibo et al., 2009.

As partículas de PAMPS/MAMPS são polissacarídeos de bactérias gram-negativas, peptídeoglucanas de bactérias gram-positivas, flagelinas de eubactérias, bem como glucanas, quitinas e proteínas derivadas de parede celular de fungos (KAZAN, 2014). Estas partículas são características de grupos de microorganismos

de composição altamente conservada (KAZAN, 2014). Quando em caso de reconhecimento de partículas derivadas de herbívoros, são conhecidas como padrão molecular associados a herbívoros (HAMPS) ou, quando associados a danos celulares nas hospedeiras, padrões moleculares associados a danos (DAMPS) (ARENA, 2014).

Os PRRs estão localizados na membrana plasmática das células e são constituídos por regiões ricas em leucina (LRR). Estes reconhecem as PAMPs e acionam um sistema de sinalização intracelular que se dá mediante mensageiros secundários e cascatas proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs - *Mitogen Activated Protein Kinases*) (JONES, 2011). A ativação dos fatores de transcrição WRKY (domínio triptofano-arginina-lisina-tirosina), decorrente da sinalização, resulta na expressão de genes relacionados à defesa (RP) (KWON, 2014), assim como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), fortalecimento da parede celular no sítio de infecção do patógeno pela deposição de calose (FALEIRO, 2011), fechamento de estômatos e indução de genes relacionados à defesa (PASCHOALATI, 2008)

Esta resposta de defesa é efetiva para a grande maioria de patógenos. Entretanto, durante a coevolução parasitas em particular desenvolveram mecanismos para evitar o reconhecimento dos eliciadores. Estas alterações ocasionam a instalação da doença, resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS- *susceptibility triggered effectors*) (Figura 2) (JONES, 2006).

Em resposta ao novo mecanismo patogênico, hospedeiros específicos se especializaram no reconhecimento de proteínas Avr oriundas dos parasitas. Estas proteínas interagem com o receptor da planta, uma proteína codificada pelo gene de resistência (gene R) do hospedeiro (FLOR, 1971). A interação entre os produtos dos genes *avr* e R leva à ativação de vias de transdução de sinais que culmina na resposta de resistência. A interação dos produtos dos genes R e *avr* é extremamente específica e se justifica pela co-evolução planta-patógeno (KANG, 2012). Este tipo de interação foi descrito inicialmente por Flor (1971) e é conhecido como interação gene a gene. Se o gene R não existir ou não for funcional na planta não ocorre interação nem reconhecimento e a doença se instala.

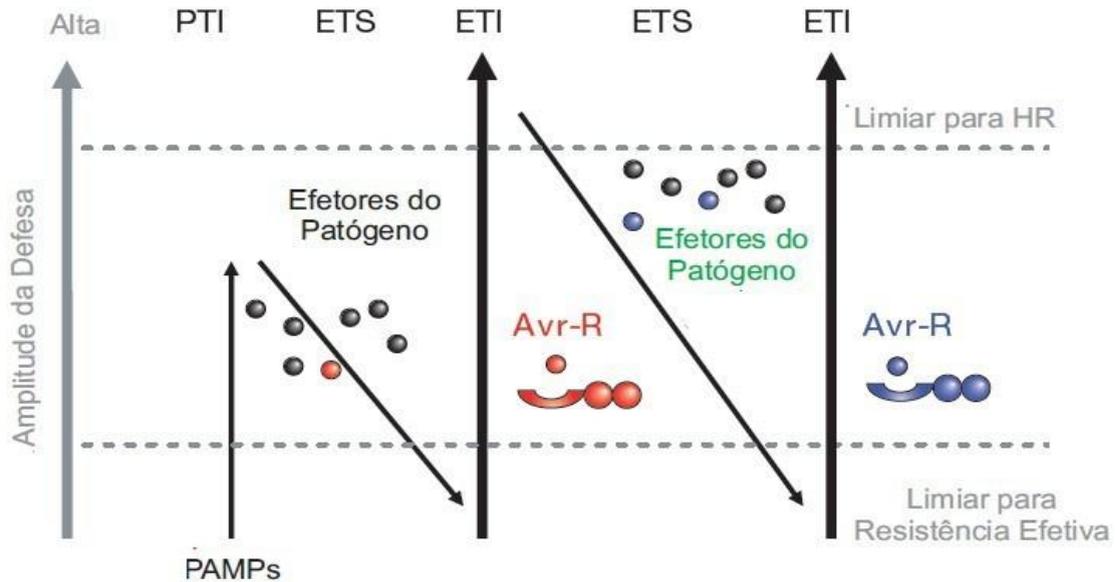


Figura 2. Modelo em zigue-zague do rendimento quantitativo da evolução do sistema imune de plantas. PTI: Imunidade disparada por PAMPs. ETS: suscetibilidade desencadeada por efetores; ETI: imunidade disparada por efetores; Avr: Produto do gene Avr do patógeno. R: produto do gene de resistência do hospedeiro. HR: Resposta de hipersensibilidade. Fonte: Jones e Dangl, 2006.

A categoria de defesa mediada por genes R é a imunidade disparada por efetores ou ETI (*Effectors triggered immunity*). As proteínas codificadas a partir dos genes de resistência possuem em comum domínios conservados, como exemplo os domínios NBS (*Nucleotide Binding Site*) e LRR (*Leucine Rich Repeat*). Os domínios são úteis no reconhecimento dos patógenos, na fosforilação, na ativação de respostas de defesa, na sinalização, na interação proteína-proteína dentre outras atividades (RONDE, 2014).

A ETI resulta em uma resposta de defesa local, que se caracteriza por um rápido afluxo de cálcio e de potássio, com ativação de vias MAPKs, a formação de EROs, resposta de hipersensibilidade e a morte celular programada (JONES, 2006). Em adição, os sistemas de defesa físicos como a parede celular são reforçados. A resposta desencadeada por ETI é considerada mais forte do que a resposta de PTI (AGRIOS, 2005).

2.1.1 Genética da resistência

As plantas possuem em seu genoma um conjunto de genes conhecidos como genes resistentes a estresses bióticos, que desempenham papel fundamental na defesa e são ativados após a infecção pelos patógenos. Estes genes resistentes a estresses bióticos podem ser divididos em genes de efeito qualitativo, representados pelos genes de resistência (genes R), ou genes de caráter quantitativo, representados pelos genes relacionados à resistência (RR- *resistance-related*) e pelos genes relacionados à patogênese (RP- *pathogenesis related*) (KUSHALAPPA, 2014).

Os genes R conferem uma completa e específica inibição do patógeno. Sua presença ou ausência pode resultar em interação incompatível e compatível respectivamente. No sistema incompatível há o reconhecimento das proteínas do patógeno o que resulta na não infecção, enquanto na interação compatível as proteínas *Avr* não são reconhecidas permitindo o progresso da doença (SCHERER, 2002).

O isolamento e a clonagem de genes R têm sido intensamente realizados em espécies mono e dicotiledôneas (SANSEVERINO; ERCULANO, 2012). Os primeiros exemplos de genes de resistência a doenças clonados a partir de espécies monocotiledôneas são *Hm1* no milho e *Xa21* no arroz (SONG et al., 1995). Com o avanço das tecnologias e das análises moleculares muitos outros genes de importância econômica foram clonados, como exemplo o gene *RPS2*, *RPS5* e *RPM1* responsáveis pela resistência à *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis thaliana*, e os genes *Mla1*, *Mla6*, *Mla12*, *Mla13* e *Mla6* que conferem resistência a *Blumeria graminis* em cevada (SORIANO, 2012; WILLIANSO, 2006; GURURANI, 2012).

A clonagem e isolamento dos genes são possíveis graças à presença de domínios conservados. Dentre os domínios os mais comuns são as repetições ricas em leucina (LRR- *Leucine Rich Repeat*) e o sítio de ligação de nucleotídeos (NBS- *Nucleotide Binding Site*). A região NBS está presente em muitas famílias de proteínas G e ATPases, promovendo a hidrólise de nucleotídeos trifosfatados e iniciando a resposta de resistência em plantas, além disso a região NBS possui motivos quinase 1a (P-loop), quinase 2 e quinase 3 que atuam na ligação e hidrólise

de nucleotídeos trifosfatados, e o motivo GLPL (Figura 3) (PALOMINO, 2006; LEI, 2014)

Produtos de genes com domínio LRR atuam na mediação proteína-proteína, e podem estar direta ou indiretamente envolvidos no reconhecimento das proteínas codificadas pelos genes *avr* (BENT, 1996).

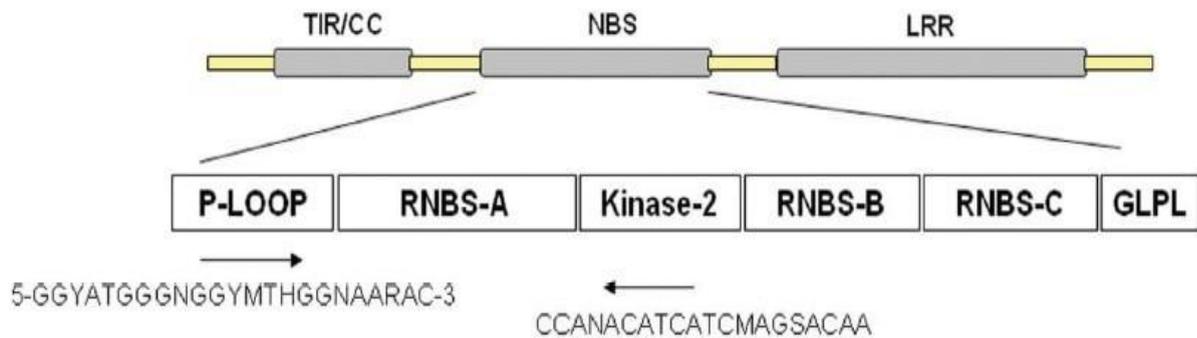


Figura 3. As sequências dos iniciadores desenhados com base na ansa P e cinase-2 de domínio de NBS. Fonte: Lei, 2014.

Na região N-terminal existe, além do NBS, uma segunda região variável que pode ser um domínio CC (*Coiled Coils*) (PAN et al., 2000) ou um domínio homólogo ao domínio *Toll* de *Drosophila* e IL-1r de mamífero, denominado TIR (*Receptor interleucine*) (WHITHAM et al., 1994; HAMMOND-KOSACK, 1997; JONES, 1997). O domínio CC está envolvido na interação proteína-proteína e é encontrado em proteínas codificadas por genes presentes em mono e dicotiledôneas, como por exemplo, *RPS2*, *Cre3*, *RPM1*, *I2C*, *Xai1 PrF*, *RPP8*, *RPS5*, *Mi* e *RGC2* que conferem resistência a diversos patógenos (WILLIAMSON, 1999).

O domínio TIR possui características muito parecidas com os domínios encontrados em espécies animais, sua função é a transdução de sinal podendo também ter papel no reconhecimento dos patógenos (GOMES, 2005). Além destes domínios, são conhecidos também o zíper de leucina (*LZ-Leucine Zipper*), o domínio NLS (*Nuclear localization signal*), o domínio WRKY (domínio triptofano-arginina-lisina-tirosina) e quinase. Os diferentes arranjos entre domínios permitiram a identificação de oito classes de genes de resistência (Figura 4). A primeira classe compreende genes que codificam proteínas citoplasmáticas com sítio de ligação a nucleotídeos (NBS), o domínio LRR e o domínio CC na porção N-terminal (GURURANI, 2012).

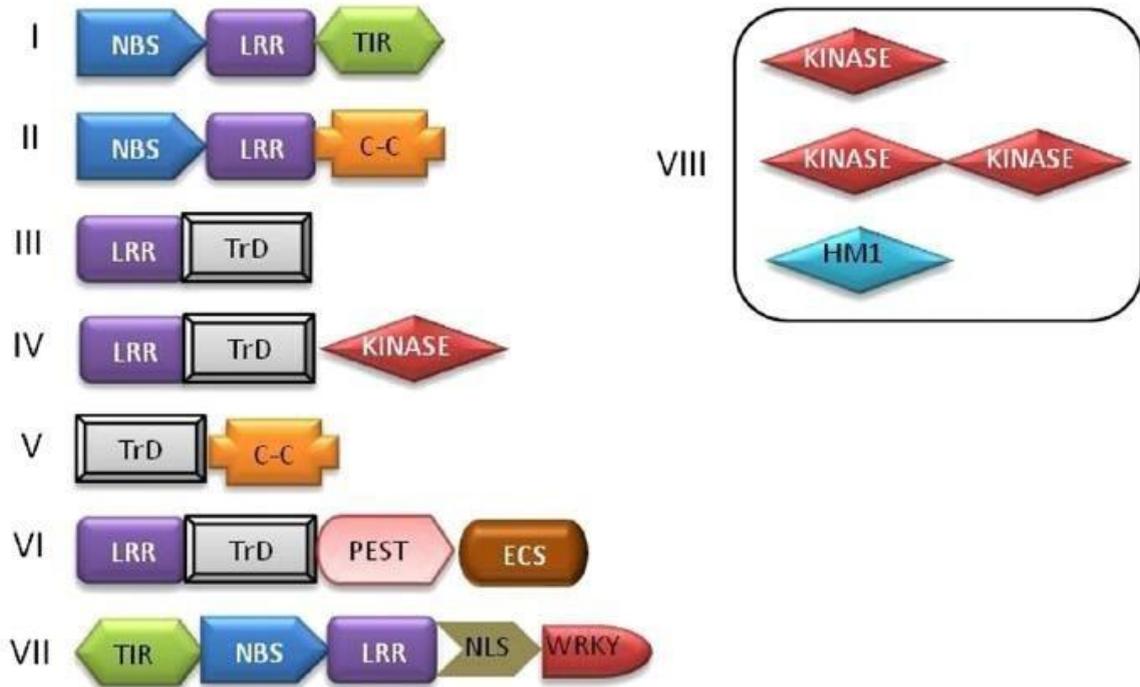


Figura 4. Classe dos genes de resistência de plantas, baseado no arranjo dos domínios funcionais. LRR - repetição ricas em leucinas; NBS - sítio de ligação de nucleotídeos; TIR - domínio de interação proteína-proteína, homólogo ao receptor da interleucina-1; domínio CC (*coiled coil*); TM – domínio transmembrana; PEST – domínio de degradação de proteína; ECS – domínio de sinalização celular para endocitose; NLS - sinal de localização nuclear; WRKY - domínio aminoácido; HM1 - enzima HC-toxina redutase. Fonte: GURURANI et al., 2012.

A segunda classe apresenta genes com os domínios conservados LRR, NBS, e um domínio TIR (LAWRENCE, 1995). A terceira e quarta classe de genes codificam proteínas transmembranas que apresentam o domínio LRR (SONG, 1995). O quinto grupo é representado por proteínas formadas pela junção dos domínios transmembranas TM e pelo motivo CC (GURANINE 2012).

O gene *RRS1* representa a sexta classe, este gene possui uma região carboxi-terminal, um motivo putativo de sinal de localização nuclear (NILs) e um domínio WRKY (WANG, 2009). Os genes da sétima classe contêm os domínios extracelulares LRRs e o domínio PEST, além de um curto motivo de sinalização celular para endocitose (ECS). Na oitava classe a resistência se dá pela codificação da enzima HC-Toxina redutase, esta classe apresenta genes que codificam várias proteínas que desempenham funções distintas (GURANINE, 2012).

As funções dos domínios evidenciam a importância dos genes de resistência e, por esse motivo, tais genes são foco em estudos de pré-melhoramento. Contudo, a atividade de demais genes como os RR e os RP, que possuem efeito quantitativo, contribuem significativamente para uma resposta de defesa ampla e eficiente.

Os genes relacionados à resistência (RR) são encontrados em grandes quantidades em genótipos resistentes reduzindo a biomassa do patógeno e a gravidade da infecção por eles ocasionada. Os produtos dos genes RR são metabólitos ou proteínas que atuam diretamente na redução e no controle da doença (KUSHALAPPA, 2014).

As proteínas relacionadas à patogênese (RP) também tem sua importância na defesa da planta. Quando a ETI é ativada dá-se início a reação de hipersensibilidade, nesta resposta há a indução da produção de fitoalexinas e várias proteínas de defesa, como proteínas estruturais que contribuirão por reforçar a parede celular, enzimas do metabolismo secundário e as RPs (PASCHOALATI, 2008). Estas proteínas conferem resistência local e sistêmica às plantas após o reconhecimento do patógeno (SCHERER, 2012) e determinam a expressão de moléculas que atuam na defesa como compostos fenólicos, metabólitos secundários que atuam diretamente na inibição do patógeno, fitoalexinas além de muitas outras moléculas. As RPs possuem características peculiares como baixo pH (~2,8), são resistentes a enzimas proteolíticas, sua massa molecular está entre 8 e 50 kDa, são estáveis sob altas temperaturas (60 a 70 °C) e podem ser encontradas no vacúolo, na parede celular e nos apoplastos (STANGARLIN, 2011).

As proteínas RP podem ser categorizadas em 12 famílias de acordo com suas propriedades biológicas, bioquímicas, e de acordo com seus componentes estruturais e suas funções principais (Tabela 1).

Tabela 1. Famílias das proteínas relacionadas á patogênese, segundo Van Lonn et al., (1994).

Família	Membro	Propriedades	Referência
PR-1	PR-1 ^a /Fumo	Atividade Antifúngica	Antoniw et al.(1980)
PR-2	PR-2/Fumo	β -1,3-glucanases	Antoniw et al.(1980)
PR-3	P e Q/ Fumo	Quitinase	Van Lonn (1982)
PR-4	“R”/Fumo	Atividade Antifúngica	Van Lonn (1982)
PR-5	S/Fumo	Atividade Antifúngica	Van Lonn (1982)
PR-6	Inibidor I/ Tomate	Inibidor de protease	Green e Ryan (1972)
PR-7	P ₆₉ /Tomate	Endoprotease	Vera e Conejero (1988)
PR-8	Quitinase/Pepino	Quitinase/lisozima	Métraux et al.(1988)
PR-9	Peroxidase/Fumo	Peroxidase	Lagrimini etal. (1987)
PR-10	“PR1” de salsa	Similar a ribonuclease	Somssich et al. (1986)
PR-11	Quitinase V/Fumo	Quitinase/quitosanase	Melchers et al. (1994)

Fonte: Paschoalati,2008.

A família PR-1 compreendem as proteínas PR-1a, PR-1b e PR-1c, foi a primeira classe estudada estando presentes em folhas de fumo infectadas com vírus TMV (*Tabacco mosaic virus*). As PR-2 contêm proteínas com atividade de β -1,3-glucanases, enquanto que as famílias PR-3, PR-8 e PR-11 atuam realizando atividades de quitinase (PASCHOALATI, 2008). A família PR-4 engloba proteínas serologicamente relacionadas entre si, com características de massa molecular e localização celular específicas. A família PR-5 é composta por proteínas com características similares a proteínas taumatina, extraída do arbusto *Thaumatococcus danielli*. Esta categoria tem como peculiaridade o potencial de ação antifúngico (STANGARLIN, 2011). A família PR-6 incluem proteínas que inibem a ação de proteases. É uma família bastante extensa classificada em oito sub-famílias. A PR-7 é representada pela proteína P69, uma endoproteinase envolvidas na senescência da planta. A família PR-9 possui atividade de peroxidase e a PR-10 atua como ribonuclease, sendo encontrada em um grande número de vegetais como soja, aspargo, sorgo, feijão e ervilha (PASCHOALATI, 2008).

2.2 Marcadores moleculares na identificação de genes de resistência.

Marcadores moleculares são ferramentas da biologia molecular que permitem identificar a presença de sequências nucleotídicas específicas no genoma de uma espécie. O uso de marcadores é uma técnica prática e eficaz para ensaios em programas de melhoramento, auxiliando na escolha de progenitores, na identificação de genótipos, na conservação do germoplasma, em métodos de melhoramento como o retrocruzamento e na seleção assistida. Essa ferramenta tem ampla utilidade no pré-melhoramento, pois permite ao pesquisador selecionar indivíduos que possuam características de interesse, como por exemplo, a resistência à patógenos

Com base nos domínios conservados dos genes R é possível o isolamento e a clonagem de genes de resistência mediante uso de oligonucleotídeos degenerados específicos para regiões conservadas (SHEN, 1998; PALOMINO, 2006; SORIANO, 2006). Com base nisso surgiram os RGAs, sequências análogas a genes R que estão frequentemente ligadas aos genes de resistência, podendo atuar como marcador molecular. A associação entre RGA e gene R é um forte indicativo de que os RGAs são fontes de variação genética e podem vir a contribuir para a evolução de novos genes R e sua dispersão pelo genoma (GOMES, 2005).

A técnica de amplificação por marcadores RGAs vem sendo utilizado com sucesso em uma ampla gama de espécies tais como soja, amêndoa, uva, maçã (SORIANO, 2005) e batata (LEISTER et al.,1996). Confirmando a utilidade destes marcadores como ferramentas visando inferir sobre a presença dos genes de resistência nas plantas e caracterizá-las quanto ao seu padrão de resistência.

Além dos RGAs pode-se fazer a predição de genes de resistência por meio de marcadores do tipo SSR. Este marcador possui como característica sequências de nucleotídeos (dinucleotídeos, trinucleotídeos,etc) repetidas em *tandem* e estão amplamente distribuídos nos genomas de eucariotos. Genes que conferem resistência a determinados patógenos podem estar distribuídos em vários QTLs, logo, o uso de marcadores do tipo SSR próximos a QTLs permite a identificação destas regiões associadas a resistência (SANTANA, 2008).

2.3 Eucalipto e soja: culturas modelos para estudos de RGA

O gênero *Eucalyptus* spp pertence à família Myrtaceae e possui mais de 700 espécies descritas. Embora seja nativo da Austrália e de ilhas da Oceania, encontra-se disseminado em mais de 100 países dos seis continentes, sendo amplamente cultivados em países de clima tropical da América do Sul, África e Ásia. Isto se deve a características como: fácil adaptação, grande potencial para extração de água e nutriente do solo, rápido crescimento, alta diversidade e adaptabilidade (ALFENAS, 2012) e baixo custo de produção (SALVATIERRA, 2006).

