

# Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênies de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake

## Silvicultural and botanical characterization and genetic variability by RAPD molecular marker in progeny trial of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake

Silvana M. P. Cangiani Pigato  
Catalina Romero Lopes

---

**RESUMO:** Os marcadores moleculares foram recentemente incorporados aos programas de melhoramento. No entanto, já são considerados ferramentas poderosas com diversas aplicações, entre elas, o monitoramento da variabilidade genética em populações. Este trabalho teve como objetivo principal estimar a variabilidade genética em uma população de *Eucalyptus urophylla* submetida a um teste de progênies, ao qual foram acrescentadas informações silviculturais e botânicas com a finalidade de fornecer subsídios para a continuidade do programa de melhoramento. A população utilizada encontra-se instalada na Estação Experimental de Ciências Florestais em Anhembi, SP, pertencente à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. Analisaram-se 69 progênies representadas por um único indivíduo por família. A detecção de polimorfismo molecular obtido pelo uso do marcador RAPD permitiu a identificação de 72 locos que foram analisados através do Coeficiente de Similaridade de Jaccard, gerando uma matriz de similaridade genética, que permitiu o cálculo das distâncias genéticas. Os resultados obtidos mostraram que a distância genética média entre indivíduos foi de 0,40, com 12 grupos de diferentes níveis de divergência genética a partir de um limite de distância genética padronizada de 40%. As progênies apresentaram diferentes padrões de casca, permitindo o estabelecimento de grupos de casca. Os agrupamentos de indivíduos obtidos em função das distâncias genéticas estabelecidas pela análise do DNA não corresponderam aos agrupamentos obtidos em função do padrão de casca exibido. Foi possível simular uma seleção genética onde aliam-se dados de variabilidade genética e silviculturais, evitando perdas excessivas de variabilidade. A simulação de cruzamentos controlados tornou possível recombinar pares de indivíduos apresentando entre eles as distâncias genéticas máximas obtidas, com superioridade em altura e menores percentuais de casca rugosa.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Eucalyptus urophylla*, Caracterização botânica, Caracterização silvicultural, Melhoramento, Marcador molecular, Genética molecular

**ABSTRACT:** Molecular markers have recently been incorporated into genetic improvement programs. They are already considered as powerful tools with several different uses, for instance the monitoring of genetic variability in tree populations. The main objectives of this study were to evaluate genetic variability in *Eucalyptus urophylla* progenies and together with silvicultural and botanical information, provide assistance to the improvement program. The Eucalypts population is located at the Experimental Forestry Sciences Station, Anhembi, SP,

which belongs to the College of Agriculture "Luiz de Queiroz". Sixty-nine progenies were analysed representing one individual by family in open pollinated *Eucalyptus urophylla* trees. The RAPD technique allowed the identification of 72 loci that were analysed using Jaccard's Coefficient generating a genetic similarity matrix to permit estimation of genetic distances. The results obtained showed genetic distance between individuals of 0.40 with 12 groups of genetic variability using a standardised distance of 40%. The progenies showed different bark patterns, allowing the establishment of bark groups. The groups formed based on genetic distances obtained using DNA analysis did not correspond to those based on bark pattern. Genetic selection was simulated in which silvicultural and genetic variability data were linked, thus avoiding excessive variability losses. The simulation of controlled crossings allowed the maximum genetic difference to be obtained linked with height and individual bark roughness.

**KEYWORDS:** *Eucalyptus urophylla*, Silvicultural characterization, Botanical characterization, Molecular marker, Molecular genetic

## INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, apresentando cerca de 600 espécies, muitas variedades e híbridos. Uma grande parte destes materiais está descrita no trabalho de S.T. Blake (Brooker e Kleinig, 1983; Andrade, 1961).

O *Eucalyptus urophylla* é uma espécie tropical originária da Indonésia, onde ocorre naturalmente. 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). A espécie foi introduzida no Brasil em 1919 por Edmundo Navarro de Andrade.

A espécie apresenta porte elevado, forte dominância apical; a casca pode ser parcialmente rugosa a espessa fibrosa, de coloração marrom quando seca e quase negra quando úmida. Em função da altitude pode haver ocorrência de casca lisa. As folhas das plantas adultas são alongadas, estreitas e pecioladas. Os frutos podem apresentar 2 tipos de formas: campanulada ou hemisférica em altitudes superiores a 1000m; cônico em altitudes inferiores a 1000 m (Martin e Cossalter, 1976).

