

EDGARD AUGUSTO DE TOLEDO PICOLI

**MORFOGÊNESE *in vitro* E OTIMIZAÇÃO DO NÚMERO DE
MARCADORES RAPD PARA ESTIMAÇÃO DA DIVERSIDADE
GENÉTICA EM EUCALIPTO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

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

T

P598m
2005

Picoli, Edgard Augusto de Toledo, 1974-
Morfogênese *in vitro* e otimização do número de mar-
cadores RAPD para estimação da diversidade genética em
eucalipto / Edgard Augusto de Toledo Picoli. – Viçosa :
UFV, 2005.
xii, 87f. : il. ; 29cm.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 73-87.

1. Marcadores genéticos. 2. Eucalipto - Morfogênese
in vitro. 3. Polimorfismo (Genética). 4. Tecidos vegetais -
Cultura e meios de cultura. 5. Eucalipto - Melhoramento
genético. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 631.53

EDGARD AUGUSTO DE TOLEDO PICOLI

**MORFOGÊNESE *in vitro* E OTIMIZAÇÃO DO NÚMERO DE
MARCADORES RAPD PARA ESTIMAÇÃO DA DIVERSIDADE
GENÉTICA EM EUCALIPTO**

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

APROVADA: 03 de março de 2005.

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Prof. Cosme Damião Cruz
(Conselheiro)

Prof. Paulo José de Moraes

Dr. Douglas Lau

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

À Pietra (*in memoriam*),

Por alguns momentos de felicidade em nossas vidas...

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), e à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, pelo acolhimento e pela oportunidade de realização desse curso. Sou igualmente grato à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo, e aos Departamentos de Fitopatologia, Biologia Vegetal e Biologia Geral pelo suporte na condução dessa tese.

A Cenibra S/A e a Suzano Bahia Sul por disponibilizarem os materiais genéticos para a condução dos trabalhos de marcadores moleculares e cultura de tecidos, respectivamente, e pelo suporte na condução dos experimentos.

Registro também o meu reconhecimento a meus amigos, mestres e familiares, pelos ensinamentos, argumentações, sugestões, confiança, companhia, auxílio, paciência, apoio, que dentre outras coisas, contribuíram para esse trabalho como para meu próprio aperfeiçoamento.

Nomeadamente, em especial, agradeço aos Professores Acelino Couto Alfenas; pelo apoio, crédito, suporte, convívio e conselhos; Cosme Damião Cruz; por suas sugestões, estímulo, conselhos, exemplo de conduta e assistência; e Wagner Campos Otoni; pelo constante incentivo, apoio, conselhos, exemplo, paciência, por tudo, e acima de tudo pela amizade.

A Rejane Fraga, pelo constante apoio, estímulo e incentivo incondicionais, pelo carinho, amor, amizade, e por compartilhar comigo tanto da vida.

A Leonardo Lucas Carnevalli Dias, Diogo Faustini Moura e Daniela Andrade Neves, pelo auxílio na condução dos experimentos.

A Márcia Brandão, por sua paciência e boa vontade, sempre a nos auxiliar no trabalho, com as solicitações de materiais, recursos, reagentes, informações, etc.

Aos meus companheiros de trabalho e de república, Alexandre, Galvão e Zeca, Márcio Gilberto Costa, Lili, Ana Paula, Vespa, Ana, Luciano, Mauriciune, Lourdes, Takeshi, Andréia, Malu, Elisa, Cármen, Miranda, Prof. Aloísio, Alexandra, Robson, Letícia, Miki, Douglas, Edgar, Gabriela, Reginaldo, Edval, Luiz, Carlos Eduardo, Rivadalve, Miguel, Sandra, Danival, Klaus, Lúcio, Júlio, Renildo, Michele, Kida, Rodrigo, pelo companheirismo, convivência, solidariedade, boa vontade, pelo auxílio no trabalho e sugestões.

A Douglas Lau e Paulo José de Moraes, pelas sugestões, críticas e incentivo e auxílio na correção da tese.

Em especial, a Shinitiro Oda e Eduardo Mello (Suzano Bahia Sul), e à David Fernandes, e pelas sugestões, interesse, informações e empenho.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa, que contribuíram para minha formação e para a execução deste trabalho.

A José Maria, Eneir, e Sr. Nozinho, responsáveis pelas casas de vegetação, pela valiosa ajuda na manutenção das plantas, ao Márcio (Fruticultura) pelo apoio.

Aos funcionários da Universidade Federal de Viçosa e a todos aqueles que, mesmo não tendo seus nomes aqui citados, de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho e para a minha formação.

BIOGRAFIA

EDGARD AUGUSTO DE TOLEDO PICOLI, filho de Edgard Augusto Picoli e Imaculada Conceição Manoel Picoli, nasceu em Juiz de Fora, no Estado de Minas Gerais, em 22 de fevereiro de 1974.

No ano de 1997, graduou-se em Engenharia Agrônômica, pela Universidade Federal de Viçosa. Foi monitor I da disciplina de Anatomia das Espermatófitas, no período de 1994 a 1996. Em março de 1997, iniciou na Universidade Federal de Viçosa o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, defendendo tese em outubro de 1999. Foi monitor II da disciplina de Anatomia das Plantas Vasculares, no segundo semestre de 1997.

Foi bolsista de DTI (Desenvolvimento Tecnológico Industrial) do Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno, no período de fevereiro de 2000 a março de 2001.

Ingressou no Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa em abril de 2001.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- AFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (“Amplified Fragment Length Polymorphism”)
- AIA (IAA) – ácido indolacético
- AIB (IBA) – ácido indolbutírico
- ANA (NAA) – ácido a-naftalenoacético
- BAP – 6-benzilaminopurina
- BSAA (ABSA) – ácido 3-(benzo[b]selenil) acético
- CIA – clorofórmio: álcool isoamílico (24:1)
- CMB – concentração mínima bactericida
- CTAB – detergente catiônico (“Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide”)
- DO – densidade ótica
- EDTA – “ethylenediaminetetraacetate”
- ELISA – “enzyme-linked immunosorbent assay”
- HR – reação de hipersensibilidade
- KIN – cinetina
- MAS – seleção assistida por marcadores (“Marker Assisted Selection”)
- MS – meio nutritivo para cultura de tecidos (Murashige e Skoog, 1962)
- PCA – análise de componentes principais (“Principal Component Analysis”)
- PCR – “Polimerase Chain Reaction”

PPM – “Plant Preservative Mixture”

PVP – polivinilpirrolidona

QTL – loco de característica quantitativa (“Quantitative Trait Loci”)

RAPD – polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (“Random Amplified Polymorphic DNA”)

rDNA16S – seqüência de DNA codificando para o rRNA ribossomal 16S

RFLP – polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (“Restriction Fragment Length Polymorphism”)

RNAse – ribonuclease

SSR – seqüências simples repetidas (“Simple Sequence Repeats”)

TAE – tampão de eletroforese (Tris, Ácido acético glacial, EDTA)

TBE – tampão de eletroforese (Tris, Ácido bórico, EDTA)

TDZ – thidiazuron (“N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea”)

TE – solução Tris-Cl: EDTA

TL – complexo vitamínico desenvolvido para cultura de tecidos constituído por 2,5 mg L⁻¹ ácido nicotínico, 10 mg L⁻¹ tiamina.HCl, 1,2 mg L⁻¹ piridoxina.HCl

UPGMA – “Unweighted Pair-Group Method using an arithmetic Average”

UV – ultravioleta

ZEA – zeatina

CONTEÚDO

	página
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO	1
A cultura de tecidos.....	2
Marcadores RAPD	5
CAPÍTULO 1	7
DETECÇÃO E CONTROLE COM ANTIBIÓTICOS DE <i>Herbaspirillum</i> <i>huttiense</i> ISOLADA DE EXPLANTES DE EUCALIPTO <i>in vitro</i>	7
Resumo.....	8
Abstract	8
Introdução.....	9
Material e métodos	10
Material vegetal	10
Isolamento da bactéria	10
Teste de patogenicidade.....	11
Identificação da bactéria	11
Testes bioquímicos e de Gram.....	11
Clonagem e sequenciamento do rDNA16S	11
Avaliação dos antibióticos	12
Antibiogramas.....	12
Concentração mínima inibitória (CMI)	12
Resultados e discussão	13
Agradecimentos.....	20
CAPÍTULO 2	21
<i>In vitro</i> MORPHOGENESIS OF <i>Eucalyptus grandis</i> : EFFECTS OF ANTIBIOTIC AND EXPLANT SOURCES	21
Resumo.....	22
Abstract	22
Introduction	23
Materials and methods	24

Plant material	24
Antibiotic treatment	24
Statistical analysis	25
Results and discussion	25
Acknowledgments	27
CAPÍTULO 3	31
GROWTH REGULATORS PULSING PRE-TREATMENT EFFECT ON THE <i>Eucalyptus grandis</i> SHOOT AND ADVENTITIOUS ROOT MORPHOGENESIS	31
Resumo	32
Abstract	32
Introduction	33
Materials and methods	33
Results and discussion.....	35
Acknowledgments	42
CAPÍTULO 4	43
<i>A priori</i> CHOICE OF HYBRID PARENTS IN PLANTS.....	43
Resumo	44
Abstract	44
Introduction	45
Materials and Methods	46
Results and Discussion.....	46
Genetic divergence	46
Divergence-heterosis association.....	48
Acknowledgments	49
CAPÍTULO 5	57
OPTIMUM NUMBER OF RAPD MARKERS TO ESTIMATE GENETIC DIVERSITY IN <i>Eucalyptus grandis</i> AND <i>E. urophylla</i>	57
Resumo	58
Abstract	58
Introduction	59
Materials and methods	60
Plant material, DNA extraction, and RAPD reactions	60
Genetic distance estimation	60
Effect of the number of markers on the estimated genetic distance	61
Clustering and genetic diversity estimation.....	61
Results and discussion.....	62
Acknowledgments	65
CONCLUSÕES GERAIS	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

RESUMO

PICOLI, Edgard Augusto de Toledo, D. S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2005. **Morfogênese *in vitro* e otimização do número de marcadores RAPD para estimação da diversidade genética em eucalipto.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Conselheiros: Cosme Damiano Cruz e Wagner Campos Otoni.

Foram conduzidos experimentos de cultura de tecidos utilizando um genótipo híbrido de *Eucalyptus grandis* vs. *E. smithii* e sementes de um cruzamento controlado de *E. grandis*. Foram isoladas uma levedura e uma bactéria que têm dificultado a cultura *in vitro* e transformação genética do genótipo híbrido, sendo a bactéria identificada como *Herbaspirillum huttiense* (Leifson) Ding e Yokota. Dentre 34 antibióticos testados *in vitro* para o controle do crescimento de *H. huttiense*, 12 induziram halos de inibição. Sulfadiazina, estreptomicina, canamicina e penicilina foram selecionados para determinação da concentração inibitória mínima. Sulfadiazina, estreptomicina e canamicina induziram halos de inibição entre as concentrações de 256 e 512 mg L⁻¹, contudo, apresentaram apenas atividade bacteriostática. Penicilina não apresentou efeito bactericida ou bacteriostático em concentrações até 1024 mg L⁻¹. Cefotaxima, carbenicilina e timentin foram avaliados quanto ao seu efeito sobre a morfogênese *in vitro* de explantes de *Eucalyptus grandis*. Foi observado que carbenicilina e timentin, em concentrações até 600 mg L⁻¹, favoreceram a frequência de explantes regenerando calos (50-70%) e a redução da necrose. Cefotaxima beneficiou a calogênese até 300 mg L⁻¹, concentração a partir da qual

promoveu aumento dos calos necrosados (>60%). Explantes cotiledonares e de hipocótilos de *E. grandis* foram submetidos a altas concentrações de diferentes reguladores de crescimento (ABSA, AIA, AIB, ANA, 2,4-D, TDZ, ZEA, BAP e KIN) e a combinações de 10, 50 e 100 mg L⁻¹ de 2,4-D e períodos de exposição de 6, 12, 24 e 48 horas. Plântulas intactas apresentaram resultados superiores (~7 raízes/explante) quanto à rizogênese adventícia comparadas a hipocótilos e cotilédones isolados (<1,5 raízes/explante). ABSA, AIA, AIB, ANA e 2,4-D aumentaram (>10 raízes/explante), enquanto TDZ, ZEA, BAP e KIN inibiram (<1 raízes/explante) de maneira significativa a indução de raízes adventícias. O alongamento de epicótilos também foi inibido por TDZ, KIN, 2,4-D, BAP e ABSA, enquanto o mesmo não ocorreu com AIA, AIB, ANA e ZEA. Foi observada uma maior eficiência de ABSA na indução do enraizamento, mesmo quando comparada à AIB. Houve um decréscimo no alongamento de epicótilos e no número médio de raízes por explante, e um aumento da necrose de explantes, com o aumento da exposição e da concentração de 2,4-D. Nos estudos com marcadores moleculares, foi determinado o perfil de 84 genótipos com base em marcadores RAPD. Foi gerado um total de 501 bandas, dos quais 450 (89,82%) foram polimórficas e 51 (10,18%) monomórficas. A análise de bootstrap com duzentas repetições para cada número de marcadores mostrou que um número de marcadores maior que 393 resultou em valores de estresse menores que 5%, menores que 5 para soma de quadrados e maiores que 0,95 para correlação. Comparando os índices de diversidade genética entre e dentro das sub-populações de *E. grandis* e *E. urophylla*, a maior parte da variabilidade foi encontrada dentro das sub-populações. Exceto para o índice de Shannon, os outros índices de variabilidade aumentaram quando os marcadores monomórficos foram retirados das análises. A análise de agrupamento baseada em marcadores RAPD demonstrou associação com a classificação taxonômica.

ABSTRACT

PICOLI, Edgard Augusto de Toledo, D. S., Universidade Federal de Viçosa, March 2005. ***In vitro* morphogenesis and optimization of the number of RAPD markers for the estimation of the eucalypt genetic diversity.** Adviser: Acelino Couto Alfenas. Committee members: Cosme Damião Cruz and Wagner Campos Otoni.

Tissue culture experiments were conducted with a *Eucalyptus grandis* vs. *E. smithii* hybrid genotype and *E. grandis* controlled cross seeds. One yeast and one bacterium, which have diffculted *in vitro* tissue culture and genetic transformation of the hybrid genotype, were isolated and the latter identified as *Herbaspirillum huttiense* (Leifson) Ding e Yokota. Among 34 antibiotics tested, only 12 inhibited bacterial growth. Sulfadiazine, streptomycin, kanamycin and penicillin were selected for determining the minimal inhibitory concentration. Sulfadiazine, streptomycin, and kanamycin presented inhibition halo at 256 and 512 mg L⁻¹, yet all three were bacteriostatic. Penicillin did not display bactericidal effect at the concentrations up to 1024 mg L⁻¹. Cefotaxime, carbenicillin and timentin effects on the *in vitro* morphogenesis of *Eucalyptus grandis* seedling explants were evaluated. It was observed that carbenicillin and timentin, up to 600 mg L⁻¹, favored the frequency of explants regenerating callus (50-70%) and decreased necrosis. Cefotaxime supported callogenesis up to 300 mg L⁻¹ from which displayed an increasing frequency of necrosed explants and callus (>60%). *E. grandis* hypocotyl and cotyledon explants were submitted to high concentrations of different growth regulators (BSAA, IAA, IBA, NAA, 2,4-

D, TDZ, ZEA, BAP and KIN), and to combinations of 10, 50 and 100 mg L⁻¹ 2,4-D and 6, 12, 24 and 48 hours pre-treatment periods. Intact plantlets displayed superior adventitious rhizogenesis (~7 roots/explant) compared to isolated hypocotyl and cotyledon explants (<1.5 roots/explant). BSAA, IAA, IBA, NAA and 2,4-D enhanced (>10 roots/explant) whereas TDZ, ZEA, BAP and KIN significantly inhibited (<1 roots/explant) adventitious rhizogenesis. Epicotyl elongation was also significantly inhibited by TDZ, KIN, 2,4-D, BAP and BSAA, while IAA, IBA, NAA and ZEA did not. BSAA displayed a significantly higher effect on adventitious root induction, even compared to IBA. Epicotyl elongation and average number of roots per explant declined, whereas explant necrosis augmented, with higher 2,4-D exposures and concentrations. In the molecular marker studies, the profiles of 84 *Eucalyptus* genotypes based on RAPD markers were determined. A total of 501 bands was generated, from which 450 (89.82%) were polymorphic and 51 (10.18%) monomorphic. Two hundred bootstrap analysis revealed that a number higher than 393 markers provided values below 5% for stress, lower than 5 for sum of squares and higher than 0.95 for correlation statistics. Comparing the genetic diversity indexes between and within the *E. grandis* and *E. urophylla* sub-populations, most of the variability was found in the sub-populations. Except for the Shannon index, other variability indexes increased as monomorphic markers were withdrawn from the analysis. Nevertheless, clustering analysis based on RAPD markers demonstrated association with taxonomic classification.

INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo, tem-se observado aumento na demanda por produtos florestais. Em 2000, a produção mundial atingiu 40,5 milhões de toneladas e 187,5 milhões de toneladas métricas para carvão vegetal e madeira para papel e celulose, respectivamente (FAO, 2003). O gênero *Eucalyptus* contém algumas das espécies mais importantes para as indústrias de papel e celulose, carvão vegetal e madeira sólida. Atualmente, o eucalipto é a árvore mais plantada no mundo, com mais de 17,8 milhões de hectares, sendo o Brasil o segundo maior país em área plantada, com cerca de três milhões de hectares (FAO, 2003). Em 1996, haviam 4,8 bilhões árvores de eucalipto no Brasil (IBGE, 2002). Em 2000, a área plantada com eucalipto ultrapassou 2,9 milhões de hectares, o que representou um faturamento de 8,3 trilhões de reais, considerando apenas a produção de celulose e papel (SBS, 2003).

Entre as espécies do gênero *Eucalyptus* observa-se variação quanto à adaptação as diferentes condições climáticas, ao crescimento, a qualidade da madeira e a resistência a doenças. Fato este que permite aos melhoristas selecionar genótipos que atendam as crescentes demandas de produtividade do mercado.

O melhoramento genético de espécies florestais é ainda incipiente em relação aos programas de culturas anuais, como a soja e o milho. Isto se deve ao recente começo do melhoramento de lenhosas, ao longo período de geração, e ao fato de que muitas características só podem ser avaliadas na maturidade. Neste

contexto, o uso das técnicas biotecnológicas atualmente disponíveis poderá resultar em significativo impacto no setor florestal acelerando o melhoramento genético de lenhosas. A abordagem biotecnológica inclui procedimentos eficientes de propagação *in vitro*, seleção assistida por marcadores, engenharia de genes e transformação genética, e (RAEMDONCK et al., 2001).

Nesta tese, são abordados a cultura de tecidos e o uso de marcadores moleculares RAPD aplicados ao melhoramento de *Eucalyptus*.

A cultura de tecidos

Existem mais de 700 espécies de eucalipto, das quais *E. grandis*, *E. gunnii*, *E. citriodora* e *E. camaldulensis* foram as mais estudadas dentro das 51 espécies citadas numa revisão realizada por Le ROUX e van STADEN (1991). Dentre 15 espécies, para as quais a regeneração tem sido pesquisada nos últimos vinte anos, somente oito possuem protocolos de regeneração completos (WATT et al., 2003).

A maioria dos protocolos envolvendo a regeneração adventícia de *Eucalyptus* spp. se baseia na regeneração indireta (WATT et al., 1991; LAINÉ e DAVID, 1994; TIBOK et al., 1995; TERMIGNONI et al., 1996; HO et al., 1998; MORALEJO et al., 1998; CID et al., 1999; GONZÁLEZ et al., 2002; PINTO et al., 2002; SARTORETTO et al., 2002). Nesses trabalhos, os calos obtidos são induzidos à regeneração em resposta a reguladores de crescimento, ou combinações destes. Por exemplo, a organogênese foi induzida em explantes de eucalipto com o uso de ANA/BAP (TIBOK et al., 1995), TDZ/2,4-D (NUGENT et al., 2001), TDZ/ANA (NUGENT et al., 2001), enquanto 2,4-D (WATT et al., 1991), ANA/TDZ (TIBOK et al., 1995) e ANA (TERMIGNONI et al., 1996; PINTO et al., 2002) induziram a embriogênese somática.

Nos protocolos de regeneração *in vitro* de eucalipto são utilizados diferentes tipos de explantes como folhas (WATT et al., 1991; MULLINS et al., 1997; CID et al., 1999), plântulas (TERMIGNONI et al., 1996), embriões (PINTO et al., 2002), cotilédones (BANDYOPADHYAY et al., 1999; CID et al., 1999; HARCOURT et al., 2000; NUGENT et al., 2001; PINTO et al., 2002; SARTORETTO et al., 2002), nós cotiledonares (CID et al., 1999) e hipocótilos (TIBOK et al., 1995, HO et al., 1998, BANDYOPADHYAY et al., 1999; CID et

al., 1999; HARCOURT et al., 2000; NUGENT et al., 2001; SARTORETTO et al., 2002).

Recentemente, foi observado que o “pulsing” com reguladores de crescimento pode aumentar ou promover a regeneração a partir de explantes de ginseng (KEVERS et al., 1999; KEVERS et al., 2000), cenoura (KITAMIYA et al., 2000), goiabeira serrana (GUERRA et al., 2001), berinjela (PICOLI e OTONI, 2001), mirtilo (CAO et al., 2002), melão (KINTZIOS et al., 2002) e marmelo (D’ONOFRIO e MORINI, 2004). Mesmo considerando diferentes espécies e períodos de pré-tratamento, foi obtido sucesso na diferenciação adventícia de raízes (KEVERS et al., 1999; PICOLI e OTONI, 2001; D’ONOFRIO e MORINI, 2004), embriões (KEVERS et al., 2000; GUERRA et al., 2001; PICOLI e OTONI, 2001; D’ONOFRIO e MORINI, 2004) e ramos (CAO et al., 2002; D’ONOFRIO e MORINI, 2004). Essa abordagem apresenta-se como uma alternativa para o desenvolvimento de protocolos de cultura de tecidos que permitam melhor eficiência de regeneração para diferentes genótipos.

MULLINS et al. (1997) observaram que somente para treze dos vinte e quatro clones de *E. camaldulensis* testados obteve-se regeneração (acima de 1% de explantes regenerando) em duas ou mais ocasiões, em que um deles apresentou frequência de regeneração de 80-90%, sendo selecionado para experimentos de transformação. Visando obter protocolos de transformação genética de *Eucalyptus grandis*, ARGENTON et al. (2002) realizaram inoculações com *A. tumefaciens* e selecionaram clones com alta capacidade de regeneração *in vitro*. No referido trabalho, *E. grandis*, *E. marginata*, *E. microtheca* e *E. ochrophloia* também apresentaram regeneração de ramos, porém em frequências inferiores a 10%. MACHADO et al. (1997) verificaram variação na suscetibilidade de plantas de *E. grandis* x *E. urophylla* a diferentes estirpes de *Agrobacterium*. Assim, pode-se perceber a importância do genótipo, do tipo de explante e dos reguladores de crescimento no sucesso dos protocolos de regeneração e transformação de *Eucalyptus* spp.

As possibilidades de economia de recursos no melhoramento, de contornar barreiras de reprodução sexual e de incorporação de genes a um genótipo ou ao “pool” gênico de uma espécie, tornam a tecnologia de DNA

recombinante fundamental em todas as áreas relacionadas à produção vegetal. Apesar do maior destaque da biobalística no que diz respeito às lenhosas (MERKLE, 2003), a transformação genética mediada por *Agrobacterium* tem sido mais utilizada para a obtenção de plantas transgênicas (SAVKA et al., 2002). Com o uso desse vetor, além da etapa de seleção, há a necessidade de se utilizar antibióticos para a eliminação de *Agrobacterium*. Essas substâncias podem interferir no potencial morfogênico das células vegetais (NAUERBY et al., 1997; LING et al., 1998; d'ULTRA VAZ et al., 1993; COSTA et al., 2000; PICOLI et al., 2000), sendo necessário o estudo de seus possíveis efeitos nos processos de regeneração.

Apesar dos relatos de sucesso na regeneração (WATT et al., 1991; LAINÉ e DAVID, 1994; TIBOK et al., 1995; PINTO et al., 2002), transformação genética (MULLINS et al., 1997; MORALEJO et al., 1998; HO et al., 1998; GONZÁLEZ et al., 2002; SARTORETTO et al., 2002), propagação clonal (ZOBAYED et al., 2000) e conservação de germoplasma (WATT et al., 2000), o eucalipto ainda é considerado recalcitrante ao cultivo *in vitro*.