Por seu potencial como matéria-prima *Eucalyptus* spp é amplamente empregado na indústria de papel, celulose, madeira, carvão, produção de óleos essenciais entre outros. Dentre as espécies mais plantadas nos países estão *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. saligna* e *E. urophylla*, além de híbrido resultantes do cruzamento entre *E. grandis* e *E. urophylla*. Recentemente o genoma da espécie *E. grandis* foi publicado (MYBURG et al. 2014), tornando esta espécie um modelo de plantas perenes vegetais para estudos moleculares.

Um fator limitante na produtividade que causa sérios prejuízos ao gênero é a suscetibilidade a uma grande diversidade de patógenos, sendo a notória a prevalência de fungos como agentes patogênicos. Dentre os fungos de maior importância que acometem o eucalipto está *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted (ROSADO, 2009). Este fungo causa danos às culturas do cacau, café, mangueira e seringueira (TAMURA, 2011). Atualmente está disseminado em vários estados do país como Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Maranhão e Pará (FERREIRA, 2009).

A doença causada pelo fungo, a murcha de *Ceratocystis*, apresenta sintomas como perda de coloração verde-escura da folhagem, seguida de murcha das folhas e conseqüente seca e morte da planta. Sendo caracterizado como um patógeno que ocupa o xilema, *C. fimbriata* pode levar a planta sofrer estresse hídrico, uma vez que impede o transporte de água e minerais para os órgãos da planta (ALFENAS et al., 2009)

Outra espécie de grande importância constantemente acometida por patógenos é a soja, *Glycine max* (L.) Merrill. A soja tem seu centro de origem

primário no continente asiático, mais precisamente na região da China Antiga, sendo que sua domesticação ocorreu na região chinesa da Manchúria, seu centro de origem secundário (CARUSO, 1997). A soja é uma espécie autógama, de ciclo anual e diploide, com $2n = 40$ cromossomos (CHUNG, 2008)

Os nematoides de cisto *Heterodera glycines* conhecidos como nematóide de cisto da soja (NCS) e os nematóides de galhas do gênero *Meloidogyne* spp estão entre os patógenos que mais causam danos à cultura (BENEVENT, 2013; DIAS, 2010; KANDOTH, 2011). O NCS é considerado o principal parasita da soja pelos prejuízos que causa e pela capacidade de dispersão (KANDOTH, 2011; KLINK, 2009). Este nematoide causa danos como: a redução da absorção de nutrientes e água, o nanismo, alterações na função do tecido vascular da raiz, redução da eficácia e do número de nódulos fixadores de nitrogênio, facilitação para novas doenças redução no porte e número de vagens, clorose e baixa produtividade. Além disto, o patógeno possui grande variedade de raças o que dificulta sua erradicação (DIAS et al., 2010).

A família Meloidogynidae é um grupo importante e abrange um grande número de espécies. Seus componentes são altamente adaptados aos hospedeiros, possuem uma ampla distribuição geográfica, (PASCHOALATI, 2008), fácil dispersão e ampla variedade de hospedeiros como o café, a soja, o tomate, a batata e a goiaba (DIAS et al., 2010). Estes nematoides formam galhas na raiz que privam as plantas de nutrientes e água, produção de raízes e tubérculos desfigurados, crescimento reduzido, nanismo, folhas pequenas de coloração amarelada e frutos de tamanho reduzido e murcha e falta de vigor das folhas (PASCHOALATI, 2008).

Os nematoides deste gênero tem ampla capacidade de sobreviver em ambientes hostis e grande potencial de disseminação, fatores que dificultam sua erradicação. Dessa forma *Meloidogyne* spp. são considerados ameaças a várias culturas de interesse econômico no Brasil. No caso da soja, a ameaça é ainda maior, pela cultura estar distribuída por quase todo o país (DIAS et al., 2010). Por ser uma das espécies anuais mais estudadas a soja pode ser considerada um modelo vegetal, uma vez que possui seu genoma mapeado e sequenciado, genes de resistência clonados e diferentes regiões genômicas associadas à resistência identificados.

3 OBJETIVO GERAL

Identificar fragmentos associados a resistência a *C. fimbriata* em genótipos de eucalipto e a *Heterodera glycines* e *Meloidogyne* spp no genoma de soja mediante uso de marcadores moleculares do tipo RGA. E realizar uma análise anatômica comparativa com os dados gerados por RGA em eucalipto com as avaliações anatômicas de raízes de cultivares comerciais.

Comparar dados de RGA referentes à ETI com informações de resistência a nematóides de cisto gerados por SSR associados a *QTLs* de resistência.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Ed 5. Elsevier Academic Press, 2005.

ALFENAS, A. C.; E. A. V. ZAUZA; R. G. MAFIA; T. F. ASSIS. Clonagem e doenças do eucalipto. 2a. Edição. Viçosa Editora UFV. 2009.

ALFENAS, A. C. ; GUIMARÃES, L. M. S.; RESENDE, M. D.V.; Genetic Basis of Resistance in *Eucalyptus* spp. Pathosystems. *Proceedings of the 4th International Workshop on Genetics of Host-Parasite Interactions in Forestry*

ARENA, G.D; **Análise de expressão gênica de *Arabidopsis thaliana* em respostas a *Citrus leprosis vírus C* e o seu vetor *Brevipalpus phoenics***. 2014. Dissertação de Mestrado- Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 2014.

BARI, R.; JONES, J. D.G.; Role of plant hormones in plant defense responses. **Plant Mol Biol**. v. 69, p.473–488. 2009.

BENEVENTI et al. Transcription profile of soybean-root-knot nematode interaction reveals a key role of phytohormones in the resistance reaction. **Biomed Central**. v. 14, 2013.

BENT, A.F. Plant Disease Resistance Genes: Function Meets Structure. **The Plant Cell**, Illinois, v. 8, p.1757-1771, 1996.

CARUSO, R. **Uma caminhada sem fim**. Ed. Fundação Cargill, 95p. 1997.

CHUNG G.; SINGH J. R.; Broadening the Genetic Base of Soybean: A Multidisciplinary Approach., **Plant Sciences**, p. 295-341, 2008.

DIAS, P. W. et. al. Reação de Genótipos de Soja a *Meloidogyne enterolobii* e *M. ethiopica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 34, p. 220-225, 2010.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS F. B. **Biotecnologia, estado da arte e aplicações na agropecuária**. Embrapa Cerrados. Planaltina, DF. 1 Ed. p 365 -376. 2011.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v.9, p.275-296, 1971.

GOMES, C.M.L. **Caracterização parcial de análogos de genes de resistência em duas espécies de Eucalipto**. 2005. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

GUO P. et al. Soybean Omics and Biotechnology in China. **Plant Omics Journal**, Beijing, n.6, p. 318-328, 2011.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C. P.; NOOKARAJU, A.; PANDEY, S. K.; PARK, S. W. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 51-65, 2012.

HAMMOND-KOSACK, K. E; JONES, J. D. H. Plant disease resistance genes. **Anu. Rev.Plant. Physiol.** v. 48, p.575 - 607, 1997.

JONES J. D.; DANGL J. L.; The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323–329, nov. 2006.

KANG, Y. J. et al. Genome-wide mapping of NBS-LRR genes and their association with disease resistance in soybean. **BMC Plant Biology**, n.12, v. 139, p. 1-13, 2012.

KANDOTH P. K. et al. The Soybean *Rhg1* Locus for Resistance to the Soybean Cyst Nematode *Heterodera glycines* Regulates the Expression of a Large Number of Stress- and Defense-Related Genes in Degenerating Feeding Cells1. **Plant Physiology**. v. 155, p. 1960–1975. 2011.

KAZAN, K.; LYONS, R. Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. **The Plant Cell**, v. 26, p. 2285 - 2309, 2014.

KLINK, V. P.; Matthews, F. B. Emerging Approaches to Broaden Resistance of Soybean to Soybean Cyst Nematode as Supported by Gene Expression Studies. **Plant Physiology**, v. 151, p. 1017–1022, nov. 2009.

KNOW, S.; YUN, H.S.; Plant Exocytic Secretion of Toxic Compounds for Defense. **Toxicol. Res.** v. 30, p. 77-81, 2014.

KUSHALAPPA, A.C.; GUNNAIAH, R. Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. **Trend in Plant Science**. v. 18, n.9, p. 522-531, 2013.

LAWRENCE JG, FINNEGAN EJ, AYLIFFE MA, ELLISAI JG. The L6 gene for flax rust resistance 1s related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene RPSP and the tobacco vira1 resistance gene N. **Plant Cell**, v.7, p.1195 - 1206, 1995

LEI, X.; YAO Q.; Xu X.; LIU, Y. Isolation and characterization of NBS–LRR resistance gene analogues from mango. **Biotechnology e Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 3, p. 417 - 424, 2014.

LEISTER, D. et al. A PCR-based approach for isolation pathogen resistance genes from potato whit potential for wide application in plants. **Nature Genetics**. v. 14, p. 421-429. 1996.

MYBURG A. A. et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v.510, p.556-562, jun.2014.

PAN, Q. et al. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucina rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and arabidopsis. **Genetics**. v.155,p.309-322. 2000.

PASCHOLATI, S. F. et al. **Interação planta-patógeno**, v.13, Piracicaba, SP.2008.

PALOMINO, C.; SATOVIC, Z.; CUBERO J.I.; TORRES, A. M. Identification and characterization of NBS–LRR class resistance gene analogs in faba bean (*Vicia faba* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Genome**, v. 49, p. 1227–1237, 2006.

ROSADO,C.C.G.; GUIMARÃES L. M. S.; TITON M.; LAU, D.; ROSSE, L.; RESENDE, M. D.V.; ALFENAS, A. C. Resistance to Ceratocystis Wilt (*Ceratocystis fimbriata*) in Parents and Progenies of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*

RONDE, D.; BUTTHERBACH, P. et al., Dominant resistance against plant virus. **Frontiers in Plant Science**, v.5, n. 307, p.1-7, jun. 2014.

SALVATIERRA, G. R. **Identificação de genes diferencialmente expressos em árvores de *Eucalyptus grandis* susceptíveis e resistentes a *Puccinia psidii***. 2006. Tese de Doutorado em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, São Paulo, 2006.

SANSEVERINO, W.; ERCOLANO, M. R. In silico approach to predict candidate R proteins and to define their domain architecture. **BMC research notes**. v. 5, n. 1, p. 678, 2012..

SANTANA F. A. **Seleção assistida e diversidade genética de fontes de resistência ao nematóide de cisto da soja**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) -Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008.

SCHERER, N. M. **Evolução molecular Darwiniana nas proteínas relacionadas à**

patogênese (PRs) em plantas. 2002. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2002.

SHEN K.A et al. Resistance Gene Candidates Identified by PCR with Degenerate Oligonucleotide Primers Map to Clusters of Resistance Genes in Lettuce. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p. 815-823, 1998.

SONG W. Y et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. **Science**, v. 270, p.1804-1806, 1995.

SORIANO J. M et al. Characterization and mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in apricot (*Prunus armeniaca* L.) **Theor Appl Genet**, v. 110, p.980-989, fev. 2005.

STANGARLIN, J. R et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, p 18-46, 2011.

SUZUKI, C. et al. Genetic relationships of soybean cyst nematode resistance originated in Gedenshirazu and PI84751 on *Rhg1* and *Rhg4* loci. **Breeding Science**. v. 61, p.602–607, 2012.

TAMURA, K. G. **Avaliação de resistência, análise epidemiológica e caracterização anatômica da madeira em clones de *Eucalyptus* sp. infectados por *Ceratocystis fimbriata*.** 2011. Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em Ciências florestal – Faculdade de ciências agronômicas da UNESP. Botucatu, São Paulo, 2011.

THAKUR M.; SOHAL, B. S.; Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. **ISRN Biochemistry**, p. 1-10, 2013.

THALER, J. S. et. Al. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. **Trends in Plant Science**. v. 17, n. 5, 2012.

ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C.; HARRINGTON, T. C.; SILVA, J. F. Resistance of *Eucalyptus* Clones to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, v. 88, n. 7, p. 758-760, jul. 2004.

WANG W, WEN Y, BERKEY R, XIAO S. Specific targeting of the Arabidopsis resistance protein RPW8.2 to the interfacial membrane encasing the fungal haustorium renders broad-spectrum resistance to powdery mildew. **Plant Cell**, v. 21, p. 2898- 2913, 2009.

WHITHAM et al. The *N* gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 8776-8781, 1994.

WILLIAMSON V. M.; Plant nematode resistance genes. Current. **Opinion in Plant Biology**. California, v. 2, p. 327–331, 1999.

WILLIAMSON, V. M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **TRENDS in Genetics**, v.22, n.7, p. 397 – 403, 2006.

CAPÍTULO I

Comparação molecular e anatômica de genótipos de *Eucalyptus* spp. resistentes e suscetíveis a *Ceratocystis fimbriata*

Resumo: O gênero *Eucalyptus* spp é severamente acometido por fungos da espécie *Ceratocystis fimbriata*. Tal microrganismo apresenta grande diversidade genética e agride genótipos de eucalipto ocasionando a murcha de *Ceratocystis*, responsável por grandes prejuízos econômicos para a cultura. Como estratégia para conter a infecção por patógenos do gênero tem-se utilizado cultivares resistentes. Tais cultivares possuem os genes R, responsáveis pela sinalização, reconhecimento e defesa contra patógenos. A prospecção destes genes em genótipos de eucalipto, bem como o entendimento da variabilidade existente entre genótipos é crucial para o avanço de programas de melhoramento. Aliado a isso, a identificação de estruturas anatômicas diferenciais nos genótipos é de relevância para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas respostas de defesa da planta ao fungo. Objetivou-se avaliar por meio de marcadores RGA e ISSR 22 genótipos de eucalipto resistentes e suscetíveis a *C. fimbriata*, e realizar análises anatômicas a fim de caracterizar a estrutura e composição das células e tecidos de raiz de diferentes cultivares de eucalipto. Pela análise de agrupamento por marcador RGA verificou-se a formação de grupos de genótipos resistentes e suscetíveis, confirmando a amplificação de sequências relacionadas à resistência ao patógeno. As análises com ISSR mostram diversidade intraespecífica. Os gráficos de *Heatmap* gerados mostraram bandas possivelmente amplificadas de genes de resistência a *C. fimbriata*, e sequências relacionadas à resistência a outros patógenos.

Palavras-Chaves: Melhoramento; Resistência genética; Diversidade genética; defesa vegetal; Anatomia de raiz

CHAPTER I

Molecular and anatomic comparison of resistant and susceptible genotypes of *Eucalyptus* spp. to *Ceratocystis fimbriata*

Abstract: The genus *Eucalyptus* spp is severely attacked by fungi of the species *Ceratocystis fimbriata*. This microorganism presents elevated genetic diversity and attacks eucalyptus genotypes causing the *Ceratocystis* wilt, which is responsible for large economic damages to the culture. As a strategy to contain the infection by pathogens of the genus, resistant cultivars have been used. These cultivars possess the R genes, responsible by the signalization, recognition and defense against pathogens. The prospection of these genes in eucalyptus genotypes, as well as the understanding of the variability existent between genotypes is crucial for the advance of breeding programs. In addition to it, the identification of differential anatomic structures in the genotypes has relevance for the comprehension of the mechanisms involved on the answers of defense of the plant to the fungus. It was aimed with the accomplishment of this work to evaluate 22 genotypes of eucalyptus resistant and susceptible to *C. fimbriata* using RGA and ISSR markers, and to carry out anatomic analysis aiming to characterize the structure and composition of cellules and tissues of root of different eucalyptus cultivars. By the cluster analysis using the RGA marker it was observed the formation of groups of resistant and susceptible genotypes, confirming the amplification of sequences related to the resistance to the pathogen. The analyses with ISSR show intraspecific diversity. The heatmap graphics showed possibly amplified bands of genes of resistance to *C. fimbriata* and sequences related to resistance to other pathogens.

Keywords: Breeding; Genetic resistance; Genetic diversity; vegetable defense; Root anatomy

1 INTRODUÇÃO

As plantas estão constantemente expostas a estresses bióticos ocasionados pelo ataque de fungos, bactérias, vírus e nematóides (MIEDES, 2014; THAKUR, 2013), que as colonizam e as utilizam como fonte de nutrientes (DANGL et al., 2013). A infecção por microorganismos patogênicos resulta em grandes prejuízos econômicos para várias culturas de importância econômica no mundo, como espécies do gênero *Eucalyptus* (ALFENAS, 2012).

O gênero *Eucalyptus* é constituído por árvores nativas da Austrália (BYRNE, 2008), que possuem alta diversidade e elevado potencial de adaptação em diferentes ambientes, o que contribuiu para sua distribuição em mais de 100 países dos seis continentes (MYBURG et al., 2014). No Brasil existem mais de 4,8 milhões de hectares cultivados com eucalipto, dados que refletem sua importância como matéria-prima para as indústrias de papel, celulose, energia renovável, produção de biomateriais, carvão e siderurgia (MYBURG et al, 2014; ABRAF, 2015). A espécie mais utilizada é *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, bem como seus híbridos interespecíficos, principalmente com a espécie *E. urophylla* (TUMURA, 2011).

O ataque do fungo *Ceratocystis fimbriata* é uma das grandes dificuldades que o gênero enfrenta (ALFENAS, 2012). A penetração do patógeno é feita por intermédio de insetos vetores, por feridas ou diretamente pela raiz, uma vez que o fungo está presente no solo. O crescimento deste fungo ocorre no câmbio vascular sendo considerado um patógeno típico do xilema (BAKER, 2004). A manifestação do parasita pode ser vista em cortes transversais dos órgãos lenhosos, onde se observa estrias radiais resultantes da oxidação e da polimerização de compostos fenólicos transportados. Dado isso, o fungo forma uma barreira nos vasos do xilema, resultando na murcha da planta (TUMURA, 2011). Os sintomas observados na planta envolvem perda de coloração verde-escura da folhagem, murcha das folhas e posterior morte da planta (FIRMINO, 2013).

Árvores perenes como o eucalipto apresentam, em sua maioria, resistência durável às doenças. Tal fato é explicado pela interação planta-patógeno, dado que o

ciclo de vida das plantas perenes é relativamente longo quando comparado ao da maioria dos patógenos (VELUTHAKKAL, 2010).

O sistema de defesa em plantas constitui-se de um mecanismo dinâmico que inclui um grande arcabouço de moléculas e estruturas envolvidas no reconhecimento, na sinalização e na defesa propriamente dita. Tal mecanismo pode ser dividido em respostas de defesa constitutivas e induzíveis (VELUTHAKKAL, 2010). A primeira linha de defesa das plantas é a defesa pré-formada ou constitutiva. Este sistema de defesa pode ser dividido em estrutural e bioquímico. A defesa estrutural é dada por adaptações das estruturas anatômicas pré-existentes na planta hospedeira, como a parede celular, estômatos, e pela presença de tricomas, cutícula e fibras que impedem e/ou dificultam o avanço do patógeno para o interior da planta. Em contrapartida a defesa bioquímica refere-se a produção de compostos como fitoantecipinas, terpenóides, dentre outros compostos tóxicos que são produzidos antes do contato da planta com o patógeno, com função de contenção do patógeno (PASCHOALATI, 2008; AGRIOS, 2005).

Apesar da defesa pré-formada ser eficiente na contenção do patógeno, em muitos casos ela não é suficiente. Com isso os vegetais desenvolveram um sistema de defesa mais complexo e dinâmico, a defesa pós-formada. Este mecanismo de defesa, dividido em estrutural e bioquímico, é ativado após o contato do patógeno com a planta. A defesa pós-formada é dependente do reconhecimento de estruturas oriundas dos patógenos (elicitors) por proteínas específicas nos hospedeiros. Este reconhecimento desencadeia um complexo de sinalização que resulta na ativação da defesa pós-formada. Dentre os fatores estruturais estão papilas, halos, lignificação, glicina, camadas de abscisão e camadas de cortiça (PASCHOALATI, 2008). Alguns destes componentes podem ser observados por meio de preparações anatômicas do material vegetal infectado utilizando a microscopia de luz. Na defesa bioquímica, a produção de fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (PR), espécies ativas de oxigênio e fitotoxinas fazem parte dos produtos envolvidos na resposta de defesa (AGRIOS, 2005).

A dinâmica de reconhecimento e sinalização dos elicitors foi proposta por Flor (1972) em sua teoria gene-a-gene. Nesta teoria, as proteínas elicitoras (Avr) são produzidas pelo gene de avirulência do patógeno (*avr*), estas interagem com o

receptor da planta, uma proteína codificada pelo gene de resistência (Gene R) do hospedeiro (FLOR, 1971). A interação entre os produtos dos genes *avr* e R leva à ativação de vias de transdução de sinais que culmina na resposta de resistência, que compreende também a resposta de hipersensibilidade (RH). A interação dos produtos dos genes R e *avr* é extremamente específicas e se justifica pela co-evolução planta-patógeno (MCDOWELL, 2003).

Dessa forma, o interesse nos genes R cresceu acentuadamente em programas de pré-melhoramento. Aliado a isso, o fato destes genes serem de caráter qualitativo (KUSHALAPPA, 2014) contribui para facilitar a prospecção e transferência para cultivares de alto desempenho agrônomico. Com isso muitos genes R de importância econômica tem sido clonados, como exemplo o gene *Mi-1* e *Hero A*, tendo como função conferir ampla resistência à várias espécies e raças de nematóides em tomate. Para *Eucalyptus* spp. foi identificado o gene *PPR1*, que codifica proteínas *avr* de defesa contra *Puccinia psidii*, um importante patógeno que afeta a cultura (VELUTHAKKA, 2010).