A espécie tem posição de destaque nas regiões tropicais, em função dos problemas adaptativos apresentados pelo *Eucalyptus grandis* nessas condições edafoclimáticas. O *E.*

*urophylla* conta com 600.000 hectares plantados e a espécie e seus híbridos são responsáveis pelo sucesso da silvicultura clonal intensiva.

No entanto, os estudos com essa espécie são limitados, em função da quantidade reduzida de material genético disponível nas regiões de introdução e principalmente em sua região de origem, a Indonésia. Além disso, só foi oficialmente descrita em 1983 por S.T. Blake.

O melhoramento florestal tem como meta o aumento da produtividade e a adequação da matéria prima ao produto final. No entanto, para a obtenção de ganhos genéticos a longo prazo é necessário um monitoramento da base genética, a fim de evitar perdas excessivas de variabilidade (Mori, 1993). Nesse sentido, foram realizados diversos estudos envolvendo o monitoramento da variabilidade genética em *Eucalyptus*, utilizando marcadores morfológicos, isoenzimáticos e, mais recentemente, RAPD, AFLP e microssatélites (Cangiani, 1990; Moran, 1992; Grattapaglia et al., 1992; Aradhyia 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).

Os marcadores moleculares foram recentemente incorporados aos programas de melhoramento. Podem ser considerados ferramentas

poderosas com muitas aplicações. São utilizados no monitoramento da variabilidade genética, identificação de indivíduos ou famílias divergentes, construção de mapas genéticos, identificação de locos relacionados aos caracteres quantitativos. (Dale e Chaparro, 1997; Grattapaglia, 1997; Ribeiro et al., 1997).

Os marcadores RAPD garantem uma boa amostragem do genoma do indivíduo, tanto para regiões codificadoras como para regiões repetitivas. Permitem a detecção de polimorfismo por um custo relativamente baixo.

Os programas de melhoramento com o *Eucalyptus urophylla* consideram dados de produtividade, adequação da matéria prima ao produto final e o padrão de casca exibido, em função da grande variação existente. Os indivíduos apresentam desde 100% de casca rugosa ou fibrosa até cascas praticamente lisas e decíduas. Esses diferentes padrões de casca são atribuídos, principalmente, a diferentes altitudes na região de ocorrência natural da espécie, sendo considerada uma variação do tipo clinal (Martin e Cossalter, 1976). Embora pouco se conheça sobre padrão de herança do tipo de casca, são desejáveis materiais genéticos com menor percentual de casca rugosa ou fibrosa, o que permite obter maiores rendimentos em madeira, além de tornar o processo de retirada da casca em si uma atividade menos onerosa.

No Brasil, as árvores selecionadas que apresentavam casca lisa foram identificadas como pertencentes ao *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla*. Essa variedade não foi descrita e a atribuição do nome é um artifício para despertar o interesse das entidades florestais brasileiras para o nosso material genético (Ferreira, 1999).

Este trabalho utilizou a tecnologia da análise genômica a partir do uso do marcador molecular RAPD na estimativa da variabilidade genética em um teste de progênies de *Eucalyptus urophylla*, simulando diferentes processos seletivos, juntamente com a caracterização botânica e silvicultural do material genético. A avaliação de polimorfismos com marcadores moleculares neutros permite analisar satisfatoriamente o genoma, colaborando na possível detecção de genes que possam ter alguma função adaptativa importante no futuro e manutenção dos mesmos em populações de interesse.

Desse modo, o presente trabalho teve como objetivos estimar a variabilidade genética em um teste de progênies de *Eucalyptus urophylla* de polinização aberta, por meio de marcadores RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"); aliar dados de variabilidade genética, obtido através do marcador molecular, de produtividade e de caracterização botânica, na seleção do material genético; fornecer subsídios para a continuidade do programa de melhoramento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material genético

Foi utilizada para o estudo uma população de *Eucalyptus urophylla*, instalada em Anhembi, SP (latitude 22°47'S, longitude 48°09'W e altitude de 500m), na Estação Experimental de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo.