Alguns fatores têm limitado o progresso na transferência de genes para o eucalipto, como o pouco conhecimento do controle molecular de características como crescimento e qualidade de caule e da madeira, indisponibilidade de genes de interesse, suscetibilidade limitada das espécies à *Agrobacterium*, e a dificuldades com os protocolos de regeneração (MacRAE e van STADEN, 2000). Dentre os fatores que dificultam a cultura *in vitro* do eucalipto destaca-se a contaminação endógena dos explantes com microrganismos (FROSSARD et al., 1977; WATT et al., 1991; ASSIS e TEIXEIRA, 1998; DIAS et al., 2001).

Como parte da linha de pesquisa visando o isolamento e à caracterização de genes que conferem resistência a *Puccinia psidii*, é essencial o desenvolvimento de um protocolo de transformação genética de *Eucalyptus* spp. Este trabalho vem sendo conduzido no Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta Patógeno/BIOAGRO/UFV em conjunto com o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II/BIOAGRO/UFV. Nesta dissertação estão descritas algumas etapas executadas visando o desenvolvimento deste protocolo. No Capítulo 1 relata-se o isolamento e identificação de uma

bactéria endofítica a partir de ramos de um genótipo híbrido de *Eucalyptus grandis* vs. *E. smithii* cultivados *in vitro*, assim como abordagens utilizadas visando o controle da mesma como a avaliação da sensibilidade da bactéria a antibióticos. No Capítulo 2 descreve-se a avaliação do efeito de diferentes concentrações de antibióticos na morfogênese *in vitro* de eucalipto. No capítulo 3 avaliou-se o efeito da exposição de explantes a altas concentrações de reguladores de crescimento por curtos períodos (“pulsing”) na morfogênese *in vitro* de eucalipto.

Marcadores RAPD

O conhecimento da diversidade genética e sua distribuição entre e dentro de populações é importante para a condução de programas de melhoramento. A obtenção de estimativas das relações genéticas entre linhagens de uma espécie tem sido proposta com base no pedigree, análise multivariada de caracteres quantitativos e de análise com base em marcadores moleculares (MOSER e LEE, 1994). Particularmente, a seleção assistida por marcadores, a identificação de QTLs (locos de características quantitativas) e a predição de performance de híbridos foram relacionadas por HENRY e SHEPHERD (2000) como aplicações dos marcadores moleculares ao melhoramento de espécies lenhosas.

Desde seu desenvolvimento por WILLIAMS et al. (1990), a técnica de RAPD tem sido utilizada em diversos estudos (DIAS et al., 2004). No gênero *Eucalyptus*, a técnica de RAPD mostrou-se eficiente na construção de mapas genéticos (CAMPINHOS et al., 1997; SHEPHERD et al., 1999; JUNGHANS et al., 2003), na discriminação de genótipos (KEIL e GRIFFIN, 1994; PICOLI et al., 2000), em estudos de parentesco de híbridos (DELAPORTE et al., 2001), da estrutura genética de populações naturais (SKABO et al., 1998), na diferenciação de espécies de *Eucalyptus* spp. e seus híbridos (SALE et al., 1996), na estimação da taxa de polinização cruzada (GAIOTTO et al., 1997), da variabilidade genética (NESBITT et al., 1995), e na estimação da capacidade específica de combinação (BARIL et al., 1997). Entretanto, existe grande variação no número de marcadores utilizados (DIAS et al., 2004). Fato que também ocorre para *Eucalyptus* spp., para o qual o número de marcadores RAPD utilizado variou de 23 (GAIOTTO et al., 1997) à 561 (DELAPORTE et al., 2001).

O uso de híbridos de algumas espécies de *Eucalyptus* em condições exóticas frequentemente resulta em ganhos significativos devido a seus valores heteróticos, ou à combinação de suas características (ZOBEL et al., 1987). ASSIS (1996) destacou a possibilidade de associar as estratégias de melhoramento para espécies puras a programas de produção de híbridos e de clonagem, tendo em vista a produção e multiplicação de combinações superiores. Apesar das considerações sobre a tendência de aumento da inviabilidade dos híbridos de eucalipto com o aumento da distância taxonômica entre os parentais (POTTS e DUNGEY, 2004), há também relatos de exceções bem sucedidas. Segundo os autores, o ponto chave para a seleção de híbridos seria o rápido desenvolvimento e teste de grandes populações e a aplicação de alta intensidade de seleção. ASSIS (2000) considera ainda que, para plantios comerciais, deve-se focar na performance dos melhores híbridos e das melhores famílias, e não na performance média do híbrido. Assim, alguns aspectos da seleção *a priori* dos parentais para a produção desses híbridos são abordados no capítulo 4, onde, particularmente para o eucalipto, espera-se que o direcionamento dos cruzamentos entre e dentro de espécies do gênero possa resultar em economia de mão-de-obra, de área e de recursos com a experimentação.

Nesse contexto, qualquer procedimento que facilite a seleção de cruzamentos de eucaliptos pode implicar em economia de trabalho, tempo e recursos técnicos. Todavia, atualmente, não existem dados experimentais que comprovem o aumento do vigor heterótico em cruzamentos de eucalipto envolvendo materiais considerados geneticamente mais divergentes com base em marcadores RAPD.

Como parte da linha de pesquisa que visa o direcionamento de cruzamentos e conservação da diversidade genética de uma população de melhoramento de eucalipto, o capítulo 5 desta tese apresenta estimativas da distância e da diversidade genética de 84 matrizes de eucalipto com base em marcadores RAPD, sua associação com as espécies *E. grandis* e *E. urophylla*; e a estimativa do número ótimo de marcadores RAPD a serem utilizados na determinação das distâncias genéticas.

CAPÍTULO 1

DETECÇÃO E CONTROLE COM ANTIBIÓTICOS DE *Herbaspirillum huttiense*

ISOLADA DE EXPLANTES DE EUCALIPTO *in vitro*

Resumo

Experimentos de cultura de tecidos vegetais visando à obtenção de um protocolo de transformação genética de um híbrido de *Eucalyptus grandis* vs. *E. smithii* têm sido dificultados por contaminações presentes nos explantes. Foram isoladas culturas de leveduras e de bactérias dos explantes. A bactéria foi identificada como *Herbaspirillum huttiense* (Leifson) Ding e Yokota, a qual foi avaliada quanto à sensibilidade a antibióticos. Dentre os 34 antibióticos testados *in vitro* visando o controle de seu crescimento, 12 induziram halos de inibição. Sulfadiazina, estreptomicina, canamicina e penicilina foram selecionadas para a determinação da concentração inibitória mínima. Sulfadiazina, estreptomicina e canamicina induziram halos de inibição a partir de 256 e 512 mg l⁻¹, enquanto penicilina não apresentou efeito bacteriostático em concentrações de até 1024 mg l⁻¹.

Palavras-chave: *Eucalyptus*, contaminação bacteriana, endófito, cultura de tecidos vegetais.

Abstract

In vitro assays involving culture of explants and aiming a genetic transformation protocol for a hybrid of *Eucalyptus grandis* vs. *E. smithii* have been arrested by microorganism contamination. There was isolated one yeast and one bacterium cultures. The bacterium was identified as *Herbaspirillum huttiense* (Leifson) Ding and Yokota, which was evaluated for antibiotic sensibility. Among 34 antibiotics tested, only 12 inhibited bacterial growth. Sulfadiazine, streptomycin, kanamycin and penicillin were selected for determining the minimal inhibitory concentration. Sulfadiazine, streptomycin, and kanamycin presented inhibition halo at 256 and 512 mg l⁻¹, while penicillin did not displayed bacteriostatic effect at the concentrations up to 1024 mg l⁻¹.

Key words: *Eucalyptus*, bacterial contamination, endophyte, plant tissue culture

Introdução

A cultura de tecidos vegetais vem contribuindo para o sucesso da propagação clonal, conservação de germoplasma e transformação genética de diversas espécies, incluindo *Eucalyptus* spp. Apesar do sucesso na regeneração (Lainé e David 1994, Tibok et al. 1995), transformação genética (Moralejo et al. 1998, González et al. 2002), propagação clonal (Zobayed et al. 2000) e conservação de germoplasma (Watt et al. 2000), o eucalipto ainda é considerado como recalcitrante ao cultivo *in vitro*. Dentre os fatores que dificultam a cultura *in vitro* de espécies de eucaliptos destacam-se a adequação dos protocolos de regeneração, as interações do genótipo com os protocolos, a produção de compostos fenólicos, a oxidação e a contaminação endógena dos explantes (Frossard et al. 1977, Watt et al. 1991, Assis e Teixeira 1999, Dias et al. 2001).

Particularmente, a contaminação endógena tem sido um obstáculo para a cultura *in vitro* de *Eucalyptus* spp. (Frossard et al. 1977, Watt et al. 1991, Dias et al. 2001). Esses contaminantes têm igualmente prejudicado o estabelecimento e a multiplicação de material *in vitro*, experimentos de regeneração e transformação genética em andamento.

Espécies de bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* encontram-se frequentemente associadas a tecidos vegetais cultivados *in vitro* (Buckley et al. 1995, Tanprasert e Reed 1998, Reed et al. 1998, Kobayashi e Palumbo 2000). Efeitos diretos sobre o material cultivado *in vitro* são observados a exemplo de Leifert e Waites (1992) que verificaram reduções significativas da matéria seca de *Delphinium* sp. devido à contaminação por *Erwinia carotovora*.

Assim, o presente estudo teve por objetivos o isolamento, a identificação e a caracterização da resposta a antibióticos, de uma bactéria isolada de culturas *in vitro* de um clone híbrido resultante do cruzamento entre *E. grandis* e *E. smithii*.

Material e métodos

Material vegetal

Plantas de um híbrido de *E. grandis* Hill ex Maiden e *E. smithii* Baker propagados *in vitro* foram aclimatadas e mantidas em casa de vegetação. Após seu estabelecimento em vasos contendo 10 l de solo fumigado com brometo de metila (50 cc m^{-3}), as plantas foram submetidas a podas regulares a cada dois meses servindo de matrizes para retirada de segmentos nodais a serem introduzidos *in vitro*. As porções terminais de ramos com três a quatro gemas foram retiradas e desinfestadas em solução de benomil a $0,5 \text{ g l}^{-1}$, por 15 min. Subseqüentemente, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar horizontal, foram enxaguadas três vezes em água destilada e autoclavada, e transferidas para solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (v:v), por 15 min, sendo novamente enxaguadas.

O material foi seccionado, de modo que cada explante constituiu um segmento nodal com uma gema, e transferido para meio de estabelecimento. Esse meio foi composto por metade da concentração dos sais MS (Murashige e Skoog 1962), 15 g l^{-1} sacarose, 15 g l^{-1} glicose, vitaminas de White (1943), 100 mg l^{-1} i-inositol, 800 mg l^{-1} PVP 40.000 (polivinilpirrolidona) (Sigma Chemical Co., EUA), $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de ANA (Sigma Chemical Co, EUA), $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP (6-benzilaminopurina) (Sigma Chemical Co., EUA), 7 g l^{-1} ágar (Merck, Germany).

Posteriormente, o material foi recultivado em meio de multiplicação consistindo de sais MS, vitaminas TL ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ácido nicotínico, 10 mg l^{-1} tiamina, $1,2 \text{ mg l}^{-1}$ piridoxina), 100 mg l^{-1} i-inositol, 800 mg l^{-1} PVP 40.000, 15 g l^{-1} sacarose, 15 g l^{-1} glicose, $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de ANA, $0,15 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP, 7 g l^{-1} ágar. Nos experimentos envolvendo a regeneração adventícia de ramos, folhas desse material foram retiradas assepticamente e transferidas para meio indutor, que difere do meio de multiplicação pelos reguladores $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ ANA e $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ (1-fenil-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea) (Sigma Chemical Co., EUA).

Isolamento da bactéria

Exsudato mucoso dos explantes foi coletado e transferido para meio de regeneração líquido, sem a adição de reguladores de crescimento.

Posteriormente, foi semeado em meio sólido, a partir do qual isolados de colônias independentes foram identificadas e submetidas a antibiogramas.

Teste de patogenicidade

Uma cultura da bactéria multiplicada em meio 523 (Kado e Heskett, 1970) sólido por 24 h foi utilizada no preparo de uma suspensão de células em solução salina NaCl a 0,85% e ajustada para $DO_{\lambda=550}=0,1$. Três plantas de cada uma das seguintes espécies: *Lycopersicon esculentum* Mill., *Pipiper nigrum* L., *Coffea arabica* L. e *Nicotiana tabacum* L., contendo quatro a seis pares de folhas cada, foram infiltradas com suspensão bacteriana utilizando-se injeção em duas folhas e mantidas a 25°C e fotoperíodo de 12 h. Plantas de *E. grandis* x *E. smithii* de seis meses de idade mantidas em casa de vegetação foram inoculadas pelo mesmo método. As plantas foram avaliadas quanto ao tipo de reação observada na área infiltrada por 72 h. As plantas de eucalipto foram avaliadas até o décimo dia após inoculação.

Identificação da bactéria

Testes bioquímicos e de Gram

Testes de Gram, Hugh e Leifson e utilização de asparagina como única fonte de carbono foram realizados de acordo com Schaad et al. (2001). A identificação da bactéria foi realizada pelo uso do sistema de microplacas Biolog (GN MicroPlate, Biolog CA). Para isso, uma cultura obtida a partir de uma colônia isolada foi multiplicada em meio BUGM (Biolog Universal Growth Medium) e após 24 h as células foram ressuspensas em solução salina (NaCl a 0,85%). Um volume de 150 µl da suspensão (com turbidez ajustada para 63% de transmitância) foram vertidos em cada cavidade da placa, a qual foi transferida para uma incubadora a 28°C. As leituras foram realizadas com o auxílio de um leitor de ELISA, utilizando-se um filtro de 560nm e o resultado submetido à análise no programa MICROLOG™4.01B (BIOLOG, CA).

Clonagem e sequenciamento do rDNA16S

O rDNA16S da bactéria foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores R₁- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG e R₂- AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA (Weisburg et al. 1991). A reação com volume final de 25µl constou de 100ng de DNA genômico da bactéria, 20pM de

cada oligonucleotídeo iniciador, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs e 1 unidade de Taq polimerase. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% sob tampão TAE (1X) por 2 h a 100 volts. O gel foi corado com brometo de etídeo a 0,5 µg ml⁻¹ e visualizado em luz UV. Os produtos da amplificação (fragmento de aproximadamente 1600pb) foram purificados do gel com kit QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo o protocolo do fabricante. Os fragmentos foram clonados em pGEMT (Promega, USA) e seqüenciados em seqüenciador ABI Prism™ (Perkin-Elmer, UK). A seqüência parcial do gene foi comparada com seqüências depositadas na base de dados do GenBank. A árvore filogenética foi construída a partir da matriz de distância calculada pelo método Neighbor-Joining (Saitou e Nei 1987).

Avaliação dos antibióticos

Antibiogramas

Discos de papel contendo diferentes antibióticos foram utilizados nos antibiogramas (Tabela 1) pela técnica de dupla camada (Romeiro, 2001). Uma camada de ágar-água(2%) foi vertida em placas de Petri e, em seguida, uma segunda camada de meio semi-sólido, constituído por 10 g l⁻¹ de sacarose, 8 g l⁻¹ caseína hidrolizada, 4 g l⁻¹ de extrato de levedura, 2 g l⁻¹ KH₂PO₄, 350 mg l⁻¹ MgSO₄, 0,85% de ágar, pH 5,7 contendo suspensão de bactéria (DO_{λ=600}=0,4) a 1% (v:v). Os discos contendo os antibióticos foram colocados sobre a segunda camada e as placas incubadas a 28°C e ausência de luz por 24 h, quando se avaliou a formação de halos de inibição.

Concentração mínima inibitória (CMI)

Os antibióticos sulfadiazina, estreptomina, canamicina e penicilina foram selecionados para a determinação da CMI. Os antibióticos foram diluídos nas concentrações 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 mg l⁻¹ e, em seguida, 10 µl de cada concentração foram aplicados em discos de papel filtro (Whatman n°1) de 0,5 cm de diâmetro. Subseqüentemente, os discos foram colocados sobre o meio contendo suspensão bacteriana, conforme descrito para os antibiogramas. Foram utilizadas quatro repetições para cada concentração de cada um dos antibióticos. Porções de ágar da região do halo de inibição correspondentes à maior concentração de cada antibiótico foram transferidas para meio líquido e

incubadas a 28°C, por 24 h. Após a incubação, aferiu-se a densidade ótica das amostras em espectrofotômetro ($DO_{\lambda=600}$) e uma alíquota foi estriada em placas contendo meio sólido, as quais foram novamente incubadas nas condições acima descritas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e em seguida foram obtidas as equações de regressão.

Resultados e discussão

Os explantes do híbrido de eucalipto em experimentos de multiplicação (Figura 1A) e regeneração (Figura 1B) apresentaram exsudação de microrganismos no meio de cultura. Juntamente com a liberação de compostos fenólicos, a contaminação microbiana dificulta a regeneração do material. Apesar dos explantes de eucalipto apresentarem oxidação, a contaminação parece agravar esse quadro (Figura 1B). A esterilização eficiente dos instrumentos é importante no controle desta contaminação, visto existirem estirpes bacterianas capazes de sobreviver a imersões em álcool e ao calor, e a observação de perdas de até 100% em material de espécies perenes recém introduzido (Skirvin et al. 1999). Essas observações estão de acordo com o relato de Leifert et al. (1989), segundo o qual a presença de contaminantes resultou na morte de material cultivado *in vitro*. Além disso, o estímulo da produção de compostos fenólicos devido a injúrias (George e Sherrington, 1984) pode afetar a morfogênese (Durand-Cresswell e Nitsch 1977, Gill e Gill 1994).

Mesmo com a eliminação do material visivelmente contaminado durante a introdução dos explantes *in vitro*, ainda se constatou contaminação microbiana (Figura 1A). Este fato pode ser atribuído à ausência de sintomas macroscópicos ou estágios latentes dos microrganismos endofíticos dos explantes (Leifert et al. 1991, Kobayashi e Palumbo 2000). Bactérias e leveduras também foram encontradas em tecidos cultivados *in vitro* de espécies como *Hemerocallis* e *Choisya* (Leifert et al. 1991), *Mentha* sp. (Reed et al. 1995), *Fragaria* sp. (Tanprasert e Reed 1997), *Corylus avellana* e *C. contorta* (Reed et al. 1998), *Citrus* (Niedz e Bausher 2002), dentre outros.

O sucesso do tratamento com antibióticos pode ser previsto com segurança somente após o isolamento, a identificação e o teste da sensibilidade dos contaminantes (Leifert et al. 1991). Assim, foram obtidas colônias isoladas

dos microrganismos presentes no exsudato de eucalipto cultivado *in vitro*, onde se constatou a presença de uma espécie de levedura e de uma bactéria. No presente trabalho, foram realizadas a identificação e caracterização da resposta a antibióticos do isolado bacteriano visando ao controle dessa contaminação em protocolos de regeneração e transformação genética desse genótipo híbrido entre *E. grandis* e *E. smithii*.

As células bacterianas apresentaram forma de bastonetes, reação gram negativa (Figura 1D), além de se caracterizarem como aeróbias estritas e utilizarem asparagina como única fonte de carbono. As colônias da bactéria são de cor creme e lisas em meio 523, medem 0,5 (0,3-0,77) mm com 72 h (Figura 1C), enquanto as células medem 1,05 (0,89-1,35) μm x 0,24 μm (Figura 1D).

Segundo a base de dados MICROLOGTM4.01B, o resultado do teste BIOLOG indicou tratar-se de *Herbaspirillum huttiense* (Leifson 1962) Ding and Yokota (2004). Esta identificação foi confirmada pelo sequenciamento parcial do gene rDNA16S, sendo que o isolado de eucalipto apresentou 94% de identidade com as seqüências do rDNA 16S de *H. huttiense*, isolado ATCC 14670T, número de acesso AB021366 (Genebank) (Figura 2). Esta bactéria era denominada *Pseudomonas huttiensis* até sua recente reclassificação para o gênero *Herbaspirillum* (Ding e Yokota 2004), que foi adotada neste trabalho. Este fato, além da condição de endófito, amplia as possibilidades de interação do isolado em estudo com o eucalipto.

A bactéria não induziu reação de hipersensibilidade em *Lycopersicon esculentum* Mill., *Piper nigrum* L., *Coffea arabica* L. e *Nicotiana tabacum* L. após 24 h de incubação, entretanto, induziu clorose e necrose em fumo a partir de 72 h (Figura 1E). A inoculação no clone híbrido entre *E. grandis* x *E. smithii* da qual foi isolada, não provocou sintomas de manchas foliares nem exsudação no ponto de inoculação. Elbeltagy et al. (2001) observaram que *Herbaspirillum* B501, uma estirpe modificada geneticamente contendo o gene *gfp*, colonizava preferencialmente os espaços intercelulares de órgãos vegetativos, não sendo encontrada nos tecidos vasculares de arroz. Reação semelhante pode estar ocorrendo com *H. huttiense* isolada no híbrido de eucalipto.

Apesar de *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* causarem a faixa mosqueada em um genótipo sensível de cana-de-açúcar, *H. seropedicae* foi encontrada como endófito em dez espécies de gramíneas, enquanto *H. rubrisubalbicans* foi isolada somente de cana-de-açúcar. Ambas foram capazes de fixar nitrogênio (Baldani et al. 1996). Elbeltagy et al. (2001) também verificaram evidências de diferenças na fixação de nitrogênio dependendo da espécie de arroz, em função da colonização variável dos tecidos por *Herbaspirillum*.

Apesar de outras espécies de *Pseudomonas* (Kobayashi e Palumbo 2000) e *Herbaspirillum* terem sido relatadas como endófitas ou endófitas diazotróficas (Sabino et al. 2000), respectivamente, a ocorrência da espécie descrita no presente trabalho como endófito ou como rizobactéria promotora de crescimento de plantas (RPCPs) em *Eucalyptus* sp. não foi encontrada na literatura consultada. Entretanto, de modo semelhante aos resultados proporcionados por *Herbaspirillum* sp. em arroz (Elbeltagy et al. 2001), o isolado de *Herbaspirillum* oriundo de eucalipto pode também proporcionar efeitos benéficos sobre o crescimento de plantas pela fixação biológica do nitrogênio ou pela produção de fitormônios.

Dentre os 34 antibióticos testados quanto a capacidade de controlar o isolado de *H. huttiense* de eucalipto, 12 induziram halos de inibição (Tabela 1, Figura 1F). De acordo com Baldani et al. (1996) *H. seropedicae* foi sensível a cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, canamicina e tetraciclina, e resistente à penicilina. Diferentemente do encontrado por esses autores, e apesar dos diferentes resultados para penicilina nos testes quantitativo e qualitativo, cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina não inibiram o crescimento de *H. huttiense* isolada do híbrido de eucalipto (Tabela 1).

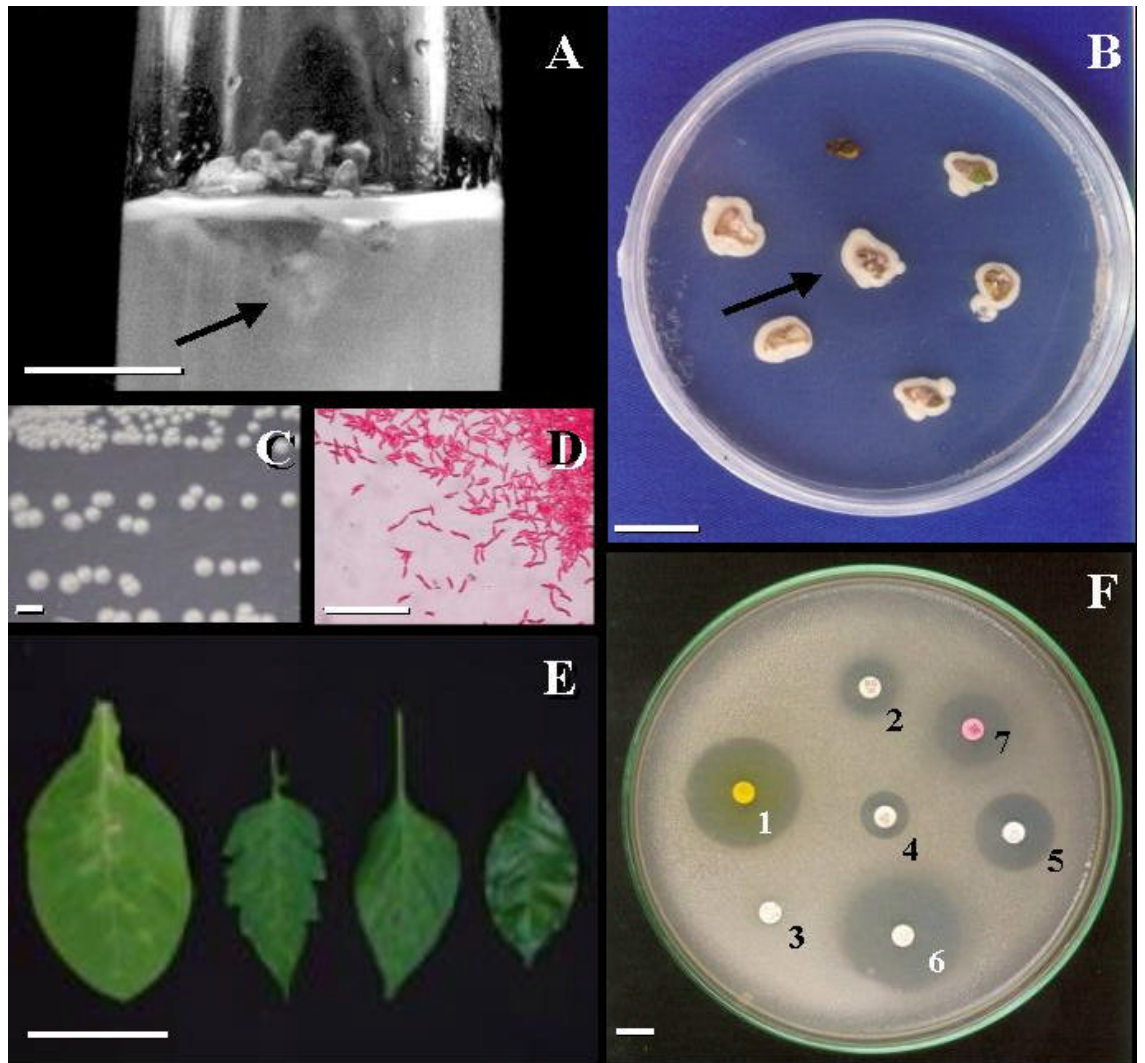


Figura 1 – Contaminação endógena em tecidos de eucalipto cultivados *in vitro*.
A – Ramo de eucalipto com exsudação em meio de multiplicação (seta);
B – Detalhe de crescimento de bactérias e ou leveduras em explantes foliares em meio de regeneração (seta); **C** – Colônias de *Herbaspirillum huttiense* em meio 523; **D** – Detalhes da forma e dimensões da bactéria observada ao microscópio ótico após coloração com safranina; **E** – Teste de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras (*Nicotiana tabacum* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Pipiper nigrum* L. e *Coffea arabica* L.);
F – Antibiograma realizado com os antibióticos nitrofurantoína (1), novamina (2), ácido oxidínico (3), polimixina (4), sulfadiazina (5), sulfonamida (6) e tobramicina (7), detalhes dos halos de inibição. Barras: (**A**, **B**, **F**) = 1 cm; (**C**) = 0,1 cm; (**D**) = 10 μ m; e (**E**) = 10 cm.

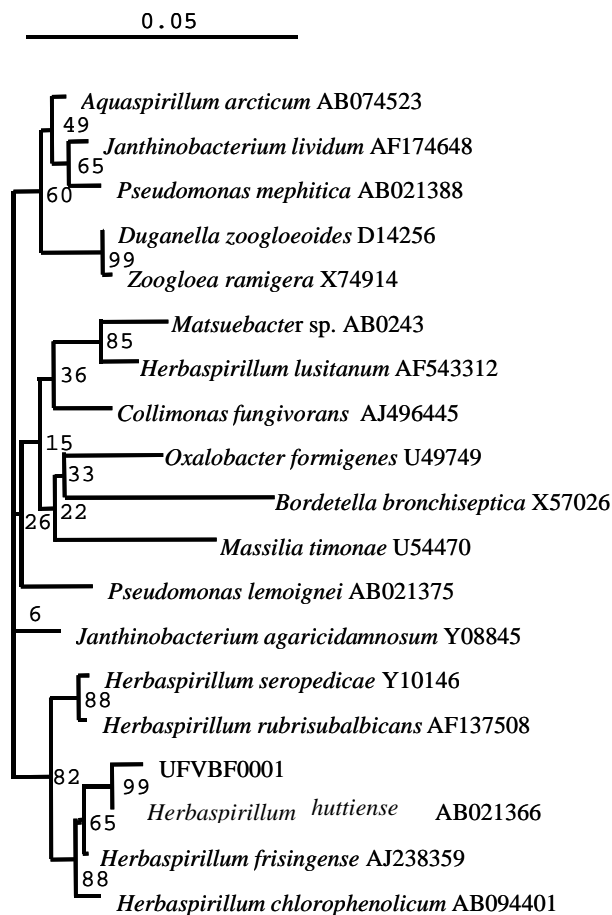


Figura 2 – Dendrograma filogenético baseado na seqüência parcial de 556 pb de rDNA16S da bactéria UFVBF0001 com seqüências de espécies presentes na base de dados GenBank. Árvore construída no programa DNAMAN 4.0 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canadá). Valores de BOOTSTRAP calculados a partir de 2000 árvores.

A adição de substâncias antimicrobianas ao meio de cultura é uma alternativa para o controle de contaminações, contudo, a determinação da concentração mínima bactericida e atenção ao potencial fitotóxico desses produtos devem ser observados. Dos antibióticos que promoveram halos de inibição (Tabela 1), sulfadiazina, estreptomicina, penicilina e canamicina foram avaliadas em diferentes concentrações para a determinação da concentração mínima bactericida (Figura 3). Sulfadiazina, estreptomicina e canamicina causaram halos de inibição a partir de concentrações entre 256 e 512 mg l⁻¹. Os halos de inibição não foram observados para nenhuma das concentrações de penicilina testadas (Figura 3).

As leituras médias de densidade ótica ($DO_{\lambda=600}$) do meio semeado com porções dos halos de inibição (estreptomicina=0,0735; canamicina=0,1088; penicilina=0,0252 e sulfadiazina=0,0191) foram menores que o controle repicado com a bactéria (0,2429). Entretanto, todas as placas semeadas com os respectivos meios apresentaram colônias de bactérias, indicando que sua atividade foi apenas bacteriostática. Igualmente, Reed et al. (1995) e Tanprasert e Reed (1997) relataram atividade bacteriostática e não bactericida de alguns antibióticos. Do mesmo modo, experimentos preliminares com o tratamento de explantes e ramos com antibióticos e fungicidas não foram eficientes no controle da contaminação endógena (dados não apresentados).

Ainda assim, mesmo que os antibióticos tivessem sido eficazes na eliminação da bactéria, alguns dos compostos não poderiam ser utilizados visto sua fitotoxicidade ao tecido vegetal, a exemplo da canamicina. Considerando os possíveis efeitos de antibióticos na morfogênese de *Eucalyptus* sp., experimentos para se determinar a dose que permitisse o controle dos microrganismos e a regeneração dos tecidos devem ser realizados. Ainda que ajustes no protocolo de regeneração sejam necessários, Picoli et al. (2005) observaram que concentrações de até 600 mg l⁻¹ de Timentin[®] e carbenicilina não prejudicaram o desenvolvimento de calos, enquanto cefotaxima a partir de 300 mg l⁻¹ mostrou-se fitotóxica.

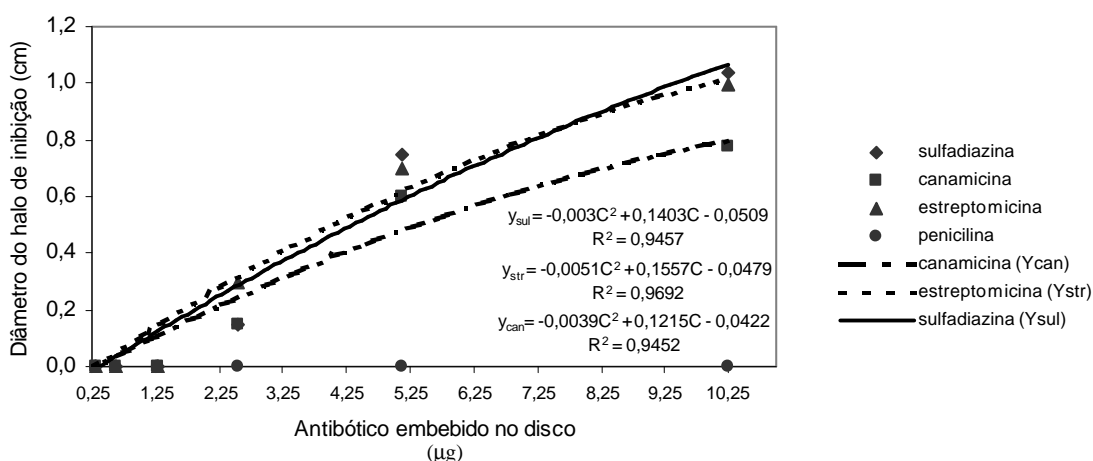


Figura 3 – Inibição do crescimento de *Herbaspirillum huttiense* devido a concentrações crescentes de sulfadiazina, canamicina, estreptomicina e penicilina. Pontos no gráfico correspondem à média de quatro leituras para cada concentração.

Tabela 1 – Relação dos antibióticos e substâncias com atividade antibacteriana testadas para o controle de *Herbaspirillum huttiense* (UFVB0001), conteúdo da substância presente nos discos e, diâmetro médio do halo de inibição.

Antibióticos	Conteúdo (mg / disco)	Diâmetro médio do halo (cm)	Antibióticos	Conteúdo (mg / disco)	Diâmetro médio do halo (cm)
amoxicilina	10	0,0	lincomicina	2	0,0
ampicilina	10	0,0	ác. nalidíxico	30	0,0
bacitracina	10	0,0	neomicina	30	0,0
carbenicilina	100	0,0	netilmicina	30	1,6
cefadroxila	30	0,0	nitrofurantoina	300	2,5
cefalexina	30	0,0	amicacina (novamicin)	30	1,2
cefalotina	30	0,0	oxacilina	5	0,0
cefotaxima	30	1,7	ác. oxdinico	30	0,0
cefoxitina	30	0,0	penicilina	10	1,5
ceftriaxona	30	0,0	polimixina	300	0,0
cloranfenicol	30	0,0	rifampicina	5	0,0
clindamicina (dalacin)	2	0,0	sulfazotrina	25	2,9
eritromicina	15	0,0	sulfadiazina	300	2,0
estreptomicina	10	1,1	sulfonamida	300	3,5
fosfomicina	50	0,0	tetraciclina	30	0,0
gentamicina	10	1,0	tobramicina	10	1,4
canamicina	30	1,3	vancomicina	300	0,0

Uma alternativa para contornar a contaminação por bactérias na cultura de tecidos é a alteração do pH do meio de cultura. Buckley et al. (1995) observaram que a sensibilidade de estirpes de *Xanthomonas* sp. e *Agrobacterium* sp. a antibióticos variou de acordo com o pH, onde foram inibidas em pH 7,5. A influência do pH sobre a sensibilidade a antibióticos também foi observada por Leifert e Waites (1992) e Niedz e Bausher (2002). Outra opção para o controle dos endofíticos é o tratamento de tecidos vegetais com água quente (42-45°C), eficiente na redução da contaminação endógena de *Lilium* sp. e *Acer* sp. (Langens-Gerrits et al. 1998).

Reed et al. (1998) e Tanprasert e Reed (1998) verificam que antibióticos testados individualmente foram ineficazes para a maioria dos isolados de bactérias estudadas, contudo, a mistura de Timentin®, estreptomicina e

gentamicina não foi fitotóxica e apresentou resultados promissores. Leifert et al. (1991) também verificaram que o uso de combinações de antibióticos foi eficiente no controle de contaminantes de tecidos vegetais cultivados *in vitro*. Entretanto, Phillips et al. (1981) verificaram que 50 µg ml⁻¹ de rifampicina foram suficientes para o controle de bactérias em *Helianthus tuberosus*. Outros antibióticos como o ácido nalidixico, fosfomicina, estreptomicina, penicilina e cloranfenicol foram ineficazes contra contaminações bacterianas dessa mesma espécie.

Apesar da atividade bacteriostática dos antibióticos individuais sob *H. huttense*, experimentos com misturas dessas substâncias encontram-se em andamento. A utilização de PPM™ (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology, Inc., EUA), bem como a alteração dos valores do pH do meio concomitantemente com o uso de antibióticos podem ser eficazes para o controle dessa contaminação. Observações quanto à fitotoxicidade e CMI também devem ser realizadas, tendo em vista o custo do tratamento com antibióticos, praticidade e redução do risco de seleção de estirpes de microrganismos resistentes. Embora *H. huttense* tenha se apresentado como uma dificuldade à cultura *in vitro* do genótipo de *E. grandis* x *E. smithii*, sua identificação em eucalipto abre perspectivas de aumento de produção ou de fixação biológica do nitrogênio em uma espécie lenhosa. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmação desta hipótese.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte concedido pela Companhia Suzano Bahia-Sul à pesquisa da otimização de protocolos de transformação genética de eucalipto, conduzida no Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno/BIOAGRO/UFV e Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II/BIOAGRO/UFV.

CAPÍTULO 2

In vitro MORPHOGENESIS OF *Eucalyptus grandis*: EFFECTS OF ANTIBIOTIC
AND EXPLANT SOURCES

Resumo

Os efeitos de concentrações crescentes de cefotaxima, carbenicilina e timentin foram avaliados na morfogênese *in vitro* de explantes de *Eucalyptus grandis*. Foi observado que carbenicilina e timentin aumentaram a frequência de explantes regenerando calos e reduziram a necrose até 600 mg L⁻¹, enquanto cefotaxima teve o mesmo comportamento até 300 mg L⁻¹, a partir da qual levou a um aumento da frequência de explantes necrosados. Explantes de hipocótilos e cotildones apresentaram resultados semelhantes quanto à morfogênese, apesar de estudos adicionais quanto ao aumento da indução de gemas e ramos serem necessários. Nossos resultados sugerem que carbenicilina ou timentin devem ser utilizados em protocolos de cultura de tecidos de eucalypto ou de transformação genética, considerando seu efeito positivo na calogênese.

Palavras chave: *Eucalyptus grandis*, morfogênese, antibióticos, cultura de tecidos vegetais.

Abstract

Effects of increasing concentrations of cefotaxime, carbenicillin and timentin on the *in vitro* morphogenesis of *Eucalyptus grandis* explants were evaluated. It was observed that carbenicillin and timentin increased the frequency of explants regenerating callus and decreased necrosis up to 600 mg L⁻¹, and that cefotaxime behaved similarly up to 300 mg L⁻¹ at which level there was an increasing frequency of explants and callus showing necrosis. Hypocotyl and cotyledon explants presented similar results for morphogenesis, although further studies on the enhancement of bud and shoot induction are necessary. Our results suggest that carbenicillin or timentin should be used in *Eucalyptus* tissue culture or on genetic transformation protocols, considering their positive effect on callogenesis.

Key words: *Eucalyptus grandis*, morphogenesis, antibiotics, plant tissue culture.

Introduction

There is an increased demand for charcoal, lumber and wood for cellulose among other silvicultural commodities in the Brazilian and world market. Figures show that more than 2.3 and 40 million tons of charcoal, and 46 millions of cubic meters and 187 metric tons of wood for cellulose and paper production were assigned to these markets, respectively (IBGE 2002, FAO 2002). Although *Eucalyptus* is native to Oceania, Australia and neighboring Islands, it is well adapted in Brazil.

Some biotechnological approaches are currently being applied to overcome the variability inherent of seed propagation, long generation periods, characteristics of late expression, and incorporation of resistance and quality features to elite genotypes. Plant tissue culture procedures have given support to these approaches while granting means of clonal propagation of superior individuals, plant rejuvenation and regeneration protocols for genetic transformation (Tibok et al. 1995, Moralejo et al. 1998, Zobayed et al. 2000, Nugent et al. 2001, Sartoretto et al. 2002). In these protocols, different regeneration frequencies are observed, what may be associated with the use of different explants such as leaves, cotyledons, plantlets, embryos and hypocotyls (Watt et al. 1991, Tibok et al. 1995, Termignoni et al. 1996, Mullins et al. 1997, Ho et al. 1998, Bandyopadhyay et al. 1999, Cid et al. 1999, Harcourt et al. 2000, Nugent et al. 2001, Pinto et al. 2002, Sartoretto et al. 2002).

There are valuable efforts at developing wood plant *Agrobacterium*-mediated transformation protocols (Ke et al. 2001, Walter et al. 2002), although transgenic trees have been most commonly obtained via biolistics (Merkle 2003). Nevertheless, *Agrobacterium*-mediated transformation has been the most used technique for obtaining transgenic plants (Savka et al. 2002). Since in the selection and *Agrobacterium* elimination steps of these protocols there are used antibiotics that may interfere in the morphogenic potential of the explants, it is interesting to use those that provide positive or at least null effects over morphogenesis. Besides that, antibiotics are also one of the ways of reducing, or preventing endogenous contamination, observed in plant tissue culture (Reed et al. 1998).

Positive (d'Ultra Vaz et al. 1993, Costa et al. 2000, Picoli et al. 2000) and negative (Nauerby et al. 1997, Ling et al. 1998, Picoli et al. 2002) effects of antibiotics are observed in *in vitro* culture of several species. Albeit studies on regeneration and transformation protocols, as far as we know, this is the first report on antibiotics effects on eucalypt *in vitro* morphogenesis. Accordingly, this work intends to evaluate the effects of increasing antibiotics concentrations, and the explant source, on the *in vitro* morphogenesis of *E. grandis*.

Materials and methods

Plant material

Eucalyptus grandis seeds from controlled-crosses were supplied by Companhia Suzano Bahia-Sul (Itapetininga, São Paulo). Surface-sterilization was accomplished by seed immersion into 70% (v:v) ethanol for 5 min, followed by 5 min in a 10% (v:v) hydrogen peroxide solution, and a final dip in a 5% (w:v) calcium hypochlorite solution containing 0.1% (v:v) Tween 20. Following, the seeds were rinsed four times in sterile distilled water, blotted on filter papers, and then were germinated *in vitro* in sterile and moistened filter paper. Seeds were kept in the dark for the first seven days and afterwards were maintained under 16 h light regime, $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light radiation provided by two fluorescent tubes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram) for additional 3 to 5 days. The culture room temperature was kept at $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

In vitro-grown seedlings (10–12 days after germination) were used as the source of hypocotyl and cotyledonary explants. They were aseptically removed and transferred to shoot induction medium (SIM). The latter consisted of MS (Murashige and Skoog 1962) basal salts supplemented with 2.5 mg L^{-1} nicotinic acid, 10 mg L^{-1} thiamine, 1.2 mg L^{-1} pyridoxine, 100 mg L^{-1} myo-inositol, 1.5% (w:v) sucrose, 1.5% (w:v) glucose, 800 mg L^{-1} PVP, 100 mg L^{-1} arginine, 0.1 mg L^{-1} NAA, 0.1 mg L^{-1} TDZ and solidified with 0.6% agar (Sigma Chem. Co., USA) at $\text{pH } 5.7 \pm 0.1$.

Antibiotic treatment

The antibiotics cefotaxime (União Química Farmacêutica Nacional SA, Brazil), timentin (SmithKline Beecham Farmacêutica, Brazil) and carbenicillin (Sigma Chem. Co., USA) at 0, 150, 300, 450 and 600 mg L^{-1} were added to SIM

just after autoclaving (1.2 kg cm⁻² at 121° C; 15 min) and cooling. The antibiotics were filter-sterilized with Millipore filters (2.5 cm diameter; 0.22 µm; Millex). Recultures to SIM were performed each four weeks. Data on frequency of explants presenting callus without oxidation sectors (CR) and buds (B) were evaluated after 3 months. Letters that follows these variables identifies first the explant source, hypocotyl (H) and cotyledon (C), and at the last, the antibiotics timentin (T), cefotaxime (CE) and carbenicillin (CA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a completely randomized design. Data were subjected to appropriate regression analysis based on the average of the experiments. Each treatment had five replicates, with 10 explants of each source, hypocotyls and cotyledons, per Petri dish. The experiment was performed twice. Completely contaminated dishes or explants were not considered in the analysis.

Results and discussion

It was observed that increasing antibiotics concentration presented positive effects on the frequency of explants with callus and promoted a reduction in the number of hypocotyl and cotyledon explants showing necrosis and oxidation, even at timentin and carbenicillin concentrations as high as 600 mg L⁻¹. Cefotaxime was an exception in that up to 300 mg L⁻¹ displayed this behavior and from which exhibited a trend to augment the necrosis frequencies (Figures 1A and 1B).

The increased necrosis frequency displayed by cefotaxime suggests inhibitory or toxic effects on eucalypt explants, as previously observed (Sarma et al. 1995, Gama et al. 1996, Picoli et al. 2000, Picoli et al. 2002). Antibiotics used in eucalypt genetic transformation should take this into account, as it can possibly increase transformation efficiencies. This is especially important when difficulties on eliminating *Agrobacterium* from plant tissues are observed (Shackelford and Chlan 1996, Landsmann et al. 1999), where higher antibiotic concentration might help without constraining regeneration efficiency. Yet, the wide spread use of cefotaxime in the transformation protocols (Ho et al. 1998,

Moralejo et al. 1998, Cid et al. 1999, González et al. 2002) should also be reviewed based on these results.

Lower frequencies of eggplant explants regenerating shoots and roots were observed with increasing cefotaxime and timentin concentrations. Even though, in the concentrations tested, the average number of shoots and roots decreased with cefotaxime, whilst with timentin no significant effect over these variables was observed (Picoli et al. 2002). Similarly, cefotaxime had deleterious effects over eggplant embryogenesis (Picoli et al. 2000), tomato (Ling et al. 1998) and tobacco organogenesis (Nauerby et al. 1997). Genotype interaction with responses to antibiotics is observed as better growth of *N. plumbaginifolia* cell colonies by use of related cephalosporins and penicillins (Pollock et al. 1983). On the other hand, d'Ultra Vaz et al. (1993) reported that cefotaxime added to the medium was essential for passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) cell division.

Although positive effects of cefotaxime on other species (Yepes and Aldwinkle 1994, Barret and Cassells 1994), this seems not to be true for *Eucalyptus*, where timentin and carbenicillin presented better results. Possibly, these beneficial effects are related to penicillin metabolism, where one of the breakdown products, a natural weak auxin (phenyl acetic acid), may contribute to morphogenic responses (Holford and Newbury 1992).

Even though the presence of explants regenerating buds (Figures 2A, 2B and 2C), necrosis and oxidation are still present in a great frequency, an average of 54% considering hypocotyls and cotyledon explants, and all antibiotics concentrations (Figures 1A, 1B and 2C). Besides that, there is also a low frequency of explants regenerating buds (Figures 1C and 1D). On the other hand, little difference was observed when the source of explant was compared (Figures 1A and 1C compared to Figures 1B and 1D). As far as the source of explants is concerned, Nugent et al. (2001) and Tibok et al. (1995) found that *E. globulus* shoot development occurred at higher frequency from hypocotyl explants. On the other hand, Cid et al. (1999) observed different results depending on the growth regulators associated to *E. grandis* vs. *E. urophylla* cotyledon, hypocotyl and cotyledonary node explants.

The occurrence of necrosis, phenols exudation and explant oxidation (Figure 2C) are still a problem to be solved regarding eucalypt regeneration protocols. This detrimental effect of phenolic compounds to morphogenic processes was approached in the studies by Durand-Cresswell and Nitsch (1977) and Gill and Gill (1994). Even though *Eucalyptus* is a recalcitrant species, genotype variation may have contributed to low regeneration frequencies since the explants were taken from seeds.

Marked effects of antibiotics and their concentration are observed for callogenesis, irrespective of the explant used (Figures 1A to 1D). It is interesting to note that regression equations display determination coefficients as high as 98% (Table I), corroborating to the influence of antibiotics on eucalypt morphogenesis. These results are of great importance though the indirect regeneration of shoots and embryos, which has an intermediary step with a proliferation of less differentiated and organized cells, from which groups or isolated cells reacquire competence and follows morphogenic pathways. It is reasoned because, besides adopting cefotaxime, most of the eucalypt regeneration and transformation protocols are based on indirect regeneration (Lainé and David 1994, Tibok et al. 1995, Ho et al. 1998, Moralejo et al. 1998, Cid et al. 1999, González et al. 2002).

Data on explants regenerating buds, in spite of the fact of good coefficients of determination, still demands further studies regarding the optimization of regeneration frequencies. Being so, our results suggests that the use of timentin and carbenicillin, in concentrations up to 600 mg L⁻¹, should support callus induction, although further studies on direct and indirect morphogenesis should be accomplished.

Acknowledgments

The authors are grateful to Companhia Suzano Bahia-Sul for supporting the research on improving eucalypt regeneration and transformation protocols, held in the Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno and Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II-BIOAGRO-UFV.

Table 1 - Regression equations and correlation coefficients for the variables analyzed. Frequency of explants presenting callus without oxidation sectors (CR) and buds (B)

Variable*	Regression	Coefficient of determination (R²)
CRHCE	$Y = -0.0002X^2 + 0.1282X + 20.73$	0.4876
CRHCA	$Y = -0.0001X^2 + 0.1476X + 15.775$	0.9824
CRHT	$Y = -0.0001X^2 + 0.1114X + 22.502$	0.5197
CRCCE	$Y = -0.0003X^2 + 0.1986X + 31.456$	0.7069
CRCCA	$Y = -0.0001X^2 + 0.1635X + 24.96$	0.9898
CRCT	$Y = -4*10^{-05}X^2 + 0.0693X + 29.106$	0.734
BHCE	$Y = 3*10^{-05}X^2 - 0.02X + 4.0604$	0.9464
BHCA	$Y = 10^{-05}X^2 - 0.014X + 4.4818$	0.616
BHT	$Y = 10^{-05}X^2 - 0.0125X + 5.3929$	0.1688
BCCE	$Y = -10^{-06}X^2 - 0.0092X + 5.2476$	0.4786
BCCA	$Y = 4*10^{-05}X^2 - 0.0204X + 3.4405$	0.8397
BCT	$Y = -4*10^{-06}X^2 - 0.0024X + 4.4262$	0.4783

**Letters that follows these variables identifies first the explant source, hypocotyl (H) and cotyledon (C), and at the last, the antibiotics timentin (T), cefotaxime (CE) and carbenicillin (CA), respectively.*

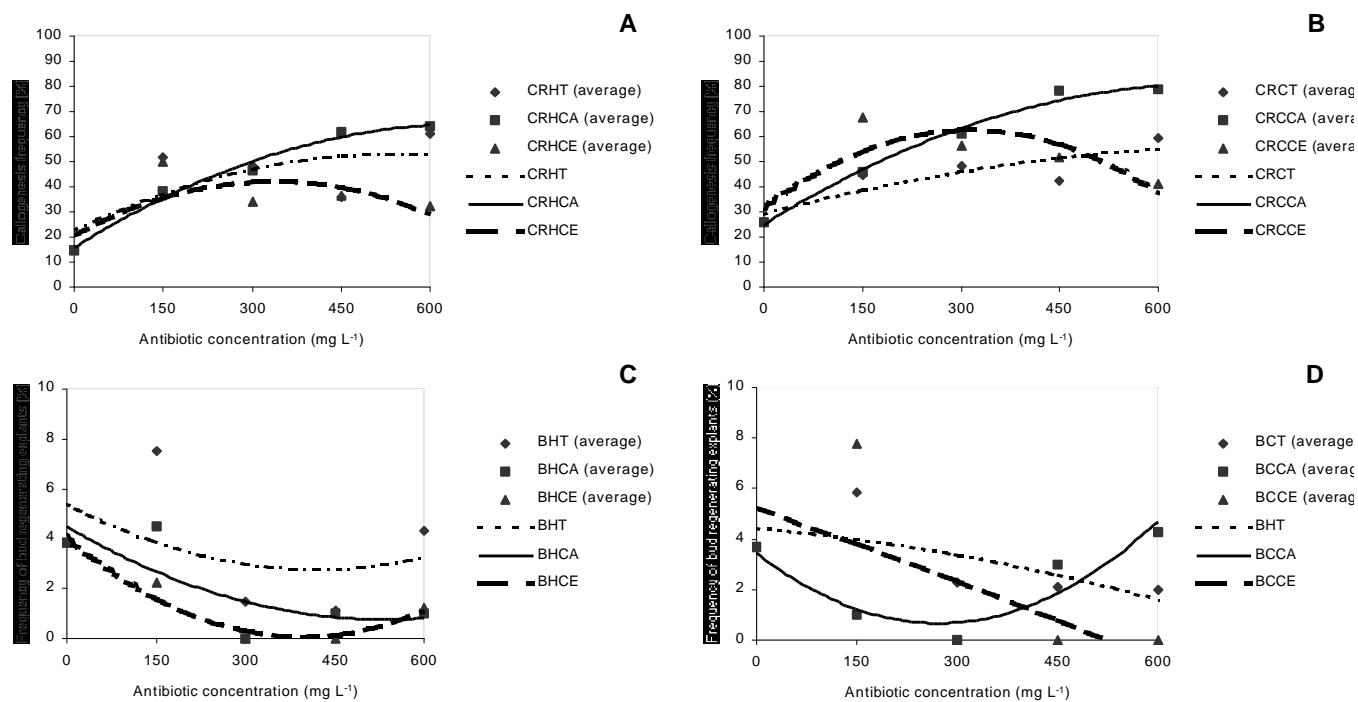


Figure 1 - Antibiotic effects on the *Eucalyptus grandis* morphogenic responses.

Observed and estimated frequency of: **A** – hypocotyl explants presenting callus with non-oxidated sectors; **B** –cotyledon explants presenting callus with non-oxidated sectors; **C** –hypocotyl explants presenting buds; **D** –cotyledon explants presenting buds. Frequency of explants presenting callus with non-oxidated sectors (CR) and buds (B). Letters that follows these variables identifies first the explant source, hypocotyl (H) and cotyledon (C), and at the last, the antibiotics timentin (T), cefotaxime (CE) and carbenicillin (CA), respectively.

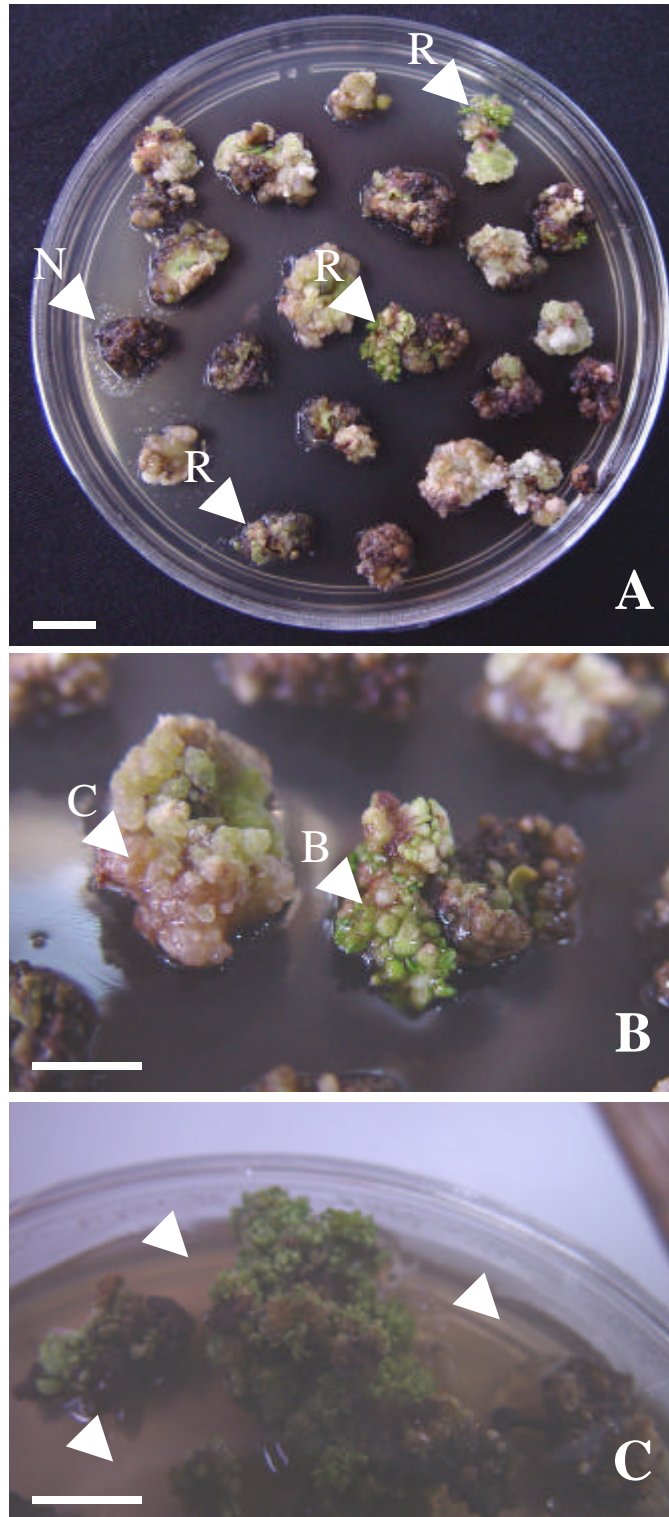


Figure 2 – Regenerating hypocotyl and cotyledon *Eucalyptus* explants. **A** – *In vitro* culture showing necrosed (N) and regenerating explants (R), 300 mg L⁻¹ carbenicillin; **B** – Detail of a callus (C) and a bud regenerating explant (B); **C** – Detail of a bud regenerating explant and phenol exudation. Bars = 10 mm.

CAPÍTULO 3

GROWTH REGULATORS PULSING PRE-TREATMENT EFFECT ON THE
Eucalyptus grandis SHOOT AND ADVENTITIOUS ROOT MORPHOGENESIS

Resumo

Foram avaliadas as respostas morfogênicas de explantes de *E. grandis* submetidos a altas concentrações de reguladores de crescimento, e a pré-tratamentos combinando as concentrações de 10, 50 e 100 mg L⁻¹ do ácido 2,4-diclorofenoxiacético por períodos de 6, 12, 24 e 48 h. Plântulas intactas apresentaram maior indução de raízes adventícias (~7 raízes/explante) comparados a cotilédones e hipocótilos isolados (<1,5 raízes/explante). O ácido 3-(benzo[b]selenil) acético (BSAA), ácido indol acético (IAA), ácido indolbutírico (IBA), ácido naftalenoacético (NAA) e 2,4-D aumentaram (>10 raízes/explante), enquanto thidiazuron (TDZ), zeatina (ZEA), 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN) inibiram (<1 raízes/explante) a morfogênese de raízes adventícias. O alongamento do epicótilo foi inibido por TDZ, KIN, 2,4-D, BAP e BSAA, enquanto o mesmo não foi observado para IAA, IBA, NAA e ZEA. BSAA promoveu maior indução de raízes adventícias. O alongamento do epicótilo e o número médio de raízes diminuíram, enquanto a necrose aumentou, com maiores concentrações e exposição a 2,4-D, sugerindo a dependência dessas respostas a essas variáveis.

Palavras chave: “pulsing”, morfogênese *in vitro*, *Eucalyptus grandis*.

Abstract

The morphogenic responses of *E. grandis* explants were evaluated when submitted to high concentrations of growth regulators, and to combinations of 10, 50 and 100 mg L⁻¹ of 2,4-dichlorophenylacetic acid (2,4-D) and 6, 12, 24 and 48 hours pre-treatments. Intact plantlets displayed superior adventitious root induction (~7 roots/explant) compared to isolated hypocotyl and cotyledon explants (<1,5 roots/explant). The 3-(benzo[b]selenyl) acetic acid (BSAA), indolacetic acid (IAA), indolbutyric acid (IBA), naphthaleneacetic acid (NAA) and 2,4-D enhanced (>10 roots/explant) whereas thidiazuron (TDZ), zeatin (ZEA), 6-benzylaminopurine (BAP) and kinetin (KIN) inhibited (<1 roots/explant) adventitious root morphogenesis. Epicotyl elongation was inhibited by TDZ, KIN, 2,4-D, BAP and BSAA, whereas IAA, IBA, NAA and ZEA did not. BSAA promoted higher adventitious root induction. Epicotyl

elongation and average number of roots per explant declined, whereas explant necrosis augmented, with higher exposure to 2,4-D, suggesting morphogenic response dependence on these variables.

Index terms: pulsing, *in vitro* morphogenesis, *Eucalyptus grandis*.

Introduction

There are several protocols for regenerating *Eucalyptus* adventitious shoots (TIBOK et al. 1995, BANDYOPADHYAY et al. 1999, CID et al. 1999, HARCOURT et al. 2000, NUGENT et al. 2001) and somatic embryos (WATT et al. 1991, TIBOK et al. 1995, TERMIGNONI et al. 1996, BANDYOPADHYAY et al. 1999). These protocols also use different explant sources such as leaf (CID et al. 1999), seedlings (TERMIGNONI et al. 1996), cotyledon (NUGENT et al. 2001), cotyledonary nodes (CID et al. 1999) and hypocotyls (TIBOK et al. 1995). All of them are grounded on callus induction, which further produces shoots and embryos whilst transferred and maintained onto growth regulators-containing medium.

Recently, it was observed that hormone-pulsing could enhance or either promote *in vitro* regeneration in goiabeira serrana (GUERRA et al. 2000), highbush blueberry (CAO et al. 2002), quince (D'ONOFRIO and MORINI 2004) and in and ginseng (KEVERS et al. 1999, KEVERS et al. 2000). Albeit different pulsing pre-treatment period, these protocols were successful in root (KEVERS et al. 1999), embryo (KEVERS et al. 2000, GUERRA et al. 2001) and shoot (CAO et al. 2002) regeneration.

In this work we submitted *E. grandis* explants to high concentrations of growth regulators during short pre-treatment periods in order to ascertain its morphogenic responses. Explant and growth regulator sources, and hormone concentration and periods of pre-treatment were also evaluated.

Materials and methods

Eucalyptus grandis seeds from a controlled crossing were surface-sterilized by immersion into 70% (v:v) ethanol for 5 min, followed by 5 min in a 10% (v:v) hydrogen peroxide solution, and a final dip in a 5% (w:v) calcium hypochlorite solution containing 0.1% (v:v) Tween 20. Following, the seeds were rinsed four times in sterile distilled water, blotted on filter papers, and then were

germinated *in vitro* in sterile and moistened filter paper. Seeds were kept in the dark for the first seven days and afterwards were maintained under 16 h light regime, $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light radiation provided by two fluorescent tubes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram) for additional 3 to 5 days. The culture room temperature was kept at $26\pm 2^\circ\text{C}$.

In vitro-grown seedlings (10–12 d old) were used as the source of plantlet (PL), hypocotyl (HYP) and cotyledonary (COT) explants. All treatments were transferred to MS medium (MURASHIGE and SKOOG, 1962) basal salts supplemented with 2.5 mg L^{-1} nicotinic acid, 10 mg L^{-1} thiamine, 1.2 mg L^{-1} pyridoxine, 100 mg L^{-1} myo-inositol, 3% (w:v) sucrose, 300 mg L^{-1} TimentinTM (SmithKline Beecham Farmacêutica), 800 mg L^{-1} PVP, 100 mg L^{-1} arginine and solidified with 0.6% (w:v) agar (Sigma Chem. Co.), at $\text{pH } 5.7\pm 0.1$. In the first experiment, the explants were transferred to MS liquid medium containing 100 mg L^{-1} naphthaleneacetic acid (NAA) or 100 mg L^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), for 4 hours. Three Petri dishes, with 22 explants per dish, composed each treatment. Initially, explants showing necrosis were not considered, and the frequency of explants presenting roots (FER) and the mean number of roots (NRE) were evaluated one month after the cultures were initiated.

In the following experiment, *Eucalyptus* plantlets were pre-treated for 24 hours into MS liquid media containing 100 mg L^{-1} of growth regulators: indolacetic acid (IAA), indolbutyric acid (IBA), NAA, 2,4-D, thidiazuron (TDZ), zeatin (ZEA), 6-benzylaminopurine (BAP), kinetin (KIN) (Sigma Chem. Co.), 3-(benzo[b]selenyl) acetic acid (BSAA) (Acros Organics). An additional control treatment in the absence of growth regulators was included. Concomitantly, other experiment was conducted as a factorial where the concentrations of 10, 50 and 100 mg L^{-1} 2,4-D, and the pulsing pre-treatment periods of 6, 12, 24 and 48 hours, were simultaneously evaluated. Each treatment held five Petri dishes with 11 to 15 plantlets per dish. The frequency of explants with epicotyl elongation (FEEE), frequency of explants showing more than 50% of oxidation (FEO), and the mean number of roots per explant (NRE) were evaluated.

The experiments were conducted in a completely randomized design. Data were subjected to Cochran and Bartlett variance homogeneity and Lillifors

normal distribution test. Appropriate mean test (Tukey), at 5% probability, and surface response analysis based on the average of the experiments were conducted by using the software Statistica 5.0.

Results and discussion

Regardless 2,4-D or NAA 4-hour pre-treatment, whole plantlets lead to higher adventitious roots morphogenesis (Figure 1A). The higher number of adventitious roots observed on intact plantlets compared to isolated hypocotyls and cotyledonary explants also confirm this observation (Figure 1B). Epicotyl elongation was inhibited with 24 hours pre-treatment in 100 mg L⁻¹ 2,4-D, TDZ or KIN, on the other hand, other growth regulators showed non-inhibitory results (Figure 2A), while BAP had an intermediary influence on elongation (Figure 3A). It is worth to mention that only average and standard deviations were performed for FER and FEEE (Figures 1A and 2A), as they did not support variance homogeneity by Cochran and Bartlett test at 1% probability.

The negative effect of these pre-treatment was accompanied by an increasing necrosis/browning just in the growth regulator reverse order obtained for epicotyl elongation (Figures 2A and 2B). Similarly, both 2,4-D concentration and exposure period enhanced explant necrosis (Figure 4A). The consequences of high plant growth regulator doses is noticed as some growth regulators led to necrosis (Figure 3C), whereas TDZ and KIN allowed neither morphogenesis nor oxidation (Figure 2B).

It is important to note an increasing FEO with pre-treatment period and growth regulator concentration (Figure 4A). Even though, investigating the concentration and exposure may result in different responses considering other pulsing periods, plant growth regulators or its combinations.

Figure 1 – Influence of growth regulators on adventitious root morphogenesis in *Eucalyptus grandis* plantlets (PL), cotyledon (COT) and hypocotyl explants (HYP). **A** – Frequency of explants presenting adventitious roots, vertical bars correspond to the means per treatment and vertical lines to respective standard deviation, and **B** – Average number of roots per explant. Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey 5%).

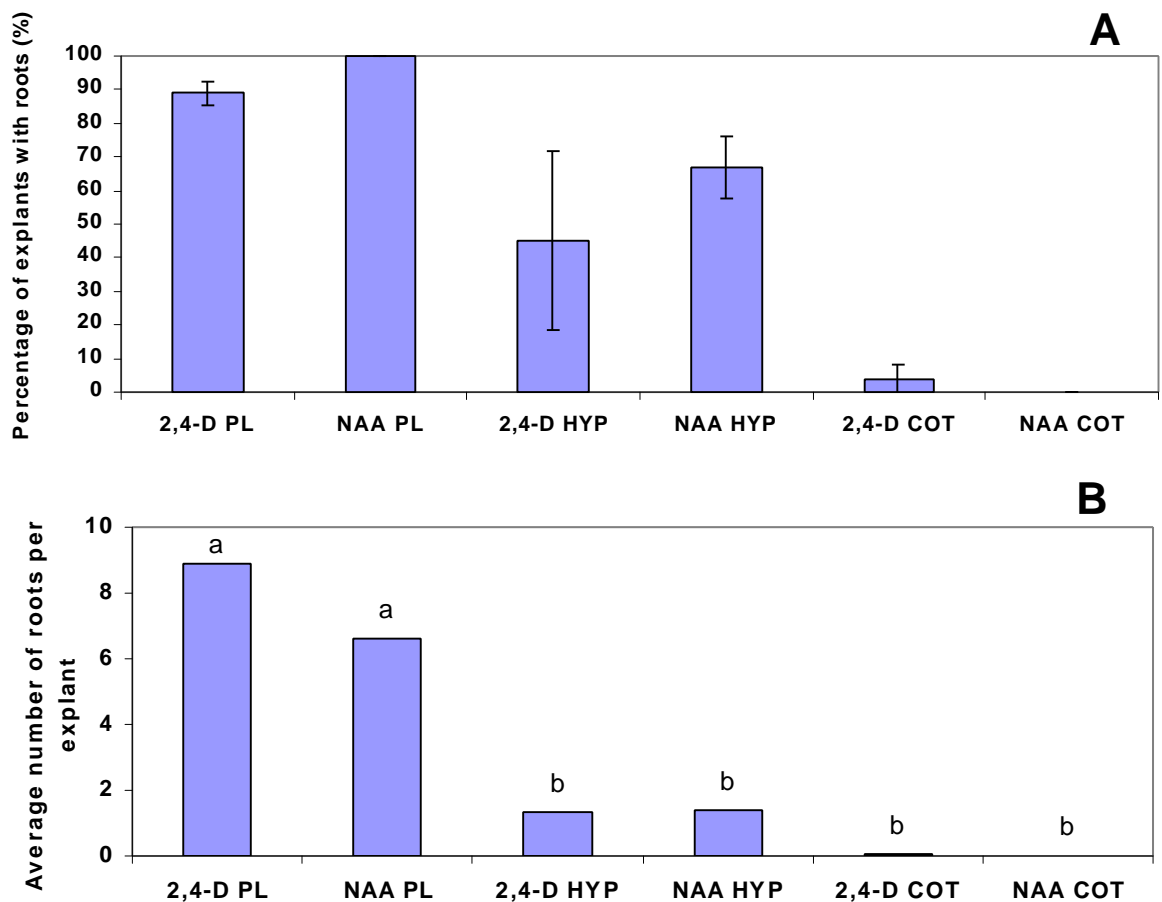


Figure 2 – Influence of growth regulators 24 h pre-treatment in *E. grandis* plantlets shoot and adventitious root morphogenesis. **A** – Frequency of explants with epicotyl elongation (FEEE), **B** – Frequency of explants with more than 50% oxidation (FEO), and **C** – Average number of roots per explant (NRE). Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey 5%).