Os genes de resistência possuem em comum a presença de domínios conservados. Dentre os domínios mais comuns estão os domínios NBS (*Nucleotide Binding Site*) e LRR (*Leucine Rich Repeat*) (ELLIS, 1998; LALLI, 2005). Demais domínios como CC (*coiled coiled*), com função principal na interação proteína-proteína, e domínios TIR (*Toll-Interleukin Receptor*) envolvido na sinalização e interação intra e intermolecular também são reconhecidos. Os domínios constituem-se de motivos específicos altamente conservados. O domínio NBS possui os motivos P-loop, Kinase 2, Kinase 3 e GLPL. Tais motivos possuem funções específicas, como exemplo os motivos P-loop e Kinase 2 são considerados sítios de ligação de ATP (Adenosina trifosfato) e GTP (Guanosina trifosfato) (LEI, 2014).

A combinação dos domínios proteicos permite a formação de distintos grupos de genes R que se baseiam na organização destes e na localização das proteínas na célula. Estes domínios conservados permitem o isolamento dos genes R mediante o uso de técnicas de PCR e a clonagem de sequências análogas de genes de resistência (RGA - *Resistance Gene Analog*) (SHEN, 1996). Os RGAs são sequências análogas a genes R, que estão frequentemente ligadas aos gene de resistência, podendo atuar como um valioso marcador molecular. Sendo, portanto,

uma importante ferramenta na detecção de genes R (GOMES, 2005), diferindo dos polimorfismos ao acaso gerados por marcadores como os ISSR (*Inter Sequence Sample Repeat*) utilizados para avaliar diferenças genéticas neutras entre indivíduos e populações (CHRISTOPOULOS et al., 2010).

Neste contexto a identificação de marcadores moleculares e morfológicos relacionados à infecção de eucalipto por *C. fimbriata* é importante tanto para a identificação de genótipos resistentes, como para entender o mecanismo da resistência. Assim avaliamos a hipótese que os motivos P-loop, kinase 2, kinase 3 e GLPL podem gerar polimorfismos relacionadas a resistência ao patógeno; e que a anatomia da raiz de genótipos resistentes e suscetíveis possuem estruturas diferentes. Assim, com o propósito de identificar algumas destas diferenças foi proposto: 1) a identificação de fragmentos genômico relacionados à resistência, comparando genótipos resistentes e suscetíveis de eucalipto por marcadores RGAs e; 2) a análise comparativa da anatomia de raízes de genótipos resistentes e suscetíveis, visando inferir sobre estruturas envolvidas na linha de defesa primária. Além disto, a conservação das regiões RGAs foi avaliada pela comparação de dados com marcadores moleculares ISSR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram utilizados 22 genótipos de eucalipto (Tabela 1). Destes, sete clones de cultivares obtidos das empresas Ecomudas Ltda e Ducampo Ltda, dos quais quatro resistentes (E 1528, AEC 0144, BA7346, TP 631) e três suscetíveis (GG100, CO 1407, BA 6021) a *Ceratocystis fimbriata*, informações baseadas em dados de experimentos prévios; e 17 genótipos seminais oriundos de cultivo comercial de eucalipto localizado no município de Itaóca Pedra - ES, Brasil, os quais não tem registro confirmado de sua espécie, sendo classificados previamente como *E. grandis* de acordo com a morfologia analisada em campo, dados estes que serão validados. Os 17 genótipos foram classificados em resistentes ou suscetíveis mediante análise em campo da presença ou ausência dos sintomas da murcha de *Ceratocystis*.

Extração de DNA e análise de marcadores RGAs e ISSR

O DNA genômico dos genótipos foi extraído de folhas seguindo o protocolo Doyle e Doyle (1990). A concentração e pureza foram avaliadas por espectrômetro utilizando NanoDrop. Os *primers* RGAs utilizados foram confeccionados a partir do domínio NBS comuns entre os genes *N* de *Nicotiana Tabacum*, *RPS2* de *A. thaliana* e *L6* de *Linum usitatissimum*. As reações com os *primers* RGA foram feitas utilizando 16 combinações de *primers*: As1+As1; As1+As2; As1+As3; As2+As3; As2+F1; As3+F1; As1+s1; As2+s1; As3+s1; s2+s2; s2+LM637; s1+LM637; As1+LM6737; s2+LM637; As1+F1; s2+As3. Nas reações de avaliação de ISSR foram utilizados oito *primers* (Tabela 2).

Tabela 1. Identificação dos genótipos de eucalipto e relação com a doença ocasionada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata*.

Cultivar	Nome comum	Parentais	Registro	Mantenedor	Resposta à <i>C. fimbriata</i>
BA7346	Eucalipto	<i>E. grandis</i> W. Hill ex Maiden X <i>E. urophylla</i> S.	22573	Suzano Papel e Celulose e S. A.	R
E 1528	Super	<i>E. grandis</i> W. Hill ex Maiden X <i>E. urophylla</i> S.	-	Gerdal Aços Longos S. A.	R
TP 361	Eucalipto	<i>E. grandis</i> W. Hill ex Maiden X <i>E. urophylla</i> S.	22426	Tecnoplant Viveiro de Mudas Ltda	R
BA 6021	Eucalipto	<i>E. grandis</i> W. Hill ex Maiden X <i>E. urophylla</i> S.	21936	Suzano Papel e Celulose S. A.	S
AEC 0144	Eucalipto Vermelho	<i>E. urophylla</i> S. T. Blake	21874	Tecnoplant Viveiro de Mudas Ltda; Aperam Bioenergia Ltda; Gos Florestal Ltda; Minas Verde Mudas Florestais Ltda	R
CO 1407	Eucalipto/ Eucalipto Vermelho	<i>E. urophylla</i> S. T. Blake	25244	Copener Florestal Ltda	S
GG100	Eucalipto/ Eucalipto Vermelho	<i>E. urophylla</i> S. T. Blake	21277	Tecnoplant Viveiro de Mudas Ltda; Gerdal Aços Longos S. A.; Gos Florestal Ltda; Minas Verde Mudas Florestais Ltda	S

Continuação...

EUC1R	Eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	-	-	R
EUC2R	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	R
EUC3R	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	R
EUC4R	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	R
EUC5R	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	R
EUC20S	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	R
EUC7S	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	S
EUC8S	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	S
EUC9S	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	S
EUC10S	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	S
EUC11S	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	S
EUC14S	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	S
EUC17S	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	S
EUC18S	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	S
EUC19S	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	S
EUC21S	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	S
EUC15S	Eucalipto	<i>spp Eucalyptus</i>	-	-	S

EUC: Genótipos seminais coletados em Itaóca Pedra avaliados previamente como *E. grandis*. Dados a serem validadas. R: Resistência; S: suscetibilidade.

Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)

Tabela 2. *Primers* RGAs degenerados, utilizados para amplificar motivos do domínio NBS, e *primers* ISSR.

Primer RGA	Motivo	Sequência (5'- 3')
As1 ¹	GLPL	CCACGCTAGTGGCAATCC
As2 ¹	GLPL	IAAIGCIAGIGGIAAICC
As3 ¹	GLPL	IAGIGCIAGIGGIAGICC
LM 637 ²	P-loop	ARIGCTARIGGIARICC
F1 ¹	GLPL	GGAATGGGIGGIGTIGGIAARAC
S2 ¹	P-loop	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC
Primer ISSR		Sequência (5'- 3')
815		CTCTCTCTCTCTCTG
818		CACACACACACACAG
836		AGAGAGAGAGAGAGYA
849		GTGTGTGTGTGTGTGTYA
852		TCTCTCTCTCTCTCRA
859		TGTGTGTGTGTGTGTGRC
880		GGAGAGGAGAGGAGA
891		HVHTGTGTGTGTGTGTG

Codificação N: qualquer base (A+C+G+T); Y ou I: Pirimidina (C+T); R; Purina (A+G). ¹Liester et al. (1196). ²Kanazin et al. (1996). Sequencia peptídica dos domínios P-loop= GGV/IGKTT; GLPL= GLPLAL.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 45ng de DNA genômico, 0,4µM de cada *primer*, *Master Mix* 1X e 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas). Foi utilizado o termociclador [Veriti® 96-Well Applied Biosystems](#). O programa de amplificação utilizado para marcadores RGAs foi: 5 minutos de desnaturação a 94°C; seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, um minuto a 40 ° C e dois minutos a 72 °C; extensão final de 10 minutos a 72 °C. Para a amplificação de ISSR aplicou-se: 95°C por cinco minutos; seguidos de 35 ciclos a 94°C por dois minutos, anelamento a 50 °C por um minuto, extensão por 10 minutos a 72°C e uma etapa de extensão final à 72°C por sete minutos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados por meio de luz ultravioleta (UV). Para estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados foram utilizados marcadores de peso molecular de 1 kb.

Os polimorfismos gerados pelos marcadores RGA e ISSR foram convertidos em matriz de dados binários (presença ou ausência de banda). As análises

estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa R (versão: 3.2.1). A matriz de dissimilaridade foi realizada pelo método de coincidência simples. A visualização dos dados foi efetuada por *heatmap*. Utilizou-se o *software* R para as análises em *cluster*. Os 22 genótipos foram avaliados para marcadores RGAs e ISSR.

Anatomia da raiz

A análise da anatomia da raiz foi realizada em sete genótipos, sendo quatro resistentes (E 1528; TP 361; AEC 0144; BA7346) e três suscetíveis (GG100; CO 1407, BA 6021) ao fungo *C. fimbriata*. Mudanças de cada genótipo foram retiradas da casa de vegetação com aproximadamente 200 dias. As mudas tiveram suas raízes seccionadas na porção superior de suas raízes primárias (logo abaixo do coleto), e na porção mediana de raízes secundárias e terciárias. As amostras foram imediatamente fixadas em FAA 50 (formaldeído + ácido acético glacial + álcool 50 %) durante 48 horas, e conservadas em etanol 70%. As amostras foram desidratadas em série etílica ascendente (80%, 85%, 90%, 95%, e 100% de álcool etílico, com intervalos de 2 horas) (JOHANSEN, 1940). As amostras sofreram pré-infiltração em resina líquida (*Leica*®) e álcool etílico 100% (1:1) por 4 horas. Em seguida, foram submetidas à infiltração em resina ativada (resina + pó ativador) por 48 horas, sob temperatura de 4 °C. Para a inclusão o material vegetal foi posicionado em moldes, sendo adicionado resina ativada e endurecedor.

Com auxílio de micrótomo rotatório, foram realizados cortes histológicos a 5 µm de espessura. As amostras de raízes primárias foram seccionadas longitudinalmente, e as raízes secundárias e terciárias transversalmente. Os cortes foram corados com azul de toluidina 0,05% pH 4,7 e as lâminas montadas em glicerina (O' BRIEN et al., 1964). O azul de toluidina é um corante metacromático que cora as paredes lignificadas ou suberificadas em tom azul esverdeado; as paredes de constituição celulósica são coradas de tons róseo a roxo, e a lamela média em tom avermelhado.

Foram preparadas 200 lâminas com nove repetições por genótipo. As lâminas foram analisadas e fotodocumentadas com auxílio de microscópio de luz *Nikon Eclipse 80i*, com câmera acoplada DS Fi1C, utilizando o programa de captura *NIS-Elements F.3.0*, obtendo-se as imagens dos cortes histológicos. Para cada genótipo foram realizadas análises descritivas das seguintes estruturas anatômicas da raiz: composição da periderme (súber, felogênio e feloderme); câmbio vascular; distribuição dos elementos de vaso do xilema 1° e 2°; caracterização do parênquima; presença/ distribuição dos raios parenquimáticos; presença/ distribuição das fibras; presença/ distribuição de cristais, tiloses e espaços intercelulares.

3 RESULTADOS

Análises de marcadores RGAs e ISSR

Os oligonucleotídeos degenerados específicos para o domínio NBS permitiram a amplificação de 114 fragmentos no genoma de 22 genótipos de eucalipto. A média foi de 9,5 *amplicons* por par de *primer* com tamanho variando entre 100 e 3.000 pb. O maior número de *amplicons* (26) foi obtido com o *primer s2*.

O agrupamento UPGMA proporcionou a formação de cinco grupos a partir de dados de RGA (Figura 1A). Os genótipos seminais ficaram agrupados separadamente dos cultivares comerciais, formando quatro grupos constituídos de *E. grandis*. No grupo três (G3) genótipos seminais resistentes a *C. fimbriata* se agruparam formando um subgrupo particular (setas vermelhas). Enquanto que o grupo dois (G2) apresenta predominância de cultivares comerciais, salvo o genótipo EU7S que também se insere neste grupo.

Os clones comerciais BA7346 e TP 631 foram excluídos da análise de RGA por apresentarem-se muito divergentes dos demais genótipos e próximos entre eles, por terem amplificados poucos fragmentos em relação aos demais. Com isso, ao serem utilizados nos agrupamentos reduziram a divergência genética entre os demais genótipos analisados (Apêndice B).

Na análise comparativa foram utilizados oito *primers* ISSR que geraram 61 *amplicons*, com média de 7,6 *amplicons* por *primer*. O ISSR UBS 880 produziu o maior número de *amplicons*: dez. A porcentagem da diversidade entre genótipos foi maior com ISSR em relação aos RGA.

No agrupamento obtido por dados de ISSR (Figura 1B), observa-se a formação de três grupos. O primeiro contendo os genótipos seminais suscetíveis, o segundo grupo formado pela união entre clones (híbridos e *E. urophylla*) e alguns representantes de *E. grandis*, e no último grupo (G3) apenas genótipos seminais. O agrupamento obtido por dados de marcadores RGAs diferiu do observado com os dados ISSR. Para estes marcadores temos a formação de três grupos onde não há segregação em subgrupos dos genótipos resistentes e suscetíveis.

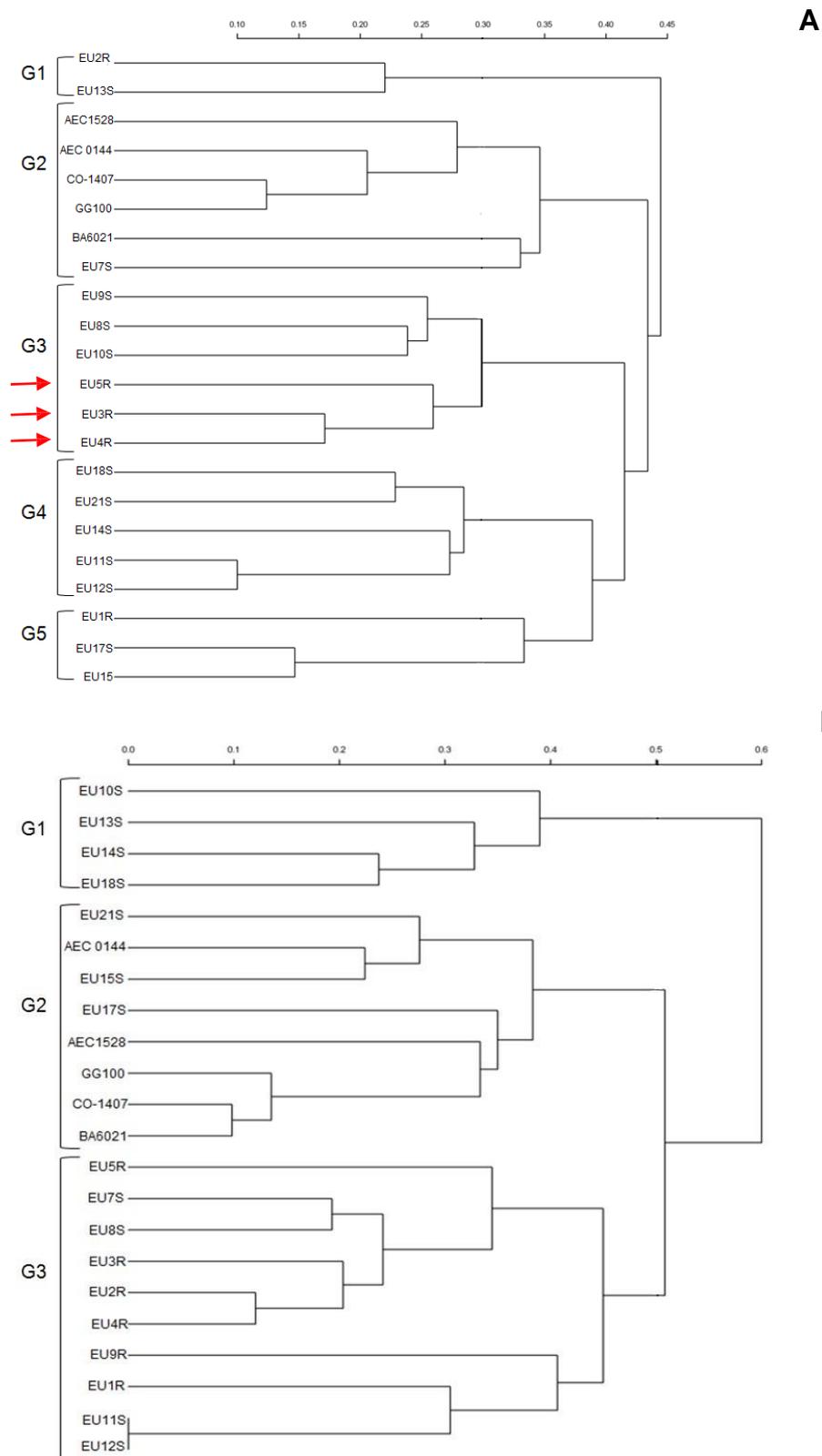


Figura 1. Dendrograma de agrupamento dos 22 genótipos de eucalipto. A) Agrupamento baseado em RGA. B) Agrupamento realizado mediante dados de ISSR.

Para visualizar fragmentos amplificados diferencialmente em genótipos resistentes e suscetíveis, foi gerado um gráfico de *heatmap* (Figura 2). O *amplicons* de RGAs apresentaram dois grandes padrões de amplificação diferindo pela quantidade de genótipos amplificados.

O primeiro grupo, com amplificação em maior quantidade de genótipos, pode ser dividido em quatro subgrupos. No terceiro subgrupo os *amplicons* s2+s2 e as1+as2 e as1+as3 amplificaram no grupo de genótipos dos clones comerciais (E 1528, AEC 0144, CO 1407, GG100, BA 6021) (setas amarelas); no quarto subgrupo, identificaram-se fragmentos específicos para os clones comerciais AEC 0144, CO 1407, GG100, BA 6021 formados pelos *primers*: as2+as3 e as2+LM637 (Setas cor laranja).

O segundo grupo é formado por *amplicons* com menor amplificação nos genótipos o qual foi subdividido em dois: o primeiro apresentou amplificação para os cinco cultivares comerciais (setas pretas); e boa amplificação de bandas específicas para genótipos seminais resistentes EU5R, EU3R, EU4R (setas vermelhas). O segundo subgrupo apresenta seis *amplicons* pouco específicos para os grupos de genótipos.

Os marcadores RGA e ISSR, apesar de abrangerem regiões genômicas distintas, formaram grupos similares quanto à composição de alguns genótipos. Ambos distinguiram genótipos seminais (*E. grandis*) dos clones, segregando-os. Da mesma forma os genótipos EU17S e EU15S para ambos os marcadores permanecem unidos, ora no grupo de genótipos suscetíveis, para o marcador RGA, ora no agrupamento de clones híbridos, para ISSR. Os genótipos EU5R, EU3R e EU4R prevalecem no mesmo agrupamento em ambos os marcadores. Tais informações confirmam a proximidade genética entre estes genótipos.

Os *amplicons* de 510 e 400 pb oriundos do ISSR 818 são relevantes na dissimilaridade entre clones e *E. grandis*. Ainda, as sequências de 500 e 550 pb amplificadas por estes mesmo *primer* são importantes na discriminação entre grupos de genótipos de *E. grandis*.

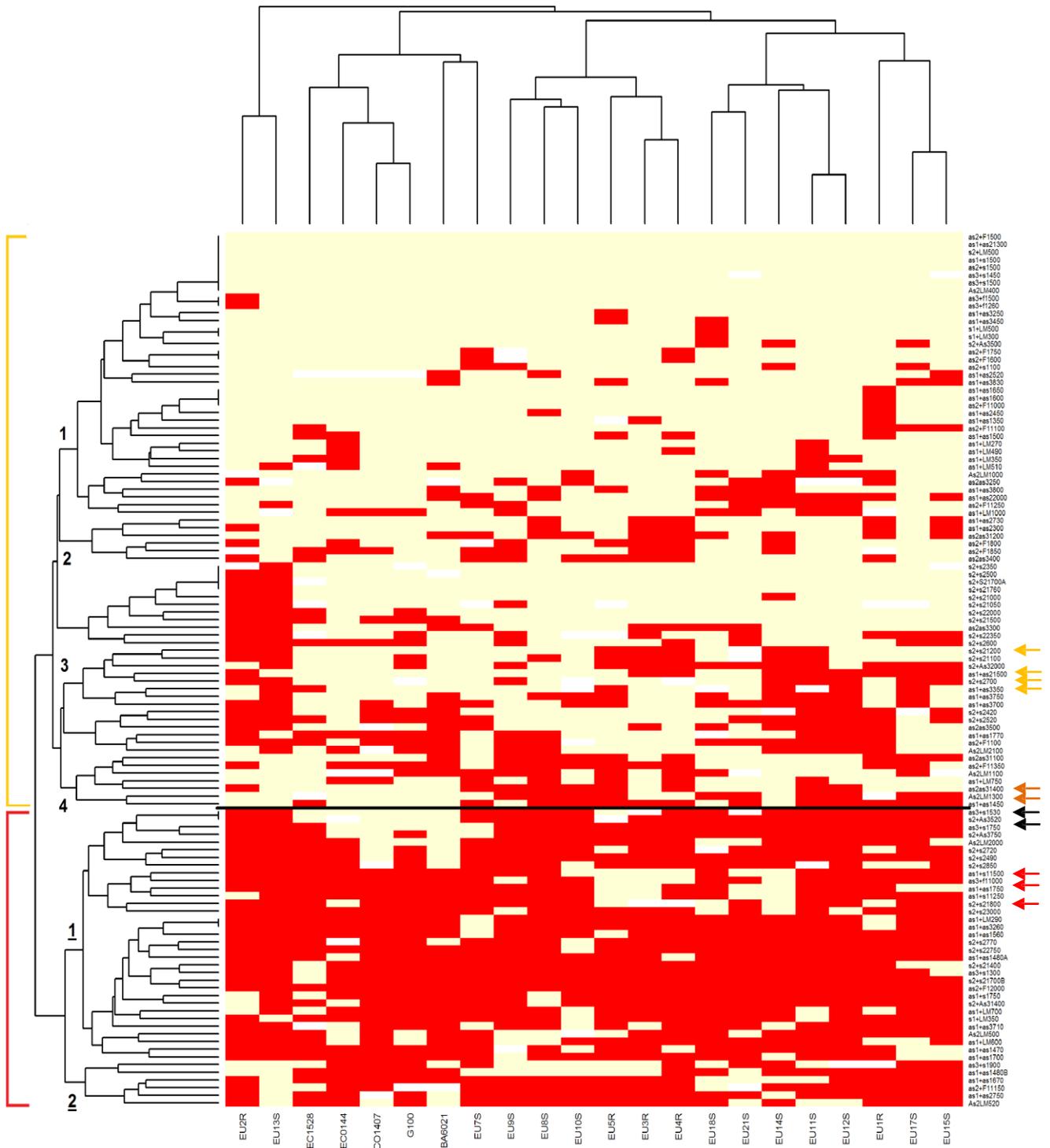


Figura 2. Heatmap gerado pelos amplicons obtidos das amplificações de 12 combinações de primers RGAs de 22 genótipos de eucalipto. Chave amarela: grupo um de amplicons; Chave vermelha: grupo 2. Numerais dentro das delimitações das chaves indicam subgrupos. Setas à direita indicam amplicons diferenciais para grupos de genótipos específicos.

Análises da Anatomia da raiz secundária

Baseado nas imagens de cortes longitudinais de raiz primária, e cortes transversais de raízes secundárias, analisadas sob microscópio de luz, pode-se realizar a análise descritiva de 11 características estruturais de quatro genótipos resistentes e três suscetíveis de eucalipto (Quadro 3).

A princípio, dentre os genótipos resistentes, E 1528 apresenta como característica particular o proeminente câmbio vascular e a abundante formação de cristais (Figura 5 a, b, o, p). Enquanto o cultivar AEC 0144 apresenta pouca lignificação de suas células parenquimáticas (Figura 4 c, d, q).

O genótipo resistente BA7346 mostra células parenquimáticas bastante lignificadas e abundância de fibras (Figura 3 e, f, r). TP 631, assim como BA7346, mostra células parenquimáticas bastante lignificadas e, além disso, um câmbio vascular discreto e raios parenquimáticos com terminações às margens do xilema secundário (Figura 3 g, s, t, u).

CO 1407 apresenta como peculiaridade o câmbio vascular menos evidente, a presença de células parenquimáticas de conteúdo celular coradas em torno dos vasos do xilema secundário e tiloses, estrutura especialmente presente neste genótipo (Figura 3 h, i, v e w).

Dentre os genótipos suscetíveis BA 6021 possui como característica raios parenquimáticos com terminações próximas aos elementos de vasos do xilema secundário, e abundância de cristais (3 j, k, l, y, z). O cultivar GG100 mostra pouca lignificação das células parenquimáticas e ocorrência de cristais (Figura 3 m, n, aa, ab, ac, ad).

Quadro 1. Resumo da análise descritiva da anatomia de raiz de sete genótipos de eucalipto.

Parâmetro		Genótipos resistentes			
		E1528 (Super)	AEC0144	BA7346	TP631
Periderme	Súber	Não visualizado	Presente	Presente	Presente
	Felogênio	Não visualizado	Não visualizado	Não visualizado	Não visualizado
	Feloderm e	10 camadas de células medianamente lignificadas	10 camadas de células Pouco lignificados	Aproximadamente 10 camadas de células bastante lignificados	Aproximadamente seis camadas de células. bastante lignificados
Câmbio vascular		Presente - seis camadas de células	Presente - quatro a cinco camadas de células	Presente - quatro a cinco camadas de células.	Presente – discreto com ~ quatro camadas de células
Sistema Vascular	Floema	Presente	Presente	Presente	Presente
	Xilema	Elementos de vaso bem distribuídos com tamanhos irregulares	Elementos =. posicionados às margens do câmbio vascular	Os elementos de vasos do xilema dispersos	Xilema bem distribuído. Elementos de vasos de diferentes diâmetros
Raios parenquimáticos		Presentes - atingem a porção central. Lignificação mediana	Presentes - atingem a porção central. Lignificação mediana	Presente atingem a porção central - bastante lignificado	Presente - terminam nos xilema primário. Lignificação mediana
Cristais		Presentes e abundantes	Presentes	Presentes	Presentes, embora raros
Fibras		Presentes	Presente	Presente e Abundância	Presentes
Células parenquimáticas coradas no xilema (*)		Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Espaços intercelulares		Presentes	Presentes	Ausentes	Ausentes
Tiloses		Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes

Parâmetro		Genótipos suscetíveis		
		BA6021	GG100	CO 1407
Periderme	Súber	Presente	Presente	Presente
	Felogênio	Não visualizado	Não visualizado	Não visualizado
	Feloderm e	Células parenquimáticas de formato arredondado e achatado. Lignificação mediana	Células parenquimáticas pouco lignificado	Aproximadamente 10 camadas de células. Lignificação mediana.
Câmbio vascular		Cinco camadas de células	Seis camadas de células	Ligeiramente menor, com quatro a cinco camadas de células.
Sistema Vascular	Floema	Presente	Presente	Presente
	Xilema	Elementos de vaso abundantes e bem distribuídos, de diâmetro grande	Elementos de vaso abundantes e bem distribuídos	Elementos de vaso de abundância média
Raios parenquimáticos		Presentes - bem distribuídos e atravessam da feloderme à margem dos elementos de vaso do xilema secundário. Lignificação mediana	Presentes - atingem a porção central, bem distribuídos, pouco lignificados.	Presentes - atravessam toda a raiz e terminam na porção central (células achatadas).
Cristais		Presentes e abundantes	Presentes	Presentes
Fibras		Presentes	Presentes	Presentes
Células parenquimáticas no xilema		Ausentes	Presentes	Presentes
Espaços intercelulares		Ausentes	Ausentes	Ausentes
Tiloses		Ausentes	Ausentes	Presentes

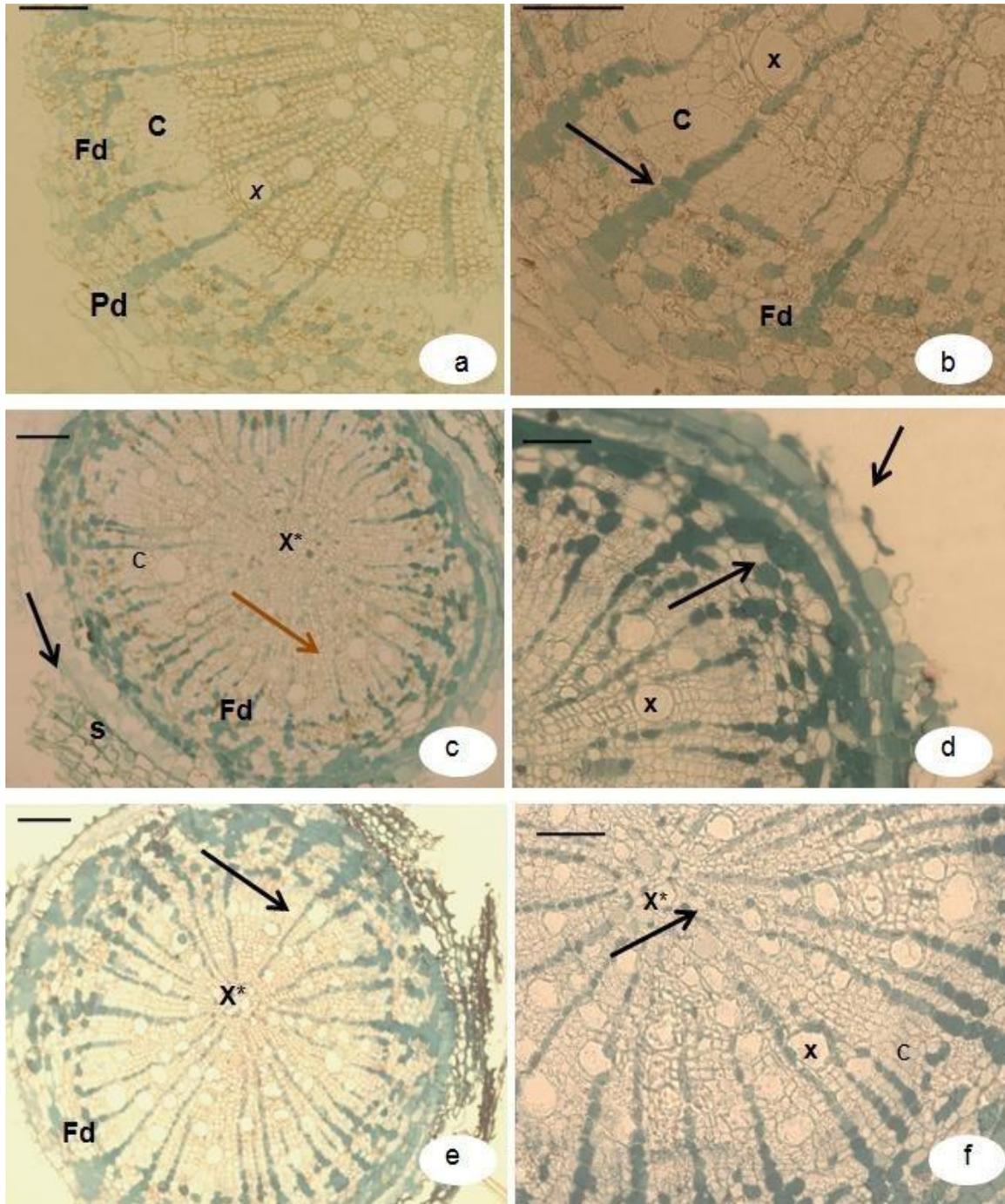


Figura 3. a-f – Secções transversais de raiz secundária de genótipos de eucalipto: a) Cultivar E 1528. Pd: Periderme; Fd: Feloderme; C: Câmbio; X: Xilema; X*: Xilema secundário. 10 μ m; b) Cultivar E 1528. Seta indicando raio parenquimático. 20 μ m; c) Cultivar AEC 0144. S: Súber. Seta preta indica a região do súber Seta vermelha indicando a porção terminal do raio parenquimático. 4 μ m; d) Cultivar AEC 0144. Seta no interior indicando células parenquimáticas e seta no exterior indicando súber. 10 μ m; e) Cultivar BA 7346. Seta indicando raios parenquimáticos longos. Xilema secundário e feloderme diferenciados. 4 μ m; f) Cultivar BA 7346. Elementos de vaso do xilema secundário em evidência. 10 μ m.

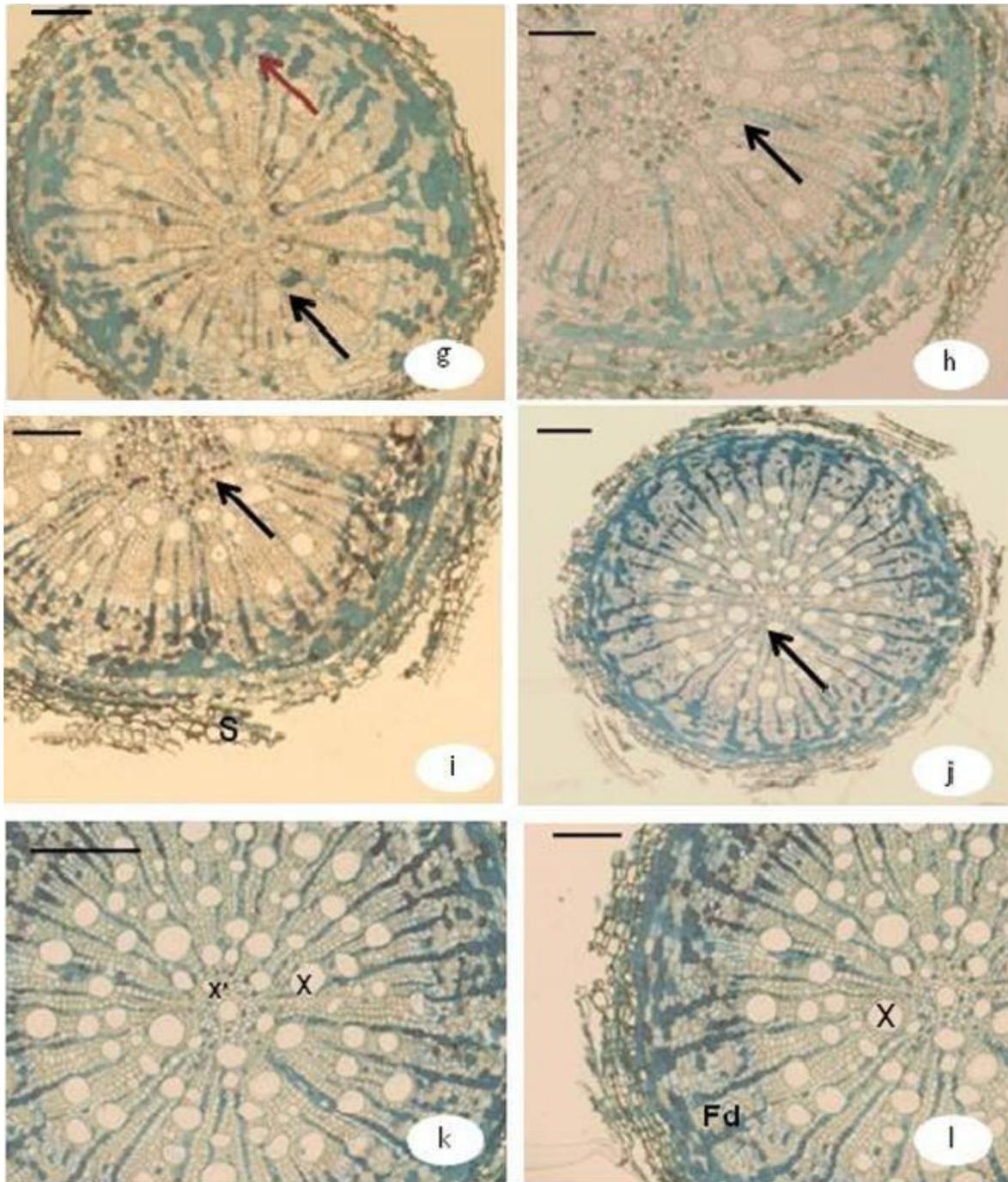


Figura 3. g-l – Secções transversais de raiz secundária de genótipos de eucalipto: g) Cultivar TP 631. Seta indicando a porção terminal dos raios parenquimáticos. Seta vermelha mostra câmbio discreto. 4 μm; h) Cultivar CO 1407. Seta preta indicando elemento de vaso do xilema com conteúdo celular. 10 μm; i). Cultivar CO 1407. Seta indicando região central do xilema apresentando células com conteúdo celular corado. S: Súber. 10 μm; j) Cultivar BA 6021. Elementos de vasos do xilema, e vasos de grande calibre. Seta indicando raios parenquimáticos. 4 μm; k) Cultivar BA 6021. Xilema primário (X) e secundário(X*) evidentes 20 μm; l) Cultivar BA 6021. X*: Xilema secundário; Fd: Feloderme. 10 μm.

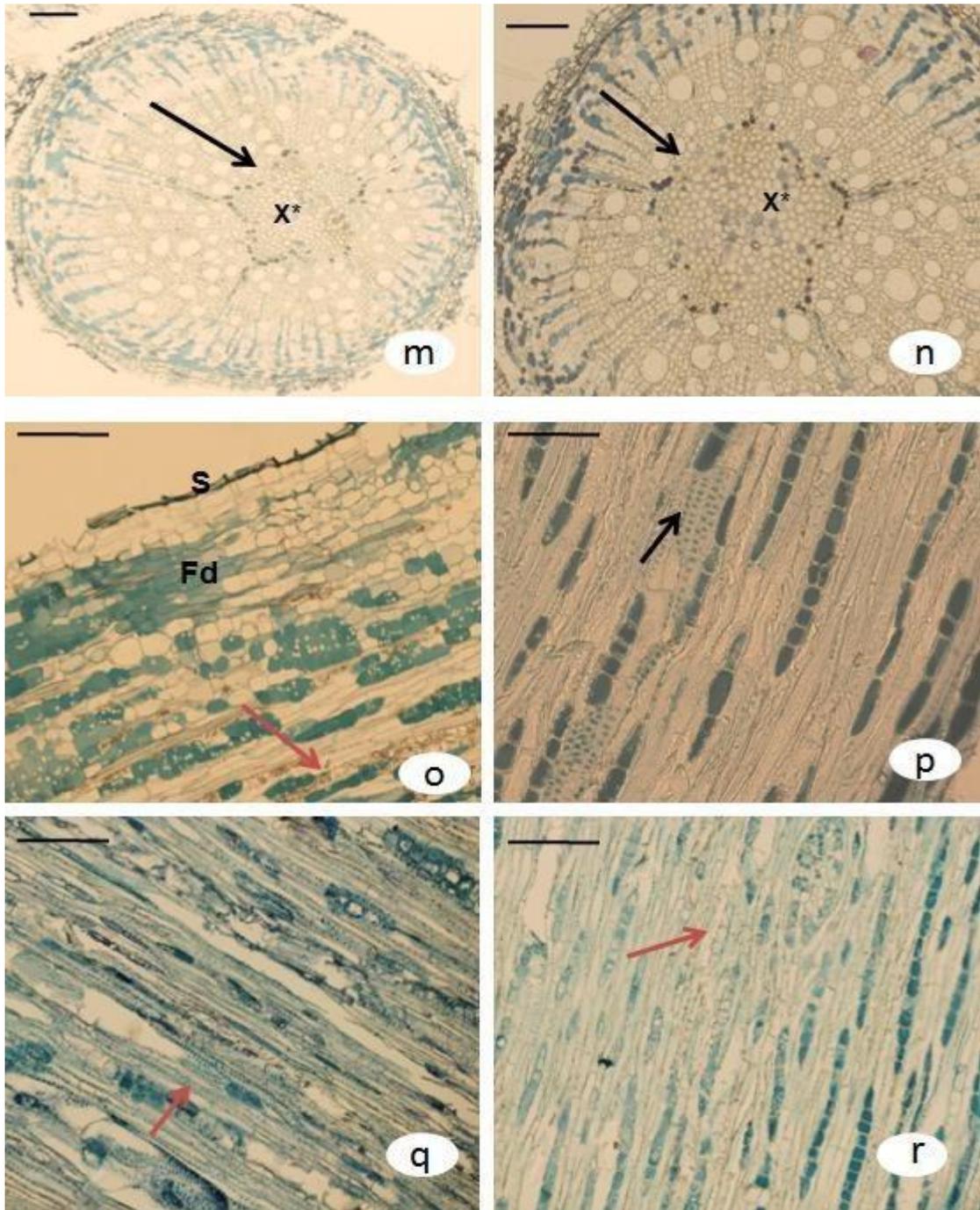


Figura 3. m-n – Secções transversais de raiz secundária de genótipos de eucalipto: m) Cultivar GG100. Seta indicando região central do xilema apresentando células com conteúdo celular corado. 4 μ m; n) Cultivar GG100. Transição entre Xilema primário e secundário evidente. X: Xilema; X*: Xilema secundário. 10 μ m; **Figura 3 o-r** - Secções longitudinais de raiz primária de genótipos de eucalipto: o) Cultivar E 1528. S: súber; Fd: feloderme. Seta vermelha indicando a presença de inclusões celulares (cristais). 20 μ m; p) Cultivar E 1528. Seta indica pontuações dos elementos de tubo crivado. 20 μ m; q) Cultivar AEC 0144. Seta vermelha indicando fibras na região do xilema. 20 μ m; r) Cultivar BA7346. Seta indicando fibras. 20 μ m.

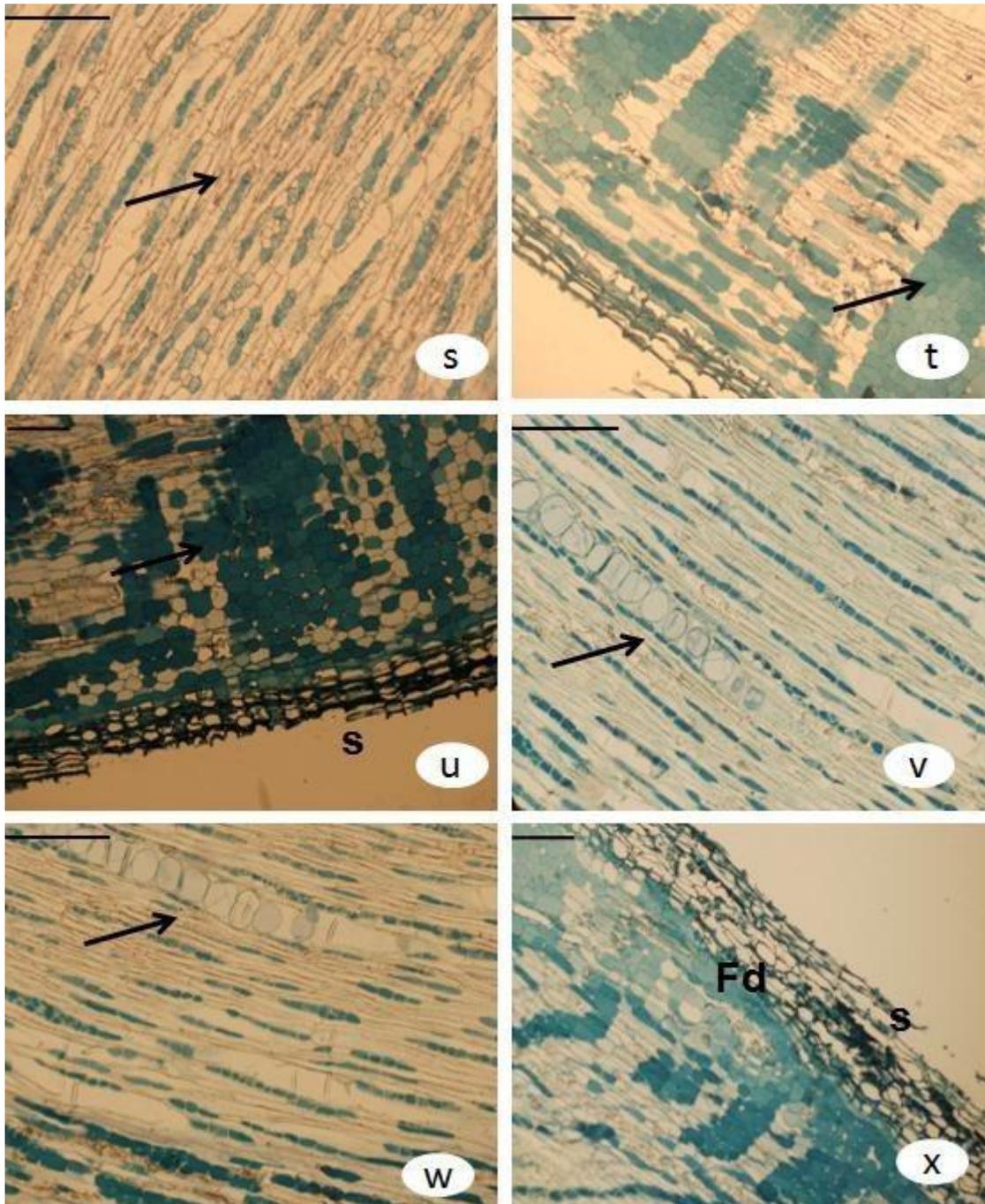


Figura 3. s-x - Secções longitudinais de raiz primária de genótipos de eucalipto: s) Cultivar TP631. Seta preta indicando fibra. 20 μm ; t) Cultivar TP631. Seta indicando células parenquimáticas. 10 μm ; u) Cultivar TP631. Seta indicando células parenquimáticas. S: súber. 10 μm ; v) Cultivar 1407. Seta indicando tilose. 20 μm ; w) Cultivar 1407. Seta indicando tiloses. 20 μm ; x) Cultivar 1407. Fd: Feloderme. S: súber. 10 μm .

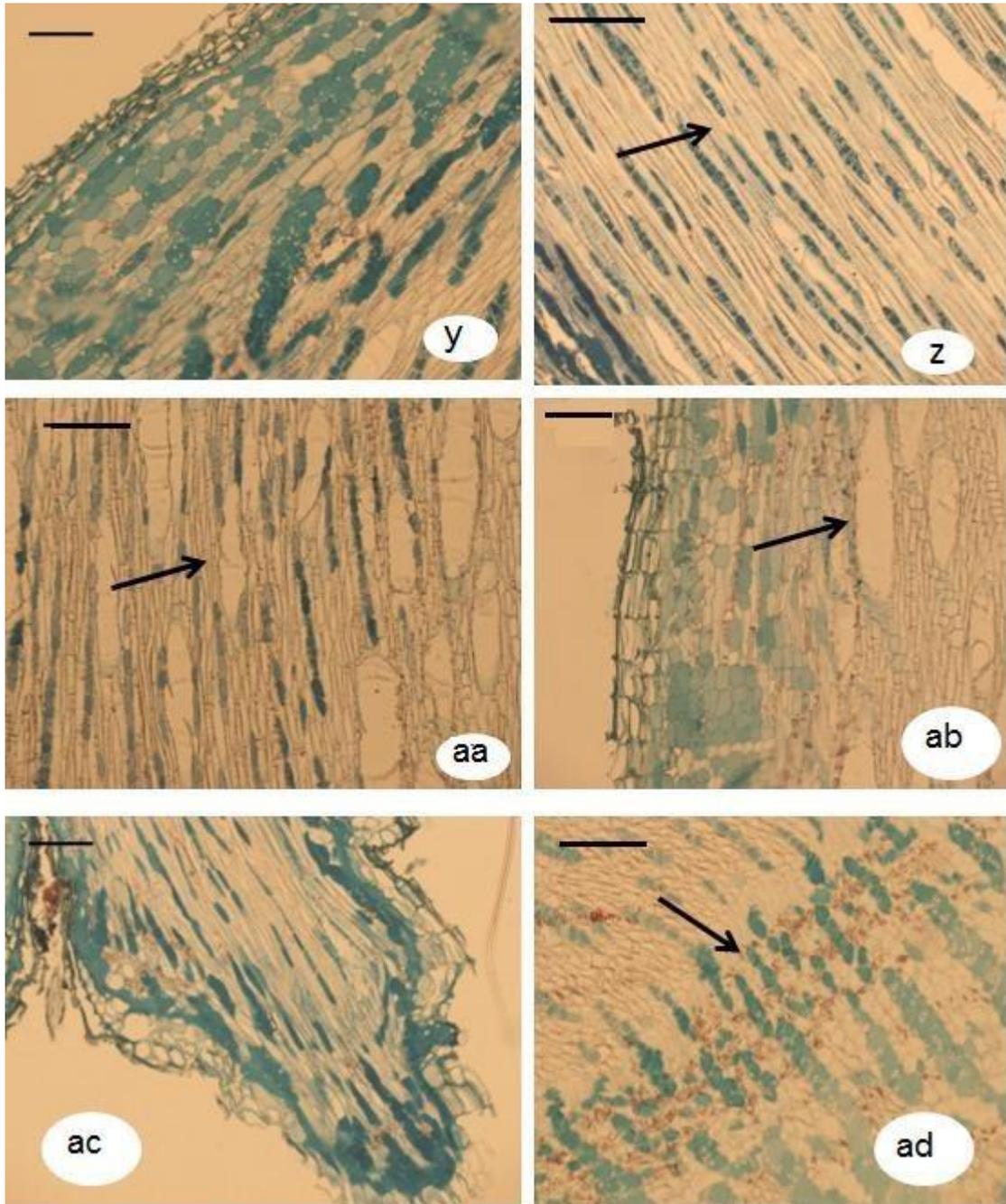


Figura 3. y- ad - Secções longitudinais de raiz secundária de genótipos de eucalipto: **y)** BA 6021. Pd: periderme. Seta indicando inclusões celulares (cristais). 10 μ m; **z)** BA 6021. Seta preta indica fibras na região do xilema. 10 μ m; **aa)** GG100. Seta indica vaso do xilema. **ab)** GG100. X: xilema; Pd: periderme. 10 μ m. **ac)** GG100 – detalhe da emissão de uma raiz lateral. 10 μ m; **ad)** GG100 – seta indicando a presença de inclusões celulares (cristais). 20 μ m.

4 DISCUSSÃO

Marcadores RGA e ISSR

Plantas superiores apresentam abundância de genes R, em especial os genes representativos da família NBS-LRR que conferem resistência específica na ETI (SILVA, 2005). Neste trabalho os genótipos resistentes apresentaram bandas diferenciais provenientes do domínio NBS que permitiu identifica-los, em grupos ou isoladamente em relação aos suscetíveis, fato que não ocorreu com a utilização de marcadores ISSR, neutros, portanto não conservados e não expressos (CHRISTOPOULOS et al., 2010) indicando que o domínio NBS tem ligação com a resistência ao *C. fimbriata*.

O agrupamento dos genótipos a partir de RGAs revelou uma clara distinção entre genótipos híbridos interespecíficos (*E. grandis* e *E. urophylla*) e *E. urophylla* em relação a *E. grandis*, sugerindo que as regiões amplificadas de NBS tenham sido provenientes de *E. urophylla*, uma vez que tem se relatado resistência moderada a esta espécie e suscetibilidade a *E. grandis* ao fungo (FIRMINO, 2013). Portanto, é possível que genes de resistência encontrados em *E. urophylla* tenham sido transferidos ao híbrido o que levou a união de E1528 neste grupo. Concomitante a isso, genótipos suscetíveis como CO 1407 e o GG100 uniram-se neste mesmo grupo devido a amplificação de demais fragmentos oriundos de NBS e específicos de *E. urophylla*. Apesar destes dois genótipos suscetíveis de *urophylla* tenham apresentado grande proximidade, o genótipo resistente AEC 0144, *E. urophylla*, foi mais divergente ficando próximo de E 1528.

A formação de um grupo representado, em sua maioria, por genótipos híbridos e da espécie *E. urophylla* indica que marcadores RGAs amplificaram para estes genótipos maior quantidade de fragmentos em comum, devido provavelmente a maior similaridade entre os híbridos com o parental *E. urophylla* quando analisados sob o caráter resistência. Dentro do grupo dois (G2, Figura 1A), existe uma proximidade entre os genótipos suscetíveis BA 6021 (híbrido), CO 1407 (*E. urophylla*) e GG100 (*E. urophylla*), fator que indica maior similaridade de BA 6021 com o parental *E. urophylla* que com o parental *E. grandis*.

As análises de ISSR mostraram a formação de dois grupos de genótipos da espécie de *E. grandis* alocados em extremidades apostas do agrupamento, o que reflete a variabilidade existente no campo de coleta. Dado que as plantas são de origem seminal e eucalipto é uma espécie alógama este resultado é esperado, uma vez que a recombinação amplia a variabilidade genética (MORRA, 2012), que podem ser refletidas na formação dos grupos.

Na análise comparativa de regiões neutras no DNA por ISSR, alguns genótipos de *E. grandis* ficaram alocados no mesmo grupo que os híbridos de *E. urophylla*. O caráter neutro deste marcador, portanto não conservado explica este agrupamento, uma vez que as duas espécies tem a mesma contribuição para a formação dos híbridos. A análise de diversidade dos 22 genótipos de eucalipto por meio de marcadores RGAs coincide com dados de parentesco, onde genótipos híbridos e da espécie *E. urophylla* agrupam-se separadamente de grupos de genótipos de *E. grandis* (coletados), a exceção de EU21S e EU17S e EU15S que se agruparam juntamente com os clones.

A presença de grupos mistos de genótipos resistentes e suscetíveis no agrupamento por RGA, como exemplo, EU1R, EU17S e EU15S, pode estar relacionado ao fato de outras regiões NBS não relacionadas à resistência terem sido acessadas, isso por que no genoma de eucalipto foram identificadas muitos *clusters* de domínios NBS associados a resistência a muitos patógenos (SILVA, 2005). Outra possibilidade é que a avaliação da resistência a campo pode estar sujeita a escapes, que é comum no caso da doença, no qual os genótipos não apresentam os sintomas de murcha, ou o apresenta tardiamente (TUMURA, 2011; ZAUZA, 2004), isto pode levar a classificação errônea deste genótipo com base numa observação do fenótipo, considerando-o resistentes. No escape a infecção pode não ter sido expressa devido a condições de crescimento na planta, idade, clima, dentre outros fatores (FIRMINO, 2010). A reação assintomática de alguns genótipos é um grande problema para a silvicultura, uma vez que a disseminação de genótipos erroneamente resistentes pode ocorrer devido a não manifestação dos sintomas. Desta forma levanta-se a hipótese de que os genótipos EUR1 não seja de fato resistente, sugerindo que, para este, sejam feitas avaliações mais precisas sobre sua resistência ao fungo a fim de evitar sua disseminação em lavouras de eucalipto.

Outra hipótese a ser questionada é a elevada diversidade inter e intraespecífica para resistência à murcha de *Ceratocystis* (ZAUZA et al., 2004) que pode ter contribuído para a alocação do genótipo neste grupo.

A melhor estratégia de controle da doença é o uso de genótipos resistentes, desta forma, é imprescindível uma metodologia segura de análise, uma vez que o plantio de genótipos suscetíveis pode levar a perdas significativas de produção (ALFENAS et al., 2004). Assim, o desenvolvimento de marcadores que possam indicar genótipos resistentes, pode ajudar a reduzir estes erros.

A base genética da resistência à murcha de *Ceratocystis* não é completamente elucidada. Trabalhos baseados em análises fenotípicas sugerem uma grande variabilidade genética para a resistência ao fungo em genótipos de eucalipto (ROSADO, 2009). Em adição, é relatado grande diversidade genética entre isolados de *Ceratocystis fimbriata*, o que resulta em diferentes graus de agressividade do fungo para com os genótipos (ZAUZA, 2004). Tais fatores, revelam complexidade da resistência a este patógeno. O caráter de resistência ao *C. fimbriata* tem sido relatado como oligogênico, ou seja controlado por um pequeno número de genes (ROSADO, 2009).

As análises em *heatmap* mostraram que um grande número de combinações de *primers* RGAs abrangeram fragmentos comuns em genótipos resistentes e suscetíveis. Tais *amplicons* possivelmente são sequências referentes a domínios NBS de genes envolvidos na resistência a outros patógenos ou com outras funções, uma vez que este domínio é amplamente encontrado no genoma de eucalipto (SILVA, 2005) para diferentes funções, o que é confirmado por Silva (2005), que relata a presença de cinco classes de genes R identificados *in silico*, sendo que 50% destes apresentam os domínios NBS-LRR.

Neste trabalho, utilizando RGAs dos motivos P-loop e GLPL do domínio NBS, foram identificados *amplicons* diferenciais nos 22 genótipos de eucalipto resistentes e suscetíveis. tanto os *primers* baseados no motivo P-loop quanto os GLPL forma importantes em discriminar genótipos resistentes e suscetíveis.

A presença de *amplicons* específicos em híbridos e *E. urophylla* (comerciais), (s2+s2_1200pb, s2+s2_700pb, as1+as2_1500pb e as1+as3_350pb), refletem a origem destes fragmentos de *E. urophylla*.

O motivo GLPL (*amplicon* de 1400pb amplificado por as2+as3) e, GLPL+P-loop (*amplicon* de 1300pb obtido por As2+LM637) está presente diferencialmente em genótipos suscetíveis, CO- 1407, GG100, BA 6021, além do híbrido AEC 0144 e ausente em *E grandis*. O isolamento e sequenciamento destes fragmentos é uma estratégia promissora para futuras investigações sobre a base genética do mecanismo de resistência e suscetibilidade ao patógeno.

A baixa amplificação da região NBS nos híbridos BA7346 e TP 361, e falta de especificidade de bandas relacionadas a resistência indica que para estes genótipos outros motivos deste domínio ou outros domínios de resistência podem estar envolvidos na resposta de resistência, isso é confirmado por Velutakkal (2010), em que relata a identificação de grande número de classes de genes R em eucalipto.

Bandas diferenciais entre genótipos resistentes e suscetíveis não foram encontradas com base em ISSR, destacando o caráter neutras das sequencias.

Análise prospectiva de marcadores morfológicos de anatomia da raiz

Diferente das respostas específicas a um patógeno baseadas de genes R, caracteres de resistência constitutiva e de defesa primária das plantas a uma ampla gama de patógenos envolvem estruturas anatômicas, que impedem fisicamente a penetração e possível infecção por patógenos (PASCHOALATI, 2008). No caso de *C. fimbriata* a avaliação de anatomia de raiz é importante, pois o fungo é de solo (MAFIA, 2004) sendo assim este órgão é porta de entrada o hospedeiro, de tal forma, é o órgão que recebe grande reforço contra a penetração do patógeno (BAKER, 2004).

Assim há relatos que genótipos resistentes e suscetíveis têm por característica apresentar distinção nas estruturas anatômicas. Características anatômicas indicativas de qualidade, resistência podem ser: disposição e forma das células; quantidade de fibras; espessura da parede celular; número de elementos de vaso, tiloses, cera e lignificação. Além disto, estas características são consideradas muitas vezes características intrínsecas de determinados genótipos (SILVA, 2005).

Nas análises anatômicas das raízes dos sete genótipos foi possível identificar particularidades entre os genótipos. Neste trabalho os genótipos resistentes apresentaram pelo menos uma característica de raiz relacionada à resistência a patógeno.

Uma característica geral foi a presença de feloderme, observada em todos os genótipos. Assim, nos diferentes genótipos observou-se variação na feloderme quanto ao número de camadas de células e sua coloração (lignificação), o que está relacionado à maior atividade do felogênio, maior espessura da casca, e/ou maior crescimento em diâmetro da raiz (Apêndice A).

A feloderme é formada por células parenquimáticas, sendo um tecido característico de plantas de crescimento secundário. Tecidos parenquimáticos podem conferir resistência contra patógenos devido a sua organização e características das células (SILVA, 2005). A maioria dos genótipos apresentaram cerca de 10 camadas de células parenquimáticas na feloderme, a exceção de TP631 (resistente), com aproximadamente seis camadas. Esta característica pode ser particular do genótipo ou um caracter relacionado a resistência.

O felogênio é o meristema secundário responsável pela produção do súber (externamente) e da feloderme (internamente), visualizados nas lâminas dos sete genótipos (APEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006). Juntos, súber e feloderme constituem a periderme, uma importante estrutura envolvida proteção contra a infecção por agentes patogênicos. Da mesma forma as células apresentaram conformação arredondada, ovalada ou achatada nos diferentes genótipos. A densidade das células parenquimáticas da feloderme não teve distinção entre os genótipos, indicando que para este quesito, os genótipos não possuem vantagens contra o patógeno.

Entretanto, os cultivares BA7346 e TP631, resistentes e mais divergentes nas análises de RGA, apresentaram coloração em azul mais intenso das células parenquimáticas e dos raios parenquimáticos que pode ser atribuída à deposição de substâncias como a lignina, o que indica ser um colaborador na resistência contra patógenos para estes genótipos. Para o genótipo BA7346 observou-se a coloração evidente até mesmo de elementos de vaso. A lignina depositada sobre as células é uma das barreiras impostas aos patógenos impedindo sua colonização, uma vez

que aumenta-se a resistência das paredes celulares à ação de enzimas de degradação oriundas dos patógenos, evitando também a difusão de toxinas e a passagem de nutrientes da planta para o parasita (AGRIOS, 2005; SILVA, 2005). Os demais genótipos apresentaram-se pouco ou medianamente lignificados.

O genótipo E1528 (Super) apresentou diferença evidente no câmbio vascular em comparação aos demais genótipos, destacando-se quanto ao tamanho de células e número de camadas. Essa estrutura é responsável pela formação dos tecidos vasculares durante o crescimento secundário (xilema e floema secundários). O xilema secundário é produzido em direção ao centro, enquanto o floema secundário para a periferia (AGRIOS, 2005). Maior atividade do câmbio vascular pode contribuir com a formação de vasos condutores (xilema e floema), contornando problemas de estresses hídrico provocados pelo patógeno. Além disto, este genótipo também se diferencia dos demais genótipos quanto aos raios parenquimáticos: enquanto os demais genótipos apresentam a terminação dos raios às margens dos elementos de vaso do xilema secundário (raios mais curtos), o E 1528 apresenta a terminação dos raios parenquimáticos na porção central da raiz (raios mais longos). Contrastando com E 1528, o cultivar resistente TP 631 e BA6021 apresenta um câmbio vascular pouco proeminente, mais uma característica que contribui para a diferenciação deste genótipo.

A distribuição dos vasos do floema e do xilema foi semelhante para a maioria dos genótipos, a exceção do clone AEC 0144, para o qual os elementos de vaso ficaram distribuídos às margens do câmbio vascular.

C. fimbriata é um patógeno típico do xilema. Durante o processo de infecção o patógeno ocupa estes vasos e causa a morte da planta devido o impedimento de transporte de substâncias e metabólitos necessários a sobrevivência. Como forma de defesa a essa ocupação foi identificado em genótipos resistentes a formação de tiloses nos vasos dos xilema, impedindo a colonização dos vaso (CLÉRIVET,S, 2000). A deposição de tilose nos vasos do xilema do clone CO 1407 (Figura) indicam que este cultivar apresenta um sistema de defesa envolvidos na resistência a estresses hídricos, seja ele ocasionado por patógenos ou não. A evidência desta estrutura é uma peculiaridade do genótipo CO 1407, não observada nos demais genótipos.

Cristais estiveram presentes em todos os genótipos, em diferentes proporções. Tais cristais têm papel na resistência de plantas quando atacadas por patógenos ou herbívoros. Os genótipos resistentes E 1528, BA7346 e os suscetíveis, CO 1407 e BA 6021 apresentaram abundância de cristais. O genótipo AEC 0144 apresentou abundância moderada destes cristais e os cultivares suscetíveis TP634 e GG100 os cristais foram considerados raros. Isso é um indicativo de que os cristais possam auxiliar ou que estes estejam envolvidos no processo de resistência. Em algumas espécies como tabaco a formação de cristais auxilia na remoção do cálcio excedente. Assim, sua formação também pode ser resultado de alterações iônicas induzidas por algum tipo de estresse, tal como invasão por patógeno (SILVA, 2010). As fibras por sua vez estiveram presentes e todos os genótipos, sendo mais evidentes em BA7346.

Não houve nenhuma característica associada a resistência que esteve presente em todos os genótipos resistentes a *C.fimbriata*, no entanto a lignificação das células parenquimáticas foi evidente em dois desses genótipos em especial BA 7346 e TP631. Os genótipos apresentaram muitas vezes características particulares ou compartilha com outro cultivar em comum, como é o caso da presença de células parênquimas com conteúdo corado próximos aos vasos do xilema, característicos dos genótipos suscetíveis GG100 e CO 1407, ambos da espécie *E. urophylla* e suscetíveis. Estes genótipos também encontram-se próximos nas análises moleculares por marcadores RGAs e ISSR. Estas evidências reafirmam a proximidade entre os genótipos e pode contribuir por caracterizar cultivares de *E. urophylla*.

5 CONCLUSÃO

Os domínios NBS foram satisfatoriamente amplificados em genótipos de *Eucalyptus* spp. Marcadores RGA foram eficientes em discriminar genótipos híbridos interespecíficos (*E. grandis* e *E. urophylla*) e *E. urophylla* em relação a *E. grandis*, permitindo identificar fragmentos específicos para cultivares comerciais.

A porcentagem da diversidade entre genótipos foi maior com ISSR em relação aos RGA, o que ocorre devido a não conservação dos domínios, característico deste marcador. No entanto, alguns grupos de genótipos mantiveram-se unidos para ambos os marcadores, evidenciando a similaridade entre eles.

