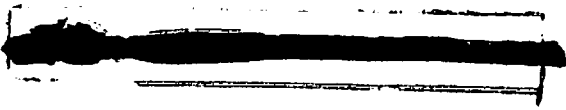


**MACHO ESTERILIDADE EM
*EUCALYPTUS UROPHYLLA***

ISABELLA ANTONIA NOUGALLI TONACO

2002



53832

38111 MFN

ISABELLA ANTONIA NOUGALLI TONACO

UFV

MACHO ESTERILIDADE EM *EUCALYPTUS UROPHYLLA*

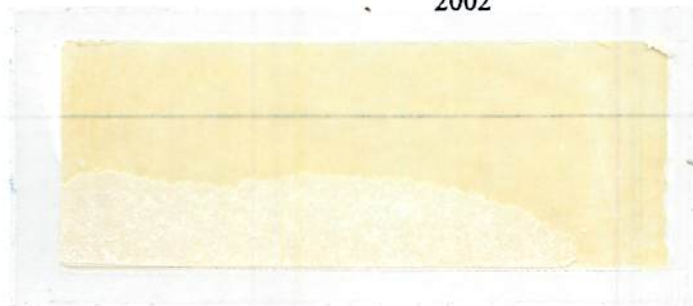
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Agronomia, Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Lisete Chamma Davide

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2002



**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Tonaco, Isabella Antonia Nougalli

Macho esterilidade em *Eucalyptus urophylla* / Isabella Antonia Nougalli

Tonaco. -- Lavras : UFLA, 2002.

51 p. : il.

Orientadora: Lisete Chamma Davide.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Eucalipto. 2. Macho esterilidade. 3. Melhoramento Genético. 4. Microscopia eletrônica. 5. Marcador molecular. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.97342

ISABELLA ANTONIA NOUGALLI TONACO

**MACHO ESTERILIDADE EM *EUCALYPTUS*
*UROPHYLLA***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Agronomia, Área de
Concentração em Genética e
Melhoramento de Plantas, para a
obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 29 de maio de 2002.

Gabriel Dehon S. P. Rezende

ARACRUZ CELULOSE S.A.

Luciano Vilela Paiva

UFLA


Lisete Chamma Davide

UFLA

(Orientadora)

Lavras

MINAS GERAIS - BRASIL

Este trabalho é dedicado à memória dos meus pais,

Darci Nougalli e

Geraldo de Oliveira Tonaco.

**“Há duas formas para viver sua vida:
Uma é acreditar que não existem milagres.
A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre”.**

**Albert Einstein
1879-1955**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo de bom já aconteceu em minha vida.

À UFLA, pelas grandes oportunidades que me deu durante todos esses anos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À professora Lisete Chamma Davide, pelo seu carinho e atenção, pois sempre foi muito mais que uma orientadora; foi, sem dúvida alguma, uma amiga muito querida.

Ao professor Magno Antonio Patto Ramalho, pela preciosa ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade.

Ao Gabriel Dehon S. P. Rezende, pelo grande apoio e incentivo.

À empresa Aracruz Celulose S.A, pela oportunidade de desenvolver um trabalho aplicado.

À EMBRAPA-CNPMS, pelo apoio durante o desenvolvimento de algumas etapas deste trabalho.

À minha família, Thiago, Divina e Raquel, pelo grande presente que vocês são para mim, com tanto carinho, força e amor. Obrigada!

Aos professores do DBI, João Bosco dos Santos, César Augusto Brasil Pereira Pinto, Giovana Augusta Torres, Elaine Aparecida de Souza, João Cândido de Souza e Ângela Abreu, pelos incentivos e amizade durante esses anos.

Aos grandes amigos, Dyeme, Marcos (Cabeça), Rose, Ana Luiza e Nara. Ficaram para mim as melhores lembranças de amizade. Obrigada!

Aos colegas João Luiz e Janaína, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética, pela convivência e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, especialmente para o Lamartine e Juliano, pela ajuda e amizade.

Aos amigos Francislei, Fausto e Vânia pela amizade e valiosas dicas.

A todos os amigos do GEN e funcionários do DBI.

À querida Maria Cristina e sua família, que têm acompanhado minha vida, sendo sempre tão especiais para mim ! Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 Introdução	1
2 Referencial teórico	4
2.1 <i>Eucalyptus urophylla</i> ST Blake	4
2.2 Biologia floral	5
2.3 Microsporogênese e desenvolvimento do grão de pólen	7
2.4 Sistemas que impedem a autofecundação	10
2.5 Métodos de identificação da esterilidade masculina	15
2.5.1 Estudos citológicos e anatômicos	15
2.5.2 Marcadores moleculares RAPD	18
3 Material e métodos	23
3.1 Material genético	23
3.2 Metodologia	23
3.2.1 Determinação da viabilidade e tamanho dos grãos de pólen	23
3.2.2 Aspectos do desenvolvimento dos estames ao microscópio eletrônico de varredura	25
3.2.3 Identificação de marcas moleculares associadas ao fenótipo macho estéril ..	26
4 Resultados	28
4.1 Viabilidade e tamanho dos grãos de pólen	28
4.2 Aspectos do desenvolvimento dos estames ao microscópio eletrônico de varredura	32
4.3 Identificação de marcas moleculares associadas ao fenótipo macho estéril	36
5 Discussão	39
6 Conclusões	45
Referências bibliográficas	46

