

Avaliação da variabilidade genética em quatro gerações de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake por meio do marcador molecular RAPD

The evaluation of genetic variability in four generations of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake by RAPD marker

Silvana M. P. Cangiani Pigato
Catalina Romero Lopes

RESUMO: Os marcadores moleculares estão gradativamente substituindo os marcadores morfológicos no estudo de populações. As vantagens dos marcadores moleculares são a precisão e rapidez nas avaliações, principalmente para culturas de ciclo longo, onde determinados caracteres podem levar anos para se expressar. Este trabalho teve como objetivos principais estimar a variabilidade e distâncias genéticas em quatro gerações de *Eucalyptus urophylla* e fornecer dados que auxiliem a continuidade do melhoramento para estes materiais. As populações encontram-se instaladas na Estação Experimental de Ciências Florestais em Anhembi, SP, pertencente à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo. A população base inicial foi implantada a partir de sementes colhidas na Indonésia e foi designada como geração P0. As gerações segregantes subseqüentes, originárias de recombinação a partir de polinização aberta, foram designadas P1, P2 e P3. Analisaram-se 174 indivíduos representantes das 4 gerações. A técnica RAPD permitiu a identificação de 86 locos que foram analisados através do Coeficiente de Similaridade de Jaccard, gerando uma matriz de similaridade genética, permitindo o cálculo das distâncias genéticas. Os resultados obtidos mostraram que a distância genética média da geração P0 é de 0,3336333, da geração P1 0,336824, da geração P2 0,400000 e da geração P3 0,381093. Em termos percentuais a distância genética média entre indivíduos aumentou em relação à população base, sendo 0,15% para a geração P1, 18,93% para a geração P2 e 13,31% para a geração P3. Isto representa um aumento da variabilidade genética com o avanço do programa, apesar dos processos seletivos. Isto significa que a população base inicial (P0) resultou da colheita de sementes em árvores isoladas. Essas populações, embora passando por seleções sucessivas, tiveram uma grande eficiência de cruzamentos através de polinização satisfatória, permitindo que a variabilidade genética aumente, fruto da recombinação efetiva entre indivíduos. As gerações P2 e P3 foram as que apresentaram melhores perspectivas para continuidade do programa de melhoramento em função do grande número de grupos divergentes gerados a partir de uma distância genética padronizada de 35%. As seleções efetuadas entre grupos de diferentes níveis de divergência genética permitiram o uso eficiente da variabilidade genética disponível.

PALAVRAS-CHAVE: Genética molecular, Eucalipto, Melhoramento, Marcador molecular, Seleção, *Eucalyptus urophylla*

ABSTRACT: Molecular markers have gradually replaced morphological markers in population studies. The advantages of molecular markers are the speed and precision of evaluations, mainly for long cycle cultures, where determinate traits can take years to manifest. The principle objectives of this research were to assess variability and genetic distances in four generations of *Eucalyptus urophylla* and provide data that help with the continued improvement of these materials. The populations can be found at the Experimental Forestry Sciences Station, Anhembi, SP, belonging to the College of Agriculture "Luiz de Queiroz" of São Paulo University. The initial base population was introduced by seeds collected in Indonesia and designated P0 generation. The subsequent segregated generations, derivatives of recombination starting with open pollination, were designated P1, P2, and P3. One hundred and seventy four individual trees representing the four generations were analysed. The RAPD technique allowed the identification of 86 loci that were analysed with the Jaccard Coefficient, generating a genetic similarity matrix, permitting the estimation of genetic distances. The genetic distance of generation P0 was 0.3336333, P1 was 0.336824, P2 was 0.40000, and P3 was 0.381093. In percentage terms the genetic distances between individuals grew in relation to base population, being 0.15% for generation P1, 18.93% for P2, and 13.31% for P3. This shows an increase in genetic variability with the advance of the program, despite the selective processes. From this came the belief that the initial base population was resulting from seed collection from isolated trees. These populations, although going through successive selections, had a high cross efficiency through satisfactory pollination, which then permitted genetic variation to increase, the outcome of effective recombination between individuals. Generations P2 and P3 gave a better perspective for the continuance of the improvement program due to the high number of different groups with standard genetic distances of 35%. The selections made between the diverse genetic groups allowed the efficient use of genetic variability evaluation.

KEYWORDS: Molecular genetic, Eucalipto, Improvement, Molecular marker, Selection, *Eucalyptus urophylla*

INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus urophylla* é uma espécie tropical originária da Indonésia onde ocorre naturalmente em diversas ilhas. Nas áreas de distribuição natural, a espécie forma densas florestas relativamente puras, típicas de áreas montanhosas e sub-montanhosas, ocorrendo em altitudes que podem variar de 300 a quase 3000m (Pryor e Johnson, 1971; Pryor, 1976).

Essa espécie, introduzida no Brasil em 1919 no Horto Florestal de Rio Claro, SP, por Edmundo Navarro de Andrade, foi descrita como *E. alba*. As introduções mais importantes foram efetuadas em 1976 e 1977.

A espécie adaptou-se no Brasil em várias condições edafoclimáticas. Suas plantações foram estabelecidas desde a Região Norte até as áreas costeiras do Sul, passando pelos cerrados do Brasil Central, litoral da Bahia e Espírito Santo e interior de São Paulo. A espécie vem

confirmando seu potencial para usos múltiplos (celulose e papel, chapas de fibras, madeira serrada, postes e energia). Estima-se que hoje existam 600.000 hectares plantados com a espécie no Brasil.

O melhoramento florestal visa o aumento de produtividade, adequação da matéria prima ao produto final, melhoria nas condições adaptativas, tais como a capacidade de florescer e produzir frutos e sementes, tolerância a pragas e doenças e, principalmente, a manutenção da variabilidade genética. A necessidade de manutenção da base genética é fundamental para a obtenção de ganhos genéticos a longo prazo.