As análises moleculares mostraram diferenças morfológicas entre genótipos de eucalipto, e foram importantes em contribuir com os dados moleculares ao afirmarem a distância dos genótipos BA7346 e TP 631 dos demais genótipos analisados e em evidenciar a similaridade entre os genótipos suscetíveis 1407 e GG100. Portanto, as análises anatômicas contribuíram com os dados moleculares e permitiram ainda identificar características individuais dos genótipos.

O uso de metodologias que abordem avaliações morfológicas em associação com dados moleculares são de grande importância por gerar informações válidas e coerentes para genótipos de interesse como o eucalipto.

6 REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Ed 5. Elsevier Academic Press, 2005.

ALFENAS, A. C.; GUIMARÃES, L. M. S.; RESENDE, M. D.V.; Genetic Basis of Resistance in *Eucalyptus* spp. Pathosystems. *Proceedings of the 4th International Workshop on Genetics of Host-Parasite Interactions in Forestry*.

APPEZATO-DA-GLÓRIA B.; GUERREIRO, S. M. C.; **Anatomia Vegetal**. 2° Ed. Editora UFV, 2006.

BAKER, C. J.; HARRINGTON, T. C. *Ceratocystis fimbriata*. In:_____. **Crop Protection Compendium**. Kew, Surrey: CABI Publishing, 2004, p.1-14.

CLÉRIVET, A. et al. Tyloses and gels associated with cellulose accumulation in vessels are responses of plane tree seedlings (*Platanus acerifolia*) to the vascular fungus *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. **Trees**, v.15, n.1, p.25-31, 2000.

DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. **Science**, v. 341, n. 6147, p. 746–751, 2013.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

ELLIS, J., JONES, D. Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. **Curr Opin Plant Biol**, v. 1, p. 288-293, 1998.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v.9, p.275-296, 1971.

FIRMINO A. C.; JUNIOR H. J. T.; SOUZA I. C. G. DE.; FURTADO E.L.; Resistência de genótipos de Eucalipto a *Ceratocystis* spp. **Sci. For.**, Piracicaba, v. 41, n. 98, p. 165-173, jun. 2013.

GOMES, C.M.L. **Caracterização parcial de análogos de genes de resistência em duas espécies de Eucalipto**. 2005. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill Co., 1940. KUSHALAPPA, A.C.; GUNNAIAH, R. Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. **Trend in Plant Science**. v. 18, n.9, p. 522-531, 2013.

KANAZIN V. et al. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 11746-11750. 1996.

LALLI, D. A. et al. Identification and mapping of resistance gene analogs (RGAs) in *Prunus*: a resistance map for *Prunus*. **Theor Appl Genet**, v. 111, p. 1504 - 1513, set. 2005.

LEI, X.; YAO Q.; Xu X.; LIU, Y. Isolation and characterization of NBS-LRR resistance gene analogues from mango. **Biotechnology e Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 3, p. 417 - 424, 2014.

LEISTER, D. et al. A PCR-based approach for isolation pathogen resistance genes from potato whit potential for wide application in plants. **Nature Genetics**. v. 14, p. 421-429. 1996.

MAFIA, R. G.; ALFENAS A. C.; FERREIRA, E. A.; BINOT, D. H. B. **Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do r, eucalipto causada por *ceratocystis fimbriata***. **Revista Árvore, Viçosa-MG**, v.35, n.4, p.817-824, 2011.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento . Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php, Acesso: 20 de agosto de 2013.

MIEDES E.; VANHOLME R.; BOERJAN W.; MOLINA A. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. **Frontiers in plant science**, v.5, n.358. p. 1-13, 2014.

McDOWELL, J. M.; WOFFENDEN, B. J.; Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. **TRENDS in Biotechnology** v. 21, n. 4, p. 178 - 183, abr. 2003.

MYBURG A. A. et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v.510, p.556-562, jun.2014.

MORRA, S. C. **Diversidade em *Psidium guajava* L. Por caracteres morfológicos, moleculares e citogenéticos**. 2012. Dissertação de mestrado - Programa de pós-

graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2012.

O'BRIEN, T. P., FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

PASCHOLATI, S. F. et al. **Interação planta-patógeno**, v.13, Piracicaba, SP.2008.

ROSADO,C.C.G.; GUIMARÃES L. M. S.; TITON M.; LAU, D.; ROSSE, L.; RESENDE, M. D.V.; ALFENAS, A. C. Resistance to Ceratocystis Wilt (*Ceratocystis fimbriata*) in Parents and Progenies of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*

SILVA, A. B. da ; In silico survey of resistance (R) genes in Eucalyptus transcriptoma. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n. 3, p. 562-574, 2005.

SHEN KA et al. Resistance Gene Candidates Identified by PCR with Degenerate Oligonucleotide Primers Map to Clusters of Resistance Genes in Lettuce. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p. 815-823, 1998.

THAKUR M.; SOHAL, B. S.; Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. **ISRN Biochemistry**, p. 1-10, 2013.

TAMURA, K. G. **Avaliação de resistência, análise epidemiológica e caracterização anatômica da madeira em clones de *Eucalyptus* sp. infectados por *Ceratocystis fimbriata***. 2011. Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em Ciências florestal – Faculdade de ciências agronômicas da UNESP. Botucatu, São Paulo, 2011.

VELUTHAKKAL, R.; DASGUPTA M.G.; Pathogenesis-related genes and proteins in forest tree species. **Trees**, v. 24, p. 993-1006, 2010.

ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C.; HARRINGTON, T. C.; SILVA,J. F. Resistance of *Eucalyptus* Clones to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, v. 88, n. 7, p. 758-760, jul. 2004.

CAPÍTULO II

Prospecção de genes de resistência à *Heterodera glycines* e *Meloidogyne pp* em soja

Resumo: As plantas possuem uma série de genes de resistência (genes R) responsáveis pelo reconhecimento do patógeno direta ou indiretamente. Os genes R apresentam em seus produtos de amplificação domínios conservados. Dentre os domínios o mais comum é o NBS (*Nucleotide-binding-site*). Por meio das sequências de nucleotídeos conservados é possível isolar sequências análogas de genes de resistência (RGA). Neste trabalho objetivou-se estudar genes de resistência em soja aos nematoides *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne enterolobii*, por meio de marcadores RGAs e SSR. Foram avaliados 46 genótipos de soja, dentre eles PIs, cultivares comerciais e fontes de resistência aos nematoides. Combinações de *primers* RGAs (oriundos dos motivos P-loop e GLPL do domínio NBS) e *primers* SSR ligados à QTLs para a resistência ao NCS foram utilizados para as amplificações por PCR. Foram amplificados fragmentos relacionados à resistência aos nematóides em estudo em genótipos fontes de resistência e *PIs*. Marcadores RGAs foram eficientes em distinguir grupos de genótipos resistentes e suscetíveis à *Meloidogyne* spp e NCS. Combinações de *primers* específicas foram identificadas por amplificar sequências nucleotídicas de possíveis genes candidatos à resistência. Os marcadores SSR contribuíram para análise de especificidade de raças para NCS evidenciando a importância em se analisar QTLs no estudo de resistência a nematóides.

Palavras-chave: Nematóide; Domínios conservados; Genes R; resistência quantitativa.

CHAPTER II

Prospection of resistance genes to *Heterodera glycines* and *Meloidogyne* spp in soybean

Abstract: The plants possess a series of resistance genes (R genes) responsible for the recognition of the pathogen direct or indirectly. The R genes present in their products of amplification conserved domains. Among the domains the most common is the NBS (Nucleotide-binding-site). Through the sequences of conserved nucleotides it is possible to isolate analogous sequences of resistance genes (RGA). In this work it was aimed to study resistance genes in soybean to the nematodes *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne enterolobii*, through the use of RGA and SSR markers. 46 genotypes of soybean were evaluated, among them PIs, commercial cultivars and source of resistance to the nematodes. Combinations of RGA primers (derived from the motives P-loop and GLPL of the NBS domain) and SSR primers attached to QTLs for the resistance to the NCS were used for the PCR amplifications. Fragments were amplified, they were related to the resistance to the nematodes in study of genotype sources of resistance and PIs. RGA markers were efficient in distinguishing groups of resistant and susceptible genotypes to *Meloidogyne* spp and NCS. Specific primer combinations were identified for amplifying nucleotide sequences of possible candidate genes to the resistance. The SSR markers contributed for the analysis of specificity of races to NCS, evidencing the importance of analyzing QTLs in the study of resistance to nematodes.

Keywords: Nematode; Conserved domains; R genes; quantitative resistance

1 INTRODUÇÃO

Os genes de resistência (genes R) medeiam a imunidade disparada por efetores (ETI), um mecanismo de resistência específico desenvolvido graças ao sistema coevolucionário da interação planta-patógeno. Neste mecanismo produtos dos genes R reconhecem elicitores oriundos do patógeno e desencadeiam a resposta de resistência (COLL, 2011).

As proteínas de reconhecimento dos produtos patogênicos possuem em comum domínios conservados, estes possuem funções específicas como reconhecimento, interação proteína-proteína, sinalização e atividades que desencadeiam a resposta de resistência (LEI, 2014). Os domínios comumente encontrados na maioria dos genes sequenciados são: repetições ricas em leucina (LRR- *Leucine Rich Repeat*); sítio de ligação de nucleotídeos (NBS - *Nucleotide Binding Site*); zíper de leucina (LZ-*Leucine Zipper*); domínio CC (*Coiled Coil*); domínio de interação proteína-proteína homólogo ao receptor da interleucina-1 (TIR-*Toll/Interleukin -1 receptor*), domínios transmembranas (TM), além de outros domínios como Sinal de localização nuclear (NLS- *Nuclear localization signal*), WRKY (Domínio triptofano-arginina-lisina-tirosina) e quinase. Os domínios agrupam-se em diferentes arranjos resultando em oito classes de genes (WILLIAMSON, 2006). Todas as classes são representadas por produtos de genes R reconhecidos e validados em várias espécies mono e dicotiledôneas (GURURANI, 2012; SANSAVERINO, 2010).

Dentre os domínios o NBS é o mais comum, sendo encontrado na maioria dos genes de resistência clonados. Estes domínios podem ser identificados no genoma mediante seus motivos P-loop, Kinase 2, Kinase 3 e GLPL (LEI, 2014). Tais motivos permitem a confecção de oligonucleotídeos degenerados específicos para regiões conservadas, como os análogos de genes de resistência (RGA - *Resistance Gene Analog*) (SHEN, 1998).

Dado isso, domínios conservados são um importante meio de identificação dos genes R (SHEN, 1998). Em culturas importantes como a soja, *Glycine max* (L.) Merrill, é interessante identificar genes relacionados à defesa contra agentes

patogênicos potenciais, como é o caso de *Heterodera glycines*, o nematoide de cisto da soja (NCS) e dos nematoides do gênero *Meloidogyne*, ambos causadores de grandes perdas nas lavouras de soja (WILLIAMSON, et al. 2006).

O primeiro gene R identificado conferindo resistência à nematoide foi *Hs1^{pro-1}* encontrado em batata doce, este gene está envolvido na resposta de resistência à *Heterodera schachtii* (Cai, 1997), os domínios conservados deste gene são LLR-TM. Os genes *rhg1* e *Rhg4* (SORIANO, 2006), com domínios LLR-TM-Kinase são relatados em soja conferindo resistência a *Heterodera glycines*. Além destes, os genes *Cre-1* e *Cre-2* com os domínios NBS-LRR conferem resistência aos nematóides *Heterodera avenuae*. Quanto à *Meloidogyne* estão descritos os genes *Mi-1* e *Mi-9* com domínios CC-NBS-LRR e *Me-3* em pimenta (GURURANI, 2012).

A prospecção de genes R a estes gêneros de nematoides é necessária para ampliar a base genética da resistência para genótipos de interesse agrônomico. Neste estudo buscou-se verificar regiões diferenciais do genoma relacionadas à resistência a nematoides do gênero *Meloidogyne* spp e da espécie *Heterodera glycines* em genótipos de soja por meio de marcadores RGAs e SSR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Os 46 genótipos de soja utilizados neste estudo foram disponibilizados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e pelo Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (Bioagro). Os genótipos utilizados foram escolhidos com base na literatura visando contemplar grupos de genótipos resistentes e suscetíveis aos nematóides do gênero *Meloidogyne* (*Meloidogyne javanica*, *M. incognita* e *M. enterolobii*) e também a diferentes raças do *Heterodera glycines*, o nematóide de cisto da soja (NCS) (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização dos genótipos de soja quanto a resistência a nematoides.

Genótipo	NCS	Mi	Mj	Me	PM/O	Parentais
CD201	S	R	R	S	CD	-
CD217	R 3	R	S	S	CD	-
Conquista	S	R	R	S	Embrapa	-
BRS 211	-	R	R	T	Embrapa	-
BRS Valiosa	S	M R	R	T	Embrapa	-
BRS 256RR	S	R	R	T	Embrapa	-
BRS	S	R	R	T	Embrapa	-
Raimunda						
BRSG	-	R	R	T	Embrapa	-
Paraíso						
Luziânia	S	MR	R	S	Embrapa	-
BRS Favorita	S	MR	R	T	Embrapa	-
BRSGO Iara	R 1, 3	S	S	-	Embrapa	Peking (S)
BRS262	R 1, 3	S	S	-	Embrapa	Peking (S); PI 437654 (H)
BRSGO	R 1, 3	S	S	-	Embrapa	Peking (S)
Raissa						
BRS	R 1, 3	S	S	-	Embrapa	Peking (S); PI 88788; PI209332
Invernada						
BRSGO	R 1, 2, 3, 4, 5, 14	MR	S	-	Embrapa	PI 437654 (H)
Chapadões						
BR Jiripoca	R 1, 3, 14	MR 5, 6, 9,1	S	S	-	Embrapa Peking (S); PI 437654 (H)
BRS263 D	R 1, 3 MR 14	S	S	-	Embrapa	Peking (S.; F.;L.); PI 437654 (H)
TMG115	R 1, 3 MR 14	S	S	-	Fund MT	Peking;PI 437654

Continuação...

TMG121RR	R 1, 3 MR 14	S	S	-	Fund.M	Peking; PI 437654
Tucunaré	R 1, 3 MR 14	S	S	-	Fund. MT	Peking (S); PI 437654 (H)
Tabarana	R 1, 3	S	S	-	Fund. MT	Peking (Centennial)
TMG117	R 3	S	S	-	Fund. MT	-
Doko	S	S	S	S	Fund. MT	-
M-Soy 8400	R 3	-	-	-	Monsanto	(Coker)
M-Soy 8001	R 1, 3	S	S	S	Monsanto	Peking (Coker 6738)
M-Soy 6106	S	-	-	-	Monsanto	-
M-Soy 8914	S	-	-	-	Monsanto	-
Y23	S	-	-	-	-	-
UFVS2001	S	-	-	-	UFV	-
UFV16	S	-	-	-	UFV	-
UFVTN104	S	-	-	-	UFV	-
UFV18	S	-	-	-	UFV	-
A7002	S	-	-	-	-	-
Bedford	R	-	-	S	-	-
PI 595099	R	R	R	R	-	-
PI 594427	R	R	R	R	-	-
PI 209332	R 3, 5, 14	-	-	-	Origem Japão	-
PI 548316	R 3 MR 14	-	-	-	Origem China	-
PI 88788*	R 3, 14	-	-	-	Origem China	-
PI 90763*	R 1, 2, 3, 5	-	-	-	Origem China	-
PI 437654	R *	-	-	-	Origem Rússia	-
PI 89772	R 1, 2, 3, 5 MR 14	-	-	-	Origem China	-
Hartwig	R*E 4 ⁺ , 14 ⁺	-	-	-	Origem EUA	-
Pickett*	R 1, 3	-	-	-	Origem EUA	-
Peking*	R 1, 3, 5	-	-	-	Origem EUA	-
Lee*	S	-	-	-	-	-

NCS: Nematóide do cisto da soja; *M.i.*: *M. incognita*; *M.j.* : *Meloidogyne javanica*; *M.e.*: *M. enterlobii*.
 CD: COODETEC; Fund.MT: Fundação MT; PM: Programa de Melhoramento; O: Origem; R:
 Resistente; R*-Resistente a todas as raças; MR: Moderadamente Resistente; T: Tolerante; S:
 Suscetível; -: Dados não disponíveis. enterlobii. Fonte EMBRAPA:
http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/tab/tab_11_1.htm
 htm

Análises moleculares

O DNA genômico foi extraído segundo McDonald et al. (1994) com adaptações. A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% corado com

brometo de etídeo. A concentração e qualidade foram determinadas por espectrofotometria.

Para a reação de PCR foram usadas 13 combinações de *primers* degenerados oriundos de domínio NBS dos genes *RPS2* de *Arabidopsis thaliana* que confere resistência a *Pseudomonas syringae*, do gene *N* de tabaco, que confere resistência a *Tobacco mosaic virus* (LIESTER, 1996; SHEN, 1998) e do gene *L6* de linho, resistente a *Melampsora lini*. Os motivos amplificados foram P-loop 1 (*primers*: s1; s2, P-loop1, P-loop 2, P-loop 3, P-loop 4, P-loop 5, P-loop 6, LM637 e F1) e GLPL (As1, As2 As3 e e GLPL1, , GLPL3, GLPL4).

Tabela 1. Caracterização dos primers RGAs utilizados oriundos do domínio NBS.

Primer	Motivo	Gene (s)	Referência
s1	P-loop	<i>N, L6, RPS2</i>	Leister, 1996
s2	P-loop	<i>N, L6, RPS2</i>	Leister, 1996
As1	GLPL	<i>N, L6, RPS2</i>	Leister, 1996
As2	GLPL	<i>N, L6, RPS2</i>	Leister, 1996
As3	GLPL	<i>N, L6, RPS2</i>	Leister, 1996
Ploop1	P-loop	<i>N, L6, RPS2</i>	Shen, 1998
Ploop2	P-loop	<i>N, L6, RPS2</i>	Shen, 1998
Ploop5	P-loop	<i>N, L6, RPS2</i>	Shen, 1998
Ploop6	P-loop	<i>N, L6, RPS2</i>	Shen, 1998
GLPL1	GLPL	<i>N, L6, RPS2</i>	Shen, 1998
GLPL3	GLPL	<i>N, L6, RPS2</i>	Shen, 1998
GLPL4	GLPL	<i>N, L6, RPS2</i>	Shen, 1998
F1	P-loop	<i>N, L6, RPS2</i>	Pan, 2000
LM637	P-loop	<i>RPS2</i>	Kanazin, 1996

Genes *N, L6, RPS2* provindos das espécies *Nicotiana tabacum*, *Linum usitatissimum* e *Arabidopsis thaliana* respectivamente. Sequencia peptídica dos domínios Ploop (ou kinase 1a) = GGV/IGKTT; GLPL: GLPLAL. Domínio hidrofóbico.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 20 µL contendo 45ng de DNA genômico, 0.4µM de cada *primer*, Master Mix 1X (*Thermo Scientific*) e 1.0 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Veriti® 96-Well Applied Biosystems* de acordo com Liester (1996) ou Shen (1997), dependendo da combinação de *primers*. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1.5%, em

tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados por meio de luz ultravioleta (UV). Para estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados foram utilizados marcadores de peso molecular de 100 pb.

Para fins comparativos 25 genótipos com resistência a NCS foram comparados por dados de RGA e SSR. Os dados de SSR foram obtidos por Santana (2008) utilizando SSR ligados a *QTLs* de resistência ao NCS. Os genótipos comparados foram: BRS 262, BRS 263 Diferente, BRS Invernada, BRS Jiripoca, BRSGO Chapadões, BRSGO Iara, BRSGO Raíssa, CD 217, MSoy-8001, MSoy-8400, TMG 115, TMG 117, TMG 121RR, FMT Tabarana, FMT Tucunaré, PI 209332, PI 437654, PI 548316, PI 89772, PI 88788, PI 90763, Pickett, Peking, Hartwig e Lee.

Análises de dados

Os polimorfismos gerados por RGAs foram convertidos em matriz de dados binários (presença ou ausência). Esta foi usada para obtenção da dissimilaridade entre genótipos usando o método de coincidência simples e posteriormente realizado o agrupamento pelo método hierárquico de Ligação Média entre Grupo (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean- UPGMA*).

Com os dados de SSR foi obtida a matriz de dissimilaridade pelo Índice ponderado, posteriormente foi realizado o agrupamento pelo método de UPGMA. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa Genes (CRUZ, 2013).

O gráfico de *heatmap* apresenta gradiente de cores que indicam presença de amplificação (presença = 1) para a cor clara e ausência (ausência = 0) para a cor vermelha. O *heatmap* é eficiente em representar de forma multidimensional o agrupamento cruzado com resultados de amplificação por genótipo. As análises foram realizadas utilizando o software R versão 3.2.1.

A inferência sobre diferenças entre grupos de genótipos utilizando o método bayesiano foi efetuada pelo software *Structure* 2.3.4. Os dados foram gerados mediante o método de coincidência simples, atribuindo à população um $k = 3$.

3 RESULTADOS

3.1 Análise de RGA

A partir dos RGAs de regiões conservadas do tipo NBS foram amplificados 80 *amplicons*, a maioria polimórficos (88,75%), com média de 7,72 *amplicons* por par de *primers*. A dissimilaridade entre os genótipos variou de 0,29 (BRS Jiripoca e Doko) à 0,66 (TMG 115 e Peking) e a análise de agrupamento dos genótipos baseada nestes dados revelou a formação de três grupos (Figura 1).