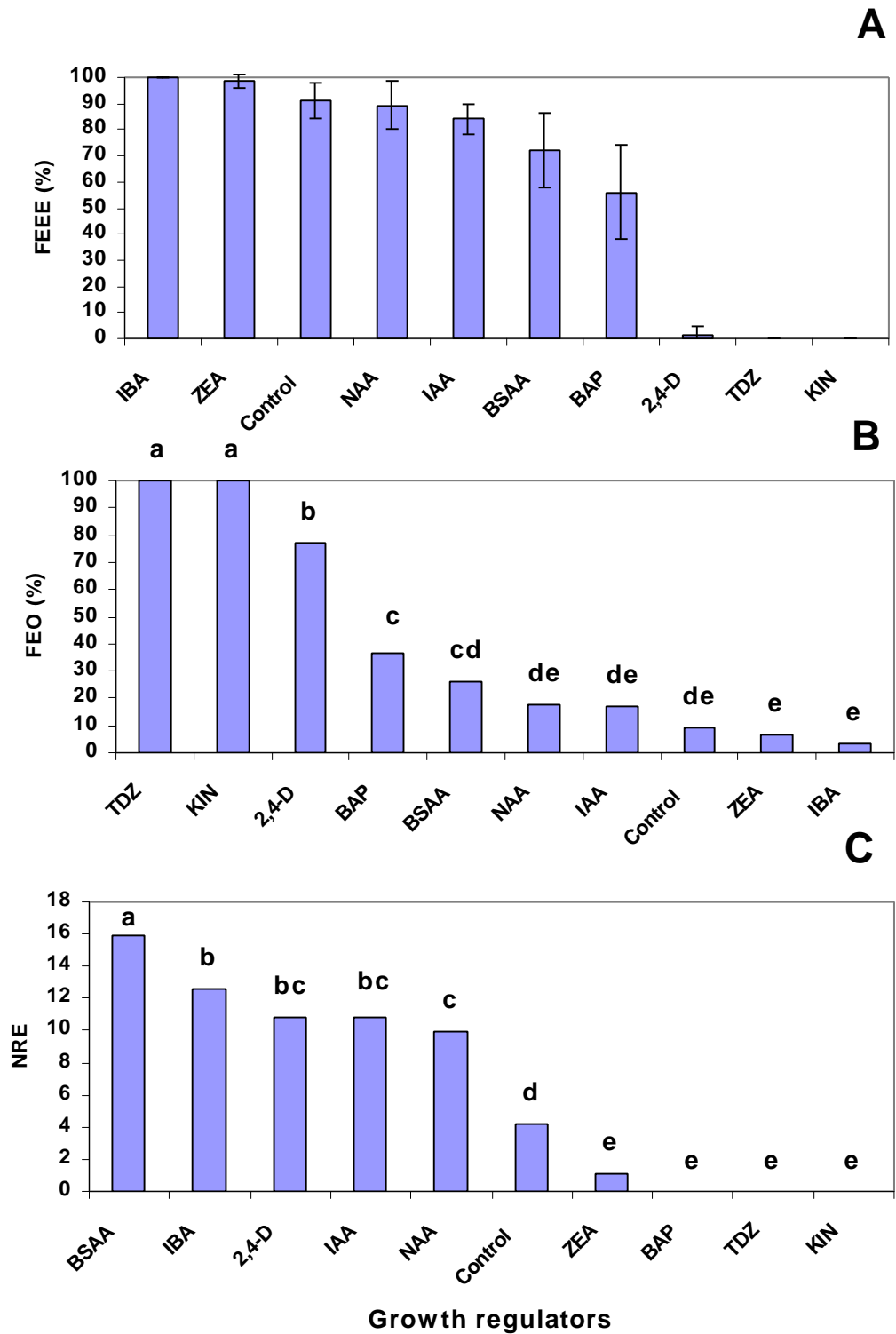


Figure 3 – Effect of 24 h growth regulators pre-treatment in *E. grandis* plantlets after 30 days on semi-solid regeneration medium. **A** – Pulsing with 100 mg L^{-1} BAP, **B** – 100 mg L^{-1} KIN, **C** – 100 mg L^{-1} 2,4-D, and **D** – 100 mg L^{-1} BSSA. (Bar = 1 cm)

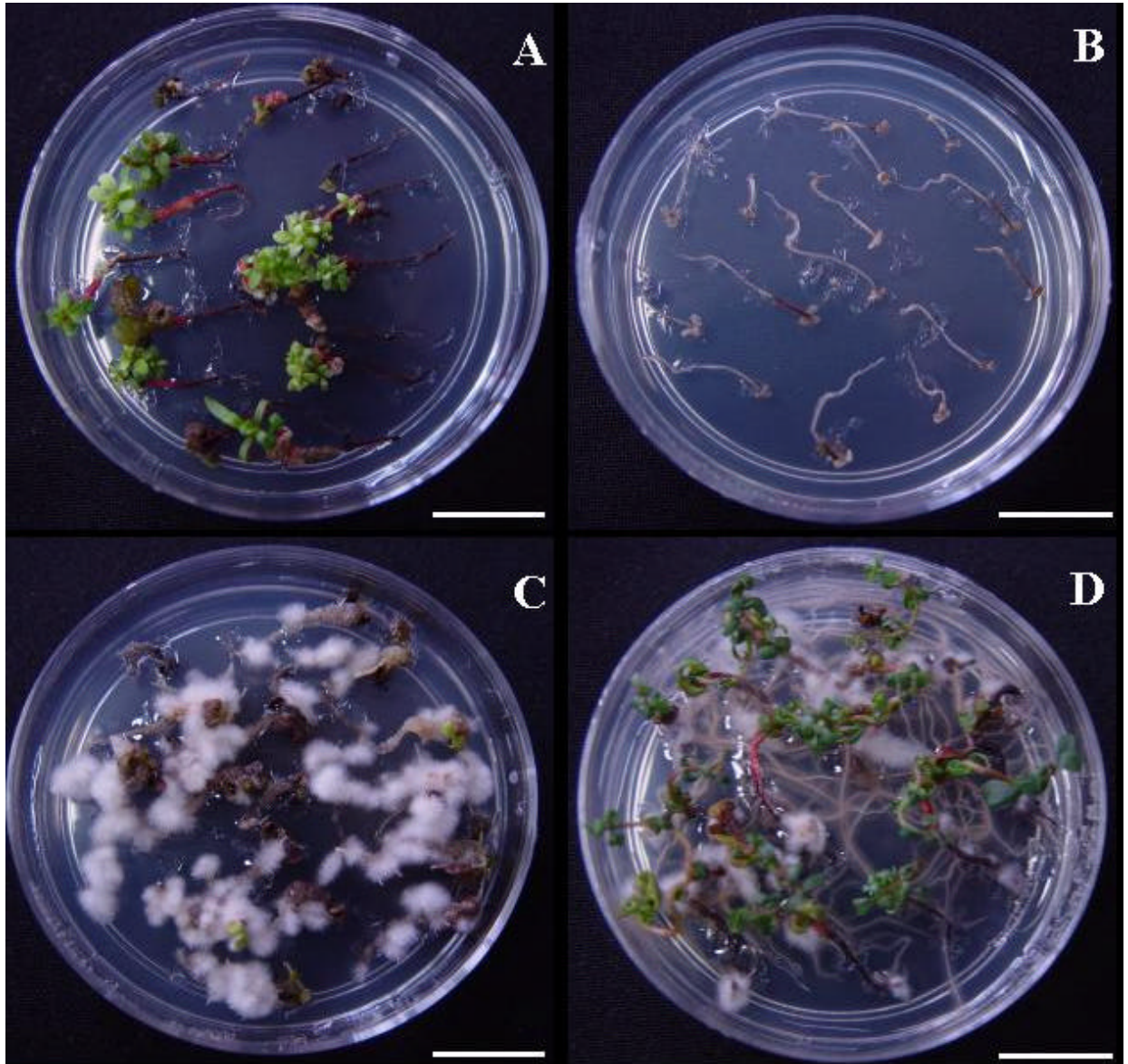
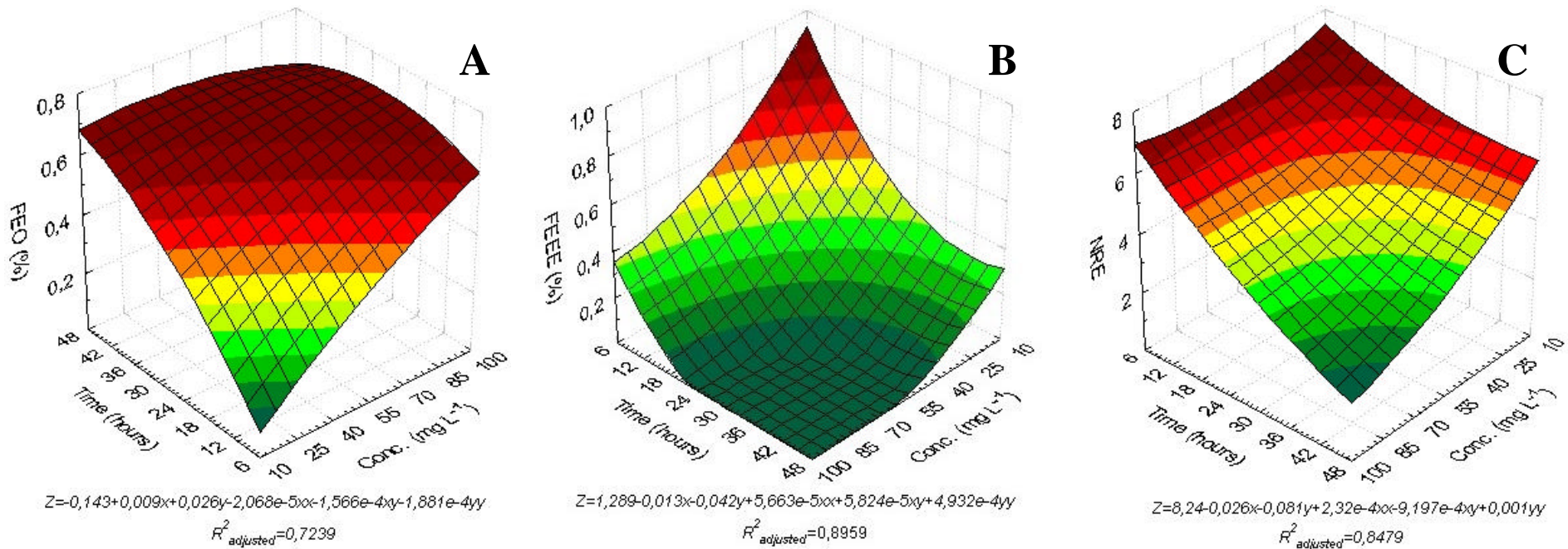


Figure 4 – Surface response analysis of the influence of growth regulators concentration (mg L^{-1}) and pre-treatment periods (time – hours) in *E. grandis* plantlets shoot and adventitious root morphogenesis. **A** – Frequency of explants with more than 50% of oxidation (FEO), **B** – Frequency of explants with epicotyl elongation (FEEE), and **C** – Average number of roots per explant (NRE). All R^2 were significant at 5% probability.



Albeit higher necrosis compared to other auxins, 2,4-D did stimulate root hair development (Figure 3C). Epicotyl elongation (Figure 4B) and average number of roots per explant (Figure 4C) declined with the exposure and 2,4-D concentration, suggesting morphogenic response dependence on these variables. ZEA, BAP, TDZ and KIN significantly inhibited rhizogenesis (Figure 2C), even compared to control treatment. In contrast, BSAA, IBA, 2,4-D, IAA and NAA significantly stimulated this process (Figure 2C) compared to cytokinin or to the control treatments. The effect of BSAA is emphasized as it induced a significantly higher number of adventitious roots (Figures 3D and 2C), even considering IBA that is the most common auxin used for stimulating rhizogenesis in *Eucalyptus* (ASSIS and TEIXEIRA 1998).

Promising reports of this benzoseleniated auxin are highlighted in stimulating somatic embryogenesis (KEVERS et al. 2000) and rooting (KEVERS et al. 1999). KEVERS et al. (2000) observed that 5 to 15 days on half-strength MS liquid medium supplemented with 3 mg L⁻¹ BSAA induced more embryos in *Panax ginseng* explants than IAA and then longer induction times, irrespective of the auxin used. On the other hand, 0.24mg L⁻¹ BSAA promoted greater rooting efficiencies as compared to other BSAA concentrations and other plant growth regulators like IAA and IBA (KEVERS et al. 1999). Even though it was not able to induce somatic embryos in eucalypt explants in the present treatments, significant higher number of roots was observed, besides still being amenable of potential application in eucalypt regeneration protocols. Further studies on the use of this growth regulator may result in favorable plant hormone ratios to shoot or embryogenic process.

Eucalypt regeneration protocols display different explants sources as leaf (WATT et al. 1991, CID et al. 1999), seedlings (TERMIGNONI et al. 1996), cotyledon (BANDYOPADHYAY et al. 1999, CID et al. 1999, HARCOURT et al. 2000, NUGENT et al. 2001), cotyledonary nodes (CID et al. 1999) and hypocotyls explants (TIBOK et al. 1995, BANDYOPADHYAY et al. 1999, HARCOURT et al. 2000, NUGENT et al. 2001). Besides examining the hormone content and relations in the explants, additional investigation on the explant source may provide other clarifying results as further explants, as calli (KEVERS

et al. 2000) and root (KEVERS et al. 1999), did also respond to different growth regulators pulsing treatment. Additionally, direct and indirect embryogenesis was reported from apical meristems in papaya zygotic embryos (KHOELER 2004) and in pinus (MALABADI and van STADEN 2003).

This is an interesting approach to eucalypt as meristem disorganization concomitantly to root differentiation was observed with 2,4-D pulse treatment (Figure 3C), and because all auxins promoted direct rhizogenesis (Figures 3A, 3C and 3D). Additionally, callogenesis, rhizogenesis and embryogenesis on eggplant explants were observed depending only on NAA concentrations and periods of time onto the inductive medium (GLEDDIE et al. 1983). This is in agreement with the review by Fehér et al. (2002) review, which argued that stress responses to heavy metal, wounding, high salt and plant hormones concentration were related to induction of embryogenic competence.

In this respect, Jiménez and Bangerth (2001) demonstrated that in addition to distinct morphogenic responses, higher IAA levels in carrot hypocotyl explants declined just after sectioning, it being or not transferred to medium containing 2,4-D. After this initial decrease, explants cultured in a 2,4-D containing medium maintained a constant IAA level, whereas an increase was observed in the third evaluation for the explants cultured in a 2,4-D-free medium. Although the amount of gibberellins (GAs) in the explants decreased independently, differences on the abscisic acid and cytokinin levels were observed whether the presence or absence of 2,4-D.

It is worthy to mention that most eucalypt regeneration reports employed auxins, 2,4-D and NAA, solely or in combination with other growth regulators, and that the explants were mostly maintained in induction medium (WATT et al. 1991, TIBOK et al. 1995, BANDYOPADHYAY et al. 1999, NUGENT et al. 2001). In addition to the auxin exogenous stimuli, its endogenous levels also had significant role on the somatic embryos development (MICHALCZUK et al. 1992, FEHÉR et al. 2002). This is further consistent with Jiménez and Bangerth (2001) findings, where, albeit no significant differences for GAs, zeatin and isopentenil adenine, extremely high differences on IAA and ABA levels among

embryogenic and non-embryogenic carrot callus and suspension cultures were detected.

Basic questions on the mechanism of somatic embryo induction are related to the first cell division, where embryogenic cells are revealed to be small, with dense cytoplasm, and preferentially dividing asymmetrically, developing into embryo-like structures (FEHÉR et al. 2002). Similar characteristics were found in eucalypt (WATT et al. 1991). Accordingly, further approach on growth regulator pre-treatment may help establishing embryo and shoot regenerating protocols similarly to Guerra et al. (2001) and Cao et al. (2002). Nevertheless, the present results along with plant physiology understanding, and to genetic and environmental aspects of plant morphogenesis shall grant advances to propagation techniques and overcome limitations still present in eucalypt *in vitro* tissue culture.

Acknowledgments

The authors are grateful to Companhia Suzano Bahia-Sul for supporting the research on improvement of *Eucalyptus* regeneration and transformation protocols, held on Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno and Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II/BIOAGRO/UFV.

CAPÍTULO 4

A priori CHOICE OF HYBRID PARENTS IN PLANTS

Resumo

O melhoramento de plantas lida com genótipos de alta produção. Entretanto, como melhor escolher os parentais desses genótipos continua sendo uma questão não resolvida. Aqui, nós focamos na escolha *a priori* baseada nas distâncias dos parentais a partir de informações agronômicas e moleculares. Apesar de numerosos estudos teóricos e empíricos, a escolha *a priori* continua sendo um procedimento controverso. Sucesso e fracasso são resultados comuns nesses relatos. O presente artigo lida com esses resultados ambíguos na tentativa de investigar suas possíveis causas. Um total de 139 artigos abordando divergência genética foi amostrado para examinar aspectos como o tipo e número de marcadores utilizados. Nossos resultados sugerem que os respectivos números médios de 160, 281 e 25 para marcadores RAPD e RFLP markers, e locos SSR registrados na amostra deveriam ser maiores para análises mais acuradas. Uma segunda amostra composta por 54 artigos foi utilizada na avaliação da associação divergencia-heterose. A maior parte deles (28) detectaram associação divergencia-heterose positiva, enquanto 26 apresentaram resultados negativos ou inconclusivos. Algumas causas influenciando positivamente e negativamente a escolha *a priori* são discutidas.

Palavras chave: escolha *a priori* de parentais de híbridos, marcadores morfológicos, marcadores moleculares, espécies vegetais.

Abstract

Plant breeding deals with high yielding genotypes. However, how best to choose parents of these genotypes remains an unsolved question. Here, we focus on *a priori* choice based on parental distances by means of agronomic and molecular data. Despite numerous theoretical and empirical studies, *a priori* choice continues to be a controversial procedure. Success and failure are common results in these reports. The present paper deals with these ambiguous results in order to investigate their possible causes. A total of 139 articles on genetic divergence were sampled for examining aspects such as type and number of markers utilized. Our findings suggest that the respective mean number of 160, 281 and 25 for RAPD and RFLP markers, and SSR loci registered in the sample should be larger for more accurate analysis. A second sample composed by 54

articles was used for evaluating the divergence-heterosis association. Most of them (28) detected positive divergence-heterosis association, whereas 26 revealed negative or inconclusive results. Several causes influencing positively and negatively *a priori* choice were discussed.

Key words: *a priori* choice of hybrid parents, morphological markers, molecular markers, plant species.

Introduction

Plant breeding deals with high yielding genotypes. However, how best to choose parents of these genotypes remains an unsolved question. Researches on parent selection may be approached into two ways (Baenziger and Peterson, 1992): *a priori* and *a posteriori* choice. The former consists in selection methods based on *per se* parent performance such as midparental value, divergence by means coefficient of parentage, character complementation, multivariate analysis and parental distances, least squares, parental complementation, and ideal genotype. On the latter, parents are evaluated on the basis F_1 , F_2 data and advanced generations. For choosing parents by this way, long period of time is necessary, especially in perennial plants. Here, we focus on *a priori* choice based on parental distances by means of agronomic and molecular data. Its predictive nature prevents hundred crossings be evaluated, whereas only predicted and promising crosses are made and evaluated, saving labor, financial resources, materials and time.

The *a priori* choice is based on the fact of the heterosis to be a relative measure to two generations - the parental and the progeny. For a given quantitative trait, the amount of heterosis following a cross between two populations depends on the square of the difference of gene frequency between the populations and of the dominance deviations (Falconer, 1989). If the populations crossed do not differ in gene frequencies there will be no heterosis. Likewise, loci without dominance cause neither inbreeding depression nor heterosis. Falconer (1989) argues that: (i) the occurrence of heterosis is dependent on directional dominance and its absence is not sufficient ground for concluding that the loci show no dominance; (ii) the amount of heterosis is something specific to each particular cross; and (iii) for inbred lines, the heterosis

is the sum of the dominance deviations of those loci that have different alleles in the two lines.

Once the divergence-heterosis association happens in high degree, it is possible to use of the divergence estimate as a solid criterion for parental selection and, subsequently, for the synthesis of heterotic hybrids, as argued by Dias and Resende (2001). The *a priori* choice was initially carried out by morphological descriptors and further reinforced by the molecular markers outcome, which assumed that the divergence between any two parents expresses the allelic differences between them. Despite numerous theoretical and empirical studies, *a priori* choice continues to be a controversial procedure. Success and failure are common results in these studies (Dias et al., 2003). The present paper deals with these ambiguous results in order to investigate its causes.

Materials and Methods

Firstly, a total of 139 articles (Table 1) dealing with genetic divergence were sampled aiming to investigate the causes of these ambiguous results. In spite of the limitations and inherent difficulties related to sample, some of the aspects to be considered in this kind of study, such as type and number of markers were examined. Subsequently, a second sample was conducted, now composed by 54 articles (Table 2) involving 21 plant species, aiming to evaluate the divergence-heterosis association in particular.

Results and Discussion

Genetic divergence

Genetic distance estimates were mostly based on morphological, biochemical (isoenzymes) and molecular markers (RAPD, RFLP, AFLP, SSR and STS-PCR) (Table 1). Some of the articles did also use pedigree information (relationship coefficient) separately or in combination with other markers. In relation to divergence, the use of RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers is emphasized, comprising the largest number of species and reported papers (Table 1). This observation may be due to the fact that the RAPD technique (Williams et al., 1990) facilitates automation, and presents low operational cost, besides its simplicity, speed, and good polymorphism level in

addition to wide genome covering. Such features mitigate its negative properties like low reproducibility and dominant heritage.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) markers are frequently used for estimating genetic diversity. These markers are co-dominant, reliable and with high information content, although demands considerable amount of good quality DNA, being a laborious technique and often requiring the use of radioactivity. The use of fluorescence, in spite of radioactivity, well-equipped and good laboratory staff ensures this system a further advantage. RFLP has the advantage of allowing the selection of probes that target desirable DNA sequences associated with yield or resistance traits. Some of the probes used in the studies that succeeded in associating genetic distance with hybrid prediction were cDNA clones. These advantages help explain why RFLP is most commonly employed in research on genetic distance-heterosis associations (see Table 2).

When compared to other kinds of molecular markers, AFLP is promising, as it combines the specificity, resolution and sampling power of enzyme restriction, with the simplicity of PCR polymorphism. Furthermore, the large number of markers generated with this technique is obvious from Table 2. However, it presents limited genetic information per locus, and is a dominant marker, as is RAPD, from which it differs by a need for higher quality DNA and more protocol steps (Ferreira and Grattapaglia, 1998). On the other hand, microsatellites or SSR (Simple Sequence Repeats) are the most polymorphic markers. SSR polymorphism is based on differences in simple repetitive sequences that are flanked by conserved borders and distributed all over the genome, making them the most suitable for paternity studies. It is important to bear in mind that the information content did not differ significantly among RFLP, AFLP and SSR, as argued by Bohn et al. (1999). For a detailed review of biochemical and molecular markers see Ferreira and Grattapaglia (1998).

In search of the optimum number of bands, Tivang et al. (1995) observed that, regardless of the restriction enzyme used, the average of polymorphic RFLP bands provided an equivalent amount of information, although 284 to 377 bands were necessary for genetic distance estimates for 37

maize inbred lines associated with a fixed 10% coefficient of variation. Similarly, Fanizza et al. (1999) evaluated 10 accessions of *Vitis vinifera* and concluded that the optimum number of RAPD markers for evaluating genetic divergence was above 400. The cluster formed with 400 markers did not present distortion compared to the cluster formed with all polymorphic markers (932 bands), and the coefficient of variation of the genetic distances was only 5%. Picoli et al. (2004) obtained similar results in a study of 84 *Eucalyptus* genotypes. In spite of limitations that value (~ 400 bands) may have to other gene pools or plant species, it is a reference that should be taken in account in diversity studies. Based on these findings, the mean number (160) of markers that we found in our sample (Table 1) should have been larger.

An analogous effort was made for microsatellites, where 44 primer pairs were required for a correlation value of 95% and 6.44% stress, comparable to a standard sample of 57 primer pairs (Moraes, 2003). This suggests that the respective mean number of 160, 281 and 25 for RAPD and RFLP markers, and SSR loci that we found in the articles that we examined (Table 1) should be larger to achieve accurate analysis. The low number of markers seems to be the major drawback to the use of isoenzymes (Table 1), besides the restricted coverage of the genome, weak correlation with other markers and possible environmental influence (Tsegaye et al., 1996). To some extension, morphological marker suffers these same limitations although phenotype assessment is essential for evaluating the traits of interest.

Divergence-heterosis association

Noteworthy in the second sample of articles (Table 2), 28 of them detected positive divergence-heterosis association, whereas 26 revealed negative or inconclusive results. There are several reasons that could explain these results. Besides the deviations of dominance, genotypic divergence and complementation already reported, additional conditions to the association divergence-heterosis have been inferred on the basis of simulation studies (Bernardo, 1992): (i) manipulation of traits of high heritability; (ii) variation of the allelic frequencies of the parents within narrow limits; (iii) that at least 30 to 50% of quantitative

trait loci (QTL) be linked to the markers; and (iv) that less than 20 to 30% of the markers be randomly distributed or not linked to QTL.

In the practice, the success of the *a priori* choice has confirmed that moderate/high heritability of the traits is decisive (Dias and Resende, 2001; Dias et al., 2003), as much as marker linkage to QTL (Vencovsky and Rumin, 2000), according to the items (i) and (iv) above. Nevertheless, this last condition may only be partially outlined in the species for which linkage maps are unavailable, where wide genome coverage may imply in a “blind” prediction, according to the item (iv). Additionally, the parents with maximum relative divergence will not necessarily originate the more heterotic crossings, in agreement with the item (ii). For instance, Dias and Resende (2001) and Dias et al. (2003) found larger frequency of heterotic hybrid and larger magnitude of the heterosis for yield components in the crosses involving parents of moderate divergence. They obtained success with *a priori* choice of hybrid parents, using yield components as well as DNA markers (RAPD).