As etapas de seleção de um programa de melhoramento podem levar a grandes perdas de variabilidade genética como consequência de alta intensidade de seleção. O monitoramento do

processo de erosão genética é uma poderosa ferramenta para que o melhorista possa intervir quando necessário (Mori, 1993).

Os marcadores moleculares foram recentemente incorporados aos programas de melhoramento. Revelaram-se ferramentas poderosas com inúmeras aplicações. São utilizados no monitoramento da variabilidade genética, identificação de indivíduos ou famílias divergentes, construção de mapas genéticos, identificação de locos relacionados a caracteres quantitativos e outras (Dale e Chaparro, 1997; Grattapaglia, 1997; Ribeiro et al., 1997).

Diversos estudos foram realizados envolvendo a avaliação da variabilidade genética em *Eucalyptus*, utilizando características morfológicas, isoenzimáticas e, mais recentemente RAPD, AFLP e microssatélites (Cangiani, 1990; Moran, 1992; Grattapaglia et al., 1992; Aradhya e Phyllips, 1993; Mori, 1993; Corder, 1994; House e Bell, 1994; Keil e Griffin, 1994; Grattapaglia et al., 1995; Nesbitt et al., 1995; Gaiotto, 1996; Paris, 1997; Leite, 1998).

Nesse sentido os marcadores moleculares representam um grande avanço na avaliação de populações florestais, representando uma considerável economia de tempo, sendo considerados de grande precisão, já que o material ge-

nético analisado é o próprio DNA, independentemente da idade e do tecido utilizado.

Para estudos de variabilidade genética, os marcadores RAPD garantem uma boa amostragem do DNA do indivíduo, já que se encontram dispersos pelo genoma. Permitem a obtenção de polimorfismo com um custo relativamente baixo.

Este trabalho utilizou a tecnologia da análise genômica com marcador molecular na estimativa da variabilidade genética ao longo de gerações de melhoramento, fornecendo subsídios para a continuidade do programa. A análise de polimorfismos no DNA detectados por marcadores moleculares neutros permite analisar quaisquer regiões do genoma, colaborando na possível detecção de genes que possam ter alguma função adaptativa importante no futuro e manutenção dos mesmos em populações de interesse.

Seus objetivos foram estimar a variabilidade genética para quatro gerações de melhoramento de *Eucalyptus urophylla* de polinização aberta, por meio do uso de marcadores RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") e fornecer subsídios para a continuidade do programa de melhoramento deste material genético.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais genéticos

Foram utilizadas para o estudo 4 gerações de melhoramento de *Eucalyptus urophylla*, conforme descrito na Tabela 1.

O material genético utilizado é de origem da Ilha de Flores (Indonésia, com altitude de 600 a 1000m) e procedência de Anhembi, SP (Latitude 22°47'S, Longitude 48°09'W e Altitude de 500m).

Número de indivíduos

Para as populações 1, 2 e 4 foram amostrados 35 indivíduos ao acaso, para cada uma. Para a população 3, analisaram-se 69 progênies representadas por um indivíduo por progênie.

Extração de DNA

O DNA genômico foi obtido a partir de folhas jovens no início da maturidade. O método de extração utilizado foi o proposto por Grattapaglia e Sederoff (1994).

Tabela 1. Materiais genéticos

(Genetics materials)

Identificação	Gerações	Número de Indivíduos nas Populações	
		Instalação	Atual
População 1	geração P0 – população base	1476	312 (real)
População 2	geração P1 – ACS *	2000	612 (real)
População 3	geração P2 – TP **	1350	500 (aproximado)
População 4	geração P3 – TP **	960	600 (aproximado)
Identificação	Observações da Genealogia		
População 1	Colheita realizada na Indonésia 1976		
População 2	Colheita em 24% das árvores na geração P0		
População 3	Colheita na geração P1 - seleção de progênies		
População 4	Colheita na geração P2 – seleção de progênies		

*ACS - Área de Colheita de Sementes (Seleção massal); **TP - Teste de Progênies

Análise RAPD

Foram utilizados 73 “primers” para testar o grau de polimorfismo detectado por “primer”. A seguir utilizaram-se os que detectaram os maiores graus de polimorfismo, permitindo uma avaliação mais precisa da variabilidade genética.

Utilizaram-se “primers” de seqüência arbitrária de 10 pares de bases para amplificação dos fragmentos de DNA, conforme descrito por Williams et al. (1990).

Para as reações de amplificação RAPD utilizou-se o protocolo descrito por Grattapaglia e Sederoff (1994).

A separação dos diferentes fragmentos amplificados foi realizada por eletroforese submersa em gel de agarose a 1,5%, usando-se 100 a 120 mA e 80 a 100 V.

Os padrões obtidos com os produtos da amplificação foram visualizados no gel, com o auxílio de brometo de etídeo, sob luz ultravioleta e fotografado com filme “polaroid” 667 preto e branco.

Análise dos dados RAPD

Os resultados obtidos pelas análises RAPD foram analisados quanto à variabilidade genética detectada nas diferentes gerações de melhoramento, procurando-se entender o comporta-

mento da mesma em função do programa de melhoramento utilizado ao longo das gerações e qual a perspectiva de utilização dos materiais na continuidade do programa.

Os dados resultantes das análises RAPD foram analisados de forma binária, através da presença ou ausência da banda, utilizando-se o número “1” para indicar a presença da banda e o número “0” para indicar a ausência da banda.

Os dados foram transferidos para o programa Excell e analisados através do software NTSYS-pc versão 1.8 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (Rohlf, 1992).

Foi obtida uma matriz de similaridades genéticas entre pares de indivíduos, utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard, que considera como similaridade a presença em comum (banda no gel) de um dado fragmento, em cada par de indivíduos considerados.

Os indivíduos representando as populações de polinização aberta foram agrupados pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average), que considera a média dos valores de similaridade genética da matriz de Jaccard. Após a obtenção dos resultados de similaridade, foram calculadas as distâncias genéticas, conforme proposto por Arcade et al. (1996).

RESULTADOS

Seleção de “Primers”

Para o teste de “primers” selecionou-se ao acaso 14 indivíduos que representaram todas as populações estudadas.

Foram testados 73 “primers”, dos quais 17 (23,3%) não apresentaram produtos de amplificação, 39 (53,4%) não detectaram clareza na identificação dos locos e 17 (23,3%) apresentaram polimorfismo.

Os 17 “primers” selecionados permitiram a identificação de 86 locos polimórficos; foram escolhidos pelo polimorfismo e em função do número e clareza dos locos amplificados, com o objetivo de evitar resultados ambíguos.

A Tabela 2 apresenta os códigos dos “primers” selecionados e o número de locos detectados por “primer”.

O número total de locos polimórficos detectados e efetivamente analisados está em concordância com os resultados obtidos em outros trabalhos realizados com *Eucalyptus spp* (Leite, 1998 e Gaiotto, 1996).

Distância genética entre gerações de melhoramento

Os indivíduos da população base (P0) apresentaram a menor média de distância genética entre si, isto é, a menor variabilidade genética (média de 0,336333, amplitude 0,09 a 0,55), sendo seguida pelas populações P1 (média de 0,336824, amplitude 0,10 a 0,44), P3 (média de 0,381093, amplitude 0,11 a 0,53) e P2 (média de 0,40000, amplitude 0,20 a 0,71), conforme mostra a Figura 1.

As populações resultantes das gerações de melhoramento foram comparadas tendo como referência a população inicial (P0), que se trata da população base que deu origem às demais. Para a população P0 deu-se um valor arbitrário de 0,00% ao grau de variabilidade genética exis-

Tabela 2. Identificação dos 17 “primers” utilizados, com o número de locos detectados por “primer”

(Amplification results for 17 selected primers and the number of selected loci).

“Primer” (Operon)	Locos Detectados
OPX6	5
OPX12	4
OPX13	7
OPX14	8
OPX15	5
OPX17	4
OPX18	4
OPB1	7
OPB2	4
OPB4	4
OPB8	6
OPB17	4
OPB19	5
OPW2	4
OPW3	7
OPW4	4
OPW14	4
TOTAL	86

tente, sendo que a variabilidade genética das gerações seguintes foi calculada a partir de P0.

A Tabela 3 apresenta o comportamento da distância genética média ao longo das gerações e as variações ocorridas (%) a partir da população base inicial.

Os indivíduos da população base inicial (P0) mostraram os menores valores para distância genética, seguido pelos indivíduos da geração P1 (+0,15%), P3 (+13,31%) e P2 (+18,93%).

Entre os indivíduos das populações P0 e P1 a variabilidade praticamente não se alterou, já as populações P2 e P3 tiveram um grande aumento na variabilidade genética em relação a população P0.

Tabela 3. Distâncias genéticas obtidas para as populações estudadas e variações ocorridas em relação à população base inicial.

(Genetics distances obtained for the populations studied and the variations in relation to the initial base population).

Populações	Distância Média	% Variação
P0 - População base	0,336333	0,00
P1	0,336824	0,15
P2	0,400000	18,93
P3	0,381093	13,31

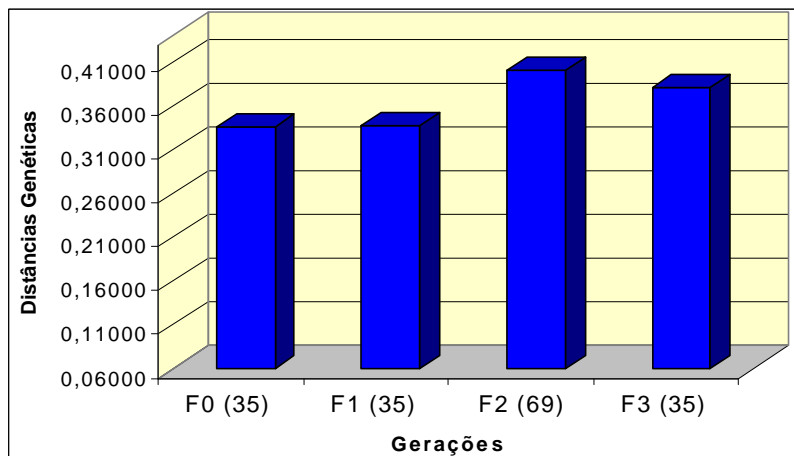


Figura 1. Distâncias genéticas médias alcançadas em função das gerações de melhoramento.

(Genetics distances in terms of improvement generations)

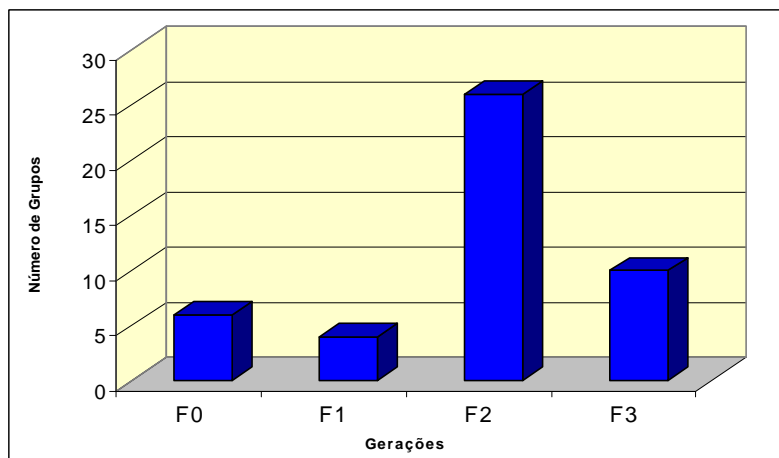


Figura 2. Número de grupos obtidos a partir de distância genética padronizada de 35% em função das gerações de melhoramento.