RESUMO

TONACO, Isabella Antonia Nougalli. **Macho esterilidade em *Eucalyptus urophylla***. 2002. 51 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Os ganhos obtidos no melhoramento genético do eucalipto no Brasil nos últimos anos foi enorme. A área cultivada passou de pouco mais de 600 mil hectares em 1960 para 3,5 milhões de hectares em 1999. Já a produtividade, que era em 1960 de 20m³/há/ano chegou em 1999 a 40m³/há/ano (Vencosvsky & Ramalho, 2000). Contudo, para que se continue obtendo ganhos é preciso encontrar novas alternativas. Uma delas é a obtenção de sementes híbridas. Apesar de terem sido implementadas inúmeras técnicas para facilitar os processos de emasculação e hibridação do eucalipto, este processo ainda é muito dispendioso. Assim, mecanismos naturais que impedem a autofecundação, tais como a macho esterilidade, podem facilitar e dinamizar o processo. Nos pomares comerciais da empresa Aracruz Celulose S.A. foi encontrado um clone da espécie *E. urophylla*, que apresenta distúrbios na produção de pólen, sugerindo tratar-se de uma planta macho estéril. Esse trabalho objetivou a confirmação deste mecanismo, o estudo inicial de sua herança, bem como a seleção de possíveis marcas moleculares associadas ao fenótipo macho estéril. Utilizando avaliações citológicas de viabilidade do pólen e morfologia dos estames, obteve-se a confirmação deste mecanismo para o clone estéril. Essas avaliações sugeriram que o mecanismo de macho esterilidade é controlado por um gene nuclear, que manifesta-se após a meiose e que o alelo responsável pela não fertilidade é recessivo. Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível visualizar, embora não conclusivamente, que o mecanismo de esterilidade deste clone ocorre por meio da incompleta degenerescência do tapete. Foi possível selecionar quatro primers que geraram polimorfismo capaz de diferenciar a planta macho estéril de plantas macho férteis. A metodologia SCAR permitiu converter um primer aleatório de RAPD em um primer específico de PCR para essa característica almejada.

* Comitê de Orientação: Lisete Chamma Davide – UFLA (Orientadora), Magno Antônio Patto Ramalho – UFLA, Gabriel Dehon S.P. de Rezende – Aracruz Celulose S.A.

ABSTRACT

TONACO, Isabella Antonia Nougalli. **Male sterility in *Eucalyptus urophylla***. 2002. 51 p. Dissertation (Master in Genetics and Plant Breeding) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The gains obtained with genetic breeding of eucalyptus in Brazil in the last years were enormous. The cultivated area passed from 600 thousand hectares in 1960 to 3.5 millions of hectares in 1999. The yield volume which was 20m³/ha/year in 1960 reached 40m³/ha/year in 1999 (Vencovsky & Ramalho, 2000). In order to continue with these gains it is necessary to find new alternative breeding strategies. One of them is the production of hybrid seeds. Although many techniques have been used to facilitate the process of emasculation and hybridization of eucalyptus, this process is still costly. Thus, natural mechanisms that prevent self-fertilization such as male sterility may facilitate the process. In commercial orchards of Aracruz Celulose S.A. it was found a clone of the species *E. urophylla*, that presents problems at the pollen production, indicating it is a male sterile plant. The objective of this work was to confirm this mechanism for the male sterile clone, to study its genetic control, and to select possible molecular markers associated with the male sterile phenotype. Using cytological evaluations of pollen viability and morphology of stamens, a confirmation of this process was obtained. These evaluations suggest that the mechanism of male sterility is controlled by a nuclear gene, post-meiotic and the allele responsible by the non-fertility is recessive. Through electronic microscopy it was possible to visualize the mechanism of sterility, although not conclusively, which occurs by incomplete degeneracy of the tapetum. It was possible to select four primers that produced polymorphism capable to differentiate male sterile plant from male fertile plants. The use of SCAR marker allowed to convert a random RAPD primer into a specific PCR primer for this trait.

* Guidance Committee: Lisete Chamma Davide -UFLA (Major Professor), Magno Antônio Patto Ramalho - UFLA, Gabriel Dehon S. P. de Rezende-Aracruz Celulose S.A.

1 INTRODUÇÃO

O sucesso obtido no melhoramento genético do eucalipto no Brasil nos últimos anos foi enorme. A área cultivada passou de pouco mais de 600 mil hectares, em 1960, para 3,5 milhões de hectares, em 1999. Já a produtividade, que era em 1960 de 20m³/ha/ano chegou em 1999 a 40m³/ha/ano (Vencovsky & Ramalho, 2000). Atualmente, a produtividade está em 45m³/ha/ano e a área total em torno de 3 milhões de hectares (Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2002) ^{*}.

O progresso genético foi, primeiramente, devido à introdução de inúmeras espécies e procedências, realizada desde o início do século XX. A partir da década de 1970, por iniciativa da empresa Aracruz Celulose S.A., foram implementados programas de melhoramento genético na cultura, principalmente por meio da seleção recorrente, especialmente com famílias de meios irmãos, e de seleção massal, em povoamentos comerciais, seguida da clonagem de indivíduos superiores.

Embora o progresso tenha sido expressivo, para continuar tendo ganhos, é necessário utilizar novas metodologias nos programas de melhoramento. Uma delas é a obtenção comercial de sementes híbridas. Como é impossível, por meio de hibridações artificiais, obter sementes em quantidade para atender à demanda, deve-se procurar outros mecanismos que possam auxiliar no processo. O principal deles é o uso do fenômeno da incompatibilidade e/ou macho esterilidade.

A incompatibilidade é um fenômeno comum a um grande número de espécies cultivadas. O pólen contendo o mesmo alelo de incompatibilