

**JÚPITER ISRAEL MURO ABAD**

**MÉTODO DE MELHORAMENTO, ASSISTIDO POR MARCADORES  
MOLECULARES, VISANDO A OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS DE *Eucalyptus*  
spp.**

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 "Magister Scientiae".

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2000

A Deus meu guia.

Aos meus pais Pablo (in memória) e Robertina

A minha esposa Alessandra.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Genética e Melhoramento pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento.

À professora Elza Fernandes de Araújo, pela dedicação e carinho com que me orientou nos trabalhos de pesquisa desde a graduação e no Mestrado.

Ao Prof. Ismael E. Pires pela co-orientação nos trabalhos e estímulo para encarar a profissão de Melhorista e principalmente pela amizade.

Ao Prof. Cosme D. Cruz pela paciência e aconselhamento nesta tese e demais trabalhos na área de melhoramento.

Ao Prof. Everaldo pelas discussões sobre o trabalho e valiosas sugestões como membro da banca de tese.

Ao Prof. Pedro pela participação na banca de tese e discussões sobre a análise dos dados.

Às empresas Cenibra, Bahia Sul Celulose e Celmar, em especial os Engenheiros Florestais Maria das Graças Rocha, Francisco e João Flávio, pelo material cedido e trabalho de cooperação.

Ao Rodrigo B. Rocha, pelo trabalho em conjunto nas análises moleculares, piadas no cafezinho e pela amizade cultivada nestes anos de trabalho.

Ao Adriano E. Almeida, pela discussões sobre Genética Quantitativa, no cafezinho, no bar, em aula, em casa, e por ai afora; em especial pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, Denise, João pelas brigas saudáveis; Luciana, Jildete, Simone, Adalgisa, pela paciência; Jorge, Andréa, Maurílio e Patrícia, pelo trabalho em equipe.

A Prof. Tânia, quem me iniciou na pesquisa na graduação, pela amizade, carinho nestes anos de trabalho e principalmente estímulo a curiosidade.

Ao Prof Walter e Prof. Marisa pelo trabalho em equipe no laboratório.

Ao Lucas pelas notícias exageradas que ele teima em contar e aos demais amigos e colegas do curso de Genética e melhoramento.

Aos amigos Marceli, Maurício, Olinto, Guilherme, Professores Catarina e Tótola, e demais colegas e professores dos laboratórios de Micorriza, Fisiologia de microrganismos e Microbiologia Industrial.

Ao Evandro, Danilo, Zé Reinaldo, Paulo, Toninho e Raimundo pela amizade e profissionalismo nestes anos de trabalho e de conversas jogadas fora.

A Nilcéa, Laura e Aparecida pela prestatividade e preocupação (puxão de orelha) com as datas dos relatórios que nunca consegui lembrar.

Em especial a minha esposa Alessandra que sempre me ajudou em tudo que decidi fazer e aguenta minhas noites de insônia em frente ao computador, estando presente em todos os momentos da minha vida.

## **BIOGRAFIA**

Júpiter Israel Muro Abad, filho de Robertina Micaela Abad de Muro e Pablo Enrique Muro Arbulú, nasceu em Lima, Peru, em 09 de janeiro de 1974.

Em dezembro de 1990, recebeu o título de Técnico em Agropecuária na Escola Técnica de Agropecuária Regional da CEPLAC – EMARC de Teixeira de Freitas - Bahia.

Em março de 1994, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, no curso de Engenharia Florestal concluindo do curso em março de 1999.

Iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento em março de 1999, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, defendendo tese no dia 24 de agosto de 2000.

## CONTEÚDO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. As espécies <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>E. urophylla</i> .....	4
2.2. Melhoramento florestal do <i>Eucalyptus</i> .....	6
2.3. Diversidade genética .....	8
2.4. Marcadores moleculares.....	11
2.5. Marcadores moleculares e heterose.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1. Material genético .....	17
3.2. Extração e quantificação do DNA total .....	18
3.3. Análise de marcadores RAPD. ....	19
3.5. Análise dos dados moleculares .....	21
3.5. Dados quantitativos.....	22

3.5.1. Análise de variância e estimativas de parâmetros genéticos.	22
3.5.2. Distância genética e agrupamento dos genótipos.....	24
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
4.1. Diversidade entre 503 matrizes de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>E. urophylla</i> utilizando marcadores RAPD. ....	27
4.2. Análise de 127 matrizes de <i>E. grandis</i> e de <i>E urophylla</i> utilizando marcadores moleculares RAPD .....	32
4.3. Análises de dados silviculturais .....	44
4.3.1. Análise de Variância .....	44
4.3.2. Divergência genética entre progenitores e características silviculturais.....	50
<b>5. RESUMO E CONCLUSÕES .....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>APENDICE.....</b>	<b>65</b>

## RESUMO

MURO-ABAD, Júpiter Israel, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2000. **Método de melhoramento, assistido por marcadores moleculares, visando a obtenção de híbridos de *Eucalyptus* spp.** Professora Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Professores Conselheiros: Ismael Eleotério Pires e Cosme Damião Cruz.

A diversidade entre progenitores selecionados em testes de progênes de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* foi avaliada, para identificação dos melhores cruzamentos utilizando dialelo parcial circulante. Para a análise da diversidade foram utilizados marcadores moleculares RAPD, e distância Euclidiana média a partir de dados silviculturais de diâmetro a altura do peito (DAP), altura total (Ht) e incremento médio anual (IMA), e foram feitas análises de variância para alguns experimentos. As análises por RAPD foram feitas em dois estádios, no primeiro com 503 matrizes, onde foram utilizados 26 fragmentos de DNA polimórficos para gerar uma matriz de distância genética para cada espécie. Com base nestas matrizes foi feita a seleção de 127 matrizes utilizando a média das distância genética para cada genótipo e o valor de IMA. As 127 matrizes foram analisadas por marcadores RAPD, considerando 74 fragmentos de DNA polimórficos, e agrupadas pela técnica de Tocher. Com base neste agrupamento, foram constituídos 6 grupos de 10 genótipos de *E. grandis* e 7 grupos de *E. urophylla*, para montagem dos dialelos parciais circulante, envolvendo dois grupos de progenitores mais

divergentes entre as duas espécies. Foram feitas as análises de variância para três delineamentos de campo, o que evidenciou uma grande variabilidade para as características DAP e Ht, pelo teste F, com elevados valores de herdabilidade em nível de família. Valores negativos do componente de variância associado ao resíduo, indicaram um efeito de competição dentro das famílias. Os dados silviculturais foram utilizados para o cálculo da distância Euclidiana média e análise de agrupamento, onde foi identificada uma grande variabilidade tanto entre quanto dentro da procedência. Entretanto, foram obtidos valores de correlação baixos quando consideramos as distâncias genéticas obtidas por marcadores RAPD e distância Euclidiana média.

## ABSTRACT

MURO-ABAD, Júpter Israel, M.S., Universidade Federal de Viçosa, august, 2000. **Improvement method, attended by molecular markers for obtaining of *Eucalyptus* spp hybrid.** Advisor: Elza Fernandes de Araújo. Committee Members: Ismael Eleotério Pires and Cosme Damião Cruz.

The diversity among progenitors selected in progeny tests with *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* was evaluated for the identification of the best crossings using circulating partial diallel. For the diversity analysis, RAPD molecular markers and Euclidian mean distance of silvicultural traits such as breast-height diameter (DAP), total height (Ht), and mean annual increase (IMA), were used as well as variance analyses for some field tests. The RAPD analyses were done in two steps: in the first one, 503 trees were analyzed and 26 polymorphic DNA fragments were used to generate a genetic distance matrix for each species. Based on these matrixes the selection of 127 trees was done using the mean genetic distance and the IMA value for each genotype. The 127 trees were analyzed by RAPD markers using 74 polymorphic DNA fragments. Tocher technique was then used to cluster the individuals. Based on the genotype classification by Tocher, 6 groups of *E. grandis* and 7 groups of *E. urophylla*, each one containing 10 genotypes, were constituted for the circulating partial diallel analysis, involving the two most divergent progenitor groups between the two species. Variance analyses for three field tests was done, evidencing a high variability for the traits diameter and height by the F

test, with high heritability values at the family level. Negative variance component values associated to the residue indicated a competition effect within families. The silvicultural data were used for the calculation of the Euclidian mean distance and cluster analyses. A high variability was identified between and within progenies. However, low correlation values were obtained, considering the genetic distances by RAPD markers and the Euclidian mean distance.

## 1. INTRODUÇÃO

O setor florestal no Brasil atualmente detêm um grande potencial de produção de florestas plantadas com *Eucalyptus*, assegurada pela alta capacidade e tecnologia na produção de mudas principalmente clonais. O uso de programas tradicionais de melhoramento, baseados na geração a longo prazo de famílias superiores e florestas oriundas de sementes melhoradas deu lugar a plantios clonais, com a grande vantagem na resposta às práticas silviculturais e uniformidade das florestas.

Todo programa de silvicultura clonal depende exclusivamente da capacidade de geração e seleção de genótipos para multiplicação clonal. Em geral estes genótipos são híbridos interespecíficos, em sua maioria, resultantes da polinização livre, entre espécies como *E. grandis* e *E. urophylla*. Assim, existe uma grande necessidade de estruturação de programas que visem o melhoramento de populações das espécies de interesse, propiciando o aumento da probabilidade de sucesso na obtenção de híbridos interespecíficos superiores.

Um método de melhoramento que adequo na obtenção de genótipos para produção de clones é a seleção recorrente recíproca, com testes de progênes envolvendo famílias de irmãos completos, oriundas de delineamentos de cruzamento baseados em dialelo parcial circulante. Esta estratégia tem a possibilidade de reunir as características de produção

desejáveis entre dois genitores de interesse, por meio da recombinação destes genótipos e seleção na população segregante.

A variabilidade genética existente na população constitui a matéria prima sobre o qual são realizados os processos de seleção e melhoramento. A avaliação da diversidade genética dos progenitores que constituem esta população é importante no sentido de auxiliar o melhorista na tomada de decisão e na identificação dos cruzamentos mais divergentes, aumentando a possibilidade de ganho por seleção na população segregante e manifestação de híbridos mais heteróticos.

A análise de divergência genética entre progenitores pode ser feita utilizando-se técnicas biométricas ou preditivas. Entre as primeiras citam-se as análises dialélicas, que avaliam a capacidade específica e geral combinatória dos progenitores envolvidos nos cruzamentos, com base em seus híbridos e F1's. Já as técnicas preditivas avaliam a diversidade basendo-se apenas nos genitores, sem a necessidade de obtenção da F1. Para tal, medidas de dissimilaridade e ou similaridade são requeridas. Estas medidas podem ser baseadas em variáveis morfológicas, fisiológicas ou marcadores moleculares. De posse das medidas a análise de divergência é feita utilizando um método de agrupamento que permite a formação de grupos mutuamente exclusivos, ou por dispersão gráfica por meio de componentes principais ou variáveis canônicas.

A análise de divergência entre genitores com base em marcadores moleculares, além de não necessitar da obtenção da população F1, também dispensa a utilização de testes de campo, o que conseqüentemente implica em um menor tempo, considerando o longo ciclo de geração para a espécie de *Eucalyptus* que é de aproximadamente 6 a 7 anos. Dentre os marcadores moleculares mais utilizados podemos destacar maracdores RFLP (Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição), RAPD (Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso) e microssatélites.

O presente trabalho teve por objetivos: Analisar a diversidade genética em um conjunto de matrizes selecionadas em populações de *E. urophylla* e *E. grandis* utilizando informações de marcadores moleculares RAPD e características quantitativas; identificar os genótipos mais distantes geneticamente interespecífica e intraespecífica das espécies, com base nos

marcadores RAPD e variáveis quantitativas; recomendar os cruzamentos entre os genótipos segundo o modelo de dialelo parcial circulante, com base nas informações gerada pela análise de diversidade entre progenitores.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. As espécies *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*

As espécies do gênero *Eucalyptus*, tem se destacado na produção de madeira nas regiões tropicais, principalmente pelo seu rápido crescimento, facilidade de manejo e boas características tecnológicas. O principal uso da madeira das florestas plantadas de *Eucalyptus* destina-se a produção de celulose fibra curta, amplamente utilizada no mundo, principalmente, para produção de papel (GOMES e COUTO, 1986). Este gênero possui grande variabilidade, compreendendo desde arbustos a imensas árvores; predominantemente alógamas, o que permite intenso fluxo gênico, dentro do mesmo subgênero (PRYOR e JOHNSON, 1971; BROOKER E KLEINING, 1990).

O eucalipto foi introduzido no Brasil há mais de um século, no Jardim Botânico do Rio de Janeiro; sendo que os primeiros plantios sistemáticos foram feitos pelo Engenheiro-Silvicultor Dr. Edmundo Navarro de Andrade para atender à necessidade de madeira como fonte de energia para as locomotivas a vapor da Companhia Paulista de Estradas de Ferro (FERREIRA, 1992). A sua grande rusticidade e agressividade, associada a seus vários usos explicam a sua grande dispersão antrópica. Este gênero possui características interessantes, dentre as quais, a facilidade de ocupação de terras desnudas, a grande produção de sementes (RAMALHO, 1995).

Dentre as espécies deste gênero utilizadas para produção de madeira destacam-se o *E. urophylla* e *E. grandis* que representam as espécies de maior interesse para a cultura do eucalipto no Brasil, principalmente pelas características tecnológicas e de rusticidade (CÂNCIO 1999).

A espécie *E. urophylla* S. T. BLAKE pertence ao subgênero *Symphyomyrtus* (BLAKE, 1977), apresenta alta potencialidade para a fabricação de celulose, chapas duras, produção de carvão e outros fins. A ampla capacidade de adaptação a diversas condições ambientais tropicais é outro ponto favorável da espécie, aliada à tolerância ao patógeno *Cyphonectria cubensis* causador do cancro do eucalipto (SANTOS et al., 1990). Esta é uma das poucas espécies que não ocorre no território australiano, originalmente distribuída nas ilhas do arquipélago de Lesse Sunda, nas ilhas de Flores, Timor, Wetar, Alor, Pantar, Andonara e Lomblen, da Indonésia Oriental (BROOKER and KLEINING 1990).

O *E. urophylla* possui ampla distribuição territorial no seu local de origem, ocorrendo em vários tipos de ambientes, desde florestas pluviais com altitudes entre 500 e 1100 m a elevadas formações montanhosas de 3000 m em Timor. Esta diversidade ambiental é acompanhada de uma grande variabilidade das características morfológicas (PASZTOR et al. 1990).

PASZTOR et al. (1990) observaram uma grande variabilidade entre as procedências de *E. urophylla* considerando adaptação, sobrevivência e produtividade. HOUSE e BELL (1994) também detectaram alta variabilidade por análise isoenzimática, agrupando separadamente as procedências de Wetar das demais procedências. Seus estudos mostraram existir grande variação tanto morfológica quanto molecular para uma mesma espécie

Recentemente outra avaliação morfológica de material floral foi feita por PRYOR et al. (1995) por análises de componentes principais, os autores conseguiram distinguir mais dois grupos além do material original de Lesser Sunda. Estes pesquisadores, com base nas análises de dados de morfologia floral de 400 amostras de materiais coletados em 26 locais do arquipélago de Lesser Sunda, Nova Guiné e Norte de Cabo York, sugeriram a separação das procedências das maiores altitudes de Timor, como uma nova espécie: *E. orophylla*; e as procedências dos sítios mais secos de Wetar como *E. wetarensis*.

A espécie *E. grandis* (Hill) MAIDEN ocorre em clima quente e úmido, em planícies, encostas baixas e em margens de florestas pluviais nas regiões sudeste e nordeste da Austrália (BOLAND et al., 1984). Possui o fuste direito até dois terços da altura total, com casca lisa e folhas estreitas, madeira vermelha a pardacenta clara e moderadamente dura (RIZZINI, 1971).

A possibilidade de hibridação entre espécies do mesmo subgênero para o *Eucalyptus* tem sido utilizada para produção de genótipos melhorados. Deste modo *E. grandis* e *E. urophylla* tem merecido especial atenção quando na constituição do híbrido interespecífico, que por meio da recombinação de caracteres possibilita a reunião das boas características de ambas as espécies na geração segregante.

Segundo ENDO e LAMBETH (1992) o híbrido Urograndis (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) em experimento na Colômbia tem se saído muito bem em altura e na Venezuela teve melhor produção de volume/ha que a melhor fonte de sementes de *E. grandis* em seis dos ensaios. LAMBETH (1991) cita que a altura no primeiro ano é boa indicação para o futuro desenvolvimento clonal e até os três anos o volume por hectare para os lotes avaliados apresenta um efeito significativo de interação genótipo-ambiente.

VIGNERON et al., (2000) avaliando experimentos de híbridos de *Eucalyptus* no Congo observaram que o híbrido urograndis reúne características desejáveis de ambos os pais; como resistência a várias doenças fúngicas do *E. urophylla*, rápido crescimento, crescimento de copa e características tecnológicas da madeira ideais para polpação química do *E. grandis*.

## **2.2. Melhoramento florestal do *Eucalyptus***

Desde a introdução do eucalipto no Brasil a seleção massal tem sido utilizada com relativa eficiência para obtenção de genótipos superiores. Os programas de deste gênero assim como de outras espécies florestais tem se utilizado da grande diversidade inerente das populações naturais sendo comum explorar a variabilidade entre plantas ou entre e dentro de famílias (XAVIER 1996).

Os programas de melhoramento tem sido conduzidos na seguinte ordem: seleção de indivíduos fenotipicamente superiores em populações naturais; propagação vegetativa das árvores superiores selecionadas, em bancos clonais; recombinação dos genótipos via polinização controlada e avaliação dos cruzamentos em testes de progênies (WRIGHT 1984). Os testes genéticos nas populações de melhoramento têm como propósitos: estimar os parâmetros genéticos, avaliar a natureza da variabilidade fenotípica e genotípica, estimar os valores dos componentes de variâncias, predição de ganho por seleção e seleção da próxima geração (DINKINS, 1992).

No Brasil até a década de 70 ainda se fazia coleta de material em populações naturais de *Eucalyptus* na Austrália e em ilhas adjacentes. Segundo PIRES (1975) naquela época o país já contava com um grupo de espécies adaptadas e que poderiam garantir a base dos programas de melhoramento, de modo que as espécies introduzidas no Brasil constituem um grupo com diferenças contrastantes das populações originais da Austrália, devido à adaptação às condições de clima e solo brasileiro e uma taxa de hibridação nos locais de introdução pela proximidade de testes de procedência.

Esta capacidade de cruzamento entre as espécies de um mesmo subgênero é uma valiosa ferramenta no melhoramento genético do *Eucalyptus*. Tem sido utilizada visando a obtenção de heterose de determinados caracteres, como forma de reunir em um mesmo indivíduo características presentes em diferentes espécies.

A hibridação dirigida é uma técnica que possui inúmeras vantagens, pois além de proporcionar o conhecimento da capacidade geral e ou específica da combinação de matrizes, possibilitam o cruzamento de genitores, onde um apresenta por exemplo, defasagem na floração (MENCK et al., 1990). Neste sentido o estudo da diversidade genética entre progenitores possibilita identificar as combinações híbridas de maior efeito heterótico (CRUZ e REGAZZI, 1994).

No processo de hibridação um dos passos primordiais é o estudo da variabilidade genética, que é intrínseca da população base. Neste caso, depende dos parâmetros amostrados, que por sua vez influenciarão nos valores das estimativas de herdabilidade e ganho com a recombinação e seleção, pois quando não há variabilidade na população não é possível

promover mudança na frequência gênica nem aumento da média populacional para a característica avaliada (ALLARD, 1960, FALCONER, 1987, ZOBEL e TALBERT, 1984).

### **2.3. Diversidade genética**

A variabilidade genética é um dos aspectos primordiais a serem analisados no início de um programa de melhoramento, uma vez que somente existindo variabilidade na população base é possível promover seleção com possibilidades de obtenção de ganho na próxima geração (ALLARD, 1960, FALCONER, 1981, ZOBEL e TALBERT, 1984 e BORÉM, 1998). O trabalho do melhorista visa principalmente o aumento da frequência de alelos favoráveis que são responsáveis pela expressão de uma determinada característica quantitativa, entretanto a seleção não é genotípica mas fenotípica de modo que a análise dos caracteres de interesse na população são medidas quantitativas ou mesmo qualitativas. Nesse sentido o melhorista tem como ferramenta a análise estatística dos parâmetros amostrados em uma população (ZOBEL e TALBERT, 1984).

Os parâmetros genéticos que podem ser estimados em conexão com uma população são medidas de variâncias e covariâncias e a subdivisão natural desta população em famílias nos permite analisar a variância em componentes que formam a base para a mensuração do grau de semelhança entre parentes (FALCONER, 1981).

Para se fazer uso destas derivações teóricas e, na prática, predições, é preciso ter estimativas dos diversos parâmetros que têm influência na seleção. As estimativas necessárias podem ser obtidas de ensaios experimentais, ou de delineamentos genéticos para se testar a hipótese da existência de variabilidade na população amostrada, e ainda obter outros parâmetros que possibilitem prever ganhos com a seleção (FALCONER, 1981; CRUZ e REGAZZI, 1994).

A obtenção de ganhos satisfatórios e manutenção da diversidade genética na população segregante depende da seleção de progenitores divergentes e com elevada média para as características de interesse (FALCONER, 1981). Neste sentido, estes estudos tornam-se importantes por

possibilita prever o efeito heterótico das progênies oriundas de cruzamentos heteróticos (CRUZ E REGAZZI, 1994). Dentre as principais metodologias para análise de diversidade dos progenitores estão os sistemas de cruzamentos dialélicos como os propostos por GRIFING, (1954); por GARDENER e EBERHART, (1966) e KEMPTHORNE e CURNOW, (1961).