(Number of groups obtained based on the standardized genetic distance of 35% in terms of improvement program)

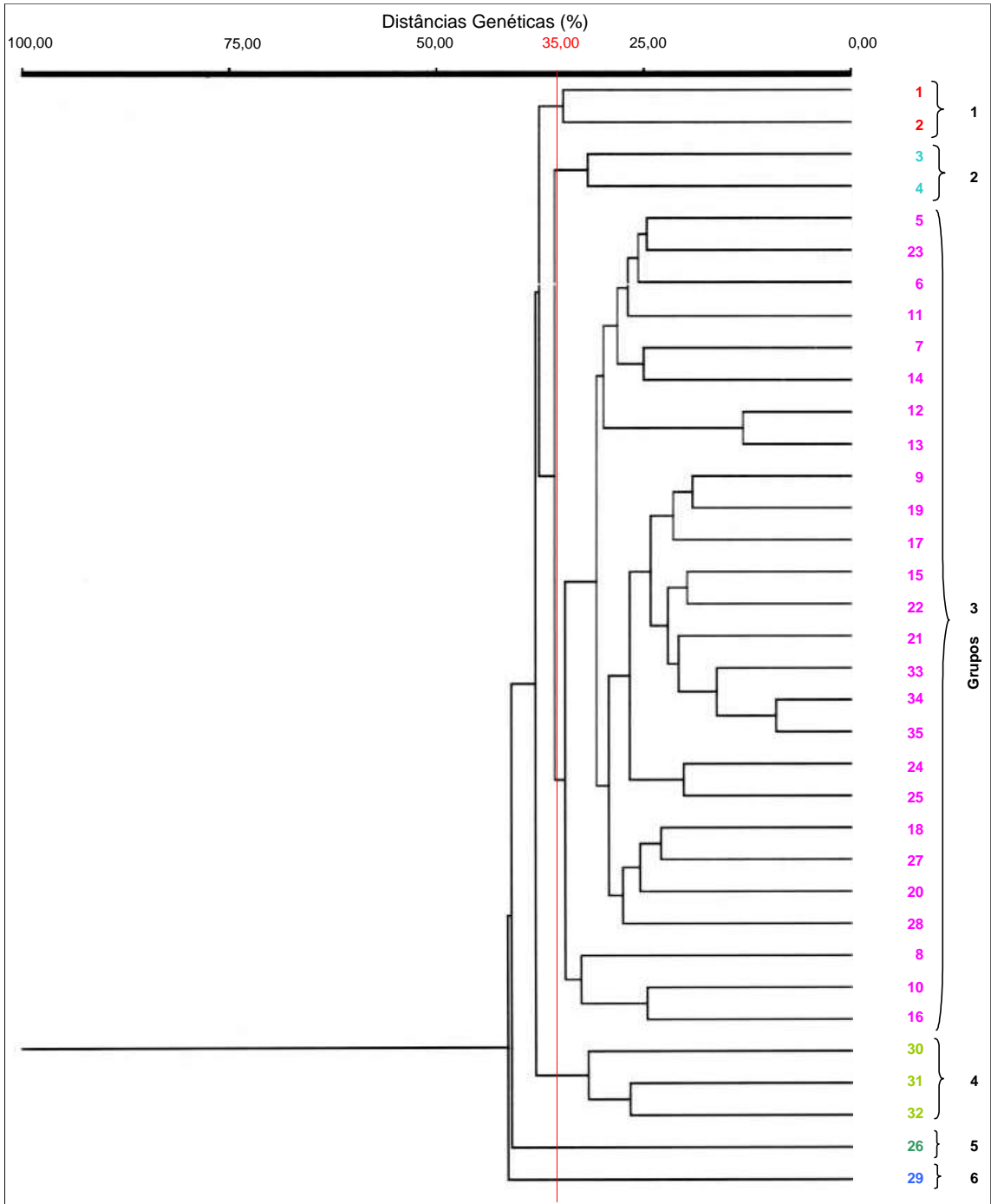


Figura 3. Dendrograma da geração P0, com 6 grupos de indivíduos de menor distância genética, gerados a partir do limite de distância genética padronizada de 35%.

(Dendrogram of generation P0, with 6 generated groups based on the standardized genetic distance of 35%).

Grupos gerados a partir de distância genética padronizada de 35%

Para garantir a continuidade do melhoramento com os materiais genéticos definiu-se um limite de distância genética arbitrária mínima de 35% entre indivíduos, a fim de identificar grupos geneticamente divergentes e permitir a realização de seleções. A Figura 2 mostra os grupos obtidos a partir desse limite de distância genética arbitrária padronizada de 35%, para todas as populações estudadas.

A avaliação do número de grupos permitiu verificar que não houve redução no número dos mesmos ao longo das gerações, o que é de grande importância nos programas de melhoramento.

As Figuras 3, 4, 5, 6 e a Tabela 4 mostram o número e distribuição dos indivíduos em cada grupo gerado a partir da distância genética padronizada de 35%, ponto básico para discussão da seleção a ser efetuada para a continuidade do programa.

Houve uma ampla distribuição dos indivíduos dentro dos diferentes grupos, em número variável ao longo das diferentes gerações estudadas, o que possibilita inúmeras oportunidades para a seleção genética visando a manutenção da variabilidade.

DISCUSSÃO

Distâncias genéticas entre as gerações de melhoramento

A distância genética média, considerando-se os 174 indivíduos estudados para as quatro gerações de *E. urophylla*, foi de 0,36, variando de 0,09 a 0,71. Gaiotto (1996) obteve distância genética média de 0,40, trabalhando com 121 famílias de *E. urophylla*, que foi considerada satisfatória pelo autor, permitindo o desenvolvi-

Tabela 4. Grupos geneticamente divergentes obtidos com o agrupamento de indivíduos de menor distância genética entre si, nas gerações P0, P1, P2, P3, obtidos a partir do limite de distância genética padronizada em 35%.

(Distribution of individuals in generations P0, P1, P2 and P3 based on the standardized genetic distance of 35%)

Grupos	Números de Indivíduos por Geração			
	P0	P1	P2	P3
1	2	29	2	2
2	2	3	3	8
3	26	1	25	2
4	3	2	4	14
5	1	-	1	
6	1	-	3	2
7	-	-	2	1
8	-	-	3	2
9	-	-	1	1
10	-	-	1	1
11	-	-	1	-
12	-	-	1	-
13	-	-	1	-
14	-	-	1	-
15	-	-	3	-
16	-	-	1	-
17	-	-	1	-
18	-	-	4	-
19	-	-	2	-
20	-	-	1	-
21	-	-	2	-
22	-	-	2	-
23	-	-	1	-
24	-	-	1	-
25	-	-	1	-
26	-	-	1	-

mento de programas de melhoramento. No entanto, a distância genética média obtida foi inferior ao obtido por Leite (1998) para *E. grandis*, que ficou ao redor de 0,67 e por Almeida (1998) que para diferentes pares de indivíduos de *E. grandis* variou de 0,87 a 0,47.

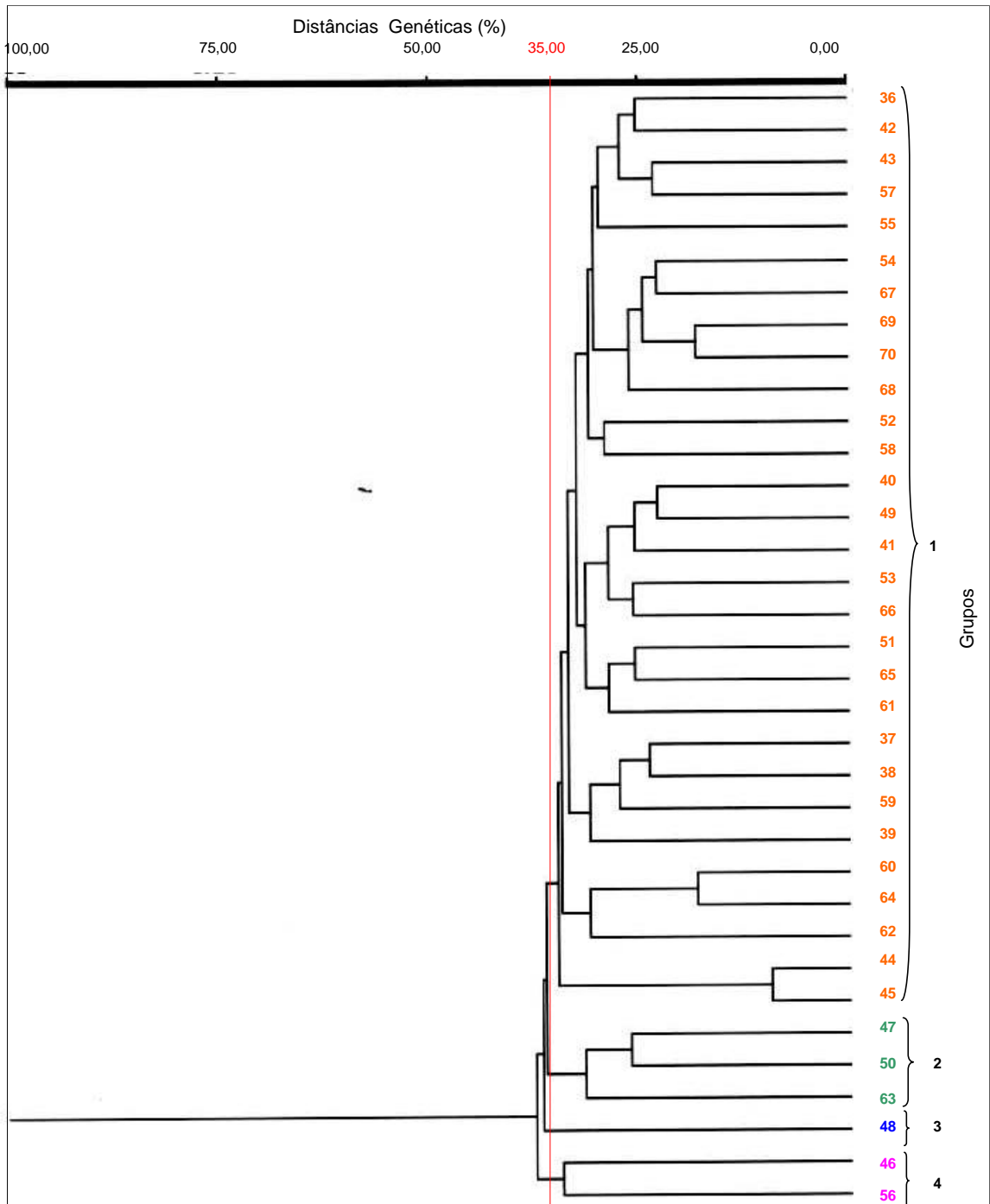


Figura 4. Dendrograma da geração P1, com 4 grupos de indivíduos de menor distância genética, gerados a partir do limite de distância genética padronizada de 35%.

(Dendrogram of generation P1, with 4 generated groups based on the standardized genetic distance of 35%)