A população, designada como P2, é a terceira geração de recombinação desse material

genético, ocorrida no Brasil. A primeira geração (ou população base) foi colhida na Ilha de Flores (Indonésia) em altitudes de 600 a 1000m.

A população encontra-se instalada na forma de teste de progênies, com 90 progênies, 5 plantas por parcela e 3 repetições. Foi instalada em 1989 e posteriormente desbastada e transformada em Pomar de Sementes, sendo mantidas todas as progênies.

### **Número de indivíduos**

Foram amostradas 69 progênies representadas por um único indivíduo por progênie, totalizando 69 indivíduos.

### **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).

### **Análise RAPD**

Foram utilizados 73 “primers” para testar o grau de polimorfismo detectado por cada um. A seguir utilizaram-se apenas os que detectaram os maiores graus de polimorfismo.

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.

### **Características botânicas e silviculturais**

Para as árvores representando as 69 progênies foram realizadas avaliações botânicas e silviculturais, utilizando a metodologia proposta

por Ferreira (1999), baseada em descrições relatadas por vários autores (Pryor et al., 1995; Brooker e Kleinig, 1983; Penfold e Willis, 1961). São elas:

- ✓ Tipo de casca: lisa e rugosa e o percentual de cada tipo de casca em relação ao tronco das árvores;
- ✓ Forma das folhas: obtida através da relação entre o comprimento e a largura foliar, com amostragem de 10 folhas por progênie;
- ✓ Frutos: forma do fruto avaliada por comparação, com amostragem de 10 frutos por progênies;
- ✓ Sementes: tamanho comparativo da semente (entre elas);
- ✓ Porte das árvores: avaliado pela medição do diâmetro do tronco a altura do peito (DAP em centímetros) e altura total das árvores em metros (m).

### **Análise dos dados**

#### **Dados RAPD**

Os resultados obtidos pelas análises RAPD foram analisados quanto à variabilidade genética entre os indivíduos. 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 Excel 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 da matriz de Jaccard. Após a obtenção dos resultados de similaridade, foram calculadas as distâncias genéticas, conforme proposto por Arcade et al. (1996).

## Dados Botânicos

### Padrão de casca

As progênies foram agrupadas segundo o padrão de casca exibido, conforme descrito abaixo:

- ✓ Grupo 1: casca 100% rugosa em todo o tronco da árvore,
- ✓ Grupo 2: casca predominantemente rugosa por todo tronco da árvore (95 a 60% de casca rugosa e o restante lisa),
- ✓ Grupo 3: casca intermediária (50 a 40% de casca rugosa e o restante lisa),
- ✓ Grupo 4: casca predominantemente lisa (25 a 5% de casca rugosa e o restante lisa).

### Frutos, sementes e folhas

Foram descritos segundo metodologia do item Características botânicas e silviculturais.

## RESULTADOS

### Seleção de “Primers”

Para o teste de “primers” selecionaram-se ao acaso 10 indivíduos que representaram a população estudada.

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 72 locos polimórficos. Os “primers” foram escolhidos em função do número e clareza dos locos amplificados com o objetivo de evitar resultados ambíguos.

A Tabela 1 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; Gaiotto, 1996).

**Tabela 1.** 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	4
OPX12	4
OPX13	5
OPX14	5
OPX15	4
OPX17	4
OPX18	4
OPB1	5
OPB2	4
OPB4	4
OPB8	4
OPB17	4
OPB19	4
OPW2	4
OPW3	5
OPW4	4
OPW14	4
<b>Total</b>	<b>72</b>

**Tabela 2.** Grupos geneticamente divergentes obtidos com o agrupamento de progênies de menor distância genética entre si, a partir do limite de distância genética padronizada de 40%.

(Classification of the progenies in the groups, using a standardized genetic distance of 40% obtained from grouping by the UPGMA method).

Grupos	Progênies	Grupos	Progênies
1	71, 72, 73, 137, 90, 85, 118, 94, 129, 93, 104, 125, 126, 134, 136, 101, 105, 106, 107, 119, 115, 127, 123, 139, 124, 130, 98, 103, 120, 100, 97, 112, 116, 117, 109, 88, 114, 113, 95, 96, 102, 110, 128, 111	6	78, 83, 84, 86, 80, 82
2	122, 135	7	74, 75, 76
3	121, 133	8	89, 92, 91
4	77, 79, 87, 81	9	99
5	131, 132	10	108
		11	138

### **Distâncias genéticas e grupos geneticamente divergentes**

Os indivíduos apresentaram distância genética média entre si de 0,40. Para a continuidade do melhoramento com o material, a presença de variabilidade genética foi considerada o ponto mais importante. Para tanto, considerou-se um limite de distância genética arbitrária mínima de 40%, o que permitiu identificar grupos geneticamente divergentes. A Tabela 2 e a Figura 1 mostram a distribuição das progênies nos grupos gerados a partir desse limite de distância genética padronizada de 40%.

As progênies distribuíram-se em 11 grupos geneticamente divergentes, isto é, grupos de progênies de menor distância genética entre si, obtidos a partir de um limite de distância genética arbitrária de 40%. 63,8% das progênies concentraram-se no grupo 1 e as demais distribuíram-se nos 10 grupos restantes.

### **Características botânicas**

As progênies foram classificadas segundo o padrão de casca exibido e estão apresentadas na Tabela 3.

O percentual de distribuição das progênies segundo o padrão de casca foi de 31,9% das

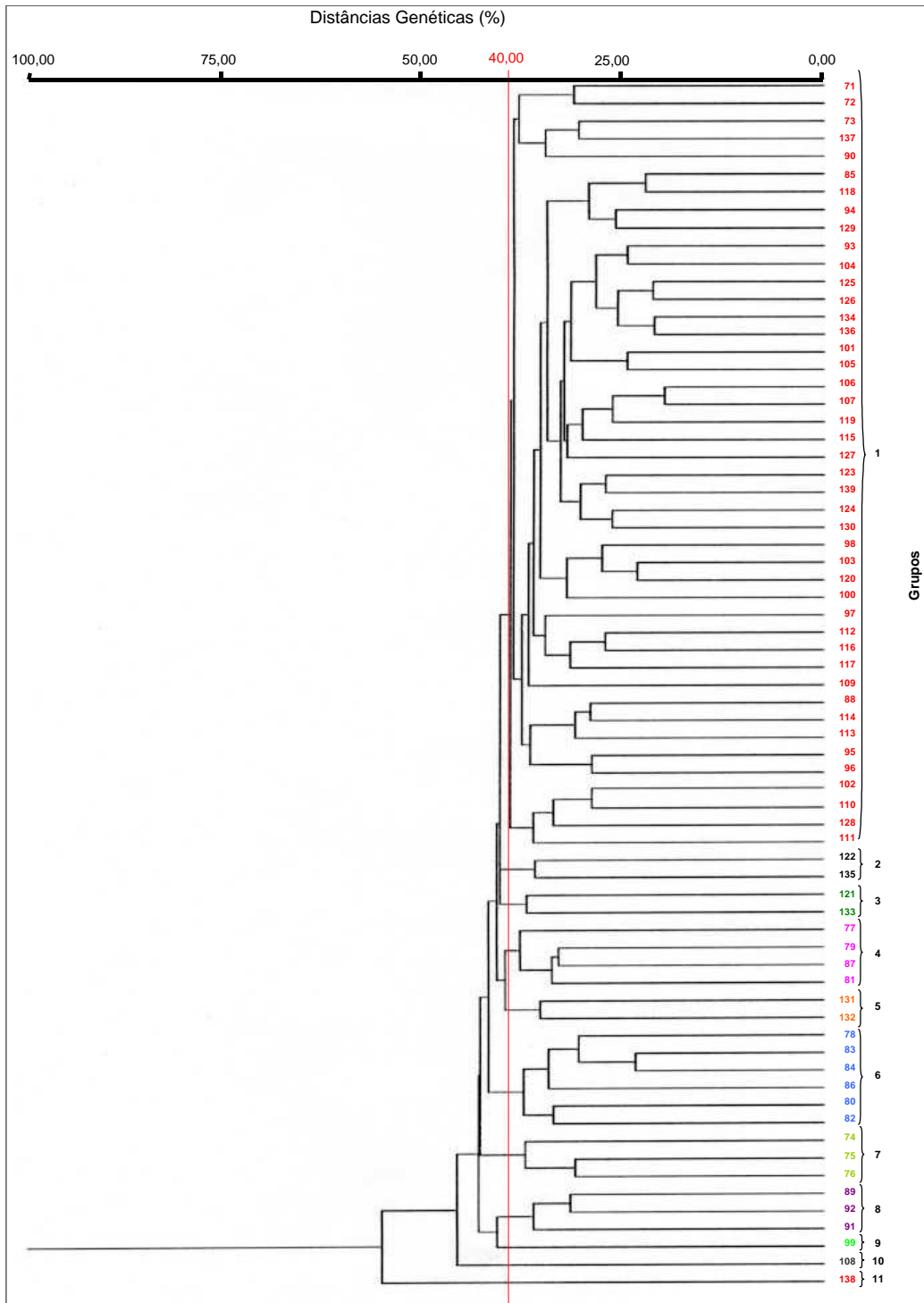
**Tabela 3.** Classificação das progênies segundo o padrão de casca.

(Classification of the progenies based on the bark pattern)

Grupos de Casca	Progênies
1	71, 72, 74, 75, 76, 85, 91, 101, 104, 106, 107, 109, 110, 117, 119, 126, 127, 128, 129, 131, 137, 138
2	77, 80, 81, 83, 86, 87, 89, 92, 94, 103, 105, 108, 112, 115, 116, 123, 124, 125, 134, 136
3	78, 82, 84, 88, 90, 93, 96, 99, 113, 114, 130, 132, 133
4	73, 79, 95, 97, 98, 100, 102, 111, 118, 120, 121, 122, 135, 139

progênies no grupo 1 de padrão de casca, 29,0% no grupo 2, 18,8% no grupo 3 e 20,3% no grupo 4.

As características relacionadas a frutos, sementes e folhas mostraram-se homogêneas, não sendo possível qualquer diferenciação: frutos cônicos a amplamente cônicos; sementes médias a grandes de coloração marrom escura; folhas lanceoladas a lanceoladas largas, com expansão da nervura do limbo foliar.



**Figura 1.** Dendrograma da geração P2, com 11 grupos de indivíduos de menor distância genética, gerados a partir do limite de distância genética padronizada de 40%

(Dendrogram of generation P2, with 11 generated groups based on the standardized genetic distance of 40%)

### Simulação de processos de seleção

#### Seleção silvicultural

As progênies foram classificadas por altura (m) com seus respectivos diâmetros do tronco à altura do peito (cm), aos 8 anos de idade (Tabela 4).

As progênies apresentaram variabilidade para os caracteres avaliados, o que permitiu a seleção das melhores. A Tabela 5 mostra a se-

leção de 1/3 das progênies em função da altura e sua distribuição nos grupos geneticamente divergentes, quando se considerou um nível arbitrário de distância genética de 40%.

A seleção efetuada pela classificação por altura concentrou 69,6% das progênies no grupo 1 de divergência genética. Quanto aos grupos de casca, sete delas pertencem ao grupo de casca 1 (30,5%), cinco ao grupo de casca 2 (21,8%), cinco ao grupo de casca 3 (21,8%) e seis ao grupo de casca 4 (26,0%).

**Tabela 4.** Classificação das progênies para altura (m) e respectivos DAP (cm).

(Progenies classification for height (m) and respectives diameters (cm)).

Progênie	Altura (M)	Dap (Cm)	Progênie	Altura (M)	Dap (Cm)	Progênie	Altura (M)	Dap (Cm)
72	20,8	15,0	130	27,7	22,3	109	29,7	22,5
137	21,8	16,7	133	27,7	23,0	114	30,0	24,3
88	23,5	19,0	104	28,0	20,7	123	30,0	21,3
106	23,5	17,3	108	28,0	18,3	82	30,2	23,0
120	24,2	17,2	119	28,2	20,2	121	30,5	21,0
112	24,7	18,3	93	28,3	21,3	129	30,5	21,3
128	24,7	18,5	110	28,3	22,3	79	30,7	22,7
75	25,0	16,8	81	28,5	21,5	97	30,8	23,3
124	25,2	20,0	92	28,5	20,0	90	30,8	22,2
127	25,5	18,3	76	28,8	20,2	107	30,8	24,5
84	25,7	19,0	95	28,8	21,3	100	31,2	23,0
115	25,8	17,0	136	28,8	23,8	74	31,5	23,0
134	26,2	18,0	87	29,0	21,5	98	31,7	23,0
125	26,5	20,7	94	29,0	18,8	89	31,8	24,7
135	26,5	18,7	78	29,2	20,7	73	32,0	22,5
102	26,8	18,0	83	29,3	23,0	99	32,0	25,7
77	27,0	19,2	86	29,3	23,5	85	32,0	24,5
91	27,0	19,3	111	29,3	21,5	71	32,2	22,0
139	27,0	19,3	117	29,3	20,5	80	32,3	22,3
122	27,2	18,7	132	29,3	20,7	101	32,3	26,3
126	27,2	19,3	96	29,5	21,3	103	32,3	25,5
131	27,3	21,3	116	29,5	19,8	113	32,8	24,8
138	27,5	20,8	118	29,5	22,5	105	34,3	26,2
Características	Média Geral	Amplitude	Desvio Padrão					
Altura (m)	28,6	20,8 – 34,3	2,74					
DAP (cm)	21,1	15,0 – 26,3	2,52					