There are many other conditions negatively influencing *a priori* choice such as: (i) increased genetic similarity on gene pool due to strong selection pressure (Barbosa et al., 2003); (ii) lack of linkage between genes controlling the traits and the markers used (Bernardo, 1992); (iii) differences on the contributions of the DNA marked regions (Kwon et al., 2002); (iv) the gene pool of narrow genetic base (Maroof et al., 1997); (v) the lack of linkage disequilibrium (Charcosset et al., 1991); (vi) epistasis (Boppenmaier et al., 1992); (vii) high degree of improvement of the gene pool used (Dias et al., 2003); (viii) and the occurrence of genotype-environment interaction (Dias et al., 2003). These remarks suggest that divergence and heterosis do not always associate linearly. Non-linear relationships support this reasoning, as revealed by Sant et al. (1999), a feature that may explain the erratic results in many studies.

Acknowledgments

The authors are grateful to FAPEMIG, CNPq and CAPES for the financial support to this project.

Table 1. Number of articles (N), plant species (S) and appraised average number of markers, loci or probes (n) and range (A) of sampled morphological, biochemical and molecular markers applied in divergence studies.

	Morphological/ Agronomic	Isoenzyme (loci)	RFLP		RAPD	Microsatellite (SSR)		AFLP	STS- PCR
			Markers	Probes		Markers	Loci		
N	22	19	31		78	22		19	03
S	13	12	12		68	17		16	02
n	14.91	15.11	281.41	85.45	160.18	101.88	25.08	1294.12	235.67
A	05-34	07-31	47-1202	34-257	27-932	26-211	6-68	55-5094	93-505

Table 2. Favorable and unfavorable association of divergence estimates based on morphological and molecular markers with heterosis in plant species.

Reference	Genetic distance/Marker	Crop or species	Divergence-heterosis association	
			Favorable	Inconclusive/unfavorable
Ramanujam et al. (1974). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 45: 211-214.	Mahalanobis distance/Morphological	<i>Phaseolus aureus</i>	Positive association of genetic divergence-heterosis	
Srivastava and Arunachalam (1977). <i>Z. Pflanz.</i> 78: 269-275.	Mahalanobis distance/Morphological	<i>Triticale</i>	Association divergence-heterosis and clustering of divergent genetic groups	
Arunachalam et al. (1984). <i>Euphytica</i> 33: 33-39.	Mahalanobis distance/Morphological	<i>Peanut</i>	Heterosis associated with moderate parental divergence	
Arunachalam and Bandyopadhyay (1984). <i>Indian J. Genet.</i> 44: 548-554.	Mahalanobis distance/Morphological	<i>Peanut</i> and <i>Brassica campestris</i>	Positive association for the limits of divergence and heterosis	
Ghaderi et al. (1984). <i>Crop Sci.</i> 24: 37-42	Mahalanobis distance /Morphological	<i>Phaseolus vulgaris</i> and <i>Vicia faba</i>	Positive and significant correlations	
Shamsuddin (1985). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 70: 306-308	Mahalanobis distance/Morphological	<i>Triticum</i>	Positive and significant association of heterosis and genetic divergence	
Frei et al. (1986). <i>Crop Sci.</i> 26:37-42	Pedigree/Aloenzymes	<i>Zea mays</i>	Yield and pedigree distance positive associations	Dependence on similar pedigree background with isoenzymes
Prasad and Singh (1986). <i>Euphytica</i> 35: 919-924	Mahalanobis distance/Morphological	<i>Zea mays</i>	Heterosis associated with moderate parental divergence	
Cowen and Frey, (1987a). <i>Euphytica</i> 36: 413-424	Genealogical distance/Morphological	<i>Avena sativa</i>	Positive association of genealogical distance and genetic variance	Negative association of genealogical distance and diversity, significant as well as non-significant correlations

Reference	Genetic distance/Marker	Crop or species	Divergence-heterosis association	
			Favorable	Inconclusive/unfavorable
Cowen and Frey, (1987b). <i>Genome</i> 29: 97-106	Three types of distance/ Morphological	<i>Avena sativa</i>		Inconsistent associations of genetic distance and transgressive segregants, heterosis and genetic variance
Lee et al. (1989). <i>Crop Sci.</i> 29: 1067-1071	RFLP	<i>Zea mays</i>	Significant correlation of genetic distance with grain yield and combining ability	
Smith and Smith (1989). <i>Maydica</i> 34: 151-161	Morphological /Isoenzymes	<i>Zea mays</i>		Lack of congruence of estimated kinship and non-accurate correlation between isoenzymes, pedigree and heterosis in estimating lineages relationship
Melchinger et al. (1990). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 80:488-496	RFLP	<i>Zea mays</i>	Positive but small correlations of genetic distance with F ₁ performance, specific combining ability (SCA) and heterosis for yield and yield components. Consistent association of clusters based on genetic distance and pedigree	
Smith et al. (1990). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 80: 833-840	Pedigree/RFLP	<i>Zea mays</i>	Higher correlation for RFLP similarity and heterosis and grain yield	
Dudley et al. (1991). <i>Crop Sci.</i> 31: 718-723	RFLP and isoenzymes	<i>Zea mays</i>	Congruence of clustering analysis based on genetic distances and pedigree	Estimates not always correlated with production and no relationship of genetic distance and hybrid yield was observed
Bernardo (1992). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 83: 628-634	RFLP	Simulation study	Positive relationship based on simulation data	
Boppenmaier et al. (1992). <i>Crop Sci.</i> 32: 895-902	RFLP	<i>Zea mays</i>	Consistent association of RFLP-genetic distance clustering with pedigree	Absence of significant correlation of F ₁ performance and genetic distance
Melchinger et al. (1992). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 84: 672-681	RFLP	<i>Zea mays</i>	Moderate, positive and significant correlation of genetic distance and F ₁ performance. Consensus of cluster analysis based on genetic distance and pedigree	
Cruz et al. (1994). <i>Rev. Ceres</i> 41: 183- 190	Mahalanobis distance/Morphological	<i>Zea mays</i>	Positive association divergence-heterosis for grain yield	

Reference	Genetic distance/Marker	Crop or species	Divergence-heterosis association	
			Favorable	Inconclusive/unfavorable
Gerdes and Tracy (1994). <i>Crop Sci.</i> 34: 26-33	Pedigree/RFLP	<i>Zea mays</i>	Positive correlations between pedigree and RFLP-distance clustering.	Morphological markers and isoenzymes clustering did not agreed with pedigree
Moser and Lee (1994). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 87: 947-956	Genealogical and multivariate distance/RFLP	<i>Avena sativa</i>	Positive association of RFLP genetic variance with genealogical distance	Heterosis and genetic variance prediction based on RFLP seemed not to be efficient
Zhang et al. (1994) <i>Theor. Appl. Genet.</i> 89: 185-192	RFLP and microsatellites	<i>Oryza sativa</i>	Marker high significant effects on yield on its component traits. Heterozygosity significantly correlated with performance and heterosis	
Ali et al. (1995). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 91: 118-121	Multivariate distance/Morphological	<i>Canola</i>	Positive and significant correlations	
Bar-Hen et al. (1995). <i>Euphytica</i> 84: 145-154	Isoenzymes	<i>Zea mays</i>	Positive relationship although dependent on genotype	
Martin et al. (1995). <i>Crop Sci.</i> 35: 104-108	Kinship coefficient/STS-PCR	<i>Triticum</i>	Hybrid performance correlations with genetic distance and complement of the kinship, showing similar magnitude and direction	Estimates did not predicted hybrid performance
Diers et al. (1996). <i>Crop Sci.</i> 36: 79-83	RFLP	<i>Brassica napus</i>	Genetic distance and hybrid yield correlation	Estimates were not consistent in indicating the best crossings
Dubreuil et al. (1996). <i>Crop Sci.</i> 36: 790-799	Pedigree/RFLP	<i>Zea mays</i>	Significant correlation between pedigree and genetic distance	
Baril et al. (1997). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 94: 796-803	RAPD	<i>Eucalyptus</i>	Positive association of genetic distance and inter-specific hybrid performance	
Cerna et al. (1997). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 95: 460-467	RFLP and isoenzymes	<i>Glycine max</i>		Non-significant relationship
Dias and Kageyama (1997). <i>Braz. J. Genet.</i> 20: 63-70	Mahalanobis distance/yield components	<i>Theobroma cacao</i>	Positive relationship between parental distance and yield components in their hybrids	
Helms et al. (1997). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 94: 20-26	RAPD	<i>Glycine max</i>		Lack of correlation of kinship coefficient and genetic variance with RAPD genetic distance

Reference	Genetic distance/Marker	Crop or species	Divergence-heterosis association	
			Favorable	Inconclusive/unfavorable
Kisha et al. (1997). <i>Crop Sci.</i> 37: 1317-1325	Genealogical distance/RFLP	<i>Glycine max</i>		Positive and negative genetic distance associations with genetic variance in different population groups
Lanza et al. (1997). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 94: 1023-1030	RAPD	<i>Zea mays</i>	Correlation of genetic distance and agronomic traits	
Manjarrez-Sandoval et al. (1997a). <i>Crop Sci.</i> 37: 698-703	Kinship coefficient/RFLP	<i>Glycine max</i>	Coefficient association with yield and correlation between coefficient and genetic similarity	
Manjarrez-Sandoval et al. (1997b). <i>Crop Sci.</i> 37: 1443-1452	Kinship coefficient/RFLP	<i>Zea mays</i>	Significant correlation between coefficient and genetic similarity in heterosis prediction	Limited correlation between estimates
Saghai Maroof et al. (1997). <i>Crop Sci.</i> 37: 145-150	RFLP and SSR	<i>Oryza sativa</i>	Significant genetic distance correlations with heterozygosity and hybrid performance	Estimates dependent on germplasm
Burkhamer et al. (1998). <i>Crop Sci.</i> 38: 243-248	Kinship coefficient/STS-PCR and AFLP	<i>Triticum</i>		Genetic distance estimates were not strong predictors for variance of traits
Charcosset et al. (1998). <i>Crop Sci.</i> 38: 38-44	Isoenzymes and RFLP	<i>Zea mays</i>	Efficient models on prediction of SCA and hybrid performance	
Chowdari et al. (1998). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 97: 163-169	RAPD and microsatellite	<i>Pennisetum glaucum</i>		Genetic distance and heterosis correlation mostly non-significant
Fabrizius et al. (1998). <i>Crop Sci.</i> 38:1108-1112	Kinship coefficient/morphological	<i>Triticum</i>		Lack of adequate explanation of F ₂ heterosis and genetic distance
Garcia et al. (1998). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 96: 878-885	Pedigree/RAPD and morphological	<i>Cucumis melo</i>	Relationship among distance matrixes based on RAPD, pedigree and morphological markers. Data suggesting suitable hybrid performance based on RAPD	
Perenzin et al. (1998). <i>Euphytica</i> 100: 273-279	Kinship coefficient/RFLP and RAPD	<i>Triticum</i>	Correlation between genetic diversity and hybrid performance	Weak correlation estimates

Reference	Genetic distance/Marker	Crop or species	Divergence-heterosis association	
			Favorable	Inconclusive/unfavorable
Tenkouano et al. (1998). <i>Euphytica</i> 102: 281-288	Microsatellite and pedigree	<i>Musa</i>		Hybrid performance non-related to similarity pedigree and microsatellite indexes
Bohn et al. (1999). <i>Crop Sci.</i> 39: 228-237	Kinship coefficient/AFLP, RFLP and SSR	<i>Triticum</i>	Significant genetic similarity and coancestry coefficient correlations	Non-significant genetic variance estimated on genetic similarity
Joyce et al. (1999). <i>Euphytica</i> 107: 159-165	RAPD	White clover		Genetic distance negatively related with heterosis
Kidwell et al. (1999). <i>Crop Sci.</i> 39: 223-227	RFLP	<i>Alfalfa</i>		Lack of consistent effects of markers on selection for yield
Sant et al. (1999). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 98: 1217-1225	RAPD and microsatellite	Chick-pea		Significant non-linear relationship
Pandini et al. (2001). <i>Crop Breed. Appl. Biotech.</i> 1: 229-244	Mahalanobis distance	<i>Glycine max</i>	Positive heterosis values for most evaluated traits, and parental mean and Mahalanobis distance predicting hybrid performance	
Parentoni et al. (2001). <i>Euphytica</i> 121: 197-208	RADP	<i>Zea mays</i>	Phylogeny obtained with RAPD agreed with pedigree data. Weak, positive and significant correlation between RAPD genetic distance and yield SCA	
Know et al. (2002a). <i>Plant Breed.</i> 121: 487-492	Pedigree/RAPD and SSR	<i>Oryza sativa</i>	Genetic distance clustering agreeing with pedigree data	Non-significant genetic distance and F ₁ performance correlations, with some exceptions. No correlation with heterosis, besides hybrid performance prediction dependent on germoplasm
Know et al. (2002b). <i>Euphytica</i> 128: 389-396	AFLP	<i>Oryza sativa</i>		Non-significant distance correlation, with few exceptions. No correlation of genetic distance with heterosis was observed
Barbosa et al. (2003). <i>Euphytica</i> 130: 87-99	SSR and AFLP	<i>Zea mays</i>	Cluster analysis according to assignment for heterotic groups and significant genetic distance correlation with yield	

Reference	Genetic distance/Marker	Crop or species	Divergence-heterosis association	
			Favorable	Inconclusive/unfavorable
Dias et al. (2003). <i>Braz. Arch. Biol. Tech.</i> 46: 339-347	Yield components/RAPD	<i>Theobroma cacao</i>	Positive association divergence-heterosis for both yield components and RAPD markers	
Jordan et al. (2003). <i>Theor. Appl. Genet.</i> 106: 559-567, 2003	RFLP	<i>Sorghum bicolor</i>	Significant correlation of genetic distance and yield, although weak for identifying superior hybrids	

CAPÍTULO 5

OPTIMUM NUMBER OF RAPD MARKERS TO ESTIMATE GENETIC
DIVERSITY IN *Eucalyptus grandis* AND *E. urophylla*

Resumo

Um total de 501 marcadores RAPD foi gerado para uma população de 84 genótipos de *Eucalyptus*, dos quais 89,8% foram polimórficos e 10,2% foram monomórficos. Agrupamentos coerentes baseados nas estimativas de distância genética foram obtidos para as espécies. Análises de re-amostragem baseadas no número de marcadores mostraram um número maior que 393 marcadores RAPD resultaram em valores de estresse menores que 5%, menores que 5 para soma de quadrados e maiores que 95% para correlação. A diversidade estimada com base no índice de Shannon foi de 95-96% para *E. urophylla* e 85-88% para *E. grandis*. Considerando esta população, a distância genética média para cada espécie foi estatisticamente diferente em nível de 1% de probabilidade.

Palavras-chave: Algoritmo de Tocher, coeficiente de variação, estresse, RAPD, diversidade genética.

Abstract

A total of 501 RAPD markers were generated for a population consisting of 84 eucalypt genotypes, of which 89.8% were polymorphic and 10.2% were monomorphic. Coherent genotype clustering based on the estimated genetic distances was observed for species. Bootstrap analyses based on the number of RAPD markers revealed 393 or more markers provided values below 5% for stress, lower than 5 for sum of squares, and higher than 95% for correlation statistics. The estimated diversity based on the Shannon index amounted to about 95-96% for *E. urophylla* and 85-88% for *E. grandis*. Considering this population, the average genetic distance for each species was statistically different at 1% probability.

Key words: Tocher algorithm, coefficient of variation, stress, RAPD, genetic diversity.

Introduction

Eucalyptus is an important genus of Myrtaceae used for pulp and paper, charcoal manufacturing, wood, and essential oil extraction. According to FAO (2003), pulp for paper represented imports of over 17 billion dollars worldwide. On this market, *Eucalyptus* is one of the most important genera for cellulose and paper industries, besides owing good adaptability and standing at the beginning of its domestication. These aspects awaken the interest for a better yield, product quality, and disease and stress resistance.

In this context, knowledge on the genetic diversity in a species is important for breeding programs and genetic conservation studies. Breeders have proposed several parameters for estimating genetic relationships among species lineages in which coefficients are based on pedigree, multivariate quantitative trait, and molecular analysis (Moser and Lee 1994). Molecular markers such as isozymes, RAPD, RFLP, AFLP, and SSR have greatly contributed to germplasm characterization, taxonomic relationships, marker-assisted selection, hybrid performance prediction, genetic distance estimation, mapping and diversity management (Kumar 1999, Joshi et al. 1999, Kwon et al. 2002, Barbosa et al. 2003).

Since they were first reported (Williams et al. 1990), RAPDs have been used in studies involving several species (Dias et al. 2004). They produce considerable polymorphism besides being faster and less expensive than other molecular markers (Skabo et al. 1998). Further advantages are the uncomplicated protocols, lower amount of required DNA, and a wide genome cover. For *Eucalyptus* sp., they have been successfully used for several purposes (Keil and Griffin 1994, Nesbitt et al. 1995, Gaiotto et al. 1997, Skabo et al. 1998, Junghans et al. 2003). However, there is a wide variation in the number of markers used, from as few as 23 (Gaiotto et al. 1997) to as many as 415 (Baril et al. 1997).

Thus, the present work aimed to evaluate the importance of the number of RAPD markers on the genetic distance estimates and genetic diversity in an eucalypt population.

Materials and methods

Plant material, DNA extraction, and RAPD reactions

Leaf samples of *E. grandis* and *E. urophylla* from 84 different genotypes from a CENIBRA S/A breeding program were collected and stored at -80 °C. DNA was extracted from these samples according to Ferreira and Grattapaglia (1995), diluted to 3 ng μL^{-1} , and stored at -20 °C until used for the RAPD reactions. RAPD reactions were conducted as described by Ferreira and Grattapaglia (1995) with Operon primers (Operon Technologies Inc), namely OPA 2, OPA 3, OPA 4, OPA 5, OPB 1, OPB 2, OPB 5, OPB 6, OPB 7, OPB 8, OPB 9, OPB 10, OPB 11, OPB 12, OPB 13, OPB 14, OPB 15, OPB 16, OPB 17, OPB 18, OPC 1, OPC 2, OPC 5, OPC 9, OPD 6, OPD 7, OPD 8, OPD 9, OPE 1, OPE 2, OPE 3, OPE 4, OPF 1, OPF 2, OPF 3, OPF 5, OPF 9, OPG 3, OPG 4, OPG 5, OPG 7, OPH 1, OPH 2, OPH 4, OPH 6, OPJ 12, OPJ 13, OPJ 14, OPJ 16, OPJ 18, OPJ 19, OPX 1, OPX 2, OPX 3, OPX 4, OPX 5, OPX 6, OPX 7, OPX 9, OPX 15, OPAC 8, OPAE 9, and OPAN 19. Each reaction contained 13 μl , 0.4 mM primer, 20 ng DNA, 100 μM of each dGTP, dATP, dCTP, dTTP, and 1 Taq DNA polymerase unit. The reactions were poured into 96 wells polycarbonate plates and cycled in a PTC-100 Thermocycler (MJ Research Inc.). Electrophoresis was carried out in agarose gel 1.5% in half concentrated TBE buffer containing 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ ethidium bromide. The images were captured by the Eagle Eye Stratagene system and saved in JPG format for visual analysis.

Genetic distance estimation

After electrophoresis, the RAPD profiles were scored visually for the presence or absence of bands. Based on these profiles, the distance matrix using the estimates of the arithmetic complement for the Nei and Li index was obtained using the Genes software (Cruz 2001). The population considered in all analyses was defined by one sub-population of 44 *E. urophylla* genotypes and one of 40 *E. grandis* genotypes, which came from 14 and the latter from 10 provenances, respectively.

Genetic distances were estimated for all genotypes and for one sample of ten genotypes, the former five from each species, respectively. In this analysis,

the total number of markers or only the polymorphic markers for both sub-populations were used to estimate the genetic distances and further tested by the *t*-test at 1% probability using Gqmol software (Cruz 2003).

Effect of the number of markers on the estimated genetic distance

For the 84 genotypes, two hundred sets of 10 to 500 markers were randomly selected from the total 501 RAPD markers. In this bootstrap analysis, the selected markers were always returned to the pool of markers, so that they could be picked up in the next sample. The genetic distances for all 84 genotypes were calculated per set of markers. Subsequently, the correlation (C), stress (S), and sum of squares (SS) of these estimated distances, in relation to the real genetic distances, were calculated for each of the 200 samples in each set of number of markers using Gqmol software. There was generated a total of 98,000 distance matrixes for each C, S and SS. In all cases, the real genetic distance was considered to be the distance based on the estimative using the 501 RAPD markers for each genotype.

Clustering and genetic diversity estimation

A dendrogram based on the unweighted pair-group method using an arithmetic average (UPGMA) was obtained with Treecon software (van de Peer 1997). Tocher clustering algorithm was performed with Gqmol software. Graphical dispersion analyses of the coordinates plotting was performed based on the generated distance matrix in order to search for dispersion and grouping patterns considering species, as proposed by Cruz and Viana (1994).

The genetic diversity was calculated considering the total number of markers, the polymorphic markers for the entire population, and only the markers that were polymorphic for both sub-populations (Table 1). Five indexes of variation (IV) were employed. Index (IV₁) corresponds to the total of polymorphic bands in the sub-population divided by the total of bands in the *E. urophylla* and *E. grandis* sub-populations, while (IV₂) was calculated dividing the total of polymorphic bands in the sub-populations by the total of bands in the whole population. Index (IV₃) was obtained with the quotient of the total of polymorphic bands in the sub-populations and the total of polymorphic bands in

the whole population, and (IV_4) was calculated dividing the number of markers with frequency differences superior to 50% or absent in one of the populations by the total of bands in the population. Finally, the Shannon index (Lewontin 1972) and the percentage of the total diversity estimated based on this index were also considered for the sub- and the entire population.

Results and discussion

RAPD profiles resulted in 501 bands (DNA amplified fragments), from which 450 were polymorphic and 51 monomorphic considering both *Eucalyptus* sub-populations (Table 1). One of these bands was exclusive to *E. grandis* and other nine were restricted to *E. urophylla*. When sub-populations were considered individually, 70 and 92 monomorphic bands were observed for *E. urophylla* and *E. grandis*, respectively. Additionally, 163 markers displayed a difference of at least 50% for the allele frequency between species or were absent in one of them.

Successful eucalypt specie and genotype distinction based on RAPD data was observed in the dendrogram and the graph dispersion (Figures 1 and 2) in agreement with Keil and Griffin (1994) who had already reported successful eucalypt genotype characterization using RAPDs. It is worth noting that, besides being a simple and rapid technique and providing good polymorphism levels and genome cover, RAPDs are dominant markers and present repeatability difficulties, consequently displaying lower information content compared to other markers. For example, co-dominant markers such as microsatellites provide better individual discrimination, reliability, and a high polymorphism level (Ferreira and Grattapaglia 1995, Glaubitz et al. 2001, Jones et al. 2002), although their development has the disadvantage of being more time and cost-demanding.

Despite the comparison of results from different studies may be difficult because of the type of markers (Powell et al. 1996, Crouch et al. 1999), the technical protocol (Breyne et al. 1999), and the calculated indexes used (Bussell et al. 1999), moderate (Sun et al. 2001, Ipek et al. 2003) and high correlations (Patzak 2001, Raina et al. 2001, Renganayaki et al. 2001, Simioniuc et al. 2002) were observed for the divergence/similarity matrices based on RAPD and other

molecular markers. Additionally, RAPD is still more frequently used compared to other markers in studies involving several species (Dias et al. 2004).

In this context, it was hypothesized that the number of sampled genotypes could influence genetic distance estimates. Table 2 shows that, regardless of the RAPD markers' polymorphism, the *E. urophylla* sub-population had a significantly different mean genetic distance from *E. grandis* in an 84-genotype population. However, when the sample size was reduced to 10 genotypes (5 *E. grandis* and 5 *E. urophylla*) the genetic distance was no longer significant between the sub-populations by the t-test at 1% probability. It must be considered that, due to sampling, this result may be valid only for these genotypes in particular. Nevertheless, a lack of correlation was observed between the population size and genetic variability in certain eucalypt species (Rosseto et al. 1999).

The effect of the number of markers was also investigated based on the bootstrap analysis of RAPD band random samples. The analysis of the estimated genetic distances showed that less than 10, 5, and 1% for stress statistics were obtained, respectively, with 71, 338, and 472 bands, considering all 200 samples for each number of markers (Figure 3A). Similarly, correlations of 0.90 and 0.95 were detected with 317 and 393 markers (Figure 3B), respectively, while sum of squares values below 10 were observed for 183 and below 5 for 368 markers (Figure 3C). Interestingly, an analogous number of markers was established in other approaches using a variation coefficient of 5% (Tivang et al. 1994, Fanizza et al. 1999).