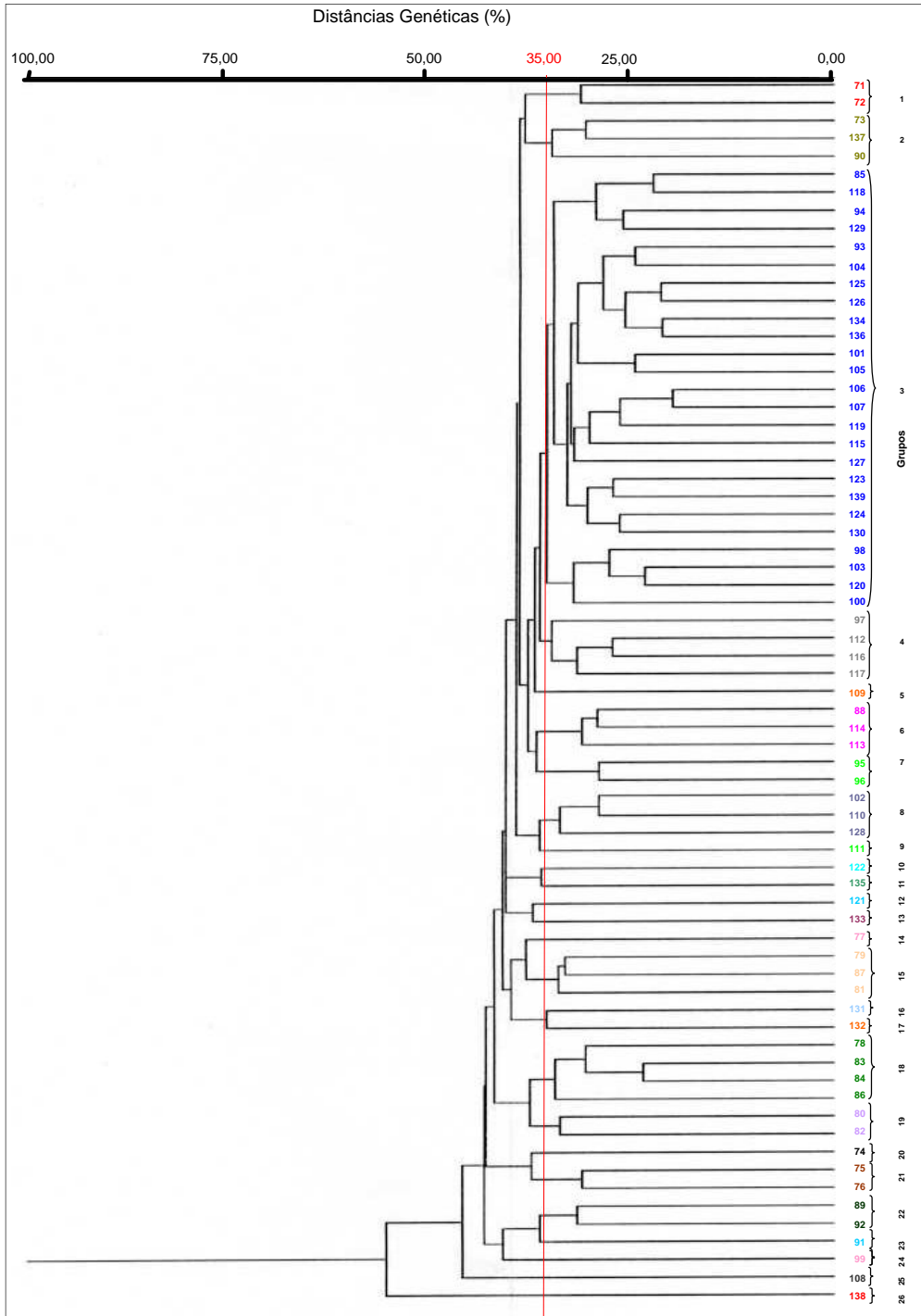


Figura 5. Dendrograma da geração P2, com 26 grupos de indivíduos de menor distância genética, gerados a partir do limite de distância genética padronizada de 35%

(Dendrogram of generation P2, with 26 generated groups based on the standardized genetic distance of 35%)