**Tabela 5.** Seleção de 1/3 das melhores progênies para altura (m) e respectivos grupos geneticamente divergentes (limite de distância genética padronizada de 40%) e grupos de casca.

(Selection of the best 1/3 of progenies by height (m) and their respective genetic variability (standardized genetic of 40%) and bark groups).

Progênie	Altura (M)	Dap (Cm)	Grupos Geneticamente	
			Divergentes	Grupos de Casca
109	29,7	22,5	1	1
114	30,0	24,3	1	3
123	30,0	21,3	1	2
82	30,2	23,0	7	3
121	30,5	21,0	4	4
129	30,5	21,3	1	1
79	30,7	22,7	5	4
97	30,8	23,3	1	4
90	30,8	22,2	1	3
107	30,8	24,5	1	1
100	31,2	23,0	1	4
74	31,5	23,0	8	1
98	31,7	23,0	1	4
89	31,8	24,7	9	2
73	32,0	22,5	1	4
99	32,0	25,7	10	3
85	32,2	24,5	1	1
71	32,3	22,0	1	1
80	32,3	22,3	7	2
101	32,3	26,3	1	1
103	32,3	25,5	1	2
113	32,8	24,8	1	3
105	34,3	26,2	1	2
<b>Média</b>	<b>31,4</b>	<b>23,5</b>		

### Seleção silvicultural e genética

A Tabela 6 apresenta os resultados finais de uma adequação do processo de seleção, onde primeiro se realizou uma seleção prévia de 2/3 das melhores progênies para altura (m) em seguida selecionou-se 1/3 das progênies com restrição de participação das progênies do mesmo grupo de divergência genética (obtido a partir do

limite máximo de distância genética padronizada de 40%) em até 30% do total de progênies selecionadas.

A adequação da variabilidade genética com restrição em até 30% da participação do número de indivíduos do mesmo grupo de divergência genética, do total de progênies, não prejudicou a seleção para produtividade. A perda média em altura com a adequação da variabilidade genéti-

ca, foi de 2% em relação à primeira simulação de seleção efetuada e o ganho em altura em relação à média geral do ensaio foi de 7,5%.

Quanto aos grupos de casca, cinco deles pertencem ao grupo de casca 1 (21,8%), dez ao grupo de casca 2 (43,4%), cinco ao grupo de casca 3 (21,8%) e três ao grupo de casca 4 (13,0%).

### **Progênies destinadas a programas de cruzamentos**

A distância genética é um bom indicativo para orientação de cruzamentos em programas de melhoramento (Baril et al., 1997).

**Tabela 6.** Resultados da adequação da seleção genética, com restrição de progênies do mesmo grupo de divergência genética em até 30% do total e respectivos grupos de casca

(Results of the adaptation of genetic selection, restricting the progenies from the same genetic variability group to 30% of the total and respective bark groups)