Estas metodologias prevêm um número de cruzamentos relativamente grande, constituindo-se uma limitação de seu uso, principalmente no meio florestal. Para viabilizar o estudo da capacidade combinatória de um número muito grande de progenitores, métodos alternativos de análises, como os dialelos parciais e circulantes, foram propostos. Os dialelos parciais partem do pressuposto que dois grupos "p" e "d" de progenitores já foram estabelecidos, perfazendo um total de **pd** cruzamentos, enquanto que nos dialelos circulantes os "**pd**" progenitores constitui apenas um grupo e o número de cruzamentos "s" é menor que **pd**, uma vez que nem todos os possíveis cruzamentos são estabelecidos (KEMPTHORNE e CURNOW, 1961; CRUZ e REGAZZI, 1994).

Uma variação, incluindo estes dois tipos de dialelos, é o chamado dialelo parcial circulante, ideal para estabelecimento de cruzamentos interespecíficos, possibilitando a utilização de duas espécies distintas e um grande número de progenitores, uma vez que não é necessário o uso de todos os cruzamentos. A grande vantagem dos dialelos é justamente na avaliação da Capacidade Geral de Combinação (CGC), Capacidade Específica de Combinação (CEC) e efeito heterótico da combinação destes progenitores, permitindo estimar os parâmetros genéticos da população em estudo (CRUZ e REGAZZI, 1994).

Além de testes genéticos baseados na análise de variância das diferentes fontes de variação, análise da população de melhoramento utilizando marcadores moleculares tem sido recentemente adotado, com forma de estabelecer grupos divergentes dentro da população (GAIOTO et al. 1997; LANZA et al. 1997; BARBOSA-NETO et al. 1996). Para esta análise de diversidade genética vários índices foram propostos entre eles os coeficientes mais utilizados são:

*Coeficiente de Combinação Simples* (SNEATH e SOKAL, 1973):

$S_{ij} = (a+d)/(a+b+c+d)$ , onde:  $S_{ij}$  = Coeficiente de similaridade;  
a = número de ocorrências 1-1;  
b = número de ocorrências 1-0;  
c = número de ocorrências 0-1;  
d = número de ocorrências 0-0.

*Coeficiente de Ney e Li* (NEY e LI, 1979):

$S_{ij} = 2a/(b+c)$ , onde: a = número de bandas nos dois genótipos;  
b e c = número de bandas em cada genótipo.

*Índice de Jaccard* (JACCARD, 1908):

$$S_{ii}' = \frac{a}{a+b+c} \quad \text{sendo}$$

a : número de bandas presentes nos dois genótipos analisados;  
b : número de bandas presentes apenas no genótipo i;  
c : número de bandas presentes apenas no genótipo i'.

Dos índices apresentados, os mais utilizados são o Coeficiente de Ney e Li e o índice de Jaccard. Nas análises moleculares a diversidade é calculada com base no polimorfismos de fragmentos de DNA, onde a ausência de bandas num dos genótipos analisados (0) e a presença no outro (1). Ambos os coeficientes apresentam o valor 1 se todas as bandas são concordantes ou se as amostras são idênticas, e 0 se não há bandas comuns ou se as amostras são distintas.

Com base neste coeficiente o valor de dissimilaridade é obtido por subtração do total (100%). As matrizes de dissimilaridade geradas por meio de marcadores moleculares RAPD podem ser utilizadas para construir agrupamentos. Os métodos UPGMA (Unweighted Paired Group Method using

Arithmetic Averages) e Variância Mínima de Ward têm sido os mais utilizados para a maioria dos estudos. Esses métodos são geralmente apropriados quando existe uma expectativa de diminuição das distâncias a medida que se aumentam os agrupamentos naturais. DUDLEY (1994) comparando diversos métodos de agrupamento com as informações de “pedigree”, encontrou maior consistência para o método de UPGMA. Esse é o método recomendado por SNEATH e SOKAL (1973) e por ROMESBURG (1984).

Outro tipo de análise, quando é possível a distinção entre os alelos é a diversidade gênica, que reflete a heterozigotidade esperada da população, expressa numa medida de probabilidade de dois gametas tomados ao acaso em uma população, terem alelos diferentes em um determinado loco. A heterozigotidade esperada ( $H_e$ ) é dada por:

$$H_e = 1 - \sum_{\mu} p_{\mu}^2 \quad \text{onde,}$$

$p_{\mu}$  é a frequência do  $\mu$ -ésimo alelo em uma população

#### **2.4. Marcadores moleculares**

Nas duas últimas décadas os marcadores genético-moleculares, derivados da análise direta do polimorfismo das sequências do DNA, têm sido utilizados. Os segmentos polimórficos do DNA podem ser identificados por estratégias como hibridização ou amplificação enzimática do DNA (CAETANO-ANOLLÉS, 1993). Se o marcador tiver um comportamento de acordo com as leis básicas de herança enunciadas por Mendel, ele será um “marcador genético” (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Marcadores moleculares possibilitam entender a contribuição de locos genéticos múltiplos no desenvolvimento dos organismos, além de mudanças na organização do genoma que ocorrem durante o desenvolvimento ou em resposta ao meio ambiente (YOUNG, 1993).

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados para diversos estudos genéticos em organismos eucariotos e procariotos. Dentre os mais conhecidos destacam-se os RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) e RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição de DNA).

A técnica de PCR, idealizada na década de 80, tem como princípio o anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores localizados nas extremidades da sequência alvo da fita dupla do DNA.

A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR a torna muito importante nos estudos de genética molecular, que envolve grande número de genótipos e organismos. Isso proporcionou grande desenvolvimento de métodos tradicionais de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

No início da década de 90 dois grupos (WILLIAMS et al., 1990 e WELSH et al., 1990) quase que ao mesmo tempo, baseados na técnica de PCR, descreveram um novo tipo de marcadores genéticos, onde a amplificação do DNA não requer o conhecimento da sequência alvo a ser copiada. Esses marcadores, chamados marcadores RAPD ( Random Amplified Polymorphic DNA ) são gerados pela amplificação de seqüências de DNA, ao acaso, com pequenos oligonucleotídeos com seqüência arbitrária de nucleotídeos ( WILLIAMS et al., 1993).

Um único oligonucleotídeo é utilizado como iniciador na polimerização de fragmentos de DNA em cada reação, ocorrendo uma amplificação seletiva de fragmentos que são flanqueadas em sentidos opostos por este oligonucleotídeo (MELLO, 1996). Se entre dois indivíduos houver diferenças nos locais de pareamento do oligonucleotídeo, eles serão diferentes na análise dos produtos da amplificação (YOUNG, 1993).

A técnica de RAPD é tida como uma modificação da PCR, por utilizar uma baixa temperatura de anelamento, fornecendo um padrão polimórfico bastante informativo do DNA genômico (MELLO, 1996). Para amplificação de um fragmento RAPD pela enzima *Taq* DNA polimerase é necessário a complementariedade dos oligonucleotídeos iniciadores, devendo estar em orientação oposta à distância entre 200 - 2000 pares de bases (TINGEY et al., 1992). O produto da reação de amplificação depende da sequência do oligonucleotídeo e condições da reação. Para reação RAPD são usados oligonucleotídeos de 10 bases. A amplificação de segmentos de DNA é inteiramente ao acaso, podendo ser de um gene cópia única ou até seqüências altamente repetitivas (WILLIAMS et al. 1993).

A análise RAPD considera a presença de bandas resultantes da amplificação como semelhança, e a ausência como dissemelhança. Estes dados são utilizados para construção de uma matriz quadrada contendo as distâncias genéticas calculadas, entre os indivíduos. Baseado nos dados da matriz de distância genética pode-se confeccionar um dendrograma de agrupamento para os indivíduos.

Uma grande vantagem dos marcadores RAPD é a possibilidade de utilizar outras metodologias juntamente com esta técnica, visando melhor estudo do organismo. Fragmentos individuais podem ser extraídos do gel após amplificação RAPD, e reamplificados para usar como sondas de hibridização. Estas sondas podem ser utilizadas no mapeamento RFLP ou para confirmar a identidade de bandas de DNA em gel de RAPD (WILLIAMS et al., 1993).

Marcadores moleculares RAPD têm se mostrado eficientes para avaliação da variabilidade genética intra e inter específica, sendo extensivamente utilizados com sucesso em caracterizações genéticas, estudos de variabilidade, identificação e mapeamento genético em vários organismos (LIMA et al., 1996; GARCIA et al., 1996). Em eucalipto, os marcadores RAPD foram usados para estudos de diversidade genética de progênies de *E. urophylla* (CÂNCIO 1998). GRATTAPAGLIA e SEDEROFF (1994) utilizaram marcadores RAPD para construção de mapas genéticos para duas plantas de *E. grandis* e *E. urophylla* usando “pseudo-testcross”.

Na identificação de clones de *E. grandis*, onde o uso destes marcadores possibilitaram a distinção entre diferentes clones (LANGE et al., 1993). LAIA et al. (1996) utilizaram RAPD para verificar a ocorrência da variação somaclonal entre dois clones de *E. grandis*, que ocorreu após vários subcultivos de uma cultura de células para propagação vegetativa.

SALE et al. (1996) usaram marcadores RAPD para estudar híbridos naturais entre *E. amygdalina* e *E. risdonii*, visando encontrar marcadores específicos para as espécies e determinar o grau de diferenciação entre parentais e fenótipos híbridos na zona de hibridação e próximo as amostras de espécies puras. ESBRÍSSE (1997) investigou a existência de associação entre distâncias genéticas de genitores, obtidas com marcadores moleculares RAPD, e a performance da geração F<sub>1</sub> em *Eucalyptus*.

## 2.5. Marcadores moleculares e heterose

Muitos trabalhos têm demonstrado que o ganho com a heterose está relacionada principalmente com as distâncias genéticas entre progenitores, sendo possível o uso do coeficiente de parentesco e outras relações genéticas como preditor da performance relativa de combinações híbridas, o que pode resultar na redução de tempo e custo com o teste das progênies híbridas (BRUSTIN e CHARCOSSET 1997; MARSAN et al. 1998; DUDLEY et al. 1991 e CHARCOSSET et al. 1991).

O estudo da relação entre medidas de dissimilaridade genética e heterose tem sido bastante controverso, onde a eficiência de seleção das melhores combinações híbridas com base nas análises moleculares de diversidade foram satisfatórios e até recomendados para muitos estudos, enquanto para outros, isso não foi confirmado.

LANZA et al. (1996) utilizaram marcadores moleculares RAPD no estudo da diversidade genética entre 18 linhagens endogâmicas de milho, procurando avaliar o poder de discriminação destes marcadores, bem como estimar correlações entre distâncias genéticas obtidas entre estes progenitores com a produção de grãos de seus respectivos híbridos simples. Três grupos distintos foram formados, sendo estes resultados confirmados por uma análise multivariada. As distâncias genéticas dos grupos G1xGII e G1xGIII mostraram-se alta e positivamente correlacionadas com a característica produção de grãos, apresentando estimativas iguais a 0,70 e 0,87, respectivamente. Estes marcadores foram extremamente eficientes na discriminação de diferentes grupos heteróticos de milho, bem como no direcionamento de cruzamentos desejáveis.

BARBOSA-NETO et al. (1996) estimaram a relação genética de 112 linhagens de trigo sendo calculado o Coeficiente de Parentesco (COP) e um Índice de Distância Genética (DI) com base em marcadores RFLP. Heterose foi estimada para 722 híbridos em múltiplos locais, sendo 189 testados em mais que um ano. A correlação entre estimativas de distâncias genéticas RFLP e COP foi não significativa (-0,33). Coeficiente de parentesco foi significativo com heterose para todas as características em 1991, mas não em todos os anos.

Distância genética RFLP, neste estudo, não teve correlação com heterose em nenhum dos anos testados.

Segundo BARBOSA-NETO (1996) uma das possíveis causas da ausência de correlação entre a distância genética e heterose em seu trabalho com trigo foram: o uso de sondas RFLP não relacionada a genes responsáveis pelo fenótipo e que a exploração da heterose em trigo é relativamente recente quando comparada com milho, onde cultivares têm sido explorados por mais que 70 anos, e as populações de melhoramento têm sido estruturadas para formar grupos heteróticos, e em muitos trabalhos têm sido encontrados altas correlação entre distância genética e performance híbrida (LANZA et al., 1997 e MARSAN et al., 1998). Em trigo poucos cruzamentos tem sido desenvolvidos ou identificados grupos de germoplasmas heteróticos, e ainda, um menor nível de heterose média se deve possivelmente ao baixo polimorfismo combinado com interações intergenômicas não aditivas ou de efeito dominante.

DUDLEY et al. (1991) usaram um índice, baseado na ligação entre característica de interesse e marcadores moleculares para avaliar o valor híbrido de milho, em que treze fragmentos de DNA associados com produção de grãos foram usados para calcular o índice para todos os híbridos testados. Eles detectaram 29 marcadores associados com produção de grãos que produziram grandes valores híbridos. Uma alta correlação entre valor híbrido e produção de grãos foi reportada e recomendaram este índice para predição das combinações híbridas superiores.

CHARCOSSET et al. (1991), em uma estudo teórico mostra que a correlação entre uma única característica e uma distância baseada em marcador molecular é diminuída com o aumento da presença de marcas não ligadas com as características no estimador da distância. Como uma consequência eles concluíram que para predizer a performance de uma característica baseada em marcas parentais, seria necessário selecionar marcas com uma característica particular de interesse. TSAFARIS (1991) em sua revisão sobre os aspectos moleculares da heterose defende hipótese, de que alguns QTLs podem codificar para proteínas regulatórias de modo que estas proteínas são capazes de controlar uma vasta ordem de outros genes estruturais, os produtos que são necessários para expressão de caracteres complexos, como produção e heterose para produção. Na maioria dos trabalhos as poucas proteínas identificadas são multiméricas, onde o

heteropolímero exibe diferença de atividade significativa em comparação com o homopolímero, que está em complacência com a clara manifestação de sobredominância dos poucos QTLs analisados. Isto mostra a grande importância da construção de mapas genéticos para os genótipos selecionados dentro de um programa de melhoramento, identificando marcadores ligados à grupos gênicos (possíveis QTLs) responsáveis pelas características de interesse, se não completamente, pelo menos em uma determinada fase de crescimento. A expressão de grupos gênicos parecem ser diferenciadas nas diferentes fases do desenvolvimento da planta, como demonstra o trabalho de VERHAEGEN et al. (1997) com *Eucalyptus*, onde algumas regiões do genoma exercem efeito em mais que uma característica, sendo significativo a interação QTL por idade.

Para espécies florestais, alguns trabalhos tem sido desenvolvidos com objetivo de identificação de marcadores ligados as características de produção, utilizando marcadores RAPD como por exemplo na construção de um mapa de ligação para clones de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* “pseudo testcross”, devido a configuração de cruzamento não ser planejada a priori como em um cruzamento teste clássico e sim inferida a posteriori, após a análise da segregação dos marcadores na progênie (GRATTAPAGLIA e SEDEROFF 1994).

Marcadores RAPD foram utilizados para avaliar a estabilidade de expressão de QTLs em diferentes idades de progênies híbridas de *Eucalyptus* (VERHAEGEN et al., 1997); e ainda para analisar a estrutura específica da habilidade de combinação em duas espécies de *Eucalyptus*, dentro do contexto de seleção recorrente recíproca (SRR) (BARIL et al., 1997).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material genético

O material genético utilizado foi 503 matrizes de Eucalipto pertencentes as espécies de *E. grandis* (212) e *E. urophylla* (291) provenientes de testes de progênies, de várias procedências. Estas 503 matrizes de idade variável (Quadro 1 – APÊNDICE), foram selecionadas de delineamentos experimentais na: Fazenda Itabaiana, Município: Açailândia-MA; Latitude: 5° 05` Sul; Longitude: 47° 39` Oeste; Altitude: 260m; Precipitação Média: 1473mm; Temperatura anual: Média Máx. 26,4° C; Média Mín. 24,5° C; Média Geral 25,4° C

Os dados quantitativos Diâmetro a Altura do Peito (DAP) e Altura Total (HT) dos seguintes experimentos foram obtidos:

Experimento (192), de *E. urophylla* var. *plantyphylla*. Delineamento em blocos ao acaso, com 10 repetições, 37 tratamentos, 6 árvores por parcela. Data plantio: janeiro de 1993. - Experimento (290), de diversas fontes nacionais de sementes de *E. urophylla*. Delineamento em blocos ao acaso, com 8 repetições, 30 tratamentos, 9 árvores por parcela. Data de plantio: março de 1991. - Experimento (291), de teste de progênies *E. urophylla* de Teixeira de Freitas-BA (Origem Ilmandiri Mandiri). Delineamento em blocos ao acaso, com 10 repetições, 30 tratamentos, 6 árvores por parcela. Data de plantio: março de 1992. Experimento (391) de teste de progênies *E. urophylla* de

Teixeira de Freitas-BA (Origem Egon e Ilegele). Delineamento em blocos ao acaso, com 10 repetições, 36 tratamentos, 6 plantas por parcela. Data de plantio: março de 1992.

Das 503 árvores matrizes foram coletadas folhas sadias, acondicionadas em isopor com gelo ou desidratadas em estufa ventilada, a temperatura de 42°C por 24 horas, embaladas em saco de papel e posteriormente enviadas ao Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos/BIOAGRO - UFV, para estocagem a - 10° C e posterior extração de DNA total.

### **3.2. Extração e quantificação do DNA total**

A extração de DNA total de folhas de eucalipto foi feita de acordo com o método descrito por DOYLE e DOYLE (1990), com modificações. Cerca de 50 mg de folhas desidratadas ou 150 mg de folhas verdes foram maceradas em nitrogênio líquido até o estado de pó. O material foi transferido para tubo Eppendorf e adicionado 650 µL de tampão de extração contendo: CTAB 2 %; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM, pH 8,0; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; PVP 1 % e β-mercaptoetanol 1 % (conforme Quadro 4 no APENDICE) previamente aquecido a 65°C. Os tubos foram incubados a 65°C por 30 minutos. Após a incubação foi adicionado um volume de clorofórmio-álcool isoamílico ( 24:1 ), os tubos foram agitados levemente por 10 minutos e centrifugados a 6.000g por 10 minutos. Na fase aquosa foi feita nova extração com clorofórmio-álcool isoamílico. À nova fase aquosa foi adicionado um volume de isopropanol, seguido de incubação por duas horas a -20°C. O material foi centrifugado a 6.000g por 30 minutos e o sedimento lavado com etanol 70%, seco sob vácuo e ressuspenso em 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM, pH 8,0) contendo 10 µg de RNase. Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos.

A concentração de DNA total foi estimada, comparando-se com DNA de concentração conhecida, por eletroforese em gel de agarose 0,8% e brometo de etídio a 0,2 µg/mL. Para a visualização do DNA, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta com máquina Polaroid MP4 ou as imagens digitalizadas em um sistema de vídeo Eagleye™ (Stratagene®).

### 3.3. Análise de marcadores RAPD.

As reações de amplificação foram feitas em um volume de 25µL, contendo Tris-HCl 10mM, pH 8,0; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5mM; 0,1mM de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP - Promega®); 0,4 µM de um oligonucleotídeo de 10 nucleotídeos - Operon®; 25 ng de DNA e 1 unidade de Taq DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em um termociclador “Programmable Thermal Controller - 100”, programado para 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e um minuto a 72°C. Após o último ciclo, uma etapa de 7 minutos a 72°C.

Para as análises RAPD das 503 matrizes foram utilizados 6 oligonucleotídeos (Quadro 1).

Para a segunda análise de RAPD foram utilizadas 127 matrizes sendo 57 de *E. grandis* e 70 de *E. urophylla*, e foram utilizados 11 oligonucleotídeos iniciadores conforme Quadro 2.

Terminada a amplificação, foi adicionado 5 µL de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol e 60% de glicerol) em cada tubo e o seu conteúdo analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio 200 ng/mL, em tampão TEB 1X ( Tris-borato 0,09M e EDTA 0,002 M ) por 4 horas a 100 volts. O DNA do bacteriófago lambda, clivado com as enzimas de restrição *Bam* HI, *Eco* RI e *Hind* III, ou o plasmídeo pUC 18 clivado com as enzimas *Rsa* I e *Hinf* I foram utilizado como padrão de tamanho de fragmentos de DNA. Após a corrida eletroforética, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, utilizando câmera Polaroid MP4 ou as imagens foram digitalizadas em um sistema de vídeo Eagleye™ (Stratagene®).

Quadro 1 – Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para análise por RAPD de 503 matrizes de *E. grandis* e *E. urophylla*.

<b>OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR Código da Operon®</b>	<b>SEQUÊNCIA DE BASES 5' → 3'</b>
OPF03	CCTGATCACC
OPF05	CCGAATTCCC
OPF07	CCGATATCCC
OPF19	CCTCTAGACC
OPE06	AAGACCCCTC
OPE08	TCACCACGGT

Quadro 2 – Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para análise por RAPD de 127 matrizes de *E. grandis* e *E. urophylla*.

<b>OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR Código da Operon®</b>	<b>SEQUÊNCIA DE BASES 5' → 3'</b>
OPF 01	ACGGATCCTG
OPF 02	GAGGATCCCT
OPF 09	CCAAGCTTCC
OPF 12	ACGGTACCAG
OPF 14	TGCTGCAGGT
OPF 16	GGAGTACTGG
OPE 01	CCCAAGGTCC
OPE 03	CCAGATGCAC
OPE 14	TGCGGCTGAG
OPE 15	ACGCACAACC
OPE 16	GGTGACTGTG

### 3.5. Análise dos dados moleculares

Os dados gerados pela amplificação do DNA total por RAPD foram analisados utilizando o programa GENES (CRUZ 1997). As distâncias genéticas foram calculadas entre os pares, utilizando o índice de similaridade de Jaccard (JACCARD, 1908), segundo a expressão:

$$d_{ii'} = 1 - S_{ii'} \times 100$$

em que

$d_{ii'}$  é a distância genética entre os genótipos  $i$  e  $i'$

$S_{ii'}$  é o Índice de Similaridade de Jaccard, onde

$$S_{ii'} = \frac{a}{a+b+c} \quad \text{sendo}$$

$a$  : número de bandas presentes nos dois genótipos analisados;

$b$  : número de bandas polimórficas presentes apenas no genótipo  $i$ ;

$c$  : número de bandas polimórficas presentes apenas no genótipo  $i'$ .

As estimativas de Distâncias Genéticas foram decompostas nas Médias das Distâncias Genética e Distâncias Específicas.

em que

$DG_{ij}$  = estimativa de Distância Genética entre os progenitores  $i$  e  $j$ ;

$DGG_i$  = Distância Genética Geral do progenitor  $i$  em relação aos demais;

$DGG_j$  = Distância Genética Geral do progenitor  $j$ ;

As matrizes contendo as distâncias genéticas por marcadores RAPD das espécies de *E. grandis* e *E. urophylla* foram utilizadas para formar um dendrograma usando programa STATÍSTICA (StatSoft, 1995). O agrupamento de Tocher utilizando a matriz de distância genética por RAPD dos 127 genitores das duas espécies foi feito utilizando o programa GENES (CRUZ, 1997).

### 3.5. Dados quantitativos

As características mensurados em campo foram: altura total (Ht), diâmetro a altura do peito (DAP) e incremento médio anual (IMA). Com base nos dados foi feita a análise de variância para os experimentos 290, 291 e 192 utilizando o programa genes, conforme descrito por CRUZ e REGAZZI (1994).

A fórmula para obtenção do IMA foi:

$$\text{IMA} = \frac{\text{Volume total em m}^3/\text{ha}}{\text{Idade}}$$

#### 3.5.1. Análise de variância e estimativas de parâmetros genéticos.

A hipótese de existência de variabilidade genética significativa entre as progênes amostradas da população foi testada, sendo  $H_0 : \sigma_g^2 = 0$ . Foi tomada a média das parcelas para as características métricas (DAP, altura e IMA) e a sobrevivência final da parcela, considerando-se os delineamentos para o qual foi feita a análise de divergência genética usando os dados quantitativos. O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + b_j + \varepsilon_{ij} + d_{ijk}$$

em que:

$Y_{ijk}$  = observação na planta k, da progênie i no bloco j;

$\mu$  = média geral;

$g_i$  = efeito da progênie i ( $i = 1, 2, \dots, g$ ),  $g_i \sim \text{NID}(0, \sigma_g^2)$  independentes;

$b_j$  = efeito do bloco j ( $j = 1, 2, \dots, b$ ),  $b_i \sim \text{NID}(0, \sigma_b^2)$  independentes; e

$\varepsilon_{ij}$  = efeito da variação entre parcelas, em que  $\varepsilon_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$ .

$d_{ijk}$  = efeito da variação entre plantas dentro de parcelas ( $k = 1, 2, \dots, n$ ),

em que  $d_{ijk} \sim \text{NID}(0, \sigma_d^2)$ .

O esquema de análise da variância e as esperanças matemáticas dos quadrados médios são apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 - Análise de variância para o delineamento em blocos casualizados.

<b>F. V.</b>	<b>G. L.</b>	<b>Q. M.</b>	<b>E (Q. M.)</b>
Blocos	b - 1	QMB	$\sigma_d^2 + n\sigma_e^2 + gn\sigma_b^2$
Progênes	g - 1	QMP	$\sigma_d^2 + n\sigma_e^2 + bn\sigma_g^2$
Entre parcelas	(b-1)(g-1)	QME	$\sigma_d^2 + n\sigma_e^2$
Dentro de parcelas	bg (n - 1)	QMD	$\sigma_d^2$

QMB = Quadrado médio de bloco;

QMP = Quadrado médio de progênes;

QME = Quadrado médio do efeito ambiental entre parcelas;

QMD = Quadrado médio entre plantas dentro de parcelas;

Os estimadores dos parâmetros genéticos:

a) Variância fenotípica:

$$\hat{\sigma}_f^2 = \frac{QMP}{bn}$$

em que:

$\hat{\sigma}_f^2$  = é a estimativa da variância fenotípica entre médias das progênes;

b) Variância genotípica:

$$\hat{\sigma}_g^2 = \frac{QMP - QME}{bn} = \frac{1}{4} \hat{\sigma}_A^2$$

em que:

$\hat{\sigma}_g^2$  = é a estimativa da variância genotípica entre as médias das progênes; e

$\hat{\sigma}_A^2$  = é a estimativa da variância genética devida aos efeitos aditivos.

c) Variância ambiental:

$$\sigma_e^2 = \frac{QME}{n}$$

d) Variância fenotípica entre plantas dentro de parcelas

$$\sigma_d^2 = QMD$$

e) Herdabilidade em sentido restrito:

$$h^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_f^2} = \frac{1/4 \hat{\sigma}_A^2}{\hat{\sigma}_f^2}$$

f) Coeficiente de variação genotípica:

$$CV_g = \frac{100\hat{\sigma}_g}{\bar{X}}$$

$\bar{X}$  = é a estimativa da média geral da característica.

g) Coeficiente de variação experimental:

$$CV_e = 100 \frac{\sqrt{QME}}{\bar{X}}$$

### 3.5.2. Distância genética e agrupamento dos genótipos

As variáveis quantitativas mensuradas foram utilizadas para obtenção da Distância Média Euclidiana, como medida de dissimilaridade conforme descrito por CRUZ e REGAZZI (1994) usando-se o programa GENES (CRUZ, 1997). A matriz de dissimilaridade, obtida pelo cálculo das Distâncias Médias Euclidianas, foi utilizada para agrupar os genótipos pelo método de Tocher, também utilizando o programa GENES (CRUZ, 1997).

Para análise de diversidade genética dos dados quantitativos foi usada a distância Euclidiana média, utilizando as características DAP, Ht e IMA, dada pela fórmula:

$$d_{ij} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_j (x_{ij} - x_{ij})^2}$$

Onde:

$d_{ij}$  é a distância Euclidiana média entre o progenitor “i” e o progenitor “j”;

n é o número de caracteres avaliados;

$x_{ij}$  é a observação do i-ésimo progenitor em relação ao j-ésimo caráter.

Com base na matriz de dissimilaridade considerando as características quantitativas, foi aplicado o mesmo método de agrupamento para os dados moleculares.

Os valores de distâncias genética entre os genótipos utilizando marcadores moleculares e IMA foram utilizados para recomendar um sistema de cruzamento em dialelo parcial circulante de modo a priorizar os maiores valores de diversidade genética entre pares de cruzamento.

O esquema de dialelo parcial circulante segue o algoritmo estabelecido por KEMPTHORNE e CURNOW (1961) (Quadro 4).

$p$  = é o número de progenitores a serem estudados;

$s$  = é o número de combinações híbridas de cada progenitor,  $s < p-1$  e  $s \geq 3$ ;

onde:  $\frac{ps}{2}$  número total de cruzamentos;

$k = \frac{(p+1-s)}{2}$  é número inteiro.

$k$  define o primeiro cruzamento do progenitor  $i$ .

Os cruzamentos  $ij$  são definidos por meio de:

$i = 1, 2, \dots, p$

$j = k + i, k + i + 1, \dots, k + i - 1 + s$

Os valores de  $j$  acima de  $p$  devem ser reduzidos por múltiplos de  $p$  de tal forma que  $i \leq j \leq p$ .

Quadro 4 - Esquema do Dialelo Parcial Circulante envolvendo as combinações entre as matrizes mais divergentes , com base nas análises moleculares.

GU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1					X	X	X			
2						X	X	X		
3							X	X	X	
4								X	X	X
5	X								X	X
6	X	X								X
7	X	X	X							
8		X	X	X						
9			X	X	X					
10				X	X	X				

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Diversidade entre 503 matrizes de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* utilizando marcadores RAPD.

A extração de DNA total das 503 amostras coletadas em Acailândia-Ma utilizando folhas desidratadas, apresentou um baixo rendimento e em aproximadamente 50% das amostras não foi possível obter uma boa preparação de DNA total, o que demandou nova coleta de folhas e transporte em gelo. Estes problemas devem estar associados com o tempo gasto no campo para a coleta das folhas e o transporte até a estufa de secagem para efetuar a desidratação.

As Figuras 1 e 2 mostram o padrão de amplificação de DNA de 116 das matrizes analisadas. Pode-se observar que oligonucleotídeo OPE06 evidenciou um baixo polimorfismo (Figura 1) e o oligonucleotídeo OPF03 (Figura 2) alto polimorfismo.

Foram analisadas 26 bandas polimórficas, para os 503 genótipos, e a dissimilaridade foi expressa pelo complemento aritmético do coeficiente de Jaccard. A menor distância genética observada foi de 0%, e a maior de 84%.

Os dados gerados contendo as distâncias genéticas entre os genótipos analisados podem ser apresentados na forma de lista com as distâncias genéticas ou matriz quadrada (Quadros 5 e 6).

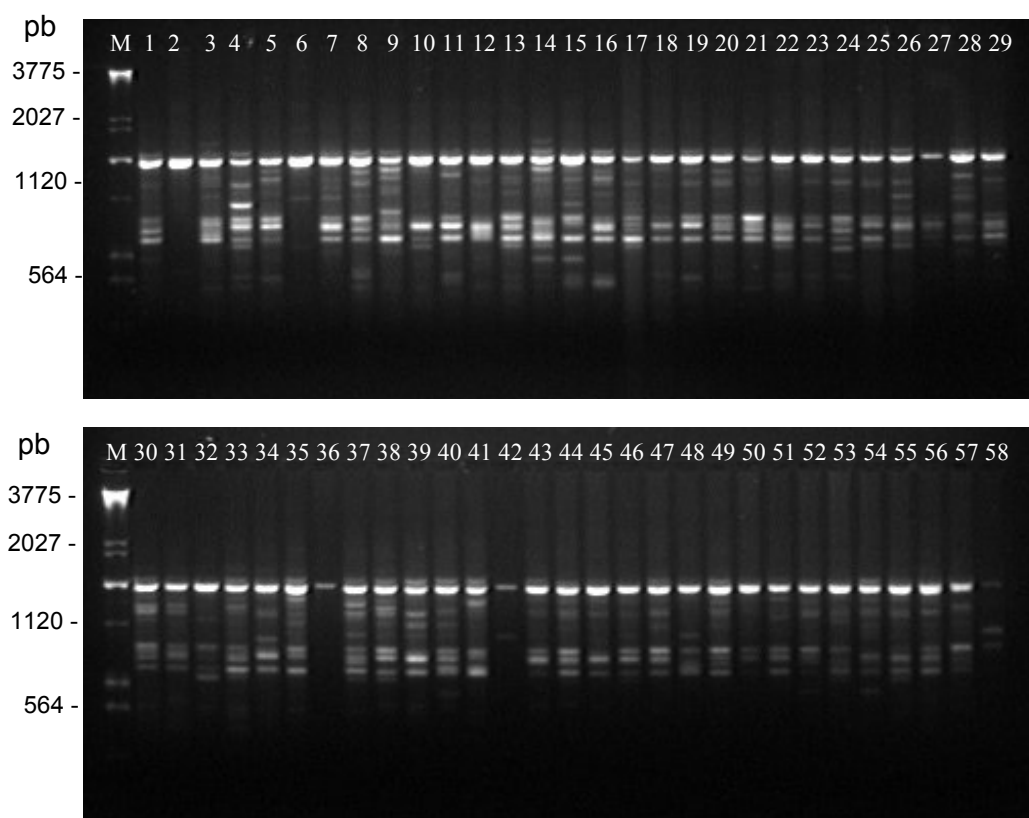


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% do DNA total de 58 genótipos de *Eucalyptus* amplificado por RAPD, utilizando o oligonucleotídeo OPE06. Os genótipos 1 – 58 correspondem as amostras de 59 a 116 (no Quadro 1 - APÊNDICE). M é o DNA do fago  $\lambda$ , clivado com a enzima *Hind* III e o plasmídeo pUC18 clivado com as enzimas *Hinf* I e *Rsa* I.

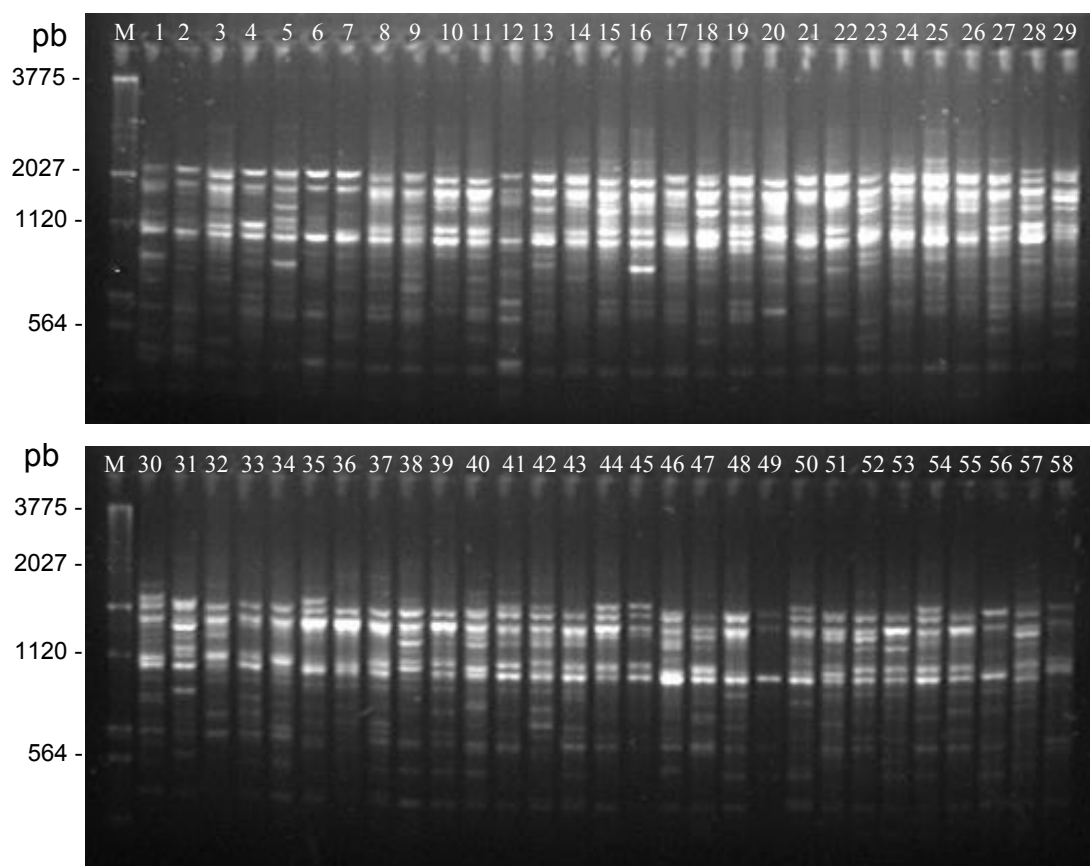


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% do DNA total de 58 genótipos de *Eucalyptus* amplificado por RAPD, utilizando o oligonucleotídeo OPf03. Os genótipos 1 – 58 correspondem as amostras de 407 a 464 (no Quadro 1 - APÊNDICE). M é o DNA do fago  $\lambda$ , clivado com a enzima *Hind* III e o plasmídeo pUC18 clivado com as enzimas *Hinf* I e *Rsa* I.

Quadro 5 – Lista parcial das distâncias genética obtida a partir das análises por maracdores RAPD, para 503 matrizes de *E. grandis* e *E. urophylla* (identificação de acordo com o Quadro 1 - APÊNDICE).

Acessos	A(1-1)	B(1-0)	C(0-1)	D(0-0)	Distâncias
1-2	3	1	3	2	0,400
1-3	4	0	2	3	0,200
1-4	3	1	3	2	0,400
1-5	4	0	1	4	0,111
1-6	2	0	1	3	0,200
1-7	1	1	0	4	0,333
1-8	3	1	2	3	0,333
1-9	3	1	2	3	0,333
1-10	2	0	2	2	0,333
1-11	3	1	2	3	0,333
1-12	3	1	2	3	0,333
1-13	2	0	1	3	0,200
1-14	3	1	2	3	0,333
1-15	3	1	2	3	0,333
1-16	3	1	0	5	0,143
1-17	3	1	1	4	0,250
1-18	2	0	0	4	0,000
1-19	3	1	2	3	0,333
1-20	3	1	0	5	0,143
.....	...	...	...	...	...
497-503	8	1	1	5	0,111
498-499	7	1	1	1	0,125
498-500	10	1	4	3	0,200
498-501	3	1	0	1	0,143
498-502	7	2	2	4	0,222
498-503	7	2	2	4	0,222
499-500	7	1	1	1	0,125
499-501	2	1	1	1	0,333
499-502	5	1	1	0	0,167
499-503	6	0	0	1	0,000
500-501	2	1	1	1	0,333
500-502	8	5	1	1	0,273
500-503	9	4	0	2	0,182
501-502	2	0	0	0	0,000
501-503	1	1	0	0	0,333
502-503	6	3	3	3	0,333

Quadro 6 – Matriz quadrada parcial das distâncias genéticas obtidas a partir da análise por marcadores RAPD, para 503 matrizes de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* (identificação de acordo com o Quadro 1 - APÊNDICE).

	1	2	3	4	5	6	7	...	499	500	501	502	503
1		0,4	0,2	0,4	0,1	0,2	0,3	...	0,14	0,14	0,14	0	0,3
2			0,3	0,24	0,24	0,47	0,8	...	0,5	0,3	0	0,42	0,46
3				0,25	0,28	0,4	0,75	...	0,2	0,23	0,14	0,26	0,47
4					0,4	0,41	0,75	...	0,28	0,33	0	0,33	0,44
5						0,5	0,66	...	0,38	0,33	0,14	0,41	0,52
6							0,5	...	0,33	0,5	0	0,2	0,6
7									0	0,71	0,33	0,5	0,5
...								...	...	...	...	...	...
499									0	0,12	0,33	0,16	0
500										0	0,33	0,27	0,18
501											0	0	0,33
502												0	0,33
503													0

O resultado desta primeira análise reflete a dificuldade de se trabalhar com grande número de amostras, no qual a interpretação dos dados é dificultada pela utilização do dendrograma de agrupamento hierárquico. Uma possibilidade de análise é o uso da técnica de agrupamento de otimização Tocher, que utiliza como princípio a construção de grupos mutuamente exclusivos. Neste sentido a estratégia que foi adotada é a utilização da média das distâncias genéticas de cada indivíduo com os demais. Este valor reflete a diversidade genética, com elevados valores médios de distância genética, que indicam maior heterogeneidade individual.

Foi feita a seleção de 127 matrizes (70 progenitores de *E. urophylla* e 57 de *E. grandis*) com base na média das distâncias genéticas geradas a partir da amplificação do DNA total por RAPD e Incremento Médio Anual (IMA). O IMA reflete o desenvolvimento do povoamento considerando a variação anual, desta forma famílias com maior número de falhas ou morte têm um decréscimo no valor do IMA. Assim as 127 matrizes selecionadas são aquelas de maiores valores de IMA e de maiores médias de distâncias genéticas (Quadro 3 do APÊNDICE).

#### **4.2. Análise de 127 matrizes de *E. grandis* e de *E. urophylla* utilizando marcadores moleculares RAPD**

Na análise dos 127 genótipos de *Eucalyptus* por meio de RAPD foram utilizados 11 oligonucleotídeos, sendo observados um total de 74 fragmentos de DNA polimórficos (Quadro 7). O Quadro 7 mostra o número de fragmentos de DNA polimórficos analisados pela amplificação com cada oligonucleotídeo, e o número de fragmentos de DNA amplificados variou de 4 a 9, com uma média de 6,72 fragmentos de DNA por oligonucleotídeo. A Figura 3 mostra o padrão de amplificação de DNA total de algumas matrizes, com os oligonucleotídeos OPF09 e OPE01, sendo que no caso do OPF09 foi observado um menor polimorfismo.

Quadro 7 – Número de fragmentos de DNA utilizados para análise RAPD das 127 amostras de *Eucalyptus* e a média de fragmentos de DNA analisados por nucleotídeos.