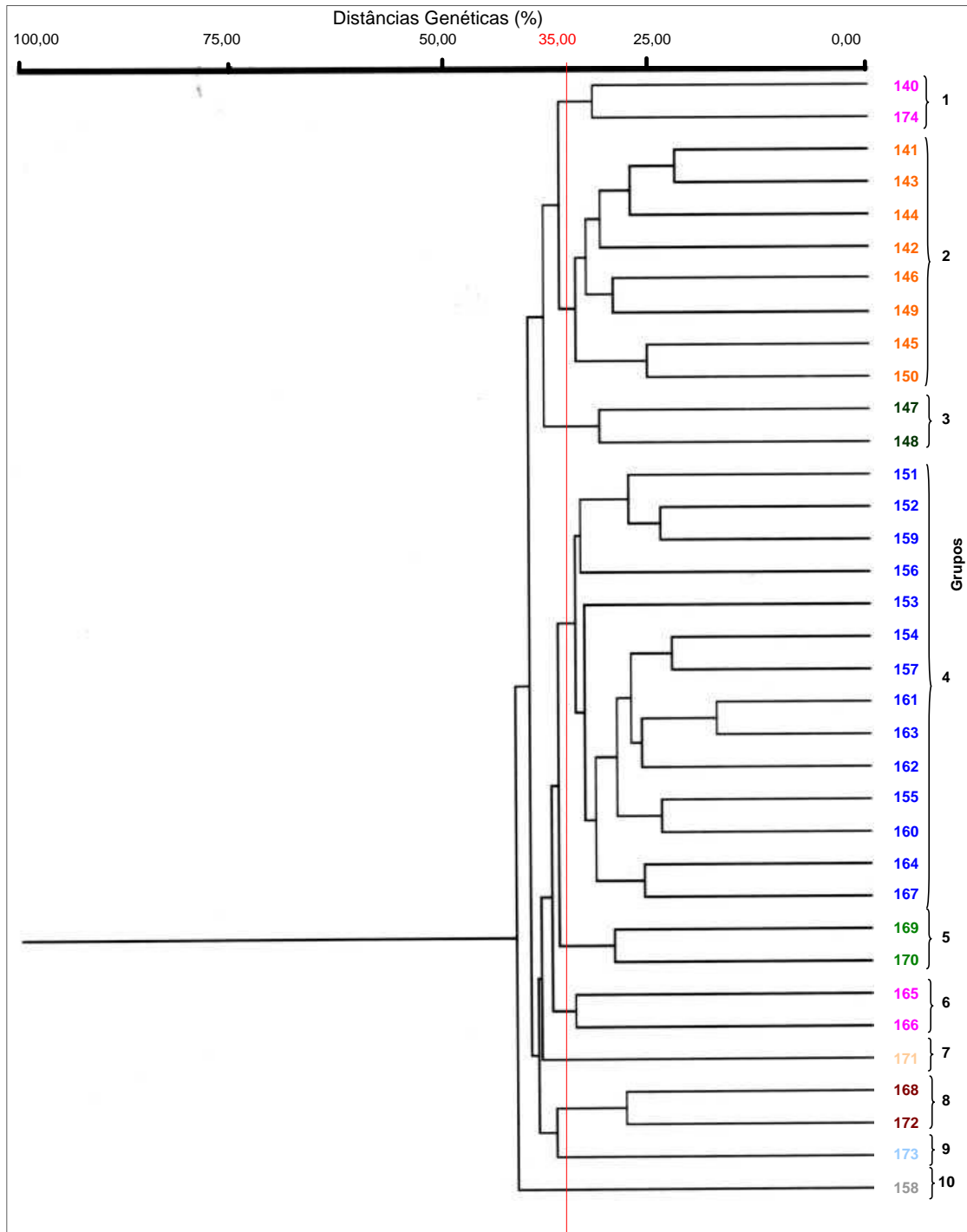


Figura 6. Dendrograma da geração P3, com 10 grupos de indivíduos de menor distância genética, gerados a partir do limite de distância genética padronizada de 35%

(Dendrogram of generation P3, with 10 generated groups based on the standardized genetic distance of 35%)

Na análise individual das populações observou-se que a população base inicial P0 apresentou o menor valor de distância genética média (0,336333), seguida pela geração P1 (0,336824), geração P3 (0,381093) e geração P2 (0,40), conforme observado na Figura 1.

Provavelmente a colheita inicial realizada na Indonésia foi efetuada em um pequeno número de indivíduos, em alguns casos árvores isoladas, com alto grau de endogamia ou oportunidade reduzida de cruzamentos, situação que reflete inúmeras introduções de outras espécies e procedências de *Eucalyptus sp* feitas no Brasil, relatado por Leite (1998) para *E. grandis*.

No entanto, observou-se que ao longo das gerações, mesmo com a realização de seleções a fim de originar a geração seguinte, a distância genética foi mantida na geração P1 e aumentou progressivamente para as gerações P2 e P3.

O esperado, em qualquer programa de melhoramento, é que ao longo das gerações a variabilidade genética passe por uma redução que deve ser monitorada para evitar excessiva erosão genética e permita identificar a necessidade de novas introduções e cruzamentos a fim de minimizar as perdas (Mori, 1993). Para o material genético em estudo essa redução não ocorreu. Uma provável hipótese para a manutenção inicial e gradual aumento da distância genética está relacionada ao programa de melhoramento utilizado, que favoreceu a recombinação dos materiais genéticos por quatro gerações. A recombinação, favorecida por condições edafoclimáticas que promoveram um florescimento satisfatório, aliada às seleções de baixa intensidade, levaram a ampliação da variabilidade genética. Possivelmente, novos genótipos foram criados através do rompimento de blocos gênicos que se encontravam separados na região de origem. A variabilidade genética gerada pela recombinação equilibrou a restrição ocorrida através dos processos seletivos. Leite (1998) encontrou resultado semelhante com *Eucalyptus grandis*, onde populações adaptadas apresentaram maiores distâncias genéti-

cas em relação às populações selvagens, resultante de recombinação efetiva.

Além disso, a variabilidade genética distribuiu-se por todo o genoma. Ao realizar uma seleção, geralmente consideram-se os caracteres silviculturais de maior importância como altura, diâmetro, forma do fuste etc., que teriam sua variabilidade genética reduzida. No entanto, a variabilidade presente no restante do genoma estaria sendo mantida.

A informação obtida tem influência direta no melhoramento genético de populações. Para as populações em estudo, foram necessárias gerações de recombinações e seleções brandas a fim de quebrar blocos gênicos, melhorar a estrutura populacional e adaptabilidade e criar uma "raça local".

Possibilidades do melhoramento genético

Na orientação de um programa de melhoramento de *E. grandis*, Leite (1998) utilizou distância genética de 0,40, tendo como base o perfil dos fenogramas, encontrando 42 grupos. No presente trabalho, os grupos de indivíduos gerados a partir de uma distância genética padronizada de 35% foram: 6 grupos para a geração P0; 4 grupos para a geração P1; 26 grupos para a geração P2; 10 grupos para a geração P3 (Tabela 4 e Figuras 3, 4, 5 e 6). As gerações P0 e P1 mostraram uma ampla concentração de indivíduos em um determinado grupo, dificultando a seleção de indivíduos geneticamente divergentes. A Tabela 4 mostra que para a geração P0, 74,3% dos indivíduos analisados pertencem ao mesmo grupo; já para a geração P1 82,9% dos indivíduos pertencem ao mesmo grupo.

As gerações P2 e P3 produziram um maior número de grupos a partir da distância genética padronizada, e com uma melhor distribuição dos indivíduos. A geração P2 concentrou 36,2% de indivíduos no mesmo grupo e a geração P3 40,0% de indivíduos no mesmo grupo (Tabela 4 e Figuras 3, 4, 5 e 6). As grandes possibilidades

de seleção dos melhores materiais genéticos estão nas gerações P2 e P3, onde a presença de variabilidade genética permite a realização de novas seleções.

A partir de indivíduos das gerações P2 (Figura 5) e P3 (Figura 6), as seleções devem procurar recombinar os indivíduos pertencentes a

diferentes grupos, dentro e entre os 26 disponíveis em P2 e os 10 disponíveis em P3. A quantificação da variabilidade genética aliada às informações silviculturais permitem ao melhorista tomar decisões sobre quais grupos devem ter seus indivíduos recombinados na realização de novas seleções.