Progênie	Altura(M)	Dap (Cm)	Grupos Geneticamente	
			Divergentes	Casca
108	28,0	18,3	10	2
81	28,5	21,5	5	2
92	28,5	20,0	9	2
76	28,8	20,2	8	1
87	29,0	21,5	5	2
78	29,2	20,7	7	3
83	29,3	23,0	7	2
86	29,3	23,5	7	2
132	29,3	20,7	6	3
82	30,2	23,0	7	3
121	30,5	21,0	4	4
79	30,7	22,7	5	4
74	31,5	23,0	8	1
89	31,8	24,7	9	2
73	32,0	22,5	1	4
99	32,0	25,7	10	3
85	32,2	24,5	1	1
71	32,3	22,0	1	1
80	32,3	22,3	7	2
101	32,3	26,3	1	1
103	32,3	25,5	1	2
113	32,8	24,8	1	3
105	34,3	26,2	1	2
<b>Média</b>	<b>30,7</b>	<b>22,8</b>		

A matriz de distâncias genéticas entre pares de indivíduos mostrou os materiais mais distantes geneticamente. Essa informação aliada a dados silviculturais e botânicos orientam a escolha dos cruzamentos das progênies.

A Tabela 7 mostra as progênies mais indicadas para cruzamentos considerando distâncias genéticas entre indivíduos iguais ou superiores a 0,50, menor teor de casca rugosa (progênies pertencentes aos grupos 3 e 4, Tabela 3) e superioridade em altura (Tabela 5).

**Tabela 7.** Progênies indicadas para programas de cruzamentos em função de distância genética entre indivíduos igual ou superior a 0,5, menor teor de casca rugosa e superioridade em altura.

(Progenies suitable for crossing programs due to the genetic distance equal to or higher than 0,5 with lower rough bark content, and height superiority).

Progênie	Distância Genética	Grupos de Casca	Altura (M)
73 e 82	0,52	4 e 3	32,0 e 30,2
78 e 111	0,51	3 e 4	29,2 e 29,3
82 e 99	0,51	3 e 3	30,2 e 32,0
82 e 111	0,56	3 e 4	30,2 e 29,3
82 e 113	0,52	3 e 3	30,2 e 32,8
82 e 132	0,52	3 e 3	30,2 e 29,3
121 e 132	0,52	4 e 3	30,5 e 29,3

## DISCUSSÃO

### ***Distâncias genéticas e grupos geneticamente divergentes***

A distância genética média obtida de 0,40 está em concordância com o obtido por Gaiotto (1996) trabalhando com 121 famílias de *E. urophylla*, que foi considerado promissor pela autora para a continuidade do programa.

Os grupos geneticamente divergentes obtidos do agrupamento de progênies de menor distância genética entre si, a partir de um limite máximo de distância genética padronizada de 40% foram 11, com 63,8% das progênies no grupo 1 e 36,2% das progênies distribuídas nos demais grupos.

O número de grupos geneticamente divergentes obtidos a partir de uma distância genética arbitrária de 40% oferece boas perspectivas de seleção.

### ***Características botânicas e variabilidade genética***

O padrão de casca é uma característica fenotípica frequentemente utilizada na diferenciação de materiais genéticos, sendo considerada um importante marcador fenotípico em *Eucalyptus* (Ferreira, 1999).

A variação no padrão de casca ocorre, principalmente, em função da variação na altitude na região de ocorrência natural, podendo ser considerada variação do tipo clinal (Martin e Cossalter, 1976). A colheita de sementes na população base em diferentes altitudes representou esse tipo de variação, o que foi confirmado nesse estudo, que mostrou grande variação entre as progênies para o padrão de casca exibido (Tabela 3), com progênies apresentando alto teor de casca rugosa e outras com casca predominantemente lisa. Já as características relacionadas a frutos, sementes e folhas foram praticamente homogêneas não permitindo qualquer

diferenciação. No entanto, a avaliação das relações existentes entre grupos de casca e grupos de divergência genética no DNA não mostraram relação entre si. Isto é, os agrupamentos ocorridos em função de similaridade genética entre as progênies não corresponderam aos agrupamentos por padrão de casca.

Ferreira (1999), analisando diferentes procedências de *E. urophylla*, observou que o padrão casca lisa também ocorreu em diferentes procedências e tipos botânicos analisados, sendo a descrição bastante semelhante ao *E. urophylla* sugerido por Pryor et al. (1995) como nova espécie.