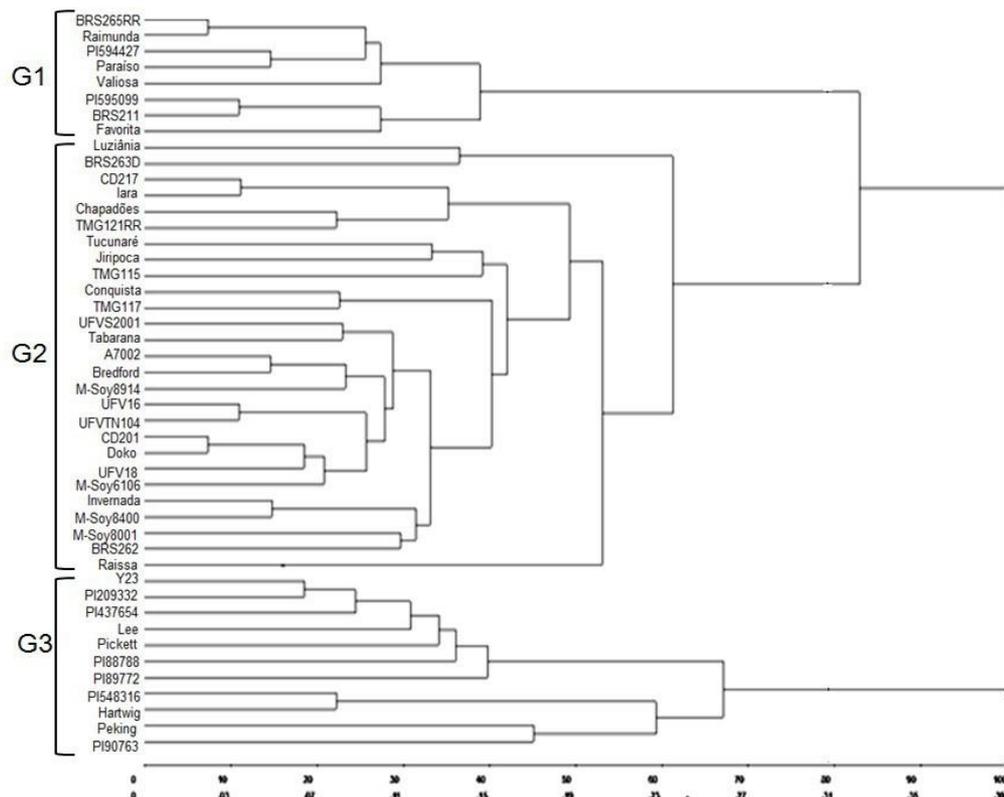


Figura 1. Agrupamento dos 46 genótipos de soja mediante dados gerados por marcadores RGAs.

No primeiro grupo foram alocadas oito genótipos resistentes e tolerantes aos três *Meloidogyne* spp, incluindo todos os genótipos com tolerância ou resistência ao *Meloidogyne enterolobii*, dos quais seis são da Embrapa (quatro suscetíveis ao

NCS) e os demais são as PI 595099 e PI 594427, genótipos resistentes a todos os nematóides de galha e ao NCS. A menor dissimilaridade foi entre BRS 256 e BRS Raimunda (0.028).

O segundo grupo, composto por 27 das 33 cultivares comerciais, apresentou características gerais quanto a resistência e suscetibilidade. Dos quais nove suscetíveis ao NCS; seis resistentes às raças 1 e 3 do NCS; quatro resistentes às raças 1 e 3 e moderadamente resistente à raça 14 e; três resistentes ao *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*.

Para *M. enterolobii* seis dos cultivares agrupados são descritos como suscetíveis e para os demais não há informação na literatura. As cultivares deste grupo são oriundas de vários programas de melhoramento como Embrapa, Fundação MT, COODETEC e Monsanto. A cultivar mais divergente do grupo foi Raissa (resistente às raças 1 e 3 do NCS e suscetível aos *Meloidogyne*).

O terceiro grupo foi composto por 11 genótipos diferenciadores para NCS (PIs e fontes de resistência). No grupo foram alocadas fontes de resistência amplamente utilizadas no Brasil e nos Estados Unidos para NCS como a PI 437654 e Peking. Para os genótipos deste grupo não há informações sobre a resposta para os *Meloidogyne spp* estudados neste trabalho. Os genótipos suscetíveis ao NCS, Lee e Y23, também ficaram neste grupo. Como os *primers* utilizados foram obtidos de genes de resistência de *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* e *Linum usitatissimum* de motivos distintos do domínio NBS, os conjuntos de *primers* foram avaliados de forma independente visando caracterizar a influência dos diferentes motivos no agrupamento dos genótipos (Figura 2 A e B)

O agrupamento inicial (Figura 1) foi mantido com os *primers* s1; s2; As1, As2 As3 (Figura 2a). Os polimorfismos gerados pelos *primers* dos motivos P-loop (P-loop1, P-loop 2, P-loop 3, P-loop 4, P-loop 5, P-loop 6) e GLPL (LM637, GLPL1, GLPL2, GLPL3, GLPL4 e GLPL5) não mantiveram os subgrupos observado no agrupamento usando todos os *primers* (Figura 2a). Entretanto, o grupo dos genótipos com resistência ao gênero *Meloidogyne spp* permaneceu o mesmo em todas as análises mostrando que os dois conjuntos de *primers* acessaram regiões semelhantes no genoma dos genótipos.

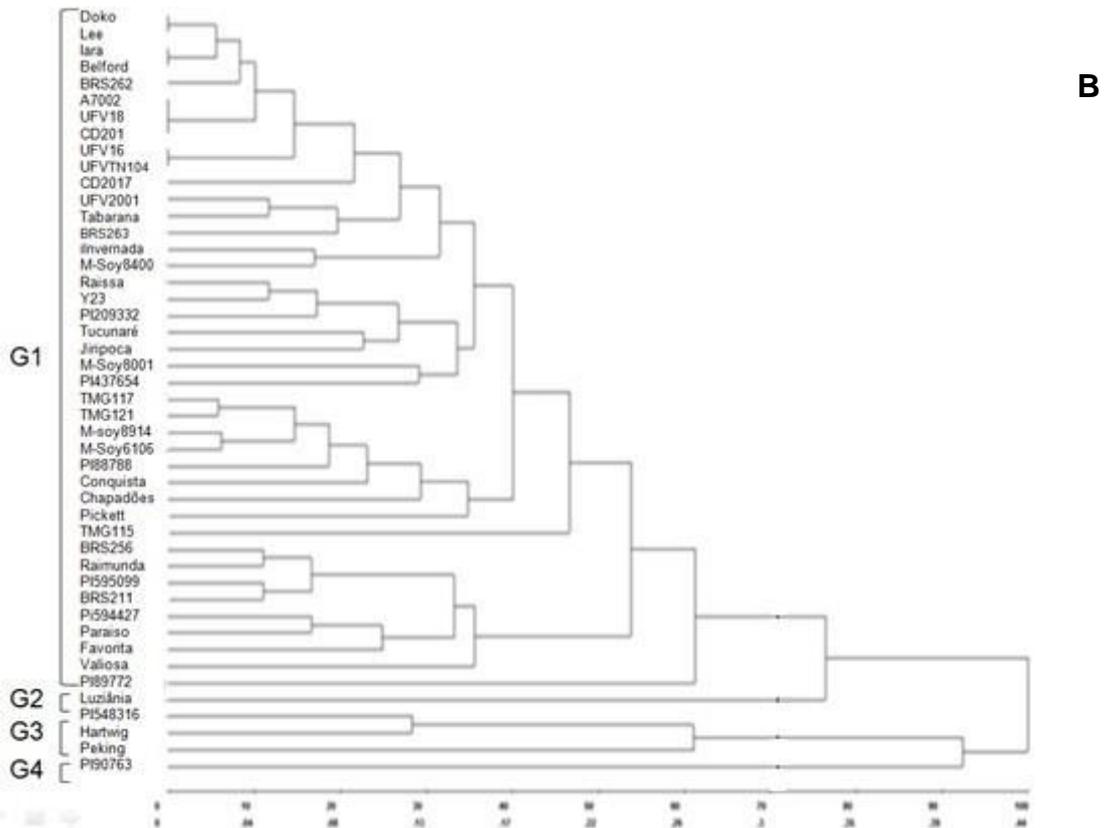
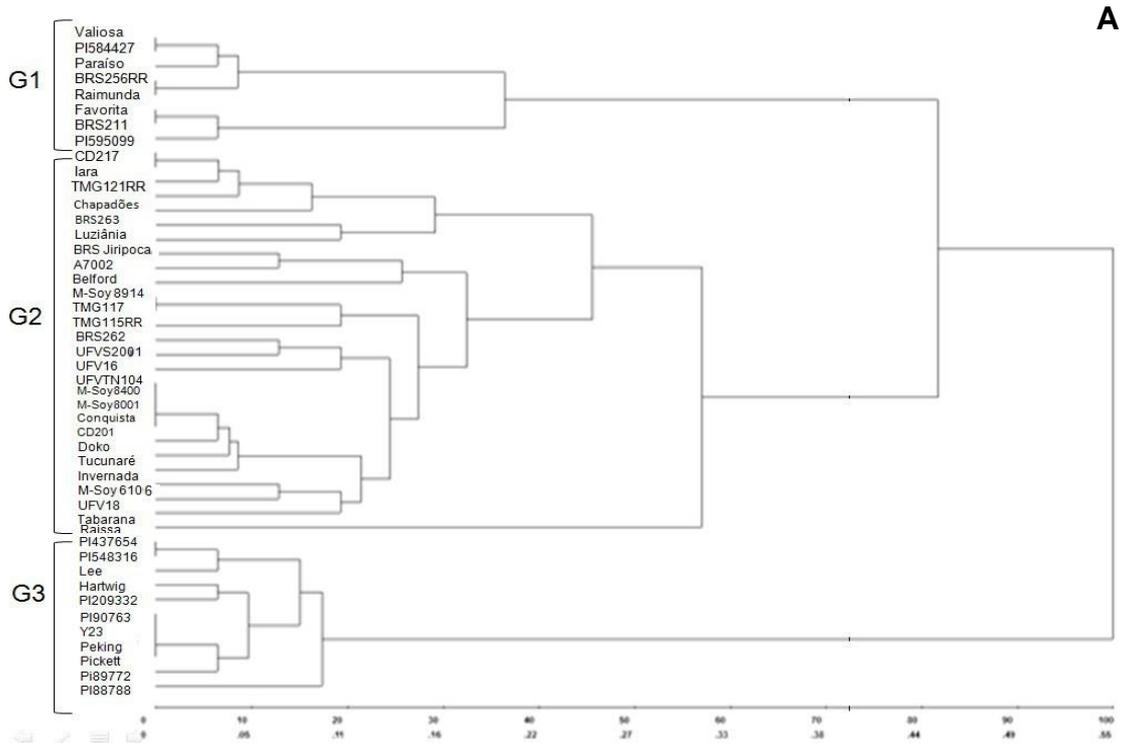


Figura 2. Agrupamento dos genótipos de acordo com A) Primers que abrangiam apenas motivos P-loop. B) Primers que abrangiam motivos P-loop e GLPL.

Os resultados do *Structure* coincidem com o agrupamento dos genótipos obtidos pelo método de UPGMA (Figura 3). O maior grupo (verde) foi composto por cultivares oriundos de diferentes programas de melhoramento, com indivíduos resistentes e suscetíveis ao NCS e a *Meloidogyne spp.* O segundo grupo (vermelho) é formado por genótipos diferenciadores e fontes de resistência ao NCS. O último grupo (azul) alocou genótipos em sua maioria resistente a *M. icognita* e *M. javanica*. Além da PI 595099 e PI 594427. Indicando que houve a amplificação dos domínio NBS para estes genótipos.

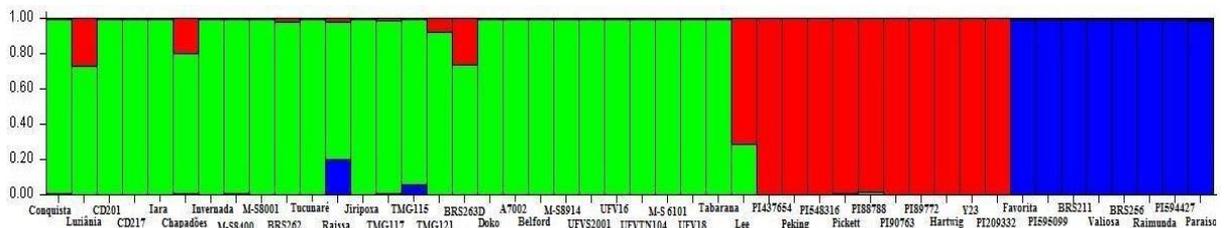


Figura 3. Gráfico gerado a partir de dados RGAs pelo programa Structure 2.3.4. K:3.

A fim de buscar evidências da associação dos fragmentos amplificados por RGAs com *QTLs* de resistência ao NCS (obtidos por Santana 2008), dados de RGAs de 25 genótipos com resistência e suscetibilidade ao NCS foram comparados com dados produzidos por SSR sabidamente associados a *QTLs* de resistência ao NCS (SANTANA, 2008) (Figura 4). Nesta análise foram excluídos genótipos relacionados à resistência ao gênero *Meloidogyne*. Com dados de marcadores microsatélites os genótipos com resistência às raças 1, 3 e 14 foram distintos dos genótipos com resistência às raças 1 e 3 também das fontes de resistência para o NCS. Evidenciando que *QTLs* para a raça 14 permitiu a separação dos genótipos comerciais. A cultivar Iara (resistente as raças 1 e 3) foi a mais divergente entre as comerciais e se agrupou com o padrão de suscetibilidade Lee. Em comparação, na análise de RGAs as fontes de resistência foram separara das dos cultivares comerciais, entretanto sem distinção de agrupamento por raça, indicando que genes específicos para a raça 14 não foram acessados nesta análise.

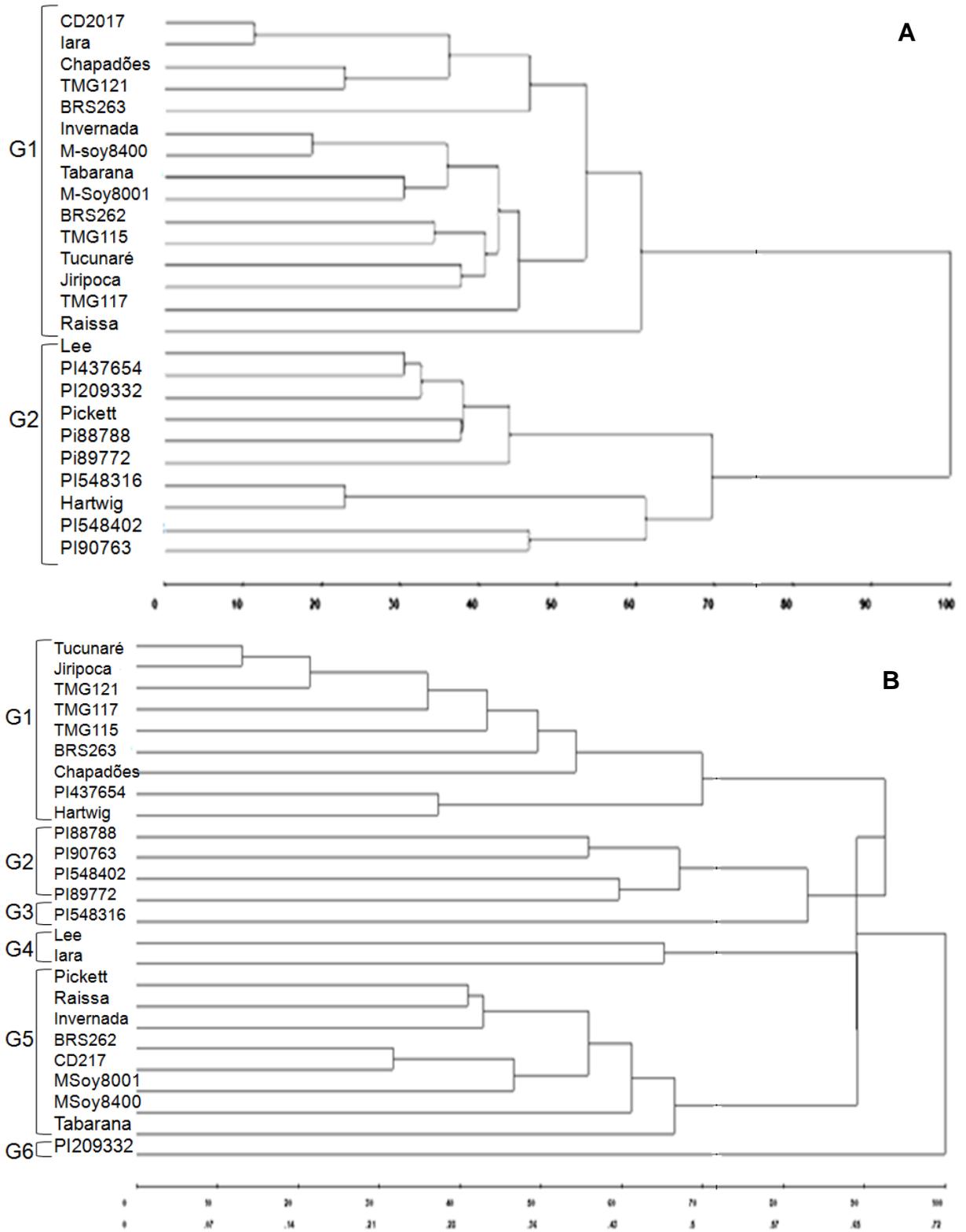


Figura 4. Agrupamento de 25 genótipos de soja de acordo com A) Marcadores SSR e B) Marcadores RGAs.

Além do agrupamento dos genótipos também foi realizada o agrupamento dos fragmentos amplificados por RGA, a fim facilitar a identificação de regiões genômicas contrastantes entre os grupos de genótipos resistentes e suscetíveis aos diferentes nematóides. Estes resultados foram apresentados em forma de *Heatmap* (Figura 4).

Com isso foi possível identificar grupos de *amplicons* específicos para cada grupo de genótipo, bem como os comuns a maioria dos genótipos. Como exemplos de fragmentos comuns a todos os genótipos foram obtidos com as combinações: F1/As2 (150 e 500 pb), S2/LM637 (500 pb), S2/As2 (500 pb), S2/As1 (850 pb), P-loop1/GLPL1 (400 e 500 pb) e P-loop1/GLPL3 (100 e 500 pb). Genótipos resistentes aos nematóides do gênero *Meloidogyne* spp (BRS Raimunda, BRS 256 RR, PI 594427, BRSGO Paraíso, BRS Valiosa, PI595099, BRS 211, BRS Favorita), geraram os amplicons de: 350 pb (F1+As2), 150 pb (s2+As3) e 800 pb (s2+As3) (setas pretas). Estes fragmentos foram isolados para futuro sequenciamento.

Estes fragmentos não foram amplificados para as fontes de resistência aos nematóides de cisto: PI 437654, PI20332, PI89772, Pickett, Pi88788, PI 548316, Hartwig, Peking, PI90736. Estas bandas também tiveram ampliações para a maioria dos cultivares comerciais. Por outro lado, os *amplicons* gerados pelas combinações a S2As2 (1050 pb) e s2As2 (1080 pb) e s2As2(700pb) foram amplificados apenas nas *PIs* e em poucas comerciais, sendo a maioria destas resistente a mais de duas raças de NCS (Figura 3) foram amplificados com sucesso nos nas fontes de resistência ao NCS, entretanto sem amplificação nos cultivares comerciais (setas vermelhas).

As cultivares do grupo dois, resistentes e suscetíveis às raças do NCS não amplificaram bandas das combinações S2/As2 (200, 1050, 1060 pb), P-loop1/GLPL1 (1020 pb) e P-loop 5/GLPL4 (450 pb), exceto os genótipos Iara (R1,3) CD217 (R3 e R a Mi), TMG121 (R1,3,4) e Chapadões (R 1,2,3,4,5).

O *amplicon* de 500pb (S2/As1) foi presente em genótipos resistentes a NCS e genótipos comerciais resistentes a pelo menos uma raça deste nematoide (seta verde).



Figura 3. Heatmap dos dados obtidos por RGA amplificados em 46 genótipos de soja com diferentes resistência a nematóides de cisto e galha. Branco representa dados perdidos, Amarelo claro equivale a presença de amplificação e a cor vermelha é atribuída a ausência de amplificação.

4 DISCUSSÃO

A conservação de domínios de genes de resistência em vários grupos taxonômicos é útil por permitir validar genes R no genoma de espécies ainda não estudadas (Shen, 1998). Trabalhos utilizando marcadores RGAs tem obtido sucesso na amplificação de sequências associadas a resistência em várias espécies de plantas tais como damasco, batata e girassol (DANGL et al. 2000; SORIANO, 2006).

Neste trabalho utilizou-se *primers* baseados no domínio NBS dos genes de resistência *RP2*, *L6* e *N* (LIESTER, 1996), estes oligonucleotídeos geraram polimorfismos em genótipos resistentes e suscetíveis aos nematóides resultando no agrupamento observado na Figura 1, onde é clara a segregação dos genótipos resistentes a NCS dos resistentes a *Meloidogyne* spp. Kang (2012) relata sobre a existência de aproximadamente 314 genes apresentando os domínios NBS associados à resistência a patógenos no genoma da soja, fator que justifica o uso destes marcadores em soja.

Verifica-se no agrupamento a formação de três grupos. O último grupo contém apenas genótipos de *PIs*, importantes fontes de resistência à NCS. Pelas análises de *heatmap* concluímos que os fragmentos diferenciais encontrados especificamente nestes genótipos são os de 1050,1080 e 700 pb obtidos pela combinação s2As2. Estas sequências estão amplamente presentes nas *PIs* e raramente verificadas em genótipos comerciais resistentes a mais de uma raça de nematóide de cisto. Presume-se que estes estão entre os principais fragmentos que possam conferir resistência a NCS, de tal forma, o sequenciamento destes *amplicons* permitirá identificar os genes acessados por estes *primers*, mediante uso das técnicas da bioinformática, como o BLAST, poderá comparar estas sequências com a de outros genes R já depositados em bancos de dados, a fim de inferir sobre a atividade deste fragmento na resistência.

Estudos da genética da resistência à *Heterodera glycines* identificaram no genoma da soja a princípio cinco genes envolvidos na defesa contra NCS. Os genes *rhg1*, *rhg2*, *rhg3* e *Rhg4* e *Rhg5* são encontrados em *PIs* fontes de resistência tal como Peking (*rhg1*, *rhg2*, *rhg3*) e PI88788 (*Rhg4* e *Rhg5*). Estes genes estão

distribuídos em mais de 18 *QTLs* ligados a resistência e são amplamente estudados. Apesar da sua importância na resistência à *Heterodera glycines* verifica-se que os genes *Rhg1* e *Rhg4*, não se enquadram nas classes de genes R com domínios NBS (SORIANO, 2006), sendo constituídos dos domínios LRR-TM e Kinase, portanto, os fragmentos gerados neste estudo não são originados destes genes, mas sim de outras sequências que abrangem os motivos P-loop e GLPL do domínio NBS, o que faz ainda mais interessante a análise destes fragmentos, sua clonagem e sequenciamento visando identificá-los e responder sobre sua função na resistência a NCS.