The average of 160 RAPD markers used in genetic distance estimation studies (Dias et al. 2004) together with the present results suggest an adjustment in the number of markers used in order to obtain more accurate and affordable estimates. It is also observed that a number between 350 and 400 markers would provide sound genetic distance estimates, even when considering different species and markers. Nevertheless, other features may also affect this aspect, such as the level of primer polymorphism. Fanizza et al. (1999) found a correlation of 0.89 and 0.90 with 462 and 470 bands with primers with more than

6 and less than 5 bands per primer, respectively. Otherwise, the correlation declined with a higher or lower level of polymorphism, although this result might be associated with the number of markers used as well.

Fanizza et al. (1999) argued that identical profiles did not add further information to the variety discrimination and that their inclusion might affect the computation of the genetic distances. Although reasoning that only polymorphic bands will not alter dendrograms and grouping (data not shown), the use of monomorphic bands would provide more accurate genetic distance estimates. The importance of this observation is noticed as estimated genetic distances are used for hybrid performance prediction, supported by reports of possible non-linear relation between divergence/heterosis (Fabrizius et al. 1998, Sant et al. 1999).

Considering that 393 RAPD markers lead to stress statistics of less than 5%, and good values of sum of squares and correlation, this amount was used for Tocher grouping, which displayed consistent clustering with the dendrogram and where *E. urophylla* and *E. grandis* species were separated (Figure 1, Table 3). According to this analysis, 12 to 21 groups were detected, where two major groups containing *E. urophylla* or *E. grandis* genotypes were formed in agreement with the original grouping based on the genetic distances estimated with 501 RADP markers. The other groups comprised a smaller number of individuals, mostly composed of one genotype, but always respecting the species assortment. Though rearrangements were observed even in the Tocher grouping consisting of 12 sets, they were coherent with the species grouping of 12 clusters obtained from the original distances (Table 3). This had been expected since similarity assessment does not obligatorily correspond to morphological resemblance, given that genetic distance based on RAPD is a relative measure and an approach where geographically distant individuals may display similar estimates (Sale et al. 1996, Skabo et al. 1998, Rossetto et al. 1999).

Assuming that marker frequency and polymorphism in the sub-populations and in the entire population enclose information on genetic population diversity, some indexes were used to evaluate *E. grandis* and *E.*

urophylla diversity. It is observed that although similar to *E. grandis*, *E. urophylla* displayed higher diversity values (Table 1). Diversity indexes (IV_1), (IV_2), (IV_3), and (IV_4) increased as the monomorphic bands were discarded for the whole population and subsequently the sub-populations. This may represent some inconvenience, as monomorphic bands are not always considered in this approach. This may be circumvented with the Shannon index, which in spite of decreasing with the same approach remained almost unaltered in its relative proportion of the estimated diversity within the sub-populations. In addition to the number of markers, the Shannon index considered the allele frequency, and when the entire population was used as reference, the sub-population proportion of diversity was less affected compared to the other indexes.

On the other hand, (IV_4) diversity index (Table 1) indicated that there are markers either restricted to one sub-population or with a great frequency difference between each other. Similar information was found for the subspecies *E. globulus*, where 63.8% of the scored RAPD bands differed significantly in frequency between sub-species cores and sites (Nesbitt et al. 1995).

The present results highlight the importance of the number of markers and its polymorphism for saving time and resources in studies involving genetic distance estimates. This is especially true since this approach is based on experimental data of highly polymorphic species such as eucalypt, besides reinforcing the usefulness of RAPD markers for eucalypt breeding programs.

Acknowledgments

The authors wish to thank Cenibra S/A for supporting this research conducted at the Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno/BIOAGRO/UFV and for the financial support.

Table 1 - Number of polymorphic and monomorphic RAPD bands and diversity indexes, (IV₁) to (IV₄) and Shannon index, considering monomorphic and polymorphic bands, polymorphic markers considering the entire *Eucalyptus* population, and polymorphic markers considering both *Eucalyptus* sub-populations

Total of RAPD markers (polymorphic and monomorphic)											
	Number of Genotypes	Monomorphic bands	Polymorphic bands	Allele frequency differing loci*	Total	(IV ₁)	(IV ₂)	(IV ₃)	(IV ₄)	Shannon Index	Diversity percentage of Shannon index
<i>E. urophylla</i>	44	70	430	-	500	86.0	85.8	95.6	-	100.12	96
<i>E. grandis</i>	40	92	400	-	492	81.3	79.8	88.9	-	88.73	85
Total pop.	84	51	450	163	501	-	89.8	-	32.5	104.52	
Polymorphic markers considering the entire <i>Eucalyptus</i> population											
	Number of Genotypes	Monomorphic bands	Polymorphic bands	Allele frequency differing loci	Total	(IV ₁)	(IV ₂)	(IV ₃)	(IV ₄)	Shannon Index	Diversity percentage of Shannon index
<i>E. urophylla</i>	44	19	430	-	449	95.8	95.6	95.6	-	100.12	96
<i>E. grandis</i>	40	41	400	-	441	90.7	88.9	88.9	-	88.73	85
Total pop.	84	0	450	163	450	-	100.0	-	36.2	104.52	
Polymorphic markers considering both <i>Eucalyptus</i> sub-populations											
	Number of Genotypes	Monomorphic bands	Polymorphic bands	Allele frequency differing loci	Total	(IV ₁)	(IV ₂)	(IV ₃)	(IV ₄)	Shannon Index	Diversity percentage of Shannon index
<i>E. urophylla</i>	44	0	380	-	380	100	100	100	-	91.97	95
<i>E. grandis</i>	40	0	380	-	380	100	100	100	-	85.54	88
Total pop.	84	0	380	143	380	-	100	-	37.6	96.85	

* loci that presented over 50% variation considering in the relationship of the allele frequencies of *Eucalyptus* populations ($F_{E. urophylla}/F_{E. grandis}$), or absent in one of the populations.

Table 2 - Average genetic distance of *E. grandis* and *E. urophylla* sub-populations

	84-genotype population		10-genotype population	
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>
(1) Polymorphic and monomorphic markers	22.57a	19.18b	20.37a	19.57a
(2) Only polymorphic markers	30.96a	27.96b	24.29a	23.76a

Considering the total 501 polymorphic and monomorphic RAPD markers (1), and the markers that were polymorphic for the sub-populations only (2). Numbers followed by the same letter in the same line and population do not differ statistically by the t-test at the 1% probability level

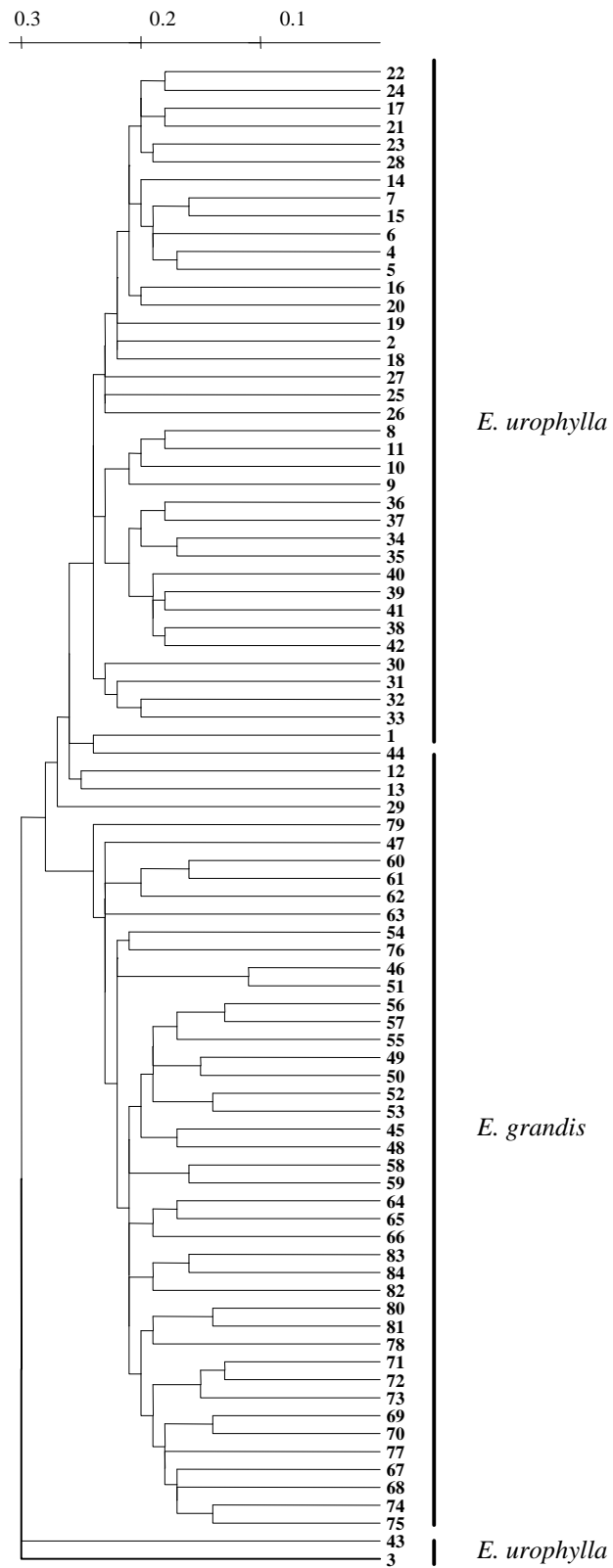


Figure 1 - UPGMA dendrogram of 84 *E. grandis* and *E. urophylla* genotypes with genetic distances estimated by the arithmetic complement of Nei and Li index

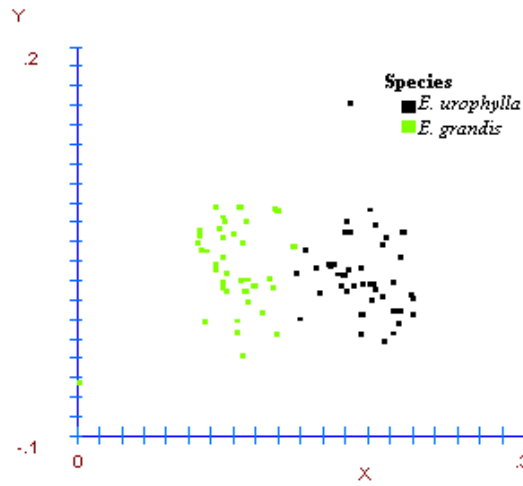


Figure 2 - Coordinate plotting associated with the estimated RAPD genetic distances according to *E. urophylla* and *E. grandis* genotypes. X and Y correspond to the coordinates. Correlation between original and estimated distances = 0.5984, and distortion = 64.7%

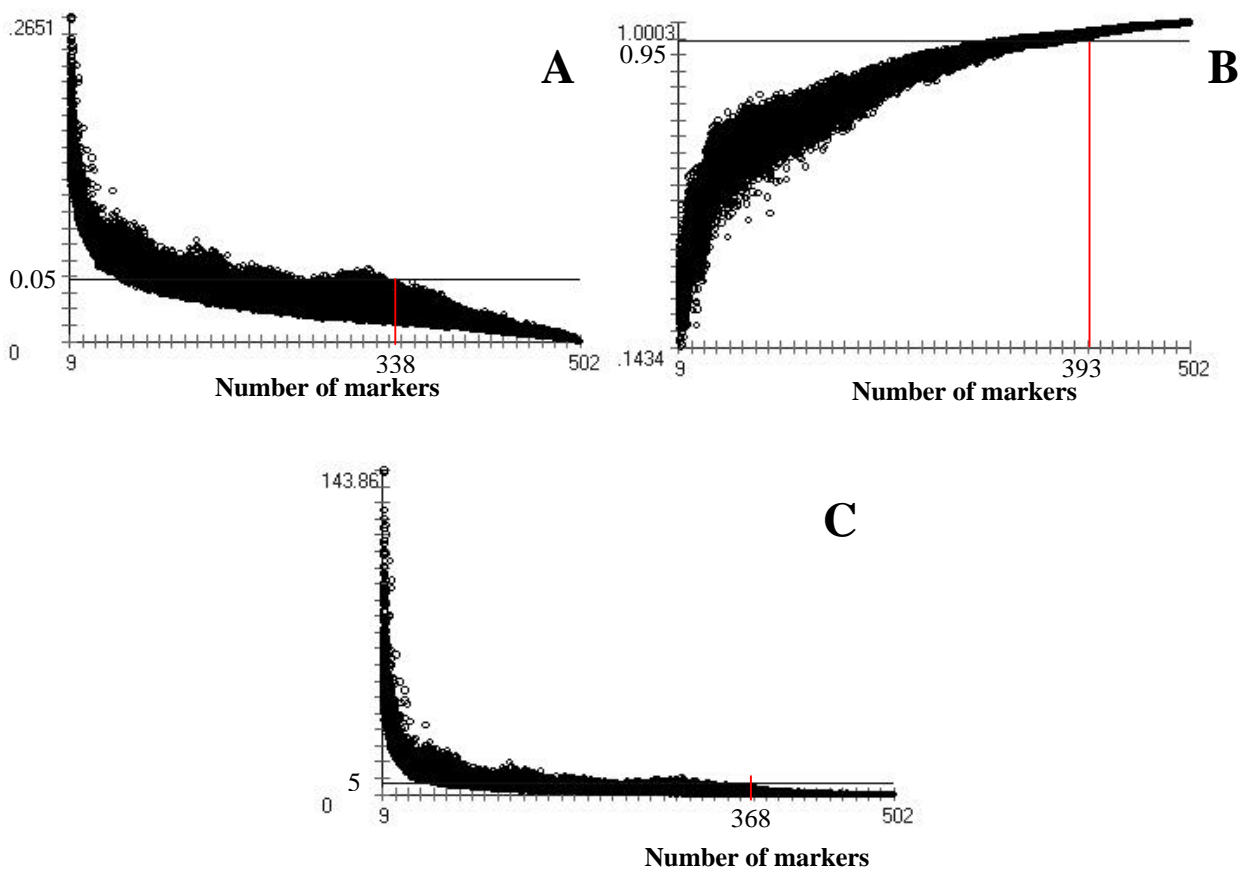


Figure 3 - Bootstrap analysis. Plot of all of the 200 bootstrap analyses evaluating the effect of the number of markers on the genetic distance matrices for **A**: stress statistical; **B**: correlation and **C**: sum of squares.

Table 3 - Tocher grouping based on genetic distances estimated from RAPD markers randomly chosen. **A**: Original Tocher grouping based on 501 RAPD markers, **B** thru **H**: Tocher groupings based on 393 randomly chosen RAPD markers and presenting equal number of groups.

group	genotypes	A
<1>	46 51 76 75 74 55 50 57 56 53 68 67 69 70 77 48 45 71 49 84 80 59 58 60 78 64 66 65 72 73 83 61 81 63 52 62 82 54 47 79	
<2>	36 37 35 42 39 38 41 40 34 21 33 8 9 11 15 24 7 17 23 22 5 14 4 20 10 28 6 19	
<3>	1 44	
<4>	2 3	
<5>	25 26 27 16	
<6>	31 32	
<7>	30	
<8>	18	
<9>	43	
<10>	29	
<11>	13	
<12>	12	

group	genotypes	B
<1>	46 51 76 75 74 77 67 68 69 55 56 53 57 70 50 49 45 48 52 71 84 59 60 80 78 61 58 72 64 81 65 66 73 83 54 82 62 63 47 79	
<2>	36 37 35 42 39 38 40 41 9 21 17 8 34 11 24 15 22 23 5 7 20 33 31 6 14 16 28	
<3>	2 4 1 3	
<4>	12 19 25	
<5>	26 32 30	
<6>	27	
<7>	29	
<8>	18	
<9>	13	
<10>	10	
<11>	44	
<12>	43	

group	genotypes	C
<1>	46 51 76 75 77 74 67 53 55 50 49 57 56 68 69 59 84 70 60 80 71 48 81 52 61 72 64 65 78 73 83 66 58 45 63 54 82 62 47 79	
<2>	36 37 35 42 39 38 40 41 9 21 8 11 17 15 24 22 7 5 35 23 6 10 28 20 14 3 19 16 4 2 44 26 32 30	
<3>	31 43	
<4>	34	
<5>	18	
<6>	1	
<7>	27	
<8>	12	
<9>	25	
<10>	13	
<11>	29	
<12>	12	

group	genotypes	D
<1>	46 51 76 75 74 55 67 77 53 56 57 68 69 70 49 50 71 48 52 45 60 61 64 80 59 84 73 72 78 65 81 66 83 58 82 63 62 47 54 79	
<2>	36 37 35 42 39 17 41 21 38 9 40 8 11 24 15 7 23 22 34 33 31 5 14 16 20 10	
<3>	2 4 1 6 44 28	
<4>	12 19	
<5>	26 32	
<6>	27 29	
<7>	30	
<8>	25	
<9>	3	
<10>	18	
<11>	13	
<12>	43	

group	genotypes	E
<1>	46 51 76 75 74 77 55 56 57 68 53 52 50 49 69 70 67 48 71 84 60 61 64 59 80 78 81 66 58 73 72 65 45 82 83 63 62 47 54 79	
<2>	36 37 35 42 39 38 34 40 41 21 8 9 11 17 7 15 24 22 33 23 5 20 31 19 6 4 14 16 28	
<3>	2 3	
<4>	1 44 27	
<5>	26 32	
<6>	12 25	
<7>	10	
<8>	13	
<9>	18	
<10>	29	
<11>	30	
<12>	43	

group	genotypes	F
<1>	46 51 76 75 74 55 50 53 69 56 57 49 68 67 70 84 59 48 45 77 52 80 71 60 61 58 81 72 73 64 66 83 82 78 65 63 47 62 54 79	
<2>	36 37 35 42 39 40 38 34 41 8 11 9 21 17 24 15 33 7 5 22 23 31 16 6 14 10 20 28 19 2	
<3>	1 4 44	
<4>	26 32 30	
<5>	25	
<6>	27	
<7>	18	
<8>	29	
<9>	3	
<10>	13	
<11>	43	
<12>	12	

group	genotypes	G
<1>	46 51 76 75 74 77 55 69 53 50 49 56 57 70 68 67 84 71 52 48 45 60 61 80 59 66 64 78 72 73 65 81 83 58 54 82 62 63 47	
<2>	36 37 35 42 39 38 40 34 41 21 9 8 11 17 24 15 33 22 7 23 20 5 6 16 14 19 28 10	
<3>	2 4 1 44	
<4>	26 32	
<5>	31 43	
<6>	12 25	
<7>	27 29	
<8>	30	
<9>	3	
<10>	18	
<11>	13	
<12>	79	

group	genotypes	H
<1>	46 51 76 75 77 74 55 56 68 69 57 70 53 67 50 49 84 48 71 52 60 59 45 80 58 61 78 72 64 66 73 83 65 62 81 63 54 47 82 79	
<2>	36 37 35 42 39 40 38 41 17 21 9 15 24 33 8 11 7 22 5 23 20 4 10 28 6 14 16 19 1 2 3	
<3>	26 32	
<4>	27 44	
<5>	31 43	
<6>	34	
<7>	18	
<8>	30	
<9>	25	
<10>	13	
<11>	12	
<12>	29	

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos nos permitem obter as seguintes conclusões:

- a bactéria presente nos tecidos do genótipo híbrido de *Eucalyptus grandis* vs. *E. smithii* foi identificada como *Herbaspirillum huttiense* (Leifson) Ding e Yokota;
- os antibióticos amicacina, cefotaxima, estreptomicina, gentamicina, canamicina, netilmicina, nitrofurantoina, penicilina, sulfazotrina, sulfadiazina, sulfonamida e tobramicina formaram halos de inibição nos testes qualitativos,
- os antibióticos estreptomicina, canamicina e sulfadiazina tiveram efeito bacteriostático sobre *H. huttiense*;
- carbenicilina e timentin favoreceram a calogênese em explantes cotiledonares e de hipocótilo de *E. grandis* em concentrações de até 600 mg L⁻¹;
- cefotaxima favoreceu a calogênese em explantes cotiledonares e de hipocótilo de *E. grandis* em concentrações de até 300 mg L⁻¹, a partir da qual aumentou-se a frequência de necrose dos explantes;
- BSAA, AIA, AIB, ANA e 2,4-D aumentaram, enquanto TDZ, ZEA, BAP e KIN inibiram a rizogênese adventícia quando os explantes foram submetidos a tratamentos de pulsos de 100 mg L⁻¹ por 24 horas;

- o alongamento do epicótilo e média de número de raízes foram reduzidos, enquanto a necrose dos explantes de *E. grandis* aumentou, com o aumento do tempo de exposição e da concentração de 2,4-D;
- as distâncias genéticas estimadas com base em marcadores RAPD foram eficientes na separação das espécies de *E. grandis* e *E. urophylla*;
- nas estimativas de distância genética de *Eucalyptus* com base em marcadores RAPD, um número igual ou superior a 393 marcas deve ser utilizado de acordo com as estatísticas de estresse, correlação e soma de quadrados;
- a sub-população de *E. urophylla* foi mais divergente que a de *E. grandis*;
- a diversidade genética estimada pelo índice de Shannon foi a menos alterada quando os marcadores monomórficos foram considerados nas análises.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGENTON, P. E.; GONZÁLEZ, E. R.; LABATE, M. T. V.; LABATE, C. A. Seleção de clones de *Eucalyptus grandis* que apresentam alta taxa de regeneração. In: 48º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP. Anais. Águas de Lindóia, Sociedade Brasileira de Genética, 17 a 20/09/2002, CD-rom.
- ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. Inf. Agropec., 18: 32-51, 1996.
- ASSIS, T. F. Production and use of *Eucalyptus* hybrids for industrial purposes. In: DUNGEY, H. S.; DIETERS, M. J.; NIKLES, D. G. (eds.) Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees. Proceedings of QFRI/CRF Symposium, 9-14 de abril, Queensland, Australia, Department of Primary Industries, Brisbane, pp. 63-74, 2000.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Eds.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. I, p. 261-296.
- BADYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSSEN, G.; HAMILL, J. D. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species – *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. Plant Sci., 140: 189-198, 1999.
- BAENZIGER, P. S.; PETERSON, C. J. Genetic variation: its origin and use for breeding self-pollinated species. In: Plant breeding in the 1990s. Proceedings of the symposium on plant breeding in the 1990s (STALKER, H.T. and MURPHY, J.P., eds.). CAB International, Raleigh, pp. 69-100, 1992.

- BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Inter. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 802-810, 1996.
- BARBOSA, A. M. M.; GERALDI, I. O.; BENCHIMOL, L. L.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA Jr, C. L.; SOUZA, A. P. Relationship of intra- and interpopulation tropical maize single cross hybrid performance and genetic distances computed from AFLP and SSR markers. *Euphytica*, 130: 87-99, 2003.
- BARIL, C. P.; VERHAEGEN, D.; VIGNERON, P.; BOUVET, J. M.; KREMER, A. Structure of the specific combining ability between two species of *Eucalyptus*. I. RAPD data. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 796-803, 1997.
- BARRET, C.; CASSELLS, A. C. An evaluation of antibiotics for elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *Pelargonii* (Brown) from *Pelargonium x domesticum* cv. 'Grand Slam' explants *in vitro*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 36: 169-175, 1994.
- BERNARDO, R. Relationship between single-cross performance and molecular marker heterozygosity. *Theor. Appl. Genet.*, 83: 628-634, 1992.
- BOHN, M.; UTYZ, H. F.; MELCHINGER, A. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSR and their use for predicting progeny variance. *Crop Sci.*, 39: 228-237, 1999.
- BOPPENMAIER, J.; MELCHINGER, A. E.; BRUNKLAUS-JUNG, E.; GEIGER, H. H.; HERRMANN, R. G. Genetic diversity for RFLPs in European maize inbreds: I. Relation to performance of Flint x Dent crosses for forage traits. *Crop Sci.*, 32: 895-902, 1992.
- BREYNE, P.; ROUMBAUT, D.; van GYSEL, A.; van MONTAGU, M.; GERATS, T. AFLP analysis of genetic diversity within and between *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Mol. Gen. Genet.*, 261: 627-634, 1999.
- BUCKLEY, M.; DEWILD, T. N.; REED, B. M. Characterization and identification of bacteria isolated from micropropagated mint plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 31: 58-64, 1995.
- BUSSELL J. D (1999) The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Mol. Ecol.*, 8: 775-789.