CONCLUSÕES

- ✓ O monitoramento do nível de variabilidade genética presente em quatro gerações de *E. urophylla* foi eficientemente realizada por meio do marcador molecular RAPD;
- ✓ A geração inicial (P0) apresentou distância genética média inferior às distâncias genéticas médias detectadas nas gerações subsequentes;
- ✓ Ao longo das gerações consideradas, ocorreu uma ampliação da variabilidade genética, ao que tudo indica, em decorrência da efetividade de cruzamentos aleatórios, favorecidos por um florescimento satisfatório e seleções brandas, resultando em ampla recombinação entre os indivíduos e melhorias na estrutura populacional;
- ✓ O melhoramento genético não restringiu a variabilidade dos genes neutros nas sucessivas gerações ;
- ✓ A partir de um limite de distância genética padronizada de 35%, as gerações P2 e P3 comprovaram possuir um significativo número de diferentes grupos de indivíduos, mais semelhantes dentro dos grupos e diferentes entre grupos, permitindo novas recombinações, adequadas para a continuidade do programa de melhoramento;
- ✓ O limite de distância genética padronizada de 35% foi adequado para o estabelecimento de grupos geneticamente divergentes;
- ✓ As seleções ou cruzamentos de indivíduos pertencentes a grupos geneticamente divergentes permitiram controlar a amplitude da variabilidade genética, em nível molecular.

AUTORES E AGRADECIMENTOS

SILVANA MARIA PAES CANGIANI PIGATO é Doutora em Ciências Biológicas, pela UNESP/Botucatu. É Pesquisadora e Professora da FAESP-Faculdades Integradas Espírito Santense. Rua Diógenes Malacarne 140, Apto 1003, Praia da Costa - Vila Velha - ES. CEP: 29101-210 E-mail: silvanap@tdf.com.br

CATALINA ROMERO LOPES é Professora Titular do Departamento de Genética da UNESP/Botucatu. Rua Hortênsia, 111 - Vila Paraíso,

Botucatu - SP. CEP: 18603-660. E-mail: btcatali@terra.com.br

As autoras agradecem à Universidade Estadual Paulista UNESP/Botucatu; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF); Departamento de Ciências Florestais/Esalq/USP pelo apoio prestado ao desenvolvimento de trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, R.B.A. **Caracterização molecular da variabilidade genética de uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden destinada a serraria**. Botucatu, 1998. 77p. Tese (Mestrado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
- ANDRADE, E.N. **O eucalipto**. 2.ed. Jundiaí: Companhia Paulista de Estradas de Ferro, 1961. 667p.
- ARADHYA, K.M.; PHILLIPS, V.D. Genetic variability in fourteen provenances of *Eucalyptus* species in Hawaii. **Silvae genetica**, v.42, p.9-15, 1993.
- ARCADE, A.; FAIVRE-RAMPANT, P.; LE GUERROÉ, B.; PÂQUEUS, L.E.; PRAT, D. Heterozygosity and hybrid performance in larch. **Theoretical applied genetics**, v.93, p.1274-1281, 1996.
- CANGIANI, S.M.P. **Caracterização e avaliação em viveiro de híbridos de polinização aberta de *Eucalyptus spp.*** Piracicaba, 1990. 106p. Tese (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo
- CORDER, M.P.M. **Caracterização isoenzimática de híbridos de *Eucalyptus spp.*** Botucatu, 1994. 113p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
- DALE, G.; CHAPARRO, J. Integration of molecular markers into tree breeding and improvement programs. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, Salvador, 1997. **Proceedings**. Colombo: EMBRAPA/CNPF, 1997. v.2, p.80.
- GAIOTTO, F.A. **Estimativa de recombinação e estrutura genética em uma população de melhora-mento de *Eucalyptus urophylla* com marcadores RAPD e AFLP**. Botucatu, 1996. 66p. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
- GRATTAPAGLIA, D. Opportunities and challenges for the incorporation of genomic analysis in *Eucalyptus* breeding. IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, Salvador, 1997. **Proceedings**. Colombo: EMBRAPA/CNPF, 1997. v.2, p.129-136
- GRATTAPAGLIA, D.; BERTOLUCCI, F.L.; SEDEROFF, R. Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. **Theoretical applied genetic**, v.90, p.933-947, 1995.
- GRATTAPAGLIA, D.; O'MALLEY, D.; SEDEROFF, R. Multiple applications of RAPD markers to analysis in *Eucalyptus sp.* In: CONFERENCE IUFRO ON BREEDING TROPICAL TREES, Cartagena, 1992. **Proceedings**. Raleigh: Camcore, 1992. p.436-450
- GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v.137, p.1121-1137, 1994.
- HOUSE, A.P.N.; BELL, J.C. Isozyme variation and mating system in *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Silvae genetica**, v.43, p.167-176, 1994.
- KEIL, M.; GRIFFIN, A.R. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. **Theoretical applied genetic**, v.89, p.442-450, 1994.
- LEITE, S.M.M. **Variabilidade genética em uma população-base de *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden através do marcador RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao acaso)**. Botucatu, 1998. 84p. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
- MORAN, G.F. Patterns of genetic diversity in Australian tree species. **New forests**, v.6, p.49-66, 1992.
- MORI, E.S. **Variabilidade isoenzimática em uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção**. Piracicaba, 1993. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo
- NESBITT, K.A.; POTTS, B.M.; VAILLANCOURT, R.E.; WEST, A.K.; REID, J.B. Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). **Heredity**, v.74, p.628-637, 1995.
- PARIS, A. **Caracterização molecular de clone de *Eucalyptus sp* utilizando a técnica de RAPD**. Botucatu, 1997. 41p. (Monografia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
- PRYOR, L.D. **Biology of *Eucalyptus***. London: Edward Arnold, 1976. 82p.
- PRYOR, L.D.; JOHNSON, L.A.S. **A classification of the *Eucalyptus***. Canberra: Australian National University, 1971. 102p.

RIBEIRO, V.J.; BERTOLUCCI, F.L.; GRATTAPAGLIA, D. RAPD marker-guided mating in a reciprocal recurrent selection program of *Eucalyptus*. IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, Salvador, 1997. **Proceedings**. Colombo: EMBRAPA/CNPF, 1997. v.2, p.156-160

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 1.70**. Setauket: Exeter Software, 1992.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