Observa-se que a maioria dos genótipos resistentes a NCS geralmente são suscetíveis à *Meloidogyne* spp e os resistentes a *Meloidogyne* são suscetíveis à NCS. Pela análise de *heatmap* conseguimos identificar um conjunto de bandas presentes apenas em genótipos resistentes a NCS (F1As_200pb; S2As2_100pb; S2As1_500pb) e ausentes em genótipos resistentes a *Meloidogyne* e outro conjunto de *amplicons* observados apenas em genótipos resistentes a *Meloidogyne* spp. e ausentes em genótipos resistentes a NCS (F1As2_350pb; S2As3_150 e 800pb). Presume-se que estas bandas estejam diretamente associadas à resistência específica a estes patógenos nas fontes de resistência e que a amplificação de ambos os conjuntos de bandas em genótipos comerciais possa estar relacionado a abordagem de demais sequências de resistência que possuem tais motivos mas que não estejam relacionados a estes nematóides.

No grupo 2 a maioria dos genótipos resistentes a NCS agrupam-se separadamente dos genótipos suscetíveis a este mesmo nematóide. Isto é um indicativo de que mesmo dentro do grupo de genótipos comerciais, com cultivares resistente e suscetíveis a *Meloidogyne* spp e NCS houve uma segregação entre cultivares resistentes e suscetíveis a NCS, confirmando assim a eficiência do marcador RGA.

Para *Meloidogyne* a maioria dos genes de resistência já clonada apresenta o domínio NBS (SANTANA, 2013). Evidentemente este domínio foi amplificado neste trabalho. Para os nematóides do gênero *Meloidogyne* os RGAs permitiram separar os genótipos resistentes e suscetíveis, no entanto não foi capaz de discriminar os padrões de resistência entre *M. incognita*, *M. javanica* e tolerância a *M. enterolobii*.

Isto dá indícios que para resistência a *Meloidogyne* spp algum fator relacionado ao domínio NBS confere ampla resistência ao nematoide, o que é sustentado por relatos de que um pequeno número de genes de efeito maior controla o a resistência a este nematóide (SILVA, 2005).

Em colaboração a estreita base genética da resistência a *Meloidogyne* devido ao uso monopolizado da cultivar Bragg como fonte de resistência dificulta a diferenciação dos genótipos resistentes por possuírem a mesma fonte de resistência. Diferentemente, para *Heterodera glycines* um grande número de genes estão envolvidos na resposta de resistência em soja, sendo a herança considerada quantitativa (OLIVEIRA, 2012).

A resposta qualitativa de *Meloidogyne* spp tem a ver com a resistência por ETI que de fato é q que nos propusemos estudar.

No caso da herança quantitativa vários genes estão envolvidos como é o caso da herança ao NCS, portanto não conseguimos ver as especificidades e nem discriminar os genótipos que temos comerciais.

As fontes de resistência passam a ser diferenciadas por possuírem regiões distintas da região de resistência ao NCS e provavelmente ainda não inseridas nos genomas comerciais. Teríamos que ter a cultivar Bragg para o nosso controle de resistência ao *Meloidogyne* e também fonte de resistência.

Dois genótipos presentes no grupo 1 (de genótipos resistentes a *Meloidogyne* spp), PI595099 e PI 594427, são interessantes para estudos de resistência, uma vez que ambos apresentam resistência tanto a NCS quanto a *Meloidogyne* ssp. Estes genótipos são amplamente utilizados em programas de melhoramento (BENEVENT, 2013). Por apresentar ambos os motivos, tanto GLPL quanto P-loop, considera-se que os *primers* que contemplam GLPL foram determinantes em aloca-los no grupo 1, apesar destes também contemplarem o motivo P-loop também amplificado.

O agrupamento realizados com os dados de RGAs são confirmados pelo gráfico de *Structure*, aumentando a confiabilidade no agrupamento dos genótipos.

A análise dos agrupamentos individuais de *primers* que contemplavam o motivo P-loop e *primers* que abrangiam os motivos P-loop + GLPL resultam em diferentes padrões de agrupamento. Os *primers* s1 e s2 amplificaram motivo P-loop, enquanto As1, As2 e As3 motivos GLPL. Os *primers* P-loop1, P-loop 2, P-loop

3, P-loop 4, P-loop 5, P-loop 6 (motivo Kinase ou P-loop) em associação com LM637, GLPL1, GLPL2, GLPL3, GLPL4 e GLPL5 (motivo GLPL) amplificaram da mesma forma os motivos P-loop e GLPL, ambos do domínio NBS. Percebe-se pelo agrupamento realizado com *primers* P-loop e+GPLP que os genótipos que conferem resistência a *Meloidogyne* spp continuavam agrupados, enquanto a maioria dos genótipos fontes de resistência a NCS mostravam-se dispersos no dendrograma. Sugere-se que os domínios NBS voltados para a resistência a *Meloidogyne* spp possuem motivo amplificado apenas por estes conjuntos de *primers*. Além disso, considera-se que as bandas amplificadas em genótipos resistentes a NCS pelos *primers* que abrangiam os motivos GLPL amplificados pelos primers P-loop + GLPL não são relacionadas à resistência a outros patógenos.

A relevância dos *primers* com motivos P-loop é confirmada pelo *Heatmap*, onde podemos inferir sobre as principais combinações de *primers* envolvidas na diferenciação dos genótipos. A combinação s1/As1 (500 pb) é dada como a combinação diferencial entre os genótipos resistentes a *Meloidogyne* spp e os resistentes a NCS, uma vez que esta banda não aparece para os resistentes a *Meloidogyne* spp e está presente em genótipos os resistentes a NCS e genótipos comerciais resistentes a pelo menos uma raça.

O agrupamento baseados em dados de SSR distinguiu grupos de genótipos resistentes a mais de uma raça de NCS. Marcadores RGAs não foram tão eficientes quanto os microssatélites associados à QTLs para discriminar genótipos resistentes a mais de duas raças do NCS. Isto indica que os RGAs não amplificaram todos os genes envolvidos com a resistência a este nematoide, não permitindo identificar a raça – especificidade. Como para resistência ao NCS existem descritos QTLs de efeito maior, como o do GL G, do gene *rhg1*, que confere quase a totalidade da resistência a raça 3 do NCS, além de vários QTLs de efeito menor que podem estar envolvidos na raça especificidade (CONCIBIDO, 2004) pressupõe que genes oriundos de locos de efeito menor não foram amplificados neste trabalho, uma vez que não foi possível identificar resistência as diferentes raças de NCS. Portanto, para o grupo de genótipos resistentes a mais de uma raça de nematóide e o grupo de genótipos fontes de resistência a NCS agruparam-se mais próximos devido a possível amplificação dos QTLs de efeito menor, o que colocou o grupo de

genótipos resistentes a apenas duas raças de nematoide mais afastado.

Portanto, é possível que os *primers* SSR contemplassem porções associadas aos genes raça específicos, como os genes *rhg1*, que confere resistência a nematóides de cisto, diferente dos *primers* aqui estudados que abrangeram o domínio NBS. Sugerindo que os fragmentos amplificados que abrangiam o motivo NBS não conferem resistência raça-específica aos nematóides de cisto, mas estão associados a QTLs de efeito maior, em geral.

5 CONCLUSÃO

Motivos específicos do domínio NBS amplificados em especial para cultivares resistentes a *Meloidogyne* spp permitiram a discriminação de grupos de genótipos quanto à resistência aos nematoides estudados.

As análises com SSR foram mais informativas quando comparadas com as de RGAs ao discriminar os genótipos de acordo com a resistência às diferentes raças de NCS. Os dados de *heatmap* permitem identificar as sequências que conferem resistência a NCS e responsáveis pela distinção entre genótipos resistentes e suscetíveis. Os motivos GLPL amplificados pelo conjunto de primers P-loop e GLPL está diretamente associado a resistência a *Meloidogyne* spp.

Este trabalho contribui como subsídio para programas de melhoramento, visando acrescentar informações sobre novos genes candidatos, ampliando a base de genes R conhecidos por conferirem resistência aos nematóides estudados.

6 REFERÊNCIAS

- CRUZ, C. D. **GENES** – versão Windows. 2013. Viçosa: Editora UFV. 642p.
- CONCIBIDO V. C. et al. Decade of QTL Mapping for Cyst Nematode Resistance in Soybean. **Crop Science**. v. 44, p.1121-1131.2004.
- COLL, N.S. et al. **Review: Programmed cell death in the plant immune system.** Cell Death and Differentiation. v.18. p1247–1256.2011.
- BENEVENTI et al. Transcription profile of soybean-root-knot nematode interaction reveals a key role of phytohormones in the resistance reaction. **Biomed Central**. v. 14, 2013.
- EMBRAPA, Doenças da soja. Disponível em: EMBRAPA
Fonte:http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/tab/tab_11_1.htm. 2003.
- GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C. P.; NOOKARAJU, A.; PANDEY, S. K.; PARK, S. W. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 51-65, 2012.
- LEISTER, D. et al. A PCR-based approach for isolation pathogen resistance genes from potato whit potential for wide application in plants. **Nature Genetics**. v. 14, p. 421-429. 1996.
- LEI X. et al. Agriculture and environmental biotechnology: Isolation and characterization of NBS_LRR resistance gene analogues from mango. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**. Vol. 28, No. 3, p. 417_424, 2014
- MacDONALD M. B. et al. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science & Technology**, v. 22, p. 171-176.1994.
- OLIVEIRA, A. L. **Resistência da soja à *Meloidogyne incognita*: herança e marcador molecular**. Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento - Universidade Estadual de Maringá – MARINGÁ, da UNESP. Botucatu, Paraná, 2012.

PAN, Q. et al. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucina rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and arabidopsis. **Genetics**. v.155,p.309-322. 2000.

SANSEVERINO, W.; ERCOLANO, M. R. In silico approach to predict candidate R proteins and to define their domain architecture. **BMC research notes**. V. 5, n. 1, p. 678, 2012.

SANTANA F. A. **Seleção assistida e diversidade genética de fontes de resistência ao nematóide de cisto da soja**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) -Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008.

SHEN KA et al. Resistance Gene Candidates Identified by PCR with Degenerate Oligonucleotide Primers Map to Clusters of Resistance Genes in Lettuce. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p.815-823. 1998.

SORIANO J. M et al. Characterization and mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in apricot (*Prunus armeniaca* L.) **Theor Appl Genet**, v. 110, p.980-989. 2005.

SUZUKI, C. et al. Genetic relationships of soybean cyst nematode resistance originated in Gedenshirazu and PI84751 on Rhg1 and Rhg4 loci. **Breeding Science**. V. 61:, p.602–607. 2012.

WILLIAMSON, V. M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **TRENDS in Genetics**.v.22, n.7,p. 397 - 403. 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Motivos NBS associados à resistência a *C. fimbriata* e *Meloydogine* spp foram amplificados no genoma de *Eucalyptus* spp. e soja respectivamente. Os marcadores RGAs também amplificaram demais motivos NBS associados a resistência a outros patógenos.

É evidente a importância dos *primers* que abrangem o motivo GLPL na segregação de grupos de genótipos resistente e suscetíveis a *Meloidogyne* spp, a clonagem e sequenciamento dos genes acessados por primers GLPL no genoma de soja permitirá identificar o gene associado a resistência a *Meloidogyne* spp, o que é crucial para programas de melhoramento.

Marcadores ISSR evidenciaram diversidade entre genótipos seminais de eucalipto da mesma espécie, o que induz a fazer previsões sobre a contribuição genética que os parentais concederam aos híbridos e sobre a veracidade dos dados anatômicos na classificação quanto espécie

Os marcadores SSR contribuíram para análise de especificidade de raças para NCS evidenciando a importância em se analisar QTLs no estudo de resistência a nematóides NCS, uma vez que a base genética da resistência é quantitativa. As análises anatômicas permitiram identificar diferenças entre genótipos e semelhanças entre cultivares resistentes e suscetíveis.

APENDICE A

Avaliação da anatomia da raiz de *Eucalyptus* spp.

Para o genótipo E 1528 (Super), resistente à *C. fimbriata*, pode-se observar a preseça da periderme composta por súber, e feloderme (Figura 3a). O corte não foi satisfatório para a visualização do súber que, possivelmente, sofreu descamação durante o preparo do material, bem como para a delimitação do felogênio. A feloderme é composta de aproximadamente 10 camadas de células arredondadas e achatadas. Este genótipo apresentou câmbio vascular evidente, destacando-se dos demais devido à quantidade de camadas (6) e a morfologia das células (grandes e arredondadas) (Figura 3 a-b). O xilema secundário apresentou elementos de vaso bem distribuídos com tamanhos irregulares, variando entre os diâmetros médio e grande. Os raios parenquimáticos partem da feloderme e atingem a porção central da raiz, sendo compostos por células delgadas e medianamente lignificadas. Verificou-se abundância de cristais na feloderme. Em cortes longitudinais, foram observados no xilema espaços intercelulares e fibras (Figura 3g).

Para o cultivar resistente AEC 0144 (*E. urophylla*) o súber foi visualizado em corte longitudinal (Figura 4c-d). A feloderme apresentou-se composta por cerca de 10 camadas de células parenquimáticas predominantemente arredondadas e achatadas. O câmbio vascular apresentou de quatro a cinco camadas de células. O xilema secundário apresentou-se relativamente escasso em elementos de vaso de maior diâmetro, sendo predominante a distribuição destes às margens do câmbio vascular. Os raios parenquimáticos são delgados e pouco lignificados, têm suas terminações às margens dos elementos de vasos do xilema secundário. Observa-se a presença de cristais, entretanto, em menor abundância que no genótipo E 1528. Por cortes longitudinais pôde-se identificar fibras e espaços intercelulares.

O cultivar BA 7346 (resistente) apresenta súber evidente composto por quatro camadas de células. A feloderme, assim como em AEC 0144, é composta por nove a 10 camadas de células com a presença de cristais nesta região. O câmbio vascular por sua vez apresentou de quatro a cinco camadas de células. Os elementos de vasos do xilema encontram-se dispersos e possuem forma circular ou ovalada, assim como para os demais genótipos. Raios parenquimáticos possuem

em sua base uma grande concentração de células parenquimáticas evidentes, sendo abundantes e encontram-se bem distribuídos. Raios parenquimáticos terminam próximos aos elementos de vasos do xilema primário. As células do parênquima e raios parenquimáticos mostram-se bastante lignificados. Visualizações dos cortes transversais mostram a presença de fibras e a abundância dos cristais.

TP631 (resistente), a semelhança do cultivar anterior, apresentou súber visível, felogênio não delimitado e feloderme composta por aproximadamente seis camadas de células. O câmbio vascular apresentou de cinco a seis camadas de células. O parênquima é abundante, sendo construído de células arredondadas e achatadas. Assim como para BA 7646, células parenquimáticas e raios parenquimáticos encontram-se bem corados indicando lignificação. Raios parenquimáticos terminam próximos aos elementos de vasos do xilema primário. O câmbio vascular apresenta uma estrutura relativamente discreta quando comparada ao câmbio de Super. O xilema secundário contém elementos de vasos de diferentes diâmetros, variando de grande a médios, ovalados e arredondados. As fibras são visualizadas em cortes longitudinais.

Dentre os genótipos suscetíveis estão: CO 1407, BA 6021 e GG100. Na cultivar CO 1407 (*E. urophylla*) a periderme possui o súber facilmente visualizado em cortes transversais e longitudinais (Figura 4h). A delimitação entre felogênio e feloderme não é nítida. A feloderme encontra-se com cerca de 9 a 10 camadas de células, assim como os demais genótipos, apresentando grande número de células parenquimáticas arredondadas medianamente lignificadas, em especial na base dos raios parenquimáticos. A densidade de células parenquimáticas de AEC 1407 e E 1528 é muito semelhante. O câmbio vascular apresenta-se ligeiramente menor, com 4 a 5 camadas de células. O xilema secundário apresenta abundância média de elementos de vaso, similar aos genótipos Super. O xilema primário está envolto por células parenquimáticas com conteúdo celular corado, o que não foi observado nos genótipos anteriores. Os raios parenquimáticos atravessam toda a raiz e terminam na porção central, suas células apresentam-se achatadas. Cristais e fibras estão presentes. Nos cortes longitudinais são observadas tiloses no interior dos vasos do xilema.

O genótipo BA 6021 apresenta estruturas bem lignificadas, camadas de súber e feloderme evidentes, grande quantidade de células parenquimáticas de formato arredondado e achatado. O câmbio vascular compreende aproximadamente cinco camadas de células predominantemente achatadas. Os elementos de vaso do xilema são abundantes, apresentando grande quantidade de vasos com diâmetro grandes, amplamente distribuídos. Os raios parenquimáticos estão bem distribuídos e atravessam da feloderme à margem dos elementos de vaso do xilema secundário, na porção central. Este genótipo é rico em cristais. Algumas estruturas como fibras, pontuações e espaços intercelulares podem ser observadas em cortes longitudinais.

GG100 é um cultivar da espécie (*E.urophylla*), sendo o único cultivar puro. Estruturas da periderme como o súber e feloderme são facilmente identificáveis. Nota-se estruturas pouco lignificadas, como exemplo o parênquima. O câmbio vascular possui seis camadas de células. O xilema secundário apresenta abundantes elementos de vaso, aparentemente separados do xilema primário por um delimitação de células parenquimáticas com conteúdo celular corado (formato de estrela). Este evento foi observado também no genótipo CO-1407. Os raios parenquimáticos são pouco lignificados e terminam às margens das células do parênquima com conteúdo corado. (Tabela com todos os dados descritivos em apêndice).

APÊNDICE B

Agrupamento de genótipos de eucalipto levando em consideração os cultivares TP 631 e BA7346

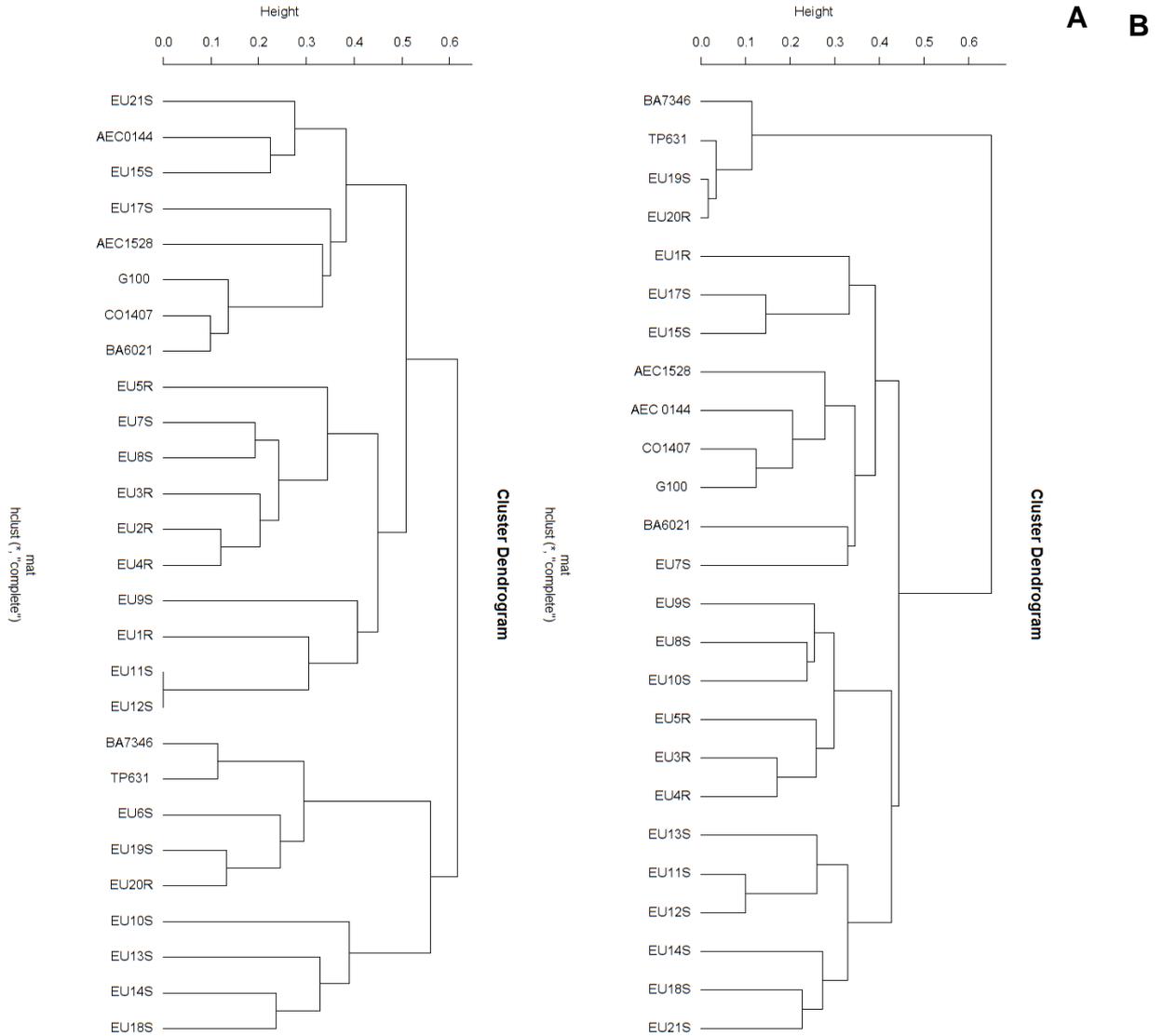


Figura 1. A). Agrupamento de 27 genótipos de eucalipto por ISSR. B) Agrupamento de 27 genótipos de eucalipto por RGA