<b>Oligonucleotídeos - Código da Operon®</b>	<b>Fragmentos RAPD analisados por Oligonucleotídeos</b>
OPF 01	5
OPF 02	9
OPF 09	7
OPF 12	8
OPF 14	5
OPF 16	9
OPE 01	8
OPE 03	4
OPE 14	8
OPE 15	4
OPE 16	7
Média	6,72

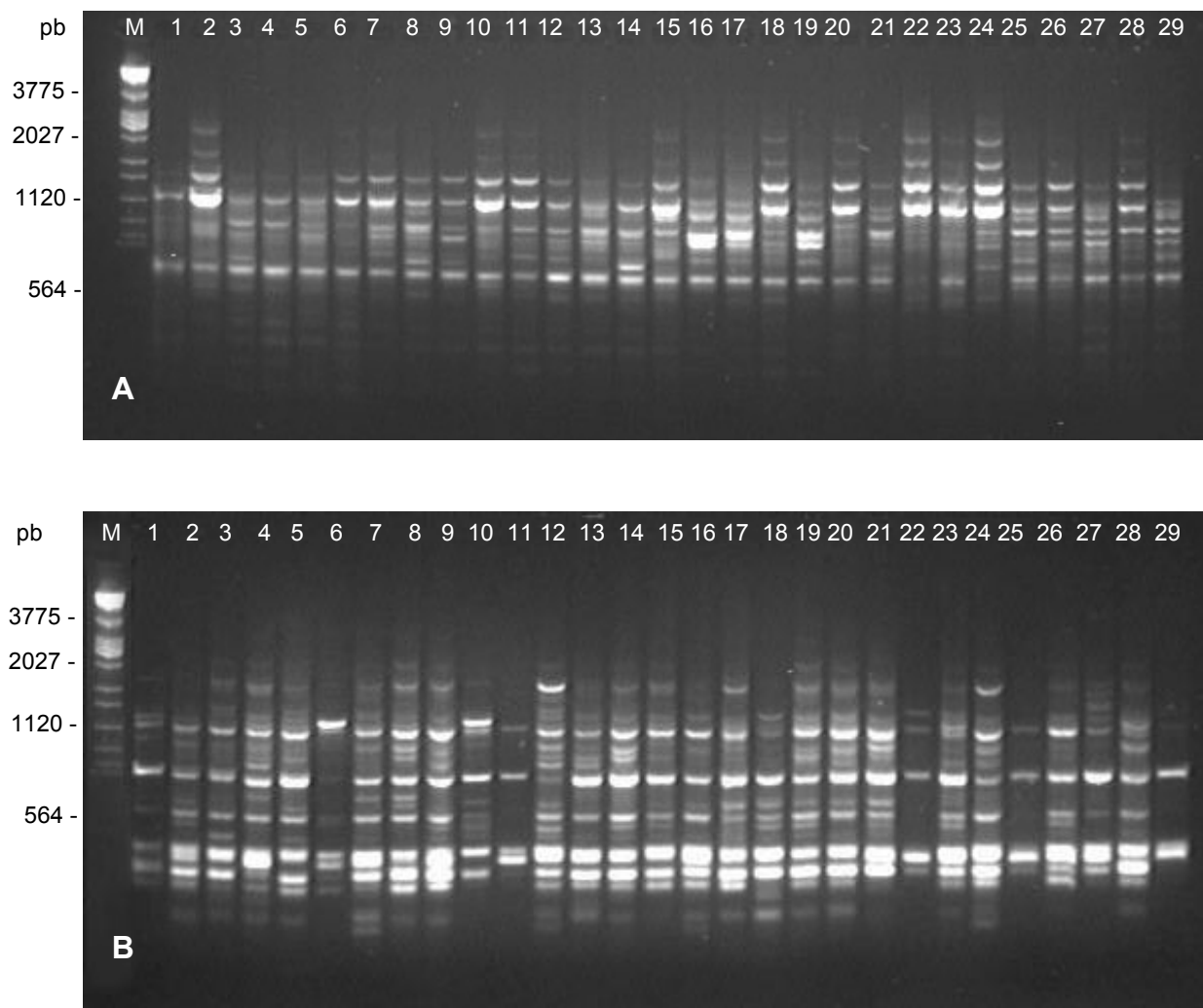


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% do DNA de 29 Matrizes de *Eucalyptus* amplificado por RAPD, utilizando o oligonucleotídeo OPF09 (A) e OPE01 (B). A ordem dos genótipos está de acordo com o Quadro 2 - APÊNDICE. M é o DNA do fago  $\lambda$ , clivado com as enzimas *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III.

A codificação em 0 ou 1 destes fragmentos foi utilizada para gerar uma matriz de distância genética para cada espécie, pelo complemento aritmético do índice de Jaccard, utilizando o programa GENES (CRUZ, 1994). A menor distância genética considerando as matrizes de ambas as espécies (*E. grandis* e *E. urophylla*), foi de 10,9% entre os genótipos G278 de Mount Spurgion e G279 de Woodum Kangaroo River - WWSA (Quadro 2 – APÊNDICE). A maior distância genética foi de 82,6%, obtida com os genótipos U23 de Anhembí T10B71 ilhas próximas de Flores e U433 sem identificação de procedência mas *E. urophylla* var. *plantyphylla* (Quadro 2 – APÊNDICE).

Considerando os genótipos de *E. grandis* a menor distância continua sendo 10,9% entre os genótipos G278 (Mount Spurgion) e G279 (Woodum Kangaroo River – WWSA), e a maior distância de 70,8% entre os genótipos G198 de Woodum Kangaroo River - WWSA e G226 Aracruz - ES - origem de Mount Speac (Quadro 2 – APÊNDICE). Para *E. urophylla* a maior distância continua sendo 82,6%, obtida com os genótipos U23 e U433, e a menor de 12,5% entre os genótipos U120 de Aradetung Flores e U129 de Lewotobi Flores (Quadro 2 – APÊNDICE).

Com base na matriz de distâncias genéticas foi feita a análise de agrupamento pelo método hierárquico (UPGMA) para cada espécie, sendo possível identificar os grupos mais homogêneos (Figura 4 e 5). Entretanto a análise considerando o dendrograma é subjetiva, por isto, outros tipos de análises, como o método de otimização de Tocher, o qual prioriza a dissimilaridade entre os grupos, podem ser utilizados. Este tipo de análise, permite formar grupos mutuamente exclusivos, a partir da matriz de distância genética, o que facilita a decisão de seleção dos genótipos. Deste modo, foi feita a análise de agrupamento por Tocher utilizando a matriz de distâncias genéticas, considerando os 127 genótipos, sendo possível a detecção de 9 grupos como mostra o Quadro 8.

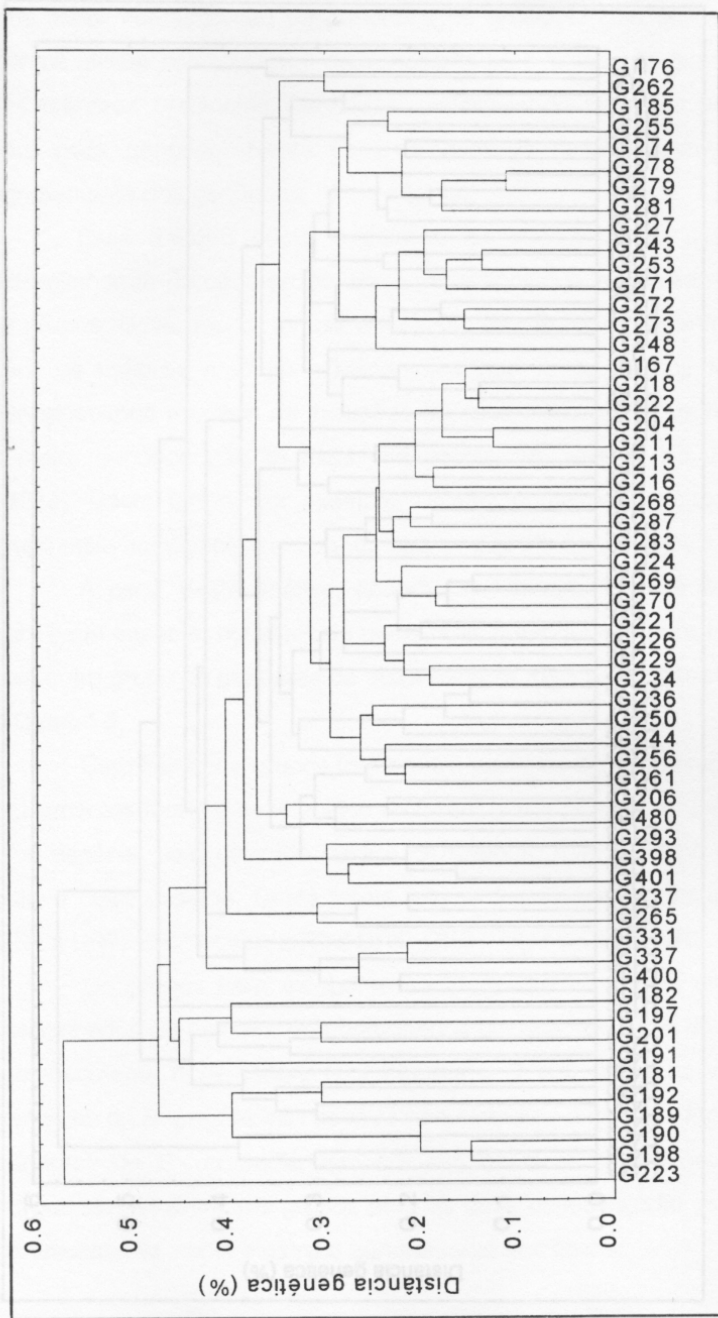


Figura 4 - Dendrograma de agrupamento com base nas análises por marcadores RAPD, para matrizes selecionadas de *E. grandis*, pelo método UPGMA. Os números correspondem à identificação do Quadro 2A - APÊNDICE.

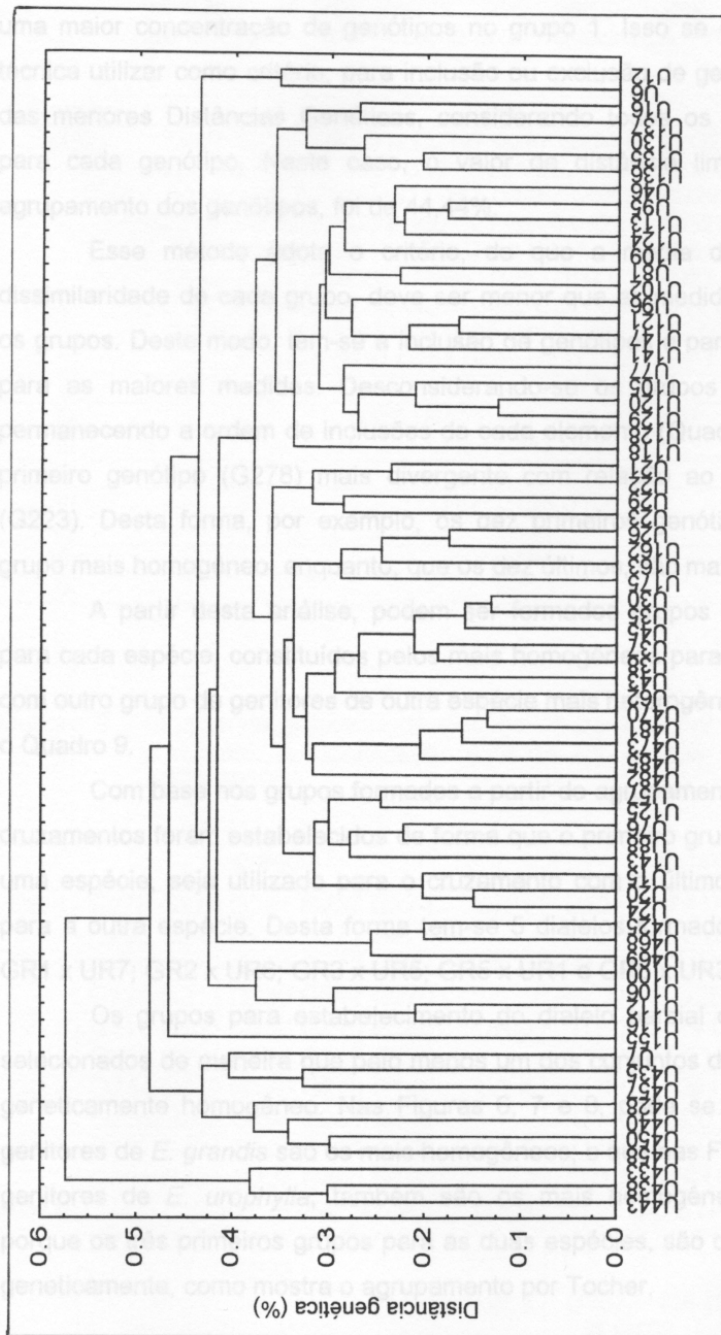


Figura 5 - Dendrograma de agrupamento com base nas análises por marcadores RAPD, para matrizes selecionadas de *E. urophylla* pelo método UPGMA. Os números correspondem à identificação do Quadro 2A – APÊNDICE.

Os resultados da análise pelo método de Tocher mostram que ocorre uma maior concentração de genótipos no grupo 1. Isso se deve ao fato da técnica utilizar como critério, para inclusão ou exclusão de genótipos a maior das menores distâncias genéticas, considerando todos os possíveis pares para cada genótipo. Neste caso o valor de distância limite utilizado no agrupamento dos genótipos foi de 44,44%.

Este método adota o critério de que a média das medidas de dissimilaridade de cada grupo deve ser menor que as medidas médias entre os grupos. Deste modo tem-se a inclusão de genótipos a partir das menores medidas para as maiores. Desconsiderando-se os grupos formados, mas permanecendo a ordem de inclusões de cada elemento (Quadro 8 ), tem-se o primeiro genótipo (G278) mais divergente com relação ao último genótipo (G223), desta forma, por exemplo, os dez primeiros genótipos formam um grupo mais homogêneo, enquanto, que os dez últimos os mais heterogêneos.

A partir desta análise podem ser formados grupos de 10 genitores para cada espécie, constituídos pelos mais homogêneos para formar o dialelo com outro grupo de genitores da outra espécie, mais heterogêneo, como mostra o Quadro 9.

Com base nos grupos formados a partir do agrupamento de Tocher, os cruzamentos foram estabelecidos de forma que o primeiro grupo formado para uma espécie, seja utilizado para o cruzamento com o último grupo formado para a outra espécie. Desta forma tem-se 5 dialelos formados pelos grupos: GR1 x UR7; GR2 x UR6; GR3 x UR5; GR5 x UR1 e GR6 x UR3.

Os grupos para estabelecimento do dialelo parcial circulante foram selecionados de maneira que pelo menos um, dos conjunto de genitores seja geneticamente homogêneo. Nas Figuras 6, 7 e 8, pode se verificar que os genitores de *E. grandis* são os mais homogêneos; e que nas Figuras 9 e 10, os genitores de *E. urophylla*, também são os mais homogêneos. Isso ocorre porque os três primeiros grupos para as duas espécies são os mais próximos geneticamente como mostra o agrupamento por Tocher.

Quadro 8 – Grupos formados a partir da matriz de distância genética de 127 genitores de *Eucalyptus* pelo agrupamento de Tocher. A identificação está de acordo com o Quadro 2 – APÊNDICE.

Grupo	Genótipos
I	G278 G279 G281 U121 U147 G287 G274 G253 G243 G255 G271 G227 G256 G273 U470 U481 G234 G222 U35 G204 G224 G213 G226 G211 G270 G218 G167 G283 G216 G268 U76 G269 U57 U88 U37 G221 G250 G236 G229 U30 U45 G244 U473 U46 G272 U24 U485 U38 G176 U162 U26 U141 U81 U113 U124 U20 U125 U77 U143 U129 G248 U128 U102 U95 G185 U135 U109 U105 U21 U15 U118 U16 U137 U468 G206 U96 G262 U482 U22 G293 U112 U43 U120 G261 U12 U175 U62 G398 U29 U163 U116 U425 U130 G337 G480 G197 U428 G181 G265 U469 G331 G401 G237 G400
II	G190 G198 G189 G192
III	U450 U458 U440 U435 U7 U457
IV	U438 U443 U433
V	G201 U23 G182 U6
VI	U106 U136 U100
VII	U155
VIII	G191
IX	G223

Quadro 9 – Grupos de genitores de *Eucalyptus* para formar o dialelo parcial circulante. A identificação está de acordo com o Quadro 2 – APÊNDICE.

<i>E. grandis</i>			<i>E. urophylla</i>		
GR 1	G278 G279 G281 G287 G274 G253 G243 G255 G271 G227	UR 1	U121 U174 U470 U481 U35 U76 U57 U88 U37 U30		
GR 2	G256 G273 G234 G222 G204 G224 G213 G226 G211 G270	UR 2	U45 U473 U46 U24 U485 U38 U162 U26 U141 U81		
GR 3	G218 G167 G283 G216 G268 G269 G221 G250 G236 G229	UR 3	U113 U124 U20 U125 U77 U143 U129 U128 U102 U95		
GR 4	G244 G272 G176 G248 G185 G206 G262 G293 G261 G398	UR 4	U135 U109 U105 U21 U15 U118 U16 U137 U468 U96		
GR 5	G337 G480 G197 G181 G265 G331 G401 G237 G400 G190	UR 5	U482 U22 U112 U43 U120 U12 U175 U62 U29 U163		
GR 6	G237* G400* G190* G198 G189 G192 G201 G182 G191 G223	UR 6	U116 U425 U130 U428 U469 U450 U458 U440 U435 U7		
		UR 7	U457 U438 U443 U433 U23 U6 U106 U136 U100 U155		

\* Genótipos pertencentes ao grupo G5 incluídos no grupo G6.

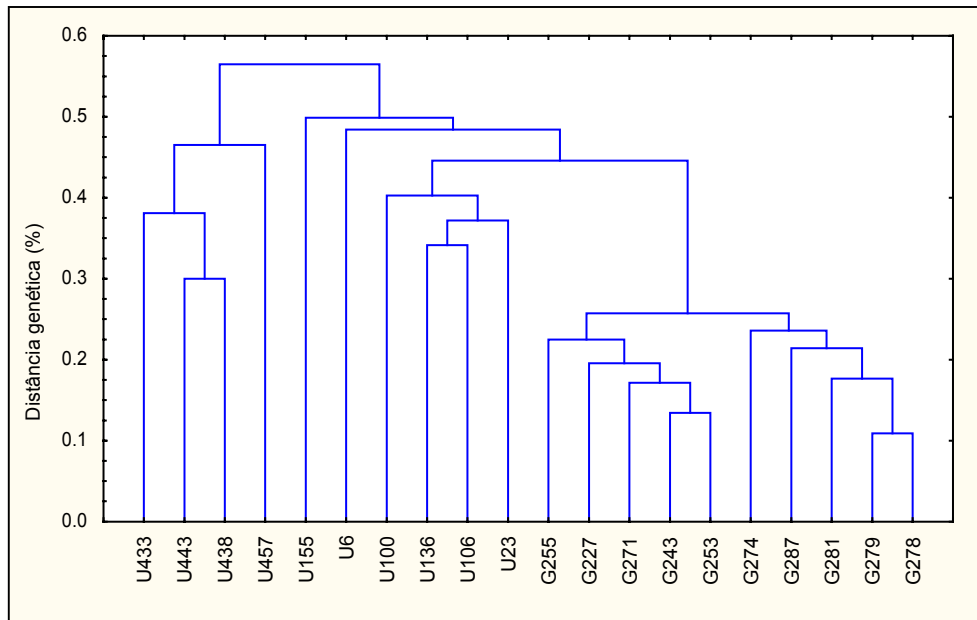


Figura 6 - Dendrograma do agrupamento com base na análise por marcadores RAPD, para matrizes selecionadas de *E. grandis* e *E. urophylla* do diallelo montado pelos genitores do GR1 x UR7, pelo método UPGMA. A identificação está de acordo com o Quadro 2 – APÊNDICE.

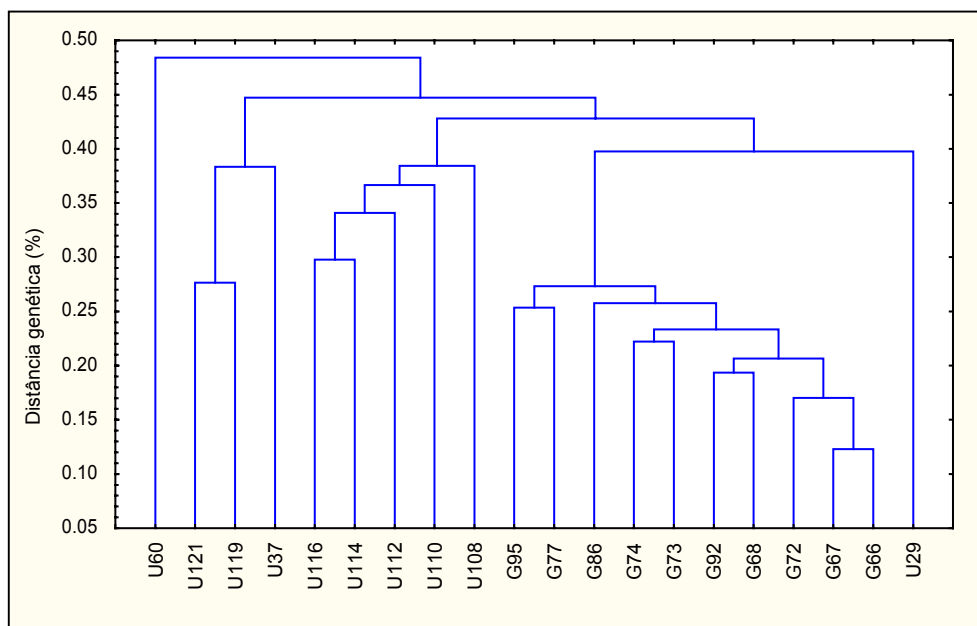


Figura 7 - Dendrograma do agrupamento com base na análise por marcadores RAPD, para matrizes selecionadas de *E. grandis* e *E. urophylla* do diallelo montado pelos genitores do GR2 x UR6, pelo método UPGMA. A identificação está de acordo com o Quadro 2 – APÊNDICE.

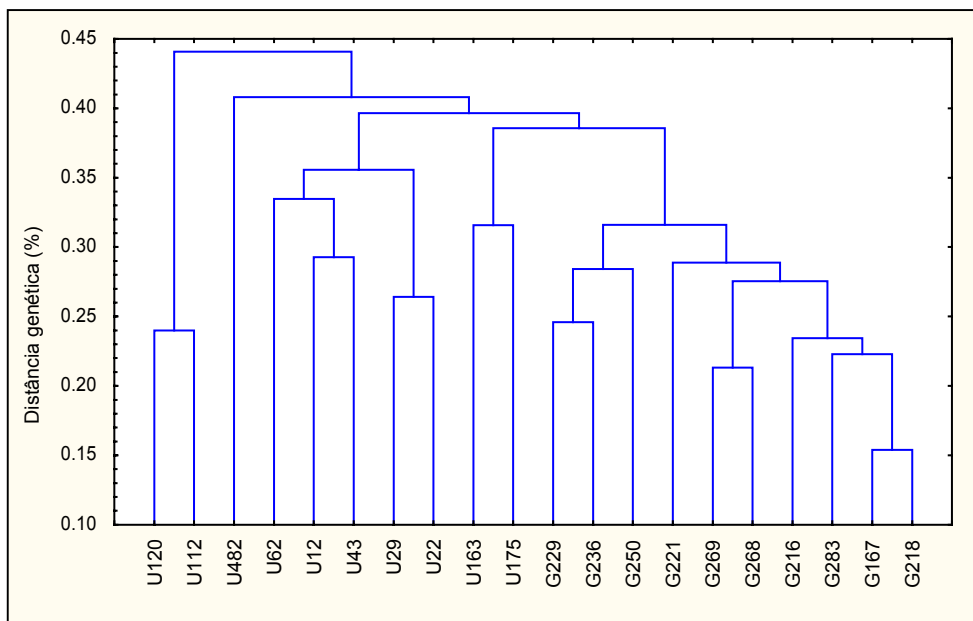


Figura 8 - Dendrograma do agrupamento com base na análise por marcadores RAPD, para matrizes selecionadas de *E. grandis* e *E. urophylla* do diallelo montado pelos genitores do GR3 x UR5, pelo método UPGMA. A identificação está de acordo com o Quadro 2 – APÊNDICE.

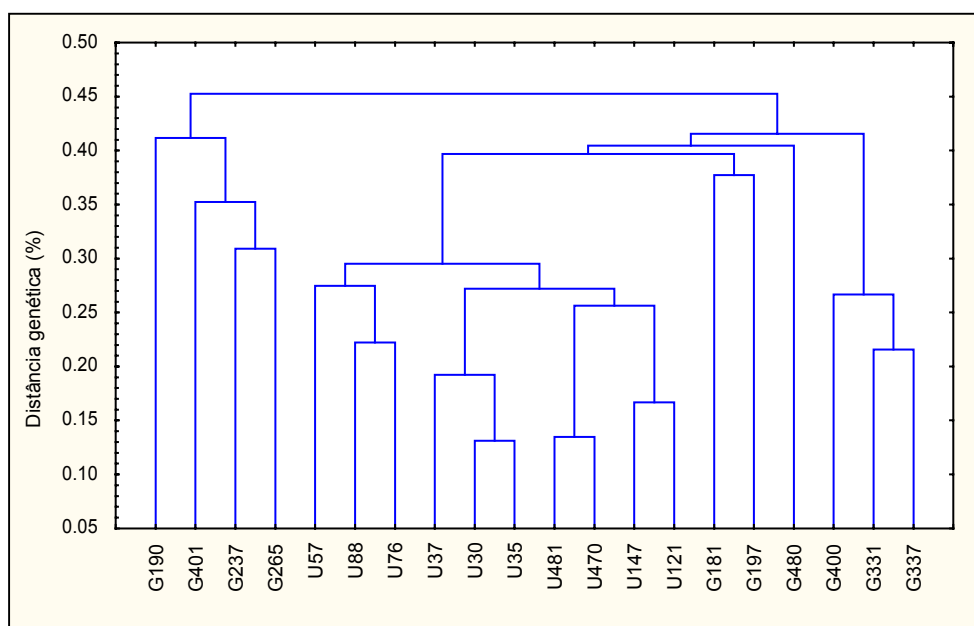


Figura 9 - Dendrograma do agrupamento com base na análise por marcadores RAPD, para matrizes selecionadas de *E. grandis* e *E. urophylla* do diallelo montado pelos genitores do GR5 x UR1, pelo método UPGMA. A identificação está de acordo com o Quadro 2 – APÊNDICE.

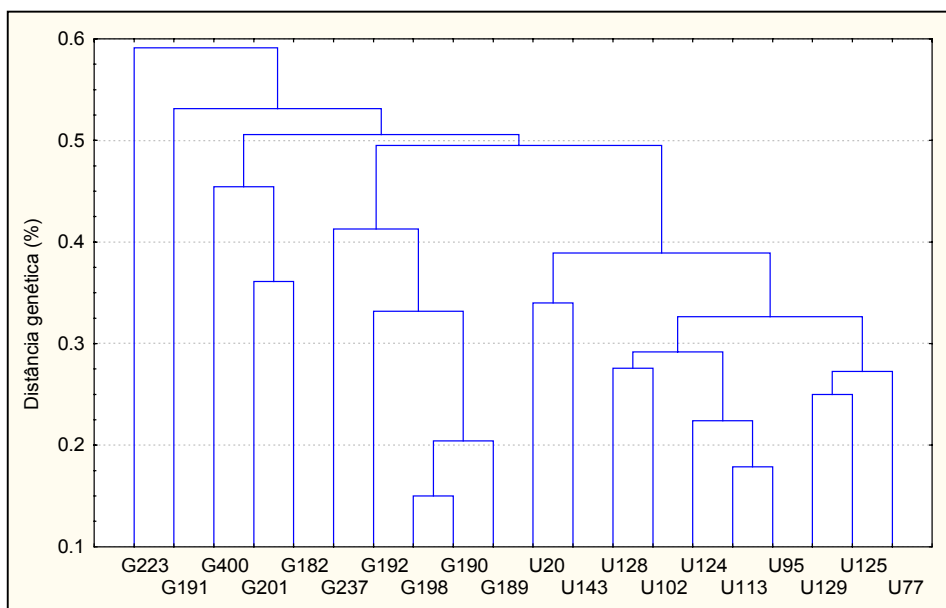


Figura 10 - Dendrograma do agrupamento com base na análise por marcadores RAPD, para matrizes selecionadas de *E. grandis* e *E. urophylla* do dialelo montado pelos genitores do GR6 x UR3, pelo método UPGMA. A identificação está de acordo com o Quadro 2 – APÊNDICE.

A homogeneidade dos grupos na montagem do dialelo permite a priorização da divergência entre os possíveis cruzamentos possibilitando combinações mais heteróticas.

Com base nestes dados foram montados os dialelos, considerando a ordem de cruzamento estabelecida pelo algoritmo descrito por KEMPTHORNE e CURNOW (1961). Assim, para cada progenitor foi estabelecido o número de 3 cruzamentos com o outro grupo de progenitores, como mostra o Quadro 10.

Quadro 10 - Esquema do dialelo parcial circulante envolvendo os genitores de *E. grandis* e *E. urophylla*, respectivamente do grupo GR1 e UR7. A identificação está de acordo com o Quadro 2 – APÊNDICE.

GIU	U457	U438	U443	U433	U23	U6	U106	U136	U100	U155
G278								X	X	X
G279	X								X	X
G281	X	X								X
G287	X	X	X							
G274		X	X	X						
G253			X	X	X					
G243				X	X	X				
G255					X	X	X			
G271						X	X	X		
G227							X	X	X	

### **4.3. Análises de dados silviculturais**

#### **4.3.1. Análise de Variância**

Foram feitas as análises de variância para três experimentos de campo: 192, 290 e 291, com base no delineamento em blocos casualizados com informação dentro da parcela. Todos os experimentos foram avaliados no ano de 1996, de modo que os indivíduos dos diferentes experimentos não têm a mesma idade.

Para os três experimentos, o efeito de genótipos foi significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F, para as características DAP e Ht. A existência de variação estatística significativa entre progênies para uma determinada característica em estudo, indica a existência de variabilidade nas populações amostradas, o que possibilita ganho com a seleção na geração seguinte (Quadro 11).

A média geral para a característica DAP em todos os experimentos variou entre 11,14 e 13,03 cm e a altura total variou de 15,43 a 18,75m. Isto reflete a diferença de idade de avaliação das plantas entre os experimentos (Quadro 12).

Os valores dos coeficientes de variação experimental ( $CV_e$ ) para os três experimentos, considerando a característica DAP, não foram calculados, uma vez que os valores da variância ambiental entre progênies foi negativo (Quadro 13). A fórmula de cálculo do  $CV_e$  considera a raiz quadrada da média da variância ambiental entre progênies. Assim, não foi possível estimar os valores da relação  $CV_g/CV_e$ .

Para a característica Ht, os coeficientes de variação experimental foram relativamente pequenos, indicando uma boa condução dos experimentos em campo. Neste caso, a relação  $CV_g/CV_e$ , para a característica Ht, ficaram todas acima de 1 (um), indicando que a variação existente entre as progênies, observadas nas análises experimentais é de origem genética.

Neste caso, em particular para a Ht, a boa precisão experimental ( $CV_e$ ), e a variabilidade genética encontrada neste trabalho indica que o número de

progênies e famílias, principalmente para a característica Ht, utilizadas no estudo foram, satisfatórias para a análise das características.

Nos experimentos 291 e 192 (considerando DAP) as variâncias entre e dentro de famílias foram semelhantes entre si (Quadro 13), e ocorre uma pequena variação quando comparados às do experimento 290, em que a variância genética entre e dentro de famílias são inferiores em até 50% às aquelas encontradas nos outros dois experimentos. Isto ocorre porque no experimento 290 a variação dos efeitos entre parcelas e dentro de parcelas são elevados, com valores de quadrado médio (QME e QMD) quase que duas vezes superiores aos dos outros dois experimentos, e baixo efeito de genótipo (QMG). Entretanto a análise de variância apresentou significância para a característica nos três experimentos.

Para a característica (DAP), o componente de variância residual foi negativo, indicando um efeito competitivo dentro de progênie. Esse efeito competitivo pode ocorrer quando o espaçamento não é adequado para aquela população, sobressaindo-se principalmente as plantas oriundas de mudas mais vigorosas, ou que foram beneficiadas de certa forma pelo ambiente nos estádios iniciais de desenvolvimento com uma expressão mais pronunciada desta característica como já relatado por SAKAI e MUKAIDE (1966), citados por XAVIER et al. (1993). Isso não representa uma diferença de ordem genética nas famílias, mas de manejo. Outra causa deste tipo de variação é a presença de falhas de plantas dentro da parcela, que podem ocasionar um elevado crescimento da planta favorecida pela ausência da outra planta.

Uma maneira de contornar o efeito competitivo dentro de família é a utilização de um fator de correção para as estimativas das esperanças dos quadrados médios, considerando o coeficiente de correlação intraclasse " $\rho$ ", que neste caso afeta as estimativas da variância ambiental entre família ( $\hat{\sigma}_e^2$ ) mas não as estimativas da variância genética entre família  $\hat{\sigma}_g^2$  (XAVIER et al. 1993).

Quadro 11 – Valores e significâncias dos quadrados médios de progênie (QMP) e erro entre parcela, erro dentro de parcela, médias e coeficiente de variação experimental ( $CV_e$ ), coeficiente de variação genético ( $CV_g$ ) e a relação  $CV_g/CV_e$ , considerando as duas características diâmetro a altura do peito (DAP), altura total (Ht) nos experimentos 192, 290 e 291.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	
		DAP	Ht
Experimento 290			
Bloco	7	55,06	135,17
Progênie	29	24,15**	59,80**
Variação entre	203	10,21	11,90
Variação dentro	1920	11,63	9,71
Média		13,037	15,43
$CV_e$		-	3,91
$CV_g$		5,84	5,78
$CV_g/CV_e$		-	1,48
Experimento 291			
Bloco	9	34,11	189,63
Progênie	29	33,69**	51,56**
Variação entre	261	6,70	17,41
Variação dentro	1500	7,90	13,94
Média		12,43	18,75
$CV_e$		-	3,30
$CV_g$		5,39	3,67
$CV_g/CV_e$		-	1,10
Experimento 192			
Bloco	9	16,36	52,12
Progênie	36	32,95**	66,56**
Variação entre	324	6,65	14,37
Variação dentro	1850	6,88	11,31
Média		11,14	17,51
$CV_e$		-	4,07
$CV_g$		10,28	5,32
$CV_g/CV_e$		-	1,31

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

- Valores não possível de calcular.

Quadro 12 – Média geral de progênies dos experimentos 192, 290 e 291, para as variáveis DAP e Ht.

Delineamentos					
290 idade 6 anos		291 idade 5 anos		192 idade 4 anos	
DAP	Ht	DAP	Ht	DAP	Ht
13,363	19,0518	12,191	17,0592	10,7963	16,4308
12,818	19,385	12,8656	17,9708	9,5095	13,915
13,2714	18,9934	13,4624	18,5528	10,591	14,6017
12,7815	19,2666	11,7058	16,8217	10,3594	15,5617
12,7466	18,6704	10,5986	15,205	11,9196	16,7733
14,054	19,643	11,7891	15,9806	11,1247	14,5825
13,4388	18,4438	13,0189	17,975	10,8626	14,9683
12,1157	18,2681	12,3908	17,2933	10,9568	15,3517
12,4291	16,9204	13,2077	18,355	12,5547	17,205
13,1759	19,333	12,2236	16,3567	11,2783	15,5517
13,7706	18,622	12,8878	18,7417	11,2857	14,4825
13,7135	20,6806	13,0106	18,2092	11,7796	16,22
12,651	17,8723	13,0072	17,2433	10,7568	15,1617
13,1322	19,0184	13,5433	18,4758	11,6868	15,9383
12,9567	18,9766	12,2606	17,5972	11,0745	14,725
13,4308	18,8571	12,6894	17,7033	11,1671	15,49
12,0876	18,1709	12,3584	17,1	11,7631	16,2783
12,69	18,5507	12,2894	18,1117	11,5594	15,8517
12,9823	18,4544	11,5308	16,3517	11,6199	15,785
11,8719	16,5859	12,3669	18,4375	10,205	13,5367
12,0435	17,5839	11,7414	15,985	10,5971	14,9167
12,5164	18,3602	12,6608	18,1983	10,4188	15,0167
13,3199	18,3114	12,6779	18,3333	11,357	15,7525
13,4319	18,7409	11,5989	16,3983	11,7918	15,6833
13,4239	19,276	12,4512	18,155	11,2862	15,8033
13,6007	18,9079	13,1038	18,9633	11,8013	15,2142
13,7563	20,3144	12,0146	17,34	11,6968	15,9183
12,4936	18,5304	12,9412	18,0342	11,6793	16,145
13,4709	19,2226	10,7573	15,4042	10,5501	15,2508
13,5643	19,5315	13,722	19,0814	12,6263	17,2108
				9,3137	13,2633
				10,5294	15,4917
				11,0485	15,3133
				11,1846	14,3583
				10,3111	13,96
				12,3419	17,9233
				10,9382	15,6125

Para a variável Ht os valores das estimativas das variâncias genóticas entre e dentro de famílias foram similares entre si (Quadro 13), e como relatado na literatura, para esta característica o efeito de competição é menor em relação ao observado para a característica DAP.

Os valores de herdabilidade, em nível de médias de famílias, para ambas as características, foram sempre superiores a herdabilidade dentro de famílias, indicando a possibilidade de ganho superior considerando a seleção de famílias. Para DAP a menor herdabilidade em nível de família foi de 57,7% (experimento 290) e a maior de 80% (experimento 291), dentro de famílias a menor herdabilidade foi de 4% (experimento 291) e a maior de 19% (experimento 192) (Quadro 13).

No caso da característica Ht a menor herdabilidade em nível de família foi de 66,2% (experimento 290) e a maior de 80,1% (experimento 192), considerando dentro de famílias a menor foi de 10,2% (experimento 290) e a maior de 24,6% (experimento 192). Quando os valores de herdabilidade em nível de planta e em nível de família são de alta magnitude, uma estratégia interessante é a combinação de seleção entre e dentro de famílias, favorecendo a seleção dos melhores genótipos dentro das famílias selecionadas. Este tipo de estratégia tem sido muito usada no setor florestal, uma vez que a maioria dos povoamentos florestais implantados são clonais.

Quadro 13 – Estimativas dos parâmetros e componentes de variância para três experimentos analisados: Herdabilidade média entre famílias ( $h_m$ ), herdabilidade dentro de família ( $h_d$ ), herdabilidade do indivíduo no bloco ( $h_b$ ) e no experimento ( $h_e$ ), coeficiente de variação experimental entre parcelas (CV2), coeficiente de variação genético dentro (CV4), variância de blocos ( $\hat{\sigma}_b^2$ ), variância genética entre famílias ( $\hat{\sigma}_g^2$ ), variância genética dentro de famílias ( $\hat{\sigma}_{gd}^2$ ), variância fenotípica dentro de famílias ( $\hat{\sigma}_d^2$ ) e variância residual ( $\hat{\sigma}$ ).

Parâmetros genéticos	Experimento. 192		Experimento 291		Experimento 290	
	DAP	Ht	DAP	Ht	DAP	Ht
$h^2$ (média Família)	0,7979	0,801	0,8009	0,7841	0,5770	0,6623
$h^2$ (dentro Família)	0,1909	0,2465	0,1706	0,2305	0,0499	0,1020
CV exp. (CV1)	9,453	9,1221	8,5037	8,8361	8,1732	7,4177
CV gen. (CV4)	10,2887	10,023	9,3402	9,2233	5,8460	6,3612
$\hat{\sigma}_b^2$	0,0437	0,1811	0,1522	0,9737	0,1661	0,4361
$\hat{\sigma}_g^2$	0,4381	0,7982	0,4497	0,8698	0,1936	0,4743
$\hat{\sigma}_{gd}^2$	1,3149	2,3948	1,3491	2,6095	0,5808	1,4228
$\hat{\sigma}_d^2$	6,8851	9,7147	7,9084	11,3198	11,6305	13,9458
$\hat{\sigma}$	-0,0378	0,3643	-0,1998	0,5085	-0,1569	0,38516

#### **4.3.2. Divergência genética entre progenitores e características silviculturais**

Para análise de diversidade entre os progenitores, foram utilizadas as seguintes características: incremento médio anual (IMA), diâmetro a altura do peito (DAP) e altura total de planta (Ht). Foram consideradas as plantas selecionadas pela análise molecular, com base em IMA e média das distância genéticas utilizando marcadores moleculares RAPD. Os indivíduos foram separados por experimento (189, 192, 290), uma vez que as plantas possuem idades diferentes, à exceção dos experimentos 391 e 291, onde as plantas possuem a mesma idade e puderam ser avaliados em conjunto. Foram utilizados os valores individuais para cada característica, para calcular a distância Eucliana média, uma vez que as distâncias utilizando marcadores moleculares foram feitas considerando o indivíduo.

Para os experimentos 189, 192 e 290 foram utilizados 31, 8 e 7 genótipos, respectivamente. Para os experimentos 291 e 391, foram utilizados 24 genótipos. As matrizes contendo as distâncias Eclidiana (Quadros 3, 4, 5 e 6 – APÊNDICE) foram utilizadas para a construção dos dendrogramas de agrupamento dos genótipos, como mostram as Figuras 11 a 14.

Analisando as distâncias Euclidianas nos experimentos em conjunto 291 e 391, a menor distância foi de 0,35 entre os genótipos U468 e U38 ambas de Procedência de Teixeira de Freitas/BA – Origem - Ilegele Flores, e a maior distância foi de 12,86 entre os genótipos de Teixeira de Freitas U102 origem de Ilegele Flores e U62 Ilimandiri - Flores. Para o experimento 189, a menor distância foi de 0,58 entre os genótipos de Belo Oriente G400 e G234, e a maior distância foi de 12,29 entre os genótipos G256 de Itabira – FRDSA (Atherton) e G213 de Belo Oriente (CENIBRA). Para os genótipos do experimento 192 a menor distância foi de 0,59 entre os genótipos de Anhembí T10B71 (ilhas próximas de Timor) U136 e U473, e a maior distância foi de 10,58 entre os genótipos U438 de Anhembí T8i70 (ilhas próximas de Timor) e U23 de Anhembí T10B71 (ilhas próximas de Timor) . Para os genótipos do experimento 290, a menor distância foi de 2,27 entre os genótipos U57 de Anhembí -SP T8c51 – Timor e U6 de Lassance ex Anhembi – Flores , e a

maior distância foi de 10,16 entre os genótipos U6 e U109 de Linhares com origem em outras ilhas próximas de Timor.

As análises dos dendrogramas, para os genitores do experimento 189, considerando um valor limite de distância de 6, tem-se três grupos (Figura 11). Para os genitores do experimento 290, considerando a distância também de 6, tem-se dois grupos (Figura 12). Na Figura 13, que representa o agrupamento dos genitores selecionados no experimento 192, tem-se dois grupos considerando a distância limite de 6, e finalmente para os genitores dos experimentos 291 e 391, considerando a distância limite de 6 tem-se três grupos evidenciados (Figura 14).

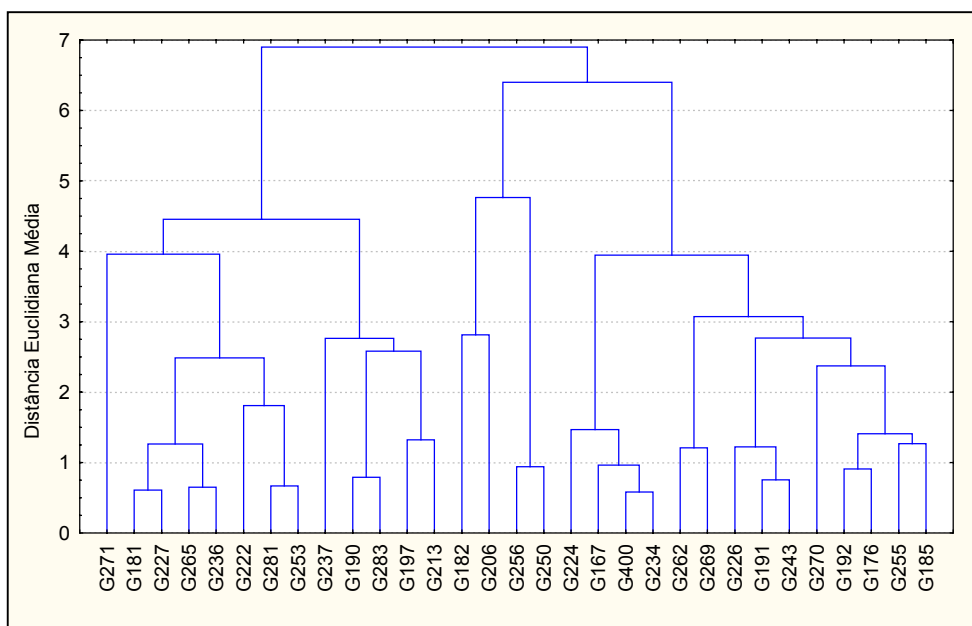


Figura 11 - Dendrograma de agrupamento com base na matriz de distâncias Euclidiana para genitores selecionados de *E. grandis* do experimento 189, utilizando o método UPGMA. A identificação está de acordo com o Quadro 2 – APÊNDICE.

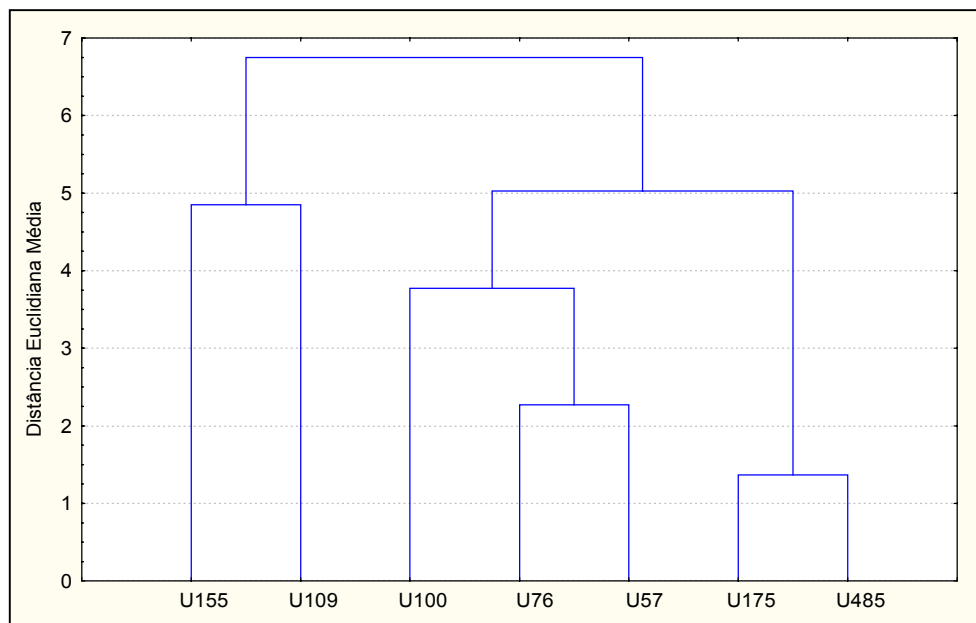


Figura 12 - Dendrograma de agrupamento com base na matriz de distâncias Euclidiana para genitores selecionados de *E. urophylla* do experimento 290, utilizando o método UPGMA. A identificação está de acordo com o Quadro 2 – APÊNDICE.

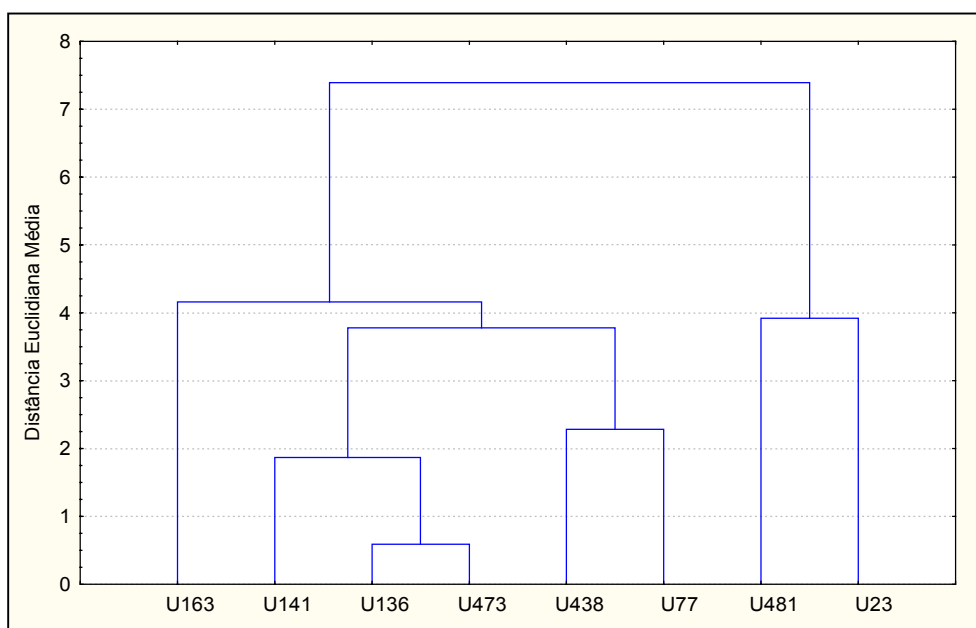


Figura 13 - Dendrograma de agrupamento com base na matriz de distâncias Euclidiana para genitores selecionados de *E. urophylla* do experimento 192, utilizando o método UPGMA. A identificação está de acordo com o Quadro 2 – APÊNDICE.

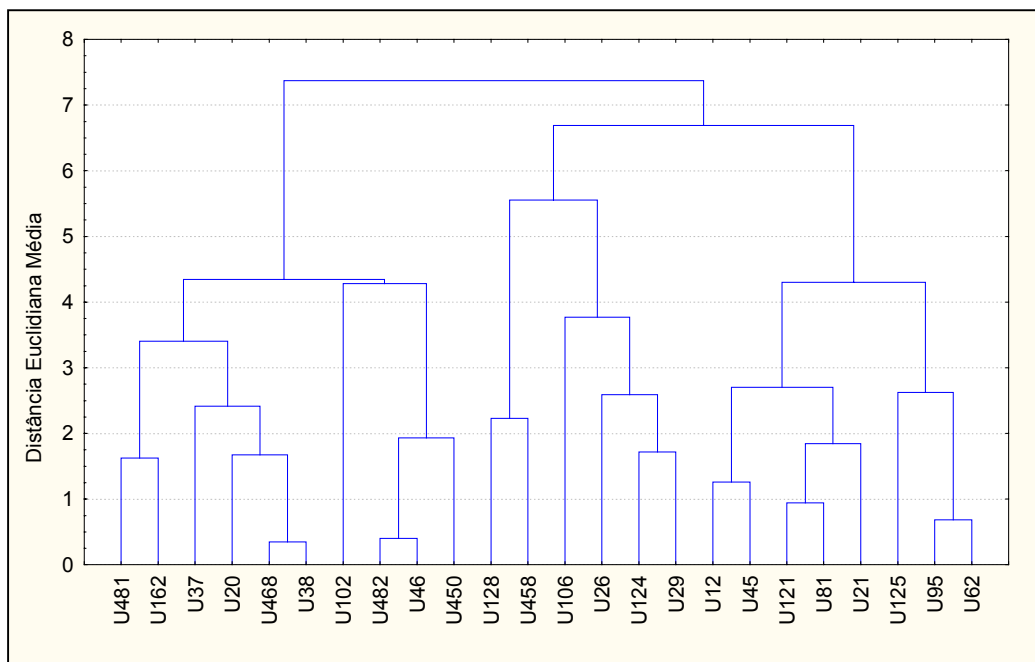


Figura 14 - Dendrograma de agrupamento com base na matriz de distâncias Euclidiana para genitores selecionados de *E. urophylla* dos experimentos 291 e 392, utilizando o método UPGMA. A identificação está de acordo com o Quadro 2 – APÊNDICE.

Foi feita uma análise de correlação, por meio do coeficiente de correlação de Pearson, utilizando os dados de distância genética com base em marcadores moleculares RAPD e as distâncias médias Euclidianas (QUADRO 14). Com exceção do experimento 290, foram encontrados valores de correlação positivos. O menor valor de correlação encontrado foi de  $-0,11$  para os genitores dos experimentos 290, e a maior correlação de  $0,21$  para os genitores do experimento 291 e 391 (analisados em conjunto). O valor de correlação negativo, indica que os maiores valores de distância genética com uma metodologia está diretamente relacionado a valores menores de distância para a outra metodologia. No caso destas análises os valores de correlação positiva foram baixos de  $2,38\%$  (experimento 189) a  $21\%$  (experimento 290) (Quadro 14).

Esta baixa correspondência dos resultados das análises com marcadores moleculares RAPD com os resultados das análise de diversidade utilizando características, podem ser explicadas por uma baixa correlação entre os fragmentos de DNA analisados, com as características utilizadas na análise de diversidade fenotípica. As regiões de DNA amplificadas por marcadores RAPD estão distribuídas ao acaso ao longo do genoma, e sem evidências de direcionamento de ampliações para regiões específicas (WILLIAMS et al. 1993).

Na análise de coincidência foi considerada uma amostra das distância de  $30\%$ , para os valores de distâncias superiores e inferiores, perfazendo um total de 88 valores entre pares de distância para os experimentos 391 e 291, 8 valores para o experimento 192, 6 valores para o experimento 290 e 139 valores para o experimento 189. Os maiores percentuais de coincidência, entre as distâncias por marcadores RAPD e distância Euclidiana média, foram encontrados para os experimentos 391 e 291, sendo de  $42,68\%$  dos valores inferiores amostrados e  $35,36\%$  dos superiores. Os menores percentuais foram encontrados no experimento 192, que foram de  $12,5\%$  para inferiores e superiores (Quadro 14).

Quadro 14 – Análise de correlação de Pearson e coincidência entre as distância genéticas obtidas com base na análise molecular por RAPD e as distâncias médias Euclidianas, para progenitores selecionados nos experimentos 189, 192, 290 e, 291 e 391.

	Experimento 189	Experimento 290	Experimento 192	Experimentos 391 e 291
Variância(E)	6,729	3,81	6,273	7,613
Variância(M)	0,009	0,0069	0,014	0,0056
Cov(E;M)	0,058	-0,018	0,061	0,044
$r_{\text{pearson}}$	0,024	-0,116 <sup>ns</sup>	0,2058 <sup>**</sup>	0,213 <sup>**</sup>
Nº de pares de dados	465	21	28	276
Análise de Coincidência				
Coincidências superiores	48	1	1	35
Coincidências superiores (%)	34,53	16,67	12,5	42,68
Coincidências inferiores	36	1	1	29
Coincidências inferiores (%)	25,90	16,67	12,5	35,37
Tamanho da amostra	139	6	8	82

\*\* Estatisticamente diferente de zero pelo teste t, em nível de 1% de probabilidade.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo analisar a diversidade genética em um conjunto de matrizes selecionadas de *E. urophylla* e *E. grandis* conduzidas em testes de progênies no município de Açailândia - Ma, utilizando marcadores moleculares RAPD e dados silviculturais. Obteve-se a correlação das distâncias genéticas e foram indicados genitores para estabelecimento de um delineamento genético em dialelo parcial circulante.

As análises moleculares foram feitas em um primeiro estágio considerando 503 matrizes previamente selecionadas, utilizando-se 26 fragmentos de DNA polimórficos para obtenção das matrizes de distâncias genéticas para as duas espécies. A obtenção de uma quantidade muito grande de dados, neste tipo de análise, inviabilizou a avaliação visual, utilizando-se modelos hierárquicos de agrupamento. Para contornar este tipo de problema utilizou-se a seleção pela classificação das médias das distâncias genéticas para cada genótipo e valores de incremento médio anual (IMA). Com base nesta análise foi feita a seleção de 127 genitores de *Eucalyptus* (70 genitores de *E. urophylla* e 57 de *E. grandis*).

Uma segunda análise com marcadores RAPD foi feita para os 127 genitores selecionados, utilizando-se 11 oligonucleotídeos, sendo observado um total de 74 fragmentos de DNA polimórficos. Utilizando os dados de polimorfismo destes fragmentos de DNA foi gerada uma matriz de distância genética e feita a análise de agrupamento utilizando o método das médias das

distâncias (UPGMA), construindo um dendrograma para cada espécie. A separação dos grupos de progenitores mais divergentes, que constituirão os cruzamentos no dialelo parcial circulante foi feita utilizando a técnica de agrupamento de Tocher. Considerando grupos de 10 progenitores mais homogêneos foram selecionados 7 grupos de progenitores para o *E. urophylla* e 6 grupos para o *E. grandis*. Os cruzamentos foram estabelecidos de forma que um dos grupos seja homogêneo, sendo indicado o estabelecimento de cinco dialelos parciais circulantes pelos grupos: GR1 x UR7; GR2 x UR6; GR3 x UR5; GR5 x UR1 e GR6 x UR3.

Para a avaliação dos dados silviculturais, foram feitas análises de variâncias para três experimentos de campo, em blocos casualizados com informação dentro da parcela. Todos os experimentos foram avaliados no ano de 1996, de modo que as plantas não tinham a mesma idade. Para todos os experimentos, o efeito de genótipos foi significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F para as duas características avaliadas DAP e Ht, indicando a existência de variabilidade para as características consideradas. A estimativa de variância residual para a característica DAP foi negativa, indicando a existência de efeito competitivo dentro da progênie. Em análises com este tipo de problema é recomendado levar em consideração o coeficiente de correlação intraclasse como fator de correção nas estimativas dos componentes de variância.

Com exceção do experimento 290, que teve os valores de herdabilidade em nível de média de família relativamente baixos, os demais experimentos tiveram valores de herdabilidade elevados, indicando que o valor fenotípico é um bom preditor do valor genotípico, o que possibilita um elevado ganho por seleção na próxima geração.

Os dados biométricos de DAP, Ht e IMA, genitores selecionados nos delineamentos 290, 189, 192 e conjuntamente os dois experimentos 391 e 291 (mesma idade) foram utilizados para análise de diversidade pela distância Euclidiana média, gerando uma matriz de dissimilaridade usada para análise de agrupamento por dendrograma. As menores distâncias ocorreram dentro de família ou com progenitores de mesma procedência e as maiores distâncias ocorreram entre diferentes procedências.

A correlação entre as distâncias Euclidiana para cada experimento comparadas com as distâncias por marcadores RAPD foi baixa, considerando cada espécie. As correlações encontradas para os experimentos 192, 189 e,

391 e 291 (analisados em conjunto) foram positivas com valores de 0,206, 0,023 e 0,213, respectivamente. Para o experimento 290 a correlação foi negativa e magnitude muito baixa (- 0,11). Estes baixos valores de correlação podem ser explicado pelo fato da técnica de RAPD amplificar fragmentos de DNA aleatórios, que correspondem a qualquer região do genoma.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**, São Paulo: Edgar Blücher, 1971. 381 p.
- BARBOSA-NETO, J.F., SORRELLS, M.E., CISAR, G. Prediction of heterosis in wheat using coefficient of parentage and RFLP-based estimates of genetics relationship. **Genome**, v. 39, p. 1142-1149, 1996.
- BARRIL, C.P., VERHAEGEN, D., VIGNERON, Ph., BOUVET, J.M., KREMER, A. Structure of the specific combining ability between two species of *Eucalyptus*. I. RAPD data. **Theor Appl Genet**, v. 94, p. 796-803, 1997.
- BLAKE, S.T. Four new species of *Eucalyptus*. **Austrobaileya**, v. 1, n. 1, p. 7-9, 1977.
- BOLAND, D.J., BROOKER, M.I.H., CHIPPENDALE, G.M., HALL, N., KLEINIG, D.A., TURNER, H.D. **Forest Tree of Australia**, 4 ed., Australia, CSIRO, 1984. 687 p.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**, 2 ed. Viçosa, MG: UFV, 1998. 453 p.
- BROOKER, M.I.H., KLEINING, D.A. **Field guide to eucalypts Melbourne and Sydney**. Melbourne: Inkata Press, 1990. 428 p.
- BRUSTIN, J, CHARCOSSET, A. relationship between phenotypic and marker distances: theoretical and experimental investigatios. **Heredity**, v. 79, p. 477-483, 1997.
- CAETANO-ANOLLÉS, G. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. **Review**, v. 3, p. 85-94, 1993.

- CÂNCIO, O.N.; ESBRISSÉ, E.J.; GOMES, E.A.; MOREIRA, M.A., ARAÚJO, E.F. Análise da diversidade genética de nove procedências de *E. grandis* utilizando marcadores moleculares RAPD. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFV, 4, 1994, Viçosa. **Anais ...**, Viçosa, MG: UFV, 1994, p 38.
- CÂNCIO, O.N.; **Diversidade genética de progênies de meios irmãos de *E. urophylla* por meio de metodologia quantitativa e marcadores moleculares RAPD.** Viçosa, MG: UFV, 1999. 52 p. Dissertação. (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- CHARCOSSET, A; LEFORT-BUSON, M., GALLAIS, A. Relationship between heterosis and heterosigosity at marker loci: A theoretical computation. **Theor Appl Genet**, v. 81, p. 571-575, 1991.
- CRUZ, C.D. **Programa GENES - aplicativo computacional em genética e estatística.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 442 p.
- CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** Viçosa, MG: UFV, 1994. 394p.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.27, p. 13-15, 1990.
- DUDLEY, J.W. Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. In: Analysis of Molecular Marker Data. **Joint Plant Breeding Symposia Series.** Corvallis, Oregon. 1994.
- DUDLEY, J.W., SAGHAI MAROOF, M.A., RUFENER, G.K. Molecular markers and grouping of parents in maize breeding programs. **Crop Sci.**, v.31, p.718-722, 1991.
- DUDLEY, J.W., SAGHAI MAROOF, M.A., RUFENER, G.K. Molecular marker information and selection of parents in corn breeding programs. **Crop Sci.**, v.32, p.301-304, 1992.
- ENDO, M e LAMBETH, C. ; Potencial promissório del híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em Colômbia; **Informe de investigación**, v. 152, p. 1 - 8, 1992.
- ESBRISSÉ, E.J.; CÂNCIO, O.N.; GOMES, E.A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. e ARAÚJO, E.F. Análise da diversidade genética em 16 espécies de *Eucalyptus* utilizando marcadores moleculares RAPD. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFV, 4, 1994, Viçosa. **Anais ...**, Viçosa, MG: UFV, 1994, p 39.

- ESBRISSE, Éder Jaime, **Associação entre distâncias genéticas, determinadas com marcadores moleculares RAPD e características da geração F<sub>1</sub> em *Eucalyptus* sp.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 51 p. Dissertação. (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa.** Viçosa, MG: UFV, 1987. 279p.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília, DF: EMBRAPA, CENARGEN, 1995. 220p.
- FERREIRA, M. Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal. Piracicaba: IPEF, v.45. p.22-30, 1992.
- GAIOTTO, F.A., BRAMUCCI, M., GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.95, p.842-849. 1997.
- GARCIA, J.E., IZIOKA, E.E.K., RODRIGUES, F.P., RAMOS, P.R.R., LOPES, C.R., MARINHO, C. Random Amplified Polymorphic DNA Markers (RAPD): a potential technic for genetic assessment in *Mazama gouazoubira* (Mammalia: Cervidae), **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, n. 3, p. 89 1996.
- GARDNER, C.O., EBERHART, S.A. Analysis and interpretation of variety cross diallell and related populations. **Biometrics**, v.22, p.439-452, 1966.
- GOMES, J. M., COUTO, L. ; Produção de mudas de Eucalptos; **Informe Agropecuário**, v.12, n.141; p. 8 - 14; 1986.
- GOWER, J.C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, v.27, p.857-874, 1971.
- GRATTAPAGLIA, D., BERTOLUCCI, F.L., SEDEROFF, R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.90, p.933-947, 1995.
- GRATTAPAGLIA, D., SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v.137, p.1121-1137, 1994.
- GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallell crossing systems. **Austr. J. Biol. Sci.**, v.9, p.463-493, 1956.
- HAYMAN, B.I. The theory and analysis of diallell crosses. **Genetics**, Austin, v.39, p789-809, 1954.

- HOUSE, A.P.N., BELL, J.C. Isoenzyme variation and mating system in *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Silvae Genetica**, n. 43, p. 2-3. 1994
- JACCARD, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bul. Soc. Vaud. Sci. Nat.**, v.44, p. 223-270, 1908.
- KEMPTHORNE, O. CURNOW, R.N. The partial diallell cross. **Biometrics**, v.17, p.229-250, 1961.
- LAIA, M. L., ESBRISSSE, E. J., BARROS, E. G., ARAÚJO, E. F. Use of RAPD-PCR markers to determine the genotypic identity of clones of *Eucalyptus grandis*. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 3, 1996.
- LAMBETH, Clements C.; Primer año de crecimiento del híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* de clones de *E. grandis* y de huertos semilleros; **Informe de Investigación**, v.128, p. 7 - 14 , 1991.
- LANGE, W.J., WINGFIELD, B.D., VILJOEN, C.D., WINGFIELD, M.J. RAPD-fingerprinting to identify *Eucalyptus grandis* clones. **Suid-Afrikaanse Bosboutydskrif**, v. 167, p. 47-49, 1993.
- LANZA, L. L. B.; SOUZA Jr, C. L.; VIEIRA, L. C.; OTTOBONI, L. M. M.; SOUZA, A. P. Distâncias genéticas entre linhagens endogâmicas de milho (*zea mays* L.) e predição de híbridos simples através de marcadores do tipo RAPD. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 3, p 40, 1996.
- LIMA, V.C.C., PALUDO, D. , MEDEIROS, A.C., MAIA, V. Caracterização por RAPD de uma amostra de peixe boi marinho (*Trichechus manatus*) da costa brasileira. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 3, p 65, 1996.
- MARSAN, P.A., CASTIGLIONI, P., FUSARI, F., KUIPER, M., MOTTO, M. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. **Theor. Appl. genet.**, v.96, p.219-227, 1998.
- MELLO, A.A., PRATA, F.L., MEDEIROS, A.C. Obtenção de Impressões Digitais Humanas Utilizando a Técnica de RAPD como Iniciador. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 3, p - , 1996.
- MENCK, A. L. Influencia do sistema de coleta de botões florais na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp ; **IPEF**, v. 43, n. 44; 1990.
- NEY, M., LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 5269-5273, 1979.
- PÁSZTOR, Y.P.C. et al. Teste internacional de procedências de *Eucalyptus urophylla*. **Revista Florestal**, v.2, n.2, p. 207-214, 1990.

- PIRES, I.E. **Eficiência da seleção combinada no melhoramento genético do *Eucalyptus* spp.** Viçosa, MG: UFV, 1996. 116p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- PRYOR, L.D., JOHNSON, L.A.S. **A classification of eucalypts.** Camberra: ANU, 1971. 102 p.
- PRYOR, L.D.; WILLIAMS, E.R.; GUNN, B.V. A morphometric analysis of *Eucalyptus urophylla* and related taxa with descriptions of two new species. **Australian Systematic Botany**, v.8, n.1, p.57-70, 1995.
- RAMALHO, R.S. **Dendrologia Tropical (terminologia).** 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 1995. 52 p.
- RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil - Manual de Dendrologia Brasileira,** SP: Ed. da Universidade de São Paulo, 1971. 294 p.
- ROMESBURG, H.C. **Cluster analysis for researchers.** Belmont, Calif.: Lifetime Learning, 1984. 268 p.
- SALE, M.M., POTTS, B.M., WEST, A.K. Molecular differentiation within and between *Eucalyptus risdonii*, *Eucalyptus amygdalina* and their hybrids using RAPD markers. **Aust. J. Bot.**, v.44, p.559-569, 1996.
- SANTOS, P. E. T. GARCIA, C.H., MORI, E.S., MORAES, M.L.T. Potencial para programas de melhoramento, estimativa de parâmetros genéticos, interação progênies x locais em populações de *Eucalyptus urophylla* ST. Blake ; **IPEF**, v. 43, n. 44, p 11 - 19, 1990.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy.** San Francisco: Freeman,1973. 123p.
- StatSoft, Inc. **STATISTICA for Windows - Computer program manual.** Tulsa, OK: StatSoft, 1995. 782 p.
- TINGEY, S.V., RAFALSKI, J.A., WILLIAMS, G.K. Soyabean genome analysis: DNA polymorphisms and identified by oligonucleotide primers of arbitrary sequence. **Plant. Molecular Biology**, v. 2, 263 – 268,1991
- TSAFTARIS, S. A. Molecular aspects of heterosis en plants. **Physiologia Plantarum**, v. 94, 362-370, 1995.
- VERHAEGEN, D., PLOMION, C., GION, J.-M.;POITEL, M., COSTA, P., KREME, A. Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers: I. Detection of QTL in Interespecific hybrid progeny, stability of QTL, expression across different ages. . **Theor Appl Genet**, v. 95, p. 597-608, 1997.

- VIGNERON, Ph., BOUVET, J-M., GOUMA, R., SAYA, A., GION, J-M., e VERHAEGEN, D. **Eucalypt hybrids breeding in Congo**. Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees "Proceedings of OFRI/CRC – SPF Symposium, 9 – 4, Quensland, Australia. 2000.
- WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K., HANAFEY, M. K., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. Genetics analysis using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. ; **Methods in enzymologi**. v. 218, p.704-742, 1993.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & SCOTT, V.T. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n. , p.6531-6535, 1990.
- WRIGHT, J. **Mejoramiento genético de los árboles florestales**. Roma: FAO, 1984. 436p.
- YOUNG, N.D. Applications of DNA genetic markers to the study of plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, v.12, p. 229-236, 1993.
- XAVIER, A., CRUZ, C.D., BOERGES, R.C.G., PIRES, I.E. Influência da correlação intraclasses nas estimativas da variância fenotípica dentro de famílias e da variância ambiental. **Rev. Árv.**, v.17, n.1, p.91-99, 1993.
- XAVIER, A. Aplicação da análise multivariada da divergência genética no melhoramento de *Eucalyptus* spp. Viçosa, MG: UFV, 1996. 126p. Dissertação (Doutorado em Ciência Florestal) Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- ZOBEL, B. TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York: John Wiley & Sons, 1984. 505p.

## APÊNDICE

Quadro 1A – Identificação das 503 amostras analisadas por marcadores moleculares RAPD

n <sup>o</sup>	Cod. CENIBRA	n <sup>o</sup>	Cod. CENIBRA	n <sup>o</sup>	Cod. CENIBRA	n <sup>o</sup>	Cod. CENIBRA
1	UO 259-1	127	UO 283-1	253	GO 135-2	379	U20
2	UO 322	128	UO 282-1	254	GO 112	380	U78
3	UO 378	129	UO 280-2	255	GO 149-1	381	G10
4	UO 374	130	UO 288-1	256	GO 135-1	382	U26
5	UO 356-1	131	UO 244-3	257	GO 138-1	383	Gc943
6	UO 351-2	132	UO 243-1	258	GO 069-1	384	G30
7	M 484	133	UO 314-1	259	GO 133	385	Gc713
8	UO 252-2	134	UO 248-1	260	GO 109	386	Gc710
9	UO 347-2	135	UO 282-2	261	GO 178	387	G939
10	UO 263-3	136	UO 279-1	262	GO 145	388	G38
11	UO 238-3	137	UO 317-1	263	GO 061-1	389	G05
12	UO 313-2	138	UO 270-2	264	GO 176	390	G03
13	UO 338	139	UO 252-3	265	GO 158	391	Gc776
14	UO 273-1	140	GO 078	266	GO 087-2	392	G01
15	UO 324-2	141	UO 316-1	267	GO 087-1	393	Gc640
16	UO 277-1	142	UO 251-1	268	GO 101-1	394	Gc1008
17	UO 229-3	143	UO 284-1	269	GO 125-3	395	Gc944
18	UO 269-2	144	UO 324-1	270	GO 172	396	Gc1013
19	UO 223-1	145	UO 275-2	271	GO 166	397	Gc859
20	UO 263-1	146	UO 305-1	272	GO 123-3	398	Gc864
21	UO 315-1	147	UO 234-2	273	GO 068-2	399	Gc955
22	UO 241-2	148	UO 252-1	274	GO 182	400	Gc860
23	UO 316-2	149	UO 381	275	GO 073	401	Gc771
24	M 485	150	UO 249-1	276	GO 144-1	402	U71
25	UO 231-2	151	UO 242-1	277	GO 086-2	403	U69
26	UO 311-1	152	UO 366-1	278	GO 160-1	404	U49
27	UO 242-3	153	UO 380	279	GO 079-1	405	U16
28	UO 264-2	154	UO 283-2	280	GO 106-1	406	U04
29	UO 312-1	155	UO 301-1	281	GO 142-1	407	U03
30	UO 310-2	156	UO 349-2	282	GO 256-2	408	U73
31	UO 327	157	UO 260-3	283	GO 170-1	409	U72
32	UO 317-2	158	UO 236-2	284	GO 187	410	U09
33	UO 264-1	159	UO 247-1	285	GO 180-2	411	U51
34	UO 275-2	160	UO 269-3	286	GO 098	412	U22
35	UO 302-1	161	UO 349-1	287	GO 068-1	413	U67
36	UO 226-3	162	UO 315-2	288	GO 174-3	414	U08
37	UO 236-1	163	GO 70-2	289	Gc1027	415	U21
38	UO 227-1	164	UO 248-3	290	Gc1012	416	U63
39	UO 371	165	GO 015-2	291	G52	417	U23
40	UO 328-1	166	UO 258-2	292	U68	418	U18
41	UO 388-1	167	GO 165	293	G02	419	U74
42	UO 319	168	UO 245-2	294	U54	420	U76

Quadro 1A – Cont.

nº	Cod. CENIBRA	nº	Cod. CENIBRA	nº	Cod. CENIBRA	nº	Cod. CENIBRA
43	UO 230-1	169	UO 334	295	G40	421	U47
44	UO 231-1	170	UO 355-2	296	G63	422	U17
45	UO 237-1	171	GO 106-2	297	U53	423	U29
46	UO 274-2	172	UO 272-1	298	U58	424	U25
47	UO 361-2	173	UO 235-1	299	U52	425	G149
48	UO 323	174	UO 250-2	300	Gc856	426	UO 251-2
49	UO 231-3	175	GO 161-2	301	U 363-2	427	UO 247-3
50	UO 368-1	176	GO 156-1	302	G41	428	UO 274-1
51	UO 383	177	GO 155-2	303	Gc638	429	UO 376
52	UO 370-3	178	GO 190	304	Gc1010	430	UO 272-2
53	UO 365-2	179	GO 155-1	305	Gc862	431	UO 387
54	UO 344-3	180	GO 021	306	G16	432	UO 240-3
55	UO 356-2	181	GO 170-2	307	Gc1023	433	UO 314-2
56	UO 368-2	182	GO 183	308	Gc868	434	UO 349-3
57	UO 284-2	183	GO 191	309	U320	435	UO 285-1
58	UO 366-2	184	GO 215	310	Gc867	436	UO 246-2
59	UO 236-3	185	GO 120-1	311	Gc1014	437	UO 385
60	UO 261-1	186	GO 163	312	G07	438	UO 230-2
61	UO 344-1	187	GO 159	313	G13	439	UO 369-3
62	UO 373	188	GO 200	314	U12	440	UO 310-1
63	UO 249-2	189	GO 020-1	315	Gc770	441	UO 386
64	UO 379	190	GO 135-3	316	Gc1006	442	UO 343
65	UO 256-3	191	GO 179	317	G22	443	UO 227-2
66	UO 357-1	192	GO 111-2	318	Gc1026	444	UO 265-3
67	UO 363-3	193	GO 012-2	319	G42	445	UO 287-2
68	UO 263-2	194	GO 100	320	G45	446	UO 224-2
69	UO 232-1	195	GO 207	321	G21	447	UO 333-2
70	UO 266-2	196	GO 018-2	322	G51	448	UO 239-2
71	UO 265-1	197	GO 143-2	323	G61	449	UO 244-1
72	UO 238-1	198	GO 044-1	324	Gc711	450	UO 273-2
73	UO 232-2	199	GO 138-3	325	U64	451	UO 346-1
74	UO 364-1	200	GO 117-2	326	G49	452	UO 262-1
75	UO 242-2	201	GO 120-3	327	G36	453	UO 265-2
76	UO 230-3	202	GO 029	328	G44	454	UO 248-2
77	UO 228-2	203	GO 205	329	G37	455	UO 260-1
78	UO 300-1	204	GO 076-3	330	G28	456	UO 223-2
79	UO 257-3	205	GO 208	331	G24	457	UO 278-1
80	UO 225-3	206	GO 204	332	U57	458	UO 276-1
81	UO 241-3	207	GO 007	333	G33	459	UO 225-1
82	UO 354-2	208	GO 006	334	G25	460	UO 246-1
83	UO 239-1*	209	GO 184	335	G15	461	UO 245-1
84	UO 344-2	210	GO 217	336	G46	462	UO 222-2

Quadro 1A – Cont.

nº	Cod. CENIBRA	nº	Cod. CENIBRA	nº	Cod. CENIBRA	nº	Cod. CENIBRA
85	UO 250-1	211	GO 124-2	337	G09	463	UO 258-1
86	UO 303-2	212	GO 196	338	G06	464	UO 243-2
87	UO 335	213	GO 136-1	339	G65	465	UO 253-2
88	UO 233-3	214	GO 189	340	G14	466	UO 255-1
89	UO 358-1	215	GO 192	341	U77	467	GO 87-1
90	UO 358-3	216	GO 170-3	342	U12	468	UO 237-2
91	UO 235-2	217	GO 194	343	U60	469	UO 241-1
92	UO 363-1	218	GO 156-2	344	U70	470	UO 237
93	UO 261-2	219	GO 150	345	U62	471	UO 262-2
94	UO 357-3	220	GO 130-2	346	G04	472	UO 355
95	UO 234-1	221	GO 154	347	Gc863	473	UO 309-2
96	UO 234-3	222	GO 060-2	348	G47	474	UO 370-1
97	UO 355-3	223	GO 077	349	Gc1021	475	UO 229-2
98	UO 360-2	224	GO 005	350	G59	476	UO 362-1
99	UO 262-3	225	GO 095	351	G08	477	UO 258-3
100	UO 227-3	226	GO 124-3	352	Gc1019	478	UO 364-3
101	UO 229-1	227	GO 164	353	Gc1015	479	UO 269-1
102	UO 276-2	228	GO 174-1	354	Gc707	480	UO 304-1
103	UO 287-1	229	GO 020-2	355	Gc645	481	UO 288-2
104	UO 267-2	230	GO 090	356	Gc870	482	UO 280-1
105	UO 299-2	231	GO 002-1	357	G11	483	UO 350-2
106	UO 313-1	232	GO 001-1	358	G35	484	UO 328-2
107	UO 350-3	233	GO 032	359	G32	485	UO 318-2
108	UO 307-2	234	GO 209	360	Gc941	486	UO 326
109	UO 302-2	235	GO 040	361	Gc942	487	UO 353-3
110	UO 307-1	236	GO 136-3	362	G34	488	UO 311-2
111	UO 303-1	237	GO 125-1	363	G19	489	UO 368-3
112	UO 286-2	238	GO 188	364	G20	490	UO 331
113	UO 286-1	239	GO 177	365	G39	491	UO 267-1
114	UO 365-1	240	GO 004	366	G23	492	G17
115	UO 365-3	241	GO 009	367	G18	493	G60
116	UO 312-2	242	GO 037	368	G31	494	G57
117	UO 233-1	243	GO 041	369	U34	495	G55
118	UO 277-2	244	GO 127	370	U05	496	U13
119	UO 259-3	245	GO 115	371	U14	497	Uo355-1
120	UO 285-2	246	GO 052	372	U48	498	Uo369-1
121	UO 318-1	247	GO 144-3	373	U46	499	Gc868
122	UO 266-1	248	GO 060-1	374	U61	500	U19
123	UO 271-2	249	GO 103	375	U02	501	U66
124	UO 309-1	250	G-O 233-2	376	U79	502	U309-2
125	UO 228-1	251	GO 113	377	U07	503	Gc861
126	UO 226-1	252	GO 139	378	U28		

Quadro 2A – Relação de 127 matrizes de *E. urophylla* (Código U) e matrizes de *E. grandis* (código G), selecionadas a partir de 503 matrizes, utilizando marcadores RAPD e IMA.

Ident. Viçosa	Cod CELMAR	Rep	Prog	Blo	Procedência	Origem	Delineamento	IMA
U12	UO 238-3	3	A31	2	T. Freitas	Egon Flores	DEAL0391	47.5
U16	UO 324-2	2	24	20	Egon II Flores	Egon II Flores	DEAL1967	
U21	UO 263-1	1	A14	10	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0291	45.6
U22	UO 315-1	1	97	11	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0387	72.6
U26	UO 231-2	2	A15	3	T. Freitas	Ilegele Flores	DEAL0391	45.6
U29	UO 264-2	2	A16	9	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0291	44
U30	UO 312-1	1	94	20	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0387	74.8
U35	UO 275-2	2	26	5	Aradetung Flores	Aradetung Flores	DEAL0387	51.3
U37	UO 226-3	3	A8	2	T. Freitas	Ilegele Flores	DEAL0391	51.3
U38	UO 236-1	1	A26	5	T. Freitas	Ilegele Flores	DEAL0391	53.6
U43	UO 319		4	2	Ilimandiri - Flores	Ilimandiri - Flores	DEAL1967	
U45	UO 231-1	1	A15	9	T. Freitas	Ilegele Flores	DEAL0391	45.6
U46	UO 237-1	1	A29	2	T. Freitas	Ilegele Flores	DEAL0391	56.2
U57	UO 368-2	2	28	8	Anhembí -SP T8c51	Timor	DEAL0290	32.3
U62	UO 261-1	1	A12	9	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0291	39.1
U76	UO 364-1	1	24	3	Anhembí -SP T8g71	Timor	DEAL0290	36.2
U77	UO 242-2	2	A10	5	Anhembí T10B71	Outras Ilhas	DEAL0192	43
U81	UO 257-3	3	A7	9	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0291	48.4
U88	UO 303-2	2	52	14	Ilegele Flores	Ilegele Flores	DEAL0387	42.1
U95	UO 261-2	2	A12	6	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0291	39.1
U96	UO 357-3	3	16	6	Brotas-SP IPEF	Timor	DEAL0290	33.5
U100	UO 360-2	2	19	3	Resende IPEF	Timor	DEAL0290	35.3
U102	UO 227-3	3	A9	2	T. Freitas	Ilegele Flores	DEAL0391	60.8
U105	UO 287-1	1	45	5	Ilegele Flores	Ilegele Flores	DEAL0387	48.9
U106	UO 267-2	2	A20	6	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0291	40.5
U109	UO 350-3	3	7	1	Linhares - ES FRDSA	Outras Ilhas	DEAL0290	44.1
U112	UO 307-1	1	89	10	T. Freitas	Egon Flores	DEAL0387	67.4
U113	UO 303-1	1	52	10	Ilegele Flores	Ilegele Flores	DEAL0387	42.1
U116	UO 365-1	1	25	8	Anhembí -SP T10b71	Timor	DEAL0290	44
U118	UO 312-2	2	94	3	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0387	74.8
U120	UO 277-2	1	29	14	Aradetung Flores	Aradetung Flores	DEAL0387	60.1
U121	UO 259-3	3	A9	4	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0291	48.2
U124	UO 266-1	1	A18	7	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0291	41.8
U125	UO 271-2	2	A28	10	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0291	42.5
U128	UO 226-1	1	A8	10	T. Freitas	Ilegele Flores	DEAL0391	51.3
U129	UO 283-1	1	40	4	Lewotobi Flores	Lewotobi Flores	DEAL0387	35.9
U130	UO 282-1	1	38	11	Lewotobi Flores	Lewotobi Flores	DEAL0387	68.8
U135	UO 314-1	1	96	11	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0387	54.9
U136	UO 248-1	1	A18	5	Anhembí T10B71	Outras Ilhas	DEAL0192	45.9
U137	UO 282-2	2	38	19	Lewotobi Flores	Lewotobi Flores	DEAL0387	68.8
U141	UO 252-3	3	A27	4	Anhembí T8h69	Outras Ilhas	DEAL0192	47.2

Quadro 2A – Cont.

Ident. Viçosa	Cod CELMAR	Rep	Prog	Blo	Procedência	Origem	Delineamento	IMA
U143	UO 316-1	1	98	3	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0387	82.3
U147	UO 275-2	2	26	5	Aradetung Flores	Aradetung Flores	DEAL0387	51.3
U155	UO 366-1	1	26	3	Anhembí -SP T8i70	Flores	DEAL0290	36.1
U162	UO 236-2	2	A26	7	T. Freitas	Ilegele Flores	DEAL0391	53.6
U163	UO 247-1	1	A17	7	Anhembí T10B71	Outras Ilhas	DEAL0192	46.1
U175	UO 355-2	2	13	6	Itamarandiba-MG	Timor	DEAL0290	42.2
G176	GO 106-2	2	G28	7	Woodum Kangaroo River - WWSA		DEAL 0189S2	27.1
G181	GO 156-1	1	E4	6	Aracruz - ES	Cairns Dan	DEAL 0189S3	31.6
G182	GO 155-2	2	E2	11	Aracruz - ES	Cairns Dan	DEAL 0189S3	25.5
G185	GO 021		A26	9	Belo Oriente - Cenibra	lote 06/88	DEAL 0189S1	28.9
G189	GO 215		10	3	São Mateus - ES	Atherton - QLD	DEAL 05/89	19.69
G190	GO 120-1	1	A9	10	Aracruz - ES	Mount Speac	DEAL 0189S3	39.7
G191	GO 163		E11	7	Aracruz - ES	Cairns Dan	DEAL 0189S3	21.9
G192	GO 159		E7	9	Aracruz - ES	Cairns Dan	DEAL 0189S3	25.6
G197	GO 179		F29	2	Windsor Tableland	Windsor Tableland	DEAL 0189S3	41
G198	GO 111-2	2	G43	12	Woodum Kangaroo River - WWSA		DEAL 0189S2	36.3
G201	GO 207							
U6	UO 378		16	4	Lewotobi Flores	Lewotobi Flores	DEAL0586	44.1
U7	UO 338		5	ESPAÇ.	Desconhecida	Desconhecida	DEAL0190	41.4
U15	UO 273-1	1	10	3	Ilimandiri - Flores	Ilimandiri - Flores	DEAL0387	60.6
U20	UO 223-1	1	A5	2	T. Freitas	Ilegele Flores	DEAL0391	53.3
U23	UO 241-2	2	A09	7	Anhembí T10B71	Outras Ilhas	DEAL0192	56.2
U24	UO 316-2	2	98	9	T. Freitas	Ilimandiri - Flores	DEAL0387	82.3
G167	GO 70-2	2	A10	12	Mount Lewis A	Mount Lewis A	DEAL 0189S2	30.6
G204	GO 044-1	1	C09	3	Itabira - FRDSA	Atherton - QLD	DEAL 0189S1	63.9
G211	GO 208		27	2	São Mateus - ES	Atherton - QLD	DEAL 03/89	27.88
G213	GO 007		A9	12	Belo Oriente - Cenibra	lote 06/87	DEAL 0189S1	42.5
G216	GO 217		10	4	São Mateus - ES	Atherton - QLD	DEAL 05/89	19.69
G218	GO 196				Aracruz - ES		DEAL 15/89	28.9
G221	GO 192				Aracruz - ES		DEAL 15/89	28.9
G222	GO 170-3	3	E22	9	Aracruz - ES	Cairns Dan	DEAL 0189S3	35.5
G224	GO 156-2	2	E4	11	Aracruz - ES	Cairns Dan	DEAL 0189S3	31.6
G226	GO 130-2	2	A23	9	Aracruz - ES	Mount Speac	DEAL 0189S3	24.1
G227	GO 154		D27	4	Aracruz - ES	Herberton SF	DEAL 0189S3	31.9
G229	GO 060-2	2	C31	9	Itabira - FRDSA	Atherton - QLD	DEAL 0189S1	37.7
G234	GO 005		A6	5	Belo Oriente - Cenibra	lote 06/87	DEAL 0189S1	32.1
G236	GO 124-3	3	A16	9	Aracruz - ES	Mount Speac	DEAL 0189S3	33.5
G237	GO 164		E13	5	Aracruz - ES	Cairns Dan	DEAL 0189S3	36.8
G243	GO 032		B10	7	Divinolândia		DEAL 0189S1	23
G244	GO 209		29	3	São Mateus - ES	Atherton - QLD	DEAL 03/89	42.35
G248	GO 188				Aracruz - ES		DEAL 15/89	28.91
G250	GO 004		A4	9	Belo Oriente - Cenibra	lote 06/88	DEAL 0189S1	22.2
U143	UO 316-1	1	98	3	Anhembí T10B71	Outras Ilhas	DEAL0192	46.1
U155	UO 366-1	1	26	3	Itamarandiba-MG	Timor	DEAL0290	42.2

Quadro 2A – Cont.

Ident. Viçosa	Cod CELMAR	Rep	Prog	Blo	Procedência	Origem	Delineamento	IMA
G253	GO 041		C02	11	Itabira - FRDSA	Atherton - QLD	DEAL 0189S1	35.2
G255	GO 115		A2	2	Aracruz - ES	Mount Speac	DEAL 0189S3	27.6
G256	GO 052		C20	12	Itabira - FRDSA	Atherton - QLD	DEAL 0189S1	22.4
G261	GO 113		BORDA	10			DEAL 0189S2	
G262	GO 139		B3	5	Aracruz - ES	Dimbulah - QLD	DEAL 0189S3	29.9
G265	GO 149-1	1	D10	5	Aracruz - ES	Herberton SF	DEAL 0189S3	33
G268	GO 069-1	1	A7	6	Mount Lewis A	Mount Lewis A	DEAL 0189S2	24.6
G269	GO 133		A26	3	Aracruz - ES	Mount Speac	DEAL 0189S3	27.9
G270	GO 109		G40	7	Woodum Kangaroo River - WWSA		DEAL 0189S2	24
G271	GO 178		F23	2	Windsor Tableland	Windsor Tableland	DEAL 0189S3	39.2
G272	GO 145	1	C6	3	Aracruz - ES	Gadgarra - QLD	DEAL 0189S3	44.2
G273	GO 061-1	1	C32	3	Itabira - FRDSA	Atherton - QLD	DEAL 0189S1	24.5
G274	GO 176		F21	7	Windsor Tableland	Windsor Tableland	DEAL 0189S3	16.3
G278	GO 087-1	1	D10	6	Mount Spurgion	Mount Spurgion	DEAL 0189S2	27.7
G279	GO 101-1	1	G16	12	Woodum Kangaroo River - WWSA		DEAL 0189S2	52.8
G281	GO 172		F8	6	Windsor Tableland	Windsor Tableland	DEAL 0189S3	35.8
G283	GO 123-3	3	A15	11	Aracruz - ES	Mount Speac	DEAL 0189S3	39.8
G287	GO 144-1	1	C5	3	Aracruz - ES	Gadgarra - QLD	DEAL 0189S3	29.1
G293	GO 256-2							
G331	G45							
G337	G49							
G398	Ge939							
G400	G05		A6	5	Belo Oriente - Cenibra	lote 06/87	DEAL 0189S1	32.1
G401	G03							
U428	U63							
U433	U47							
U435	U29							
U438	UO 251-2	2	A25	8	Anhembí T8i70	Outras Ilhas	DEAL0192	39.2
U440	UO 274-1	1	12	6	Ilimandiri - Flores	Ilimandiri - Flores	DEAL0387	54.3
U443	UO 387		17	4	Ilegele Flores	Ilegele Flores	DEAL0586	46.4
U450	UO 230-2	2	A14	5	T. Freitas	Ilegele Flores	DEAL0391	58.9
U457	UO 287-2	2	45	6	Ilegele Flores	Ilegele Flores	DEAL0387	48.9
U458	UO 224-2	2	A6	4	T. Freitas	Ilegele Flores	DEAL0391	52.2
G206	GO 117-2	2	A4	12	Aracruz - ES	Mount Speac	DEAL 0189S3	29.8
G223	GO 194				Aracruz - ES		DEAL 15/89	28.9
U425	U67							
U468	UO 223-2	2	A5	10	T. Freitas	Ilegele Flores	DEAL0391	53.3
U469	UO 278-1	1	32	12	Lewotobi Flores	Lewotobi Flores	DEAL0387	61.3
U470	UO 276-1	1	28	20	Aradetung Flores	Aradetung Flores	DEAL0387	57.5
U473	UO 245-1	1	A14	7	Anhembí T10B71	Outras Ilhas	DEAL0192	46.3
G480	GO 087-1	1	D10	6	Mount Spurgion	Mount Spurgion	DEAL 0189S2	27.7
U481	UO 237-2	2	A29	1	T. Freitas	Ilegele Flores	DEAL0391	56.2
U482	UO 241-1	1	A09	10	Anhembí T10B71	Outras Ilhas	DEAL0192	56.2
U485	UO 355	1	13	3	Itamarandiba-MG	Timor	DEAL0290	42.2

Quadro 3A – Matriz de distância Euclidiana média entre 31 progenitores selecionados no delineamento experimental 189. A identificação está de acordo com o Quadro 2A – APÊNDICE

G167	0.00	2.41	5.09	9.84	1.55	7.40	5.74	3.24	6.74	8.08	7.17	7.64	1.58	4.71	5.63	0.89	4.70	4.59	5.03	7.14	6.31	2.82	7.73	3.47	4.96	3.95	3.82	9.19	6.88	6.94	1.04
G176	2.41	0.00	4.56	8.27	1.15	8.32	3.39	0.91	8.23	7.08	8.94	7.55	2.61	2.31	5.08	3.22	4.84	5.86	2.73	4.87	6.48	1.12	5.56	2.72	4.86	2.38	2.08	9.53	7.06	8.02	3.03
G181	5.09	4.56	0.00	5.97	4.20	4.88	6.08	4.98	5.81	3.78	6.99	3.05	3.58	4.86	0.61	1.40	3.81	5.68	5.45	3.73	5.47	1.92	0.86	2.57	6.50	5.23	2.94	4.89	4.67	4.89	4.67
G182	9.84	8.27	5.97	0.00	8.43	9.21	6.97	7.98	10.99	2.82	12.26	6.75	8.73	6.81	5.89	10.28	6.91	9.23	7.09	4.83	6.78	7.28	3.93	6.57	6.61	6.17	9.21	8.19	6.79	9.63	9.91
G185	1.55	1.15	4.20	8.43	0.00	7.42	4.34	1.95	7.23	6.89	7.90	7.07	1.61	3.26	4.16	4.86	3.63	5.61	5.81	1.27	6.19	2.34	4.32	2.55	2.99	8.84	6.38	7.09	2.12	6.62	
G190	7.40	8.32	4.88	9.21	7.42	0.00	10.57	8.98	2.33	6.40	3.55	3.55	6.02	9.38	4.84	6.93	3.75	2.88	10.03	10.15	2.72	7.60	10.06	5.97	4.09	7.09	10.35	2.66	2.47	0.79	6.62
G191	5.74	3.39	6.08	6.97	4.34	10.57	0.00	2.52	11.03	7.02	11.92	9.00	5.76	1.38	6.47	6.57	6.89	8.60	0.76	2.49	8.23	3.34	3.35	4.67	6.73	3.61	2.82	11.15	8.72	10.47	6.40
G192	3.24	0.91	4.98	7.98	1.95	8.98	2.52	0.00	9.03	7.09	9.78	8.02	3.46	1.62	5.49	4.08	5.42	6.63	1.85	4.25	7.00	1.42	5.01	3.18	5.39	2.53	1.54	10.05	7.56	8.74	3.93
G197	6.74	8.23	5.81	10.99	7.23	3.33	11.03	9.03	0.00	8.22	1.32	5.21	5.66	9.77	5.89	6.05	4.53	2.44	10.41	11.08	4.28	7.78	11.17	6.42	4.95	7.60	10.21	4.79	4.35	1.59	5.83
G206	8.08	7.08	3.78	2.82	6.89	6.40	7.02	7.09	8.22	0.00	9.49	4.28	6.75	6.39	3.70	8.33	4.41	6.59	6.85	5.44	4.05	6.00	4.86	4.76	4.20	4.86	8.53	5.60	4.01	6.83	7.94
G213	7.17	8.94	6.99	12.26	7.90	3.55	11.92	9.78	1.32	9.49	0.00	6.51	6.33	10.66	7.10	6.39	5.70	3.39	11.27	12.15	5.59	8.60	12.29	7.41	6.14	8.59	10.84	5.99	5.66	2.86	6.27
G222	7.64	7.55	3.05	6.75	7.07	3.55	9.00	8.02	5.21	4.28	6.51	0.00	6.06	7.84	2.58	7.47	3.05	4.44	8.67	7.93	1.80	6.75	7.70	4.91	2.76	5.60	9.54	2.57	1.83	3.88	6.98
G224	1.58	2.61	3.58	8.73	1.61	6.02	5.76	3.46	5.66	6.75	6.33	6.06	0.00	4.54	4.11	1.62	3.12	3.34	5.08	6.61	4.75	2.45	7.06	2.21	3.39	3.04	4.56	7.66	5.33	5.62	1.20
G227	5.63	5.08	0.61	5.89	4.77	4.84	6.47	5.49	5.89	3.70	7.10	2.58	4.11	5.27	0.00	5.68	1.72	4.07	6.12	5.65	2.24	4.28	5.62	2.51	1.09	3.03	7.01	4.91	2.80	4.89	5.17
G234	0.89	3.22	5.17	10.28	2.29	6.93	6.57	4.08	6.05	8.33	6.39	7.47	1.62	5.48	5.68	0.00	4.59	4.06	5.87	7.84	6.13	3.51	8.39	3.80	4.91	4.46	4.69	8.87	6.68	6.40	0.58
G236	4.70	4.84	1.40	6.91	4.16	3.75	6.89	5.42	4.53	4.41	5.70	3.05	3.12	5.67	1.72	4.59	0.00	2.47	6.38	6.58	1.67	4.05	6.64	2.28	0.65	3.35	6.88	4.70	2.29	3.67	4.14
G237	4.59	5.86	3.81	9.23	4.86	2.88	8.60	6.63	2.44	6.59	3.39	4.44	3.34	7.37	4.07	4.06	2.47	0.00	7.98	8.77	3.01	5.35	8.93	4.05	3.00	5.24	7.85	5.07	3.36	2.35	3.78
G243	5.03	2.73	5.68	7.09	3.63	10.03	0.76	1.85	10.41	6.85	11.27	8.67	5.08	1.07	6.12	5.87	6.38	7.98	0.00	2.90	7.78	2.67	3.71	4.14	6.28	3.16	2.31	10.75	8.28	9.90	5.71
G250	7.14	4.87	5.45	4.83	5.61	10.15	2.49	4.25	11.08	5.44	12.15	7.93	6.61	2.67	5.65	7.84	6.58	8.77	2.90	0.00	7.53	4.37	0.94	4.79	6.26	3.68	5.10	10.14	7.95	10.21	7.52
G253	6.31	6.48	2.35	6.78	5.81	2.72	8.23	7.00	4.28	4.05	5.59	1.80	4.75	7.07	2.24	6.13	1.67	3.01	7.78	7.53	0.00	5.62	7.40	3.82	1.75	4.76	8.48	3.06	0.67	2.96	5.70
G255	2.82	1.12	3.73	7.28	1.27	7.60	3.34	1.42	7.78	6.00	8.60	6.75	2.45	2.20	4.28	3.51	4.05	5.35	2.67	4.37	5.62	0.00	4.92	1.94	4.08	1.54	2.88	8.68	6.18	7.39	3.27
G256	7.73	5.56	5.47	3.93	6.19	10.06	3.35	5.01	11.17	4.86	12.29	7.70	7.06	3.49	5.62	8.39	6.64	8.93	3.71	0.94	7.40	4.82	0.00	5.09	6.30	4.08	5.95	9.83	7.75	10.19	8.06
G262	3.47	2.72	1.92	6.57	2.34	5.97	4.67	3.18	6.42	4.76	7.41	4.91	2.21	3.42	2.51	3.80	2.28	4.05	4.14	4.79	3.82	1.84	5.09	0.00	2.25	1.21	4.68	6.88	4.40	5.82	3.37
G265	4.96	4.86	0.86	6.61	4.32	4.09	6.73	5.39	4.95	4.20	6.14	2.76	3.39	5.49	1.09	4.91	0.65	3.00	6.28	6.26	1.75	4.08	6.30	2.25	0.00	3.16	6.89	4.72	2.40	4.05	4.42
G269	3.95	2.38	2.57	6.17	2.55	7.09	3.61	2.53	7.60	4.86	8.59	5.60	3.04	2.33	3.03	4.66	3.35	5.24	3.16	3.68	4.76	1.54	4.08	1.21	3.16	0.00	4.06	7.74	5.32	6.97	4.06
G270	3.82	2.08	6.50	9.21	2.99	10.35	2.82	1.54	10.21	8.53	10.84	9.54	4.56	2.59	7.01	4.69	6.88	7.85	2.31	5.10	8.48	2.88	5.95	4.68	6.89	4.06	0.00	11.54	9.05	10.05	4.69
G271	9.19	9.53	5.23	8.19	8.84	2.66	11.15	10.05	4.79	5.80	5.99	2.57	7.66	10.03	4.91	8.87	4.70	5.07	10.75	10.14	3.06	8.68	9.83	6.88	4.72	7.74	11.54	0.00	2.54	3.32	8.47
G281	6.88	7.06	2.94	6.79	6.38	2.47	8.72	7.56	4.35	4.01	5.66	1.83	5.33	7.60	2.80	6.68	2.29	3.36	8.28	7.95	0.67	6.18	7.75	4.40	2.40	5.32	9.05	2.54	0.00	2.88	6.28
G283	6.94	8.02	4.89	9.63	7.09	0.79	10.47	8.74	1.59	6.83	2.86	3.88	5.62	9.25	4.89	6.40	3.67	2.35	9.90	10.21	2.96	7.39	10.19	5.82	4.05	6.97	10.05	3.32	2.88	0.00	6.11
G400	1.04	3.03	4.67	9.91	2.12	6.62	6.40	3.93	5.83	7.94	6.27	6.98	1.20	5.23	5.17	0.58	4.14	3.78	5.71	7.52	5.70	3.27	8.06	3.37	4.42	4.06	4.69	8.47	6.28	6.11	0.00

Quadro 4A – Matriz de distância Euclidiana média para 8 progenitores selecionados no delineamento experimental 192. A identificação está de acordo com o Quadro 2A – APÊNDICE

	U23	U481	U77	U473	U163	U136	U438	U141
U23	0	3.91	8.89	6.43	8.88	6.43	10.59	5.71
U481	3.91	0	7.68	5.79	6.46	6.12	9.85	5.80
U77	8.89	7.68	0	2.55	2.85	2.80	2.28	3.69
U473	6.43	5.79	2.55	0	3.74	0.58	4.27	1.86
U163	8.88	6.46	2.85	3.74	0	4.26	4.90	5.04
U136	6.43	6.12	2.80	0.58	4.26	0	4.24	1.86
U438	10.59	9.85	2.28	4.27	4.90	4.24	0	5.09
U141	5.71	5.80	3.69	1.86	5.04	1.86	5.09	0

Quadro 5A – Matriz de distância Euclidiana média para 7 progenitores selecionados no delineamento experimental 290. A identificação está de acordo com o Quadro 2A – APÊNDICE

	U485	U57	U76	U100	U109	U155	U175
U485	0	6.40	4.70	4.60	6.33	7.60	1.36
U57	6.40	0	2.27	3.87	8.08	4.85	6.01
U76	4.70	2.27	0	3.67	6.27	4.18	4.06
U100	4.60	3.87	3.67	0	9.22	7.80	4.36
U109	6.33	8.08	6.27	9.22	0	4.84	6.03
U155	7.60	4.85	4.18	7.80	4.84	0	7.07
U175	1.36	6.01	4.06	4.36	6.03	7.07	0

Quadro 6A – Matriz de distância Euclidiana média entre 24 progenitores selecionados no delineamento experimental 291 e 391. A identificação está de acordo com o Quadro 2A – APÊNDICE

U102	0.00	11.81	8.47	7.34	12.20	10.70	8.06	4.61	5.15	8.81	9.30	10.66	5.49	4.31	9.26	3.19	6.33	4.83	4.56	3.01	4.83	12.86	7.26	12.84
U106	11.81	0.00	6.46	5.05	4.10	3.13	7.69	7.59	8.53	3.57	3.57	3.64	6.36	8.00	5.31	11.52	7.27	10.61	7.92	9.08	10.61	4.39	5.28	4.34
U12	8.47	6.46	0.00	2.83	9.20	3.82	9.56	6.54	3.44	3.32	6.36	8.10	4.39	4.34	1.26	6.65	7.68	5.06	4.10	7.01	5.06	4.94	2.47	4.91
U121	7.34	5.05	2.83	0.00	7.31	3.69	7.10	4.29	3.57	1.91	4.33	5.91	2.20	3.13	2.66	6.52	5.42	5.62	2.98	5.20	5.62	5.73	0.94	5.63
U124	12.20	4.10	9.20	7.31	0.00	6.13	5.58	7.63	10.31	5.93	3.20	1.72	7.45	9.38	8.31	12.86	6.17	12.36	9.47	9.19	12.36	7.87	7.31	8.04
U125	10.70	3.13	3.82	3.69	6.13	0.00	8.54	7.18	6.51	2.01	4.19	5.50	5.37	6.58	2.65	9.76	7.32	8.49	6.45	8.33	8.49	2.53	3.49	2.72
U128	8.06	7.69	9.56	7.10	5.58	8.54	0.00	4.14	8.65	7.00	4.52	4.47	5.62	7.16	9.31	9.90	2.23	10.24	7.41	5.30	10.24	11.00	7.11	11.10
U162	4.61	7.59	6.54	4.29	7.63	7.18	4.14	0.00	4.75	5.21	4.85	6.06	2.18	3.13	6.73	5.85	2.22	6.19	3.41	1.62	6.19	9.62	4.32	9.62
U20	5.15	8.53	3.44	3.57	10.31	6.51	8.65	4.75	0.00	5.05	7.12	8.91	3.24	1.76	4.45	3.29	6.51	2.10	1.59	4.46	2.10	8.23	3.28	8.20
U21	8.81	3.57	3.32	1.91	5.93	2.01	7.00	5.21	5.05	0.00	3.18	4.81	3.39	4.76	2.53	8.15	5.59	7.13	4.67	6.38	7.13	4.42	1.78	4.45
U26	9.30	3.57	6.36	4.33	3.20	4.19	4.52	4.85	7.12	3.18	0.00	1.98	4.31	6.23	5.68	9.69	3.92	9.16	6.31	6.37	9.16	6.56	4.24	6.71
U29	10.66	3.64	8.10	5.91	1.72	5.50	4.47	6.06	8.91	4.81	1.98	0.00	5.91	7.85	7.30	11.34	4.82	10.94	7.94	7.66	10.94	7.56	6.01	7.65
U37	5.49	6.36	4.39	2.20	7.45	5.37	5.62	2.18	3.24	3.39	4.31	5.91	0.00	1.94	4.58	5.46	3.66	5.13	2.06	3.05	5.13	7.69	2.19	7.67
U38	4.31	8.00	4.34	3.13	9.38	6.58	7.16	3.13	1.76	4.76	6.23	7.85	1.94	0.00	5.00	3.59	5.10	3.31	0.35	2.96	3.31	8.61	3.09	8.55
U45	9.26	5.31	1.26	2.66	8.31	2.65	9.31	6.73	4.45	2.53	5.68	7.30	4.58	5.00	0.00	7.71	7.62	6.22	4.78	7.47	6.22	3.80	2.42	3.76
U450	3.19	11.52	6.65	6.52	12.86	9.76	9.90	5.85	3.29	8.15	9.69	11.34	5.46	3.59	7.71	0.00	7.84	1.93	3.62	4.66	1.93	11.50	6.39	11.45
U458	6.33	7.27	7.68	5.42	6.17	7.32	2.23	2.22	6.51	5.59	3.92	4.82	3.66	5.10	7.62	7.84	0.00	8.07	5.37	3.42	8.07	9.85	5.30	9.96
U46	4.83	10.61	5.06	5.62	12.36	8.49	10.24	6.19	2.10	7.13	9.16	10.94	5.13	3.31	6.22	1.93	8.07	0.00	3.21	5.39	0.40	9.99	5.37	9.95
U468	4.56	7.92	4.10	2.98	9.47	6.45	7.41	3.41	1.59	4.67	6.31	7.94	2.06	0.35	4.78	3.62	5.37	3.21	0.00	3.30	3.21	8.43	2.98	8.35
U481	3.01	9.08	7.01	5.20	9.19	8.33	5.30	1.62	4.46	6.38	6.37	7.66	3.05	2.96	7.47	4.66	3.42	5.39	3.30	0.00	5.39	10.70	5.14	10.70
U482	4.83	10.61	5.06	5.62	12.36	8.49	10.24	6.19	2.10	7.13	9.16	10.94	5.13	3.31	6.22	1.93	8.07	0.40	3.21	5.39	0.00	9.99	5.37	9.95
U62	12.86	4.39	4.94	5.73	7.87	2.53	11.00	9.62	8.23	4.42	6.56	7.56	7.69	8.61	3.80	11.50	9.85	9.99	8.43	10.70	9.99	0.00	5.62	0.68
U81	7.26	5.28	2.47	0.94	7.31	3.49	7.11	4.32	3.28	1.78	4.24	6.01	2.19	3.09	2.42	6.39	5.30	5.37	2.98	5.14	5.37	5.62	0.00	5.62
U95	12.84	4.34	4.91	5.63	8.04	2.72	11.10	9.62	8.20	4.45	6.71	7.65	7.67	8.55	3.76	11.45	9.96	9.95	8.35	10.70	9.95	0.68	5.62	0.00