Segundo Ferreira (1999) as árvores originárias de altitudes acima de 1000m apresentam o tronco coberto com uma casca fibrosa e persistente, as de menores altitudes apresentam parte de seu tronco, ou em alguns casos a totalidade dele, com casca lisa. Possivelmente, o tipo de casca é uma característica de natureza complexa e adaptativa da espécie às condições ambientais, principalmente altitude, que não correspondeu a padrões de agrupamento por similaridade genética em nível molecular.

### **Possibilidades de seleção e cruzamentos**

A geração P2 representa um teste de progênies, que oferece condições para a continui-

dade do programa. A análise genômica aliada à caracterização silvicultural e botânica oferecem, uma base segura para o planejamento das próximas gerações, direcionando seleções, colheitas de sementes e cruzamentos prioritários.

A seleção de 1/3 das melhores progênies para altura levou a uma grande concentração de progênies (69,6%) do mesmo grupo de divergência genética, com 7 grupos geneticamente divergentes (Tabela 5). A adequação do processo seletivo, com restrição de participação de progênies do mesmo grupo em até 30% do total elevou o número de grupos de divergência genética para oito, sem perda de produtividade (Tabela 6).

Pelos dois métodos de seleção não foi possível priorizar materiais genéticos com menor percentual de casca rugosa, pois a mesma distribuiu-se ao acaso entre as progênies. No entanto, a orientação de cruzamentos baseada na matriz de distâncias genéticas permitiu viabilizar cruzamentos com distâncias genéticas entre indivíduos superiores a 0,50, superioridade em altura (Tabela 4) e menores percentuais de casca rugosa (Tabela 3, grupos 3 e 4). A Tabela 7 mostra sete possibilidades de cruzamentos controlados entre diferentes progênies com a utilização de dados genômicos, silviculturais e botânicos.

## **CONCLUSÕES**

- ✓ O monitoramento da variabilidade genética da população submetida ao teste de progênies foi eficientemente realizado pelo marcador molecular RAPD;
- ✓ A característica botânica, dentre as consideradas, que apresentou maior variação foi o padrão de casca. Folhas, frutos e sementes foram praticamente homogêneos;
- ✓ Os agrupamentos de diferentes níveis de similaridade genética molecular entre as progêni-

es, avaliada pelo marcador molecular RAPD, não corresponderam a padrões similares de casca, o padrão de casca distribuiu-se ao acaso entre as progênies, ao que tudo indica, consequência da variação na altitude na região de ocorrência natural da espécie, onde foram colhidas sementes da população base;

- ✓ Através de um limite de distância genética padronizada de 40%, que corresponde à distância genética média da população, foram gera-

dos grupos geneticamente divergentes, através dos quais foi possível adequar a seleção, aliando critérios silviculturais e de variabilidade genética molecular, minimizando a erosão genética;

✓ A utilização de dados genômicos, silviculturais e botânicos permitiu o estabelecimento de um

programa de cruzamentos controlados entre progênies;

✓ A população em estudo, terceira geração de recombinação no Brasil, apresentou variabilidade genética para a continuidade do programa de melhoramento.

## AUTORES

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

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BARIL, C. P.; VERHAEGEN, D. VIGNERON, P.; BOUVET, JM.; KREMER, A. Structure of the specific combining ability between two species of *Eucalyptus*: 1- RAPD data. **Theoretical applied genetics**, v.94, p.796-803, 1997.
- BROOKER, M.I.H.; KLEINIG, D.A. **Field guide to *Eucalyptus* South-eastern Australia**. Melbourne: Inkata Press, 1983. v.1.
- 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.
- FERREIRA, M. **Melhoramento genético do *Eucalyptus urophylla*. S.T.Blake direcionado para a formação de populações base tipo casca lisa (“gum”): relatório apresentado ao CNPq**. Piracicaba, 1999. 106p.
- GAIOTTO, F.A. **Estimativa de recombinação e estrutura genética em uma população de melhoramento 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
- MARTIN, B.; COSSALTER, C. Les *Eucalyptus* des Iles de la Sonde. **Bois et forêts des tropiques**, n.164, p.3-25, 1976.
- 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
- PENFOLD, A.R.; WILLIS, J.L. **The eucalypts**. Londres: Leonard Hill, 1961. 550p.
- 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.
- PRYOR, L.D. et al. A morphometric analysis of *Eucalyptus urophylla* and related taxa with descriptions of two new species. **Australian systematic botany**, v.8, p.57-70, 1995.
- 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.