- CAMPINHOS, E. N.; GRATTAPAGLIA, D.; ALFENAS, A. C.; BERTOLUCCI, F. L. Stability of expression of QTL alleles controlling growth across variable genetic backgrounds in *Eucalyptus*. IUFRO Conference (Biotechnology Applied To Genetic Improvement of Trees Species), Salvador, v. 2, p. 186-191, 1997.
- CAO, X.; HAMMERSCHLAG, F. A.; DOUGLASS, L. A two-step pretreatment significantly enhances shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry cv. Bruecrop. HortSci., 37: 819-821, 2002.
- CHARCOSSET, A.; LEFORT-BUSON, M., GALLAIS, A. Relationship between heterosis and heterozygosity at marker loci, a theoretical computation. Theor. Appl. Genet., 81: 571-575, 1991.
- CID, L. P. B.; MACHADO, A. C. M. G.; CARVALHEIRA, S. B. R. C.; BRASILEIRO, A. C. M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 56: 17-23, 1999.
- CONNER, P. J.; WOOD, B. W. Identification of pecan cultivars and their genetic relatedness as determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. J. Amer. Horticult. Sci., 126: 474-480, 2001.
- COSTA, M. G. C.; NOGUEIRA, F. T. S.; FIGUEIRA, M. L.; OTONI, W. C., BROMMONSCHENKEL, S. H.; CECON, P. R. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. Plant Cell Rep., 3: 327-332, 2000.
- CROUCH, J. H.; CROUCH, H. K.; CONSTANDT, H. Comparison of PCR-based molecular analyses of *Musa* breeding populations. Mol. Breed., 5: 233-244, 1999.
- CRUZ, C. D. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Editora UFV, Viçosa, 648p., 2001.
- CRUZ, C. D. Programa Gqmol. <http://www.ufv.br/dbg.gqmol/gqmol.htm>, 2003.
- CRUZ, C. D.; VIANA, J. M. S. A methodology of genetic divergence analysis based on sample unit projection on two-dimensional space. Brazil. J. Genet., 17: 69-73, 1994.
- CRUZ, L. M.; SOUZA, E., M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). Appl. Environ. Microbiol., 67: 2375-2379, 2001.

- D'ONOFRIO, C.; MORINI, S. Simultaneous regeneration of different morphogenic structures from quince leaves as affected by growth regulator combination and treatment length. *Biol. Plantarum*, 47: 321-325, 2003/4.
- DELAPORTE, K. L.; COLLINS, G. C.; CONRAN J. G.; SEDGLEY M. Molecular analysis of an interspecific hybrid ornamental eucalypt for parental identification. *Euphytica*, 122: 165-170, 2001.
- DIAS, L. A. S., PICOLI, E. A. T., ROCHA, B. R., ALFENAS, A. C. A priori choice of hybrid parents in plants. *Gen. Mol. Biol.*, 3: 356-368, 2004.
- DIAS, L. A. S.; MARITA, J.; CRUZ, C. D.; BARROS, E. G.; SALOMÃO, T. M. F. Genetic distance and its association with heterosis in cacao. *Brazil. Arch. Biol. Technol.* 46: 339-347, 2003.
- DIAS, L. A. S.; RESENDE, M. D. V. Estratégias e métodos de seleção. In: DIAS, L. A. S., (ed.). *Melhoramento genético do cacauzeiro FUNAPE*, Viçosa, pp. 217-287, 2001.
- DIAS, L. L. C.; ALFENAS, A. C.; PICOLI, E. A. T.; YAMAZAKI, E.; OTONI, W. C.; LANI, E. G. Transformação genética de *Eucalyptus* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. In: 47º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP. Anais. Águas de Lindóia, Sociedade Brasileira de Genética, 2001, CD-rom, 2001.
- DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum hutiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 2223-2230, 2004.
- DURAND-CRESSWELL, R.; NITSCH, C. Factors influencing the regeneration of *Eucalyptus grandis* by organ culture. *Acta Horticult.*, 78: 149-155, 1977.
- D'UTRA VAZ, F. B.; SANTOS, A. V. P.; MANDERS, G.; COCKING, E. G.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener.). *Plant Cell Rep.*, 12: 220-225, 1993.
- ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:5285-5293, 2001.

- FABRIZIUS, M. A.; BUSCH, R. H.; KHAN, K.; HUCKLE, L. Genetic diversity and heterosis of spring wheat crosses. *Crop Sci.*, 38: 1108-1112, 1998.
- FALCONER, D. S. Introduction to quantitative genetics. 3 ed. Longman, London., 279p., 1989.
- FANIZZA, G.; COLONNA, G.; RESTA, P.; FERRARA, G. The effect of the RAPD markers on the evaluation of genotypic distances in *Vitis vinifera*. *Euphytica*, 107: 45-50, 1999.
- FAO – Forest Products [<http://apps1.fao.org/servlet/XteServlet.jrun?Areas+862&Items=1630&Element...>] FAO, 12/04/2003.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; ÖTVÖS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in plant cells: a review. *Biol. Bratislava*, 57: 5-12, 2002.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2nd ed., EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 220p., 1995.
- FETT-NETTO, A. G.; FETT, J. P.; GOULART, L. W. V.; PASQUALI, G.; TERMIGNONI, R. R.; FERREIRA, A. G. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiol.*, 21: 457-464, 2001.
- FROSSARD, R. A.; BAKER, P. K.; BOURNE, R. A. The organ culture of nodes of four species of *Eucalyptus*. *Acta Horticult.*, 78: 157-165, 1977.
- GAIOTTO, F. A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rates in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 842-849, 1997.
- GAMA, M. I. C. S.; LEITE Jr, R. P.; CORDEIRO, A. R.; CANTLIFFE, D. J. Transgenic sweet potato plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 46: 237-244, 1996.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. Plant propagation by tissue culture. Eversley Basingstoke. Exegetics Ltda, 527 p., 1984.
- GILL, R. L. S.; GILL, S. S. *In vitro* exudation of phenols in *Eucalyptus*. *Indian Forest.*, 120: 504-509, 1994.

- GLAUBITZ, J. C.; EMEBIRI, L. C.; MORAN, G. F. Dinucleotide microsatellite from *Eucalyptus sieberi*: inheritance, diversity, and improved scoring of single-base differences. *Genome* 44: 1041-1045, 2001.
- GLEDDIE, S.; KELLER, W. A.; SETTERFIELD, G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and cell suspension of *Solanum melongena* (eggplant). *Can. J. Bot.*, 61: 656-666, 1983.
- GONZÁLEZ, E. R.; ANDRADE, A.; BERTOLO, A. L.; LACERDA, G. C.; CORDEIRO, R. T.; DEFÁVARI, V. A. P.; LABATE, M. T. V.; LABATE, C. A. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. *Funct. Plant Biol.*, 29: 97-102, 2002.
- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; REIS, M. S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *Brazil. J. Plant. Physiol.*, 13(2): 117-128, 2001.
- HARCOURT, R. L.; KYOZUKA, J.; FLOYD, R. B.; BATEMAN, K. S.; TANAKA, H.; DECROOCQ, V.; LLEWELLYN, D. J.; ZHU, X.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. Insect- and herbicide-resistant transgenic eucalypts. *Mol. Breed.*, 6: 307-315, 2000.
- HENRY, R. J.; SHEPHERD, M. Molecular analysis of hybrids. In "Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees" Proceedings of QFRI/CRF-SPF Symposium, 9-14 April, 2000.
- HO, C. K.; CHANG, S. H.; TSAY, J. Y.; TSAI, C. J.; CHIANG, V. L.; CHEN, Z. Z. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. *Plant Cell Rep.*, 17: 675-680, 1998.
- HOLFORD, P.; NEWBURY, H. J. The effect of antibiotics and their breakdown products on the in vitro growth of *Antirrhinum majus*. *Plant Cell Rep.*, 11: 93-96, 1992.
- IBGE (2002) Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA [<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=1>] Banco de dados Agregados, 12/04/2002.
- IPEK, M.; IPEK, A.; SIMON, P. W. Comparison of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, 128: 246-252, 2003.

- JIMENÉZ, V. M.; BANGERTH, F. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Physiol. Plant.*, 111: 389-395, 2001.
- JONES, R. C.; STEANE, D. A.; POTTS, B. M.; VAILLANCOURT, R. E. Microsatellite and morphological analysis of *Eucalyptus globulus* populations. *Can. J. Forest. Res.*, 32: 59-66, 2002.
- JOSHI, S. P.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Molecular markers in plant genome analysis. *Cur. Sci.*, 77: 230-240, 1999.
- JUNGHANS, D. T.; ALFENAS, A. C.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; VALLE, L. A. C.; ODA, S.; MELLO, E. J. Fine genetic mapping of the rust (*Puccinia psidii*) resistance gene *Ppr1* in *Eucalyptus grandis*. *Theor. Appl. Genet.*, 108(1): 175-180, 2003.
- KADO, E. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopatol.*, 60: 969-976, 1970.
- KE, J.; KHAN, R.; JOHNSON, T.; SOMMERS, D. A.; DAS, A. High-efficiency gene transfer to recalcitrant plants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*, 20: 150-156, 2001.
- KEIL, M.; GRIFFIN, R. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 442-450, 1994.
- KEVERS, C.; JACQUES, P.; THONART, P.; GASPAR, T. *In vitro* root cultures of *Panax ginseng* and *P. quinquefolium*. *Plant Growth Regul.*, 27: 173-178, 1999.
- KEVERS, C.; LE GAL, N.; MONTEIRO, M.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. *Plant Growth Regul.*, 31: 209-214, 2000.
- KOEHLER, A. D. Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC e STS e de pulsos de 2,4-D. 2004. 72 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- KINTZIOS, S.; SERRETI, E.; BLUCHOS, P.; DROSSOPOULOS, J. B.; KITSAKI, C. K.; TSAKALIDIS, A. L. Growth regulator pretreatment improves somatic embryogenesis from leaves of squash (*Cucurbita pepo* L.) and melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Rep.*, 21: 1-8, 2002.

- KITAMIYA, E.; SUZUKI, S.; SANO, T.; NAGATA, T. Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. *Plant Cell Rep.*, 19: 551-557, 2000.
- KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: BACON, C. W.; WHITE Jr, J. F. *Microbial Endophytes*, New York, Marcel Dekker, Inc. p. 199-233, 2000.
- KUMAR, L. S. DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnol. Adv.*, 17: 143-182, 1999.
- KWON, S. J.; HA, W. G.; HWANG, H. G.; YANG, S. J.; CHOI, H. C.; MOON, H. P.; AHN, S. N. Relationship between heterosis and genetic divergence in 'Tongil'-type rice. *Plant Breed.*, 121: 487-492, 2002.
- LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated *Eucalyptus grandis*. *Plant Cell Rep.*, 13: 473-476, 1994.
- LANDSMANN, J.; GRASER, E.; MATZK, A. Elimination of agrobacteria from transgenic plants. (AMMANN, K.; JACOT, Y.; KJELLSSON, G., Eds.). *Methods for Risk Assessment of Transgenic Plants. III. Ecological risks and prospects of transgenic plants.* p. 63-67, 1999.
- LANGENS-GERRITS, M.; ALBERTS, M.; KLERK, G. J. Hot-water treatment tissue culture reduces initial contamination in *Lilium* and *Acer*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 52: 75-77, 1998.
- Le ROUX, J. J.; van STADEN, J. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* – a review. *Tree Physiol.*, 9: 435-477, 1991.
- LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WRIGHT, S. M.; WAITES, B.; CHEYNE, V. A.; WAITES, W. M. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Chosya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. *J. Appl. Bacteriol.*, 71: 307-330, 1991.
- LEIFERT, C.; WAITES, W. M. Bacterial growth in plant tissue culture media. *J. Appl. Bacteriol.*, 72: 460-466, 1992.
- LEIFERT, C.; WAITES, W. M.; NICHOLAS, J. R. J. Bacterial contaminants of micropropagated plants cultures. *J. Appl. Bacteriol.*, 67: 353-361, 1989.
- LEIFSON, E. The bacterial flora of distilled and stored water. III. New species of the genera *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Spirillum* and *Pseudomonas*. *Inter. Bull. Bacteriol. Nomencl. Tax.*, 12: 161-170, 1962.

- LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. In: Dobzhansky T, HECHT, M. K.; STEERE, W. C. (eds.) *Evolutionary Biology*. Volume 6, Meredith Corporation, New York, p. 381-389, 1972.
- LING, H. Q.; KRIESELEIT, D.; GANAL, M. W. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium* mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Rep.*, 17: 843-847, 1998.
- MACHADO, L. O.; ANDRADE, G. M.; CID, L. P. B.; PENCHEL, R. M.; BRASILEIRO, A. C. M. *Agrobacterium* strain specificity and shooty tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) *Plant Cell Rep.*, 16: 299-303, 1997.
- MacRAE, J. J.; van STADEN, J. "Transgenic *Eucalyptus*". In: Bajaj, Y. P. S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 44, *Transgenic Trees*, p. 88-114, 2000.
- MALABADI, R. B.; van STADEN, J. Somatic embryos can be induced from the vegetative shoot apex of mature *Pinus patula* trees. *South Afr. J. Bot.*, 69: 450-451, 2003.
- MAROOOF, M. A. S.; YANG, G. P.; ZHANG, Q., GRAVOIS, K. A. Correlation between molecular marker distance and hybrid performance in U.S. southern long grain rice. *Crop Sci.*, 37: 145-150, 1997.
- MERKLE, S. A. Transgenic Trees: advances in somatic embryogenesis, transformation and engineering with phytoremediation genes. In: STEWART Jr., C. N. *Transgenic plants: Current Innovations and Future Trends*. pp. 46-63, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, 2003.
- MICHALCZUK, L.; COOKE, T. J.; COHEN, J. D. Auxin levels at differing stages of carrot embryogenesis. *Phytochemistry*, Cambridge, v. 31, p. 1097-1103, 1992.
- MORAES, R. M. A. Introgressão de Alelos para alto teor de proteína em soja assistida por marcadores moleculares. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 152p., 2003.
- MORALEJO, M.; ROCHANGE, F.; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Austr. J. Plant Physiol.*, 25: 207-212, 1998.

- MOSER, H.; LEE, M. RFLP variation and genealogical distance, multivariate distance, heterosis, and genetic variance in oats. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 947-956, 1994.
- MULLINS, K. V.; LLEWWLLYN, D. J.; HARTNEY, V. J.; STRAUSS, S.; DENNIS, E. S. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Rep.*, 16(11): 787-791, 1997.
- MURALIDHARAN, E. M.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *E. citriodora*. *Plant Cell Rep.*, 6: 256-259, 1987.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497, 1962.
- NAUERBY, B.; BILLING, K.; WYNDAELE, R. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compares to carbenicillin and cefotaxime in concentration suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.*, 123(1-2): 167-177, 1997.
- 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*, 74: 628-637, 1995.
- NIEDZ, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field- grown trees. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 38: 468-471, 2002.
- NUGENT, G.; CHANDLER, S. F.; WHITEMAN, P.; STEVENSON, T. W. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus* Labill. *In Vitro Cell. Develop. Biol. – Plant*, 37: 388-391, 2001.
- PATZAK, J. Comparison of RAPD, STS, ISSR e AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 121: 9-18, 2001.
- PHILLIPS, R.; ARNOTT, S. M.; KAPLAN, S. E. Antibiotics in plant tissue culture: rifampcin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. *Plant Sci. Lett.*, 21: 235-240, 1981.
- PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; CRUZ, C. D.; MOURA, D. F.; FERNANDES, D.; DIAS, L. A. S. Sample size of RAPD number of markers in *Eucalyptus* genetic distance and diversity. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.*, 4: 384-390, 2004.

- PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; DIAS, L. L. C.; NEVES, D. A.; OTONI, W. C. *In vitro* morphogenesis of *Eucalyptus grandis*: effects of antibiotic and explant sources. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.*, artigo aceito, 2005.
- PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; OTONI, W. C.; GERALDINE, R. M.; GONÇALVES, L. A.; DIAS, L. L. C.; NEVES, D. A.; ODA, S. Alterações do ambiente interno de frascos de cultura *in vitro* de *Eucalyptus*: associações com o tipo de vedação e com as respostas dos explantes. XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas – Lavras, MG, UFLA, 5 a 9/10/2003.
- PICOLI, E. A. T.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; CECON, P. R.; da SILVA, D. J. H.; FARÍ, M. G.; OTONI, W. C. Study of genetic transformation efficiency via organogenesis and embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L. cv. Embú): effects of co-culture temperature and kanamycin and hygromycin-based selection procedures. *Inter. J. Hort. Sci.*, 8: 15-23, 2002.
- PICOLI, E. A. T.; OTONI, W. C. Morfogênese *in vitro* de berinjela influenciada por higromicina e períodos de exposição em ANA. *Rev. Ciênc. Agrotecnol.* 25: 1474-1481, 2001.
- PICOLI, E. A. T.; OTONI, W. C.; CECON, P. R.; FÁRI, M. Influence of antibiotics on NAA-induced somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L. cv. Embú). *Int. J. Hortic. Sci.*, 6: 88-95, 2000.
- PINTO, G.; SANTOS, C.; NEVES, L.; ARAÚJO, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Rep.*, 21: 208-213, 2002.
- POLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell Rep.*, 2: 36-39, 1983.
- POTTS, B. M.; DUNGEY, H. S. Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. *New Forests*, 27: 115-138, 2004.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, RAPD and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.*, 2: 225-238, 1996.
- RAEMDONCK, D. V.; JAZIRI, M.; BOERJAN, W.; BAUCHER, M. Advances in the improvement of forest trees through biotechnology. *Belg. J. Bot.*, 134: 64-78, 2001.

- RAINA, S. N.; RANI, V.; KOJIMA, T.; OGIHARA, Y.; SINGH, K. P.; DEVARUMATH, R. M. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* 44: 763-772, 2001.
- REED, B. M.; BUCLEY, P. M.; DEWILDE, T. N. Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 31: 53-57, 1995.
- REED, B. M.; MENTZER, J.; TANSPRASERT, P.; YU, X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 52: 67-70, 1998.
- RENGANAYAKI, K.; READ, J. C.; FRITZ, A. K. Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 1037-1045, 2001.
- ROMEIRO, R. Métodos em Bacteriologia de Plantas. Viçosa: Editora UFV. 279 p., 2001.
- ROSSETO, M.; JEZIERSKY, G.; HOPPER, S. D.; DIXON, K. W. Conservation genetics and clonality in two critically endangered eucalypts from the highly endemic south-western Australian flora. *Biol. Conserv.*, 88: 321-331, 1999.
- SABINO, D. C. C.; FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D., BALDANI, J. I. Avaliação da capacidade das bactérias *Burkholderia brasiliensis* e *Herbaspirillum seropedicae* em promover o crescimento de pântulas de arroz. EMBRAPA-CNPAB, comunicado técnico no 45, p1-3, 2000.
- SAITOU, N.; NEI, M. The fellow neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evolut.*, 4: 406-425, 1987.
- SALE, M. M.; POTTS, B. M.; WEST, A. K.; REID, J. B. Molecular differentiation within and between *Eucalyptus risdonii*, *E. amygdalina* and their hybrids using RAPD markers. *Austr. J. Bot.*, 44: 559-569, 1996.
- SANT, V. J.; PATANKAR, A. G.; SARODE, N. D.; MHASE, L. B.; SAINANI, M. N.; DESHMUKH, R. B.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Potential of DNA markers in detecting divergence and in analyzing heterosis in Indian elite chickpea cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 1217-1225, 1999.
- SARMA, K. S.; EVANS, N. E.; SELBY, C. Effect of carbenicillin and cefotaxime on somatic embryogenesis of sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). *J. Exper. Bot.*, 46: 1779-1781, 1995.

- SARTORETTO, L. M.; CID, L. P. B.; BRASILEIRO, A. C. M. Biolistic transformation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* callus. *Funct. Plant Biol.*, 29: 917-924, 2002.
- SAVKA, M. A.; WANG, S. Y.; WILSON, M. How to produce and characterize transgenic plants. *The Amer. Biol. Teacher*, 64: 286-300, 2002.
- SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; LACY, G. H. *Xanthomonas*. In: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3th ed. Eds.: SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. The American Phytopathological Society. St Paul. Minnessota, USA, 2001.
- SHACKELFORD, N. J.; CHLAN, C. A. Identification of antibiotics that are effective in elimination *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol Rep.*, 14: 50-57, 1996.
- SHEPHERD, M.; CHAPARRO, J. X.; TEASDALE, R. Genetic mapping of monoterpene composition in an interspecific eucalypt hybrid. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 1207-1215, 1999.
- SIMIONIUC, D.; UPTMOOR, R.; FRIEDT, W.; ORDON, F. Genetic diversity and relationships among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. *Plant Breed.*, 121: 429-435, 2002.
- SKABO, S.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M. Fine structure of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* forest revealed by RAPDs. *Austr. J. Bot.*, 46: 583-594, 1998.
- SKIRVIN, R. M.; MOTOIKE, S.; NORTON, M. A.; OZGUR, M.; AL-JUBOORY, K.; MCMEANS, O. M. Workshop on micropropagation – establishment of contaminant-free perennial plants in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 35: 278-280, 1999.
- Sociedade Brasileira de Silvicultura. <http://www.sbs.org.br/estatisticas.htm>, 2003.
- SUN, G. L.; WILLIAM, M., LIU, J.; KASHA, K. L.; PAULS, K. P. Microsatellite and RAPD polymorphisms in Ontario corn hybrids are related to the commercial sources and maturity ratings. *Mol. Breed.*, 7: 13-24, 2001.
- TANPRASERT, P.; REED, B. M. Detection and identification of bacterial contaminants of strawberry runner explants. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 52: 53-55, 1998.
- TERMIGNNONI, R. R.; WANG, P. J.; HU, C. Y. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 45:129-132, 1996.

- TIBOK, A.; BLACKHALL, N. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. *Plant Sci.*, 110: 139-145, 1995.
- TIVANG, J. G.; NIENHUIS, J.; SMITH, O. S. Estimation of sampling variance of molecular marker data using the bootstrap procedure. *Theor. Appl. Genet.* 89: 259-264, 1995.
- TSEGAYE, S.; TESEMMA, T.; BELAY, G. Relationships among tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) landrace populations revealed by isozyme markers and agronomic traits. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 600-605, 1996.
- van de PEER, Y. Treecon for Windows, versión 1.3b., 1997.
- VENCOVSKY, R.; RUMIN, G. C. R. Seleção de linhagens endogâmicas baseada em marcadores genéticos co-dominantes. In: *Jornada em Genética e Melhoramento de Plantas: Análise de QTL no Melhoramento de Plantas, 2*, Goiânia, (PINHEIRO, J. B.; CARNEIRO, I. F., eds.). Anais. FUNAPE, Goiânia, pp. 37-47, 2000.
- WALTER, C.; CHARITY, J.; GRACE, L.; HÖFIG, K.; MÖLLER, R.; WAGNER, A. Gene technologies in *Pinus radiata* and *Picea abies*: tools for conifer biotechnology in the 21st century. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 70: 3-12, 2002.
- WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. C.; MOKOTEDI, M. E. O.; JAIN, S. M. Micropropagation of *Eucalyptus*. In: JAIN, S., M.; ISHII, K. (eds.). *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, p. 217-244, 2003.
- WATT, M. P.; BLAKEWAY, F.; CRESSWELL, C. F.; HERMAN, B. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. *Suid-Afrikaanse Bosboutydskrif*, 157: 59-65, 1991.
- WATT, M. P.; THOKOANE, N. L.; MYCOCK, D.; BLAKEWAY, F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germoplasm under minimal growth conditions. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 61: 161-164, 2000.
- WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16s Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173: 27-32, 1991.
- WHITE, P. R. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. *Amer. J. Bot.*, 30: 33-36, 1943.

- 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. Nucl. Ac. Res., 18: 6531-6535, 1990.
- YEPES, L. M.; ALDWINCKLE, H. S. Factors that affect leaf regeneration in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 37: 257-269, 1994.
- ZOBAYED, S. M. A.; ZOBAYED, F. A.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. Ann. Bot., 85: 587-592, 2000.
- ZOBEL, B. J.; WYK, G. V.; STAHL, P. Growing exotic forests. John Wiley and Sons: New York, 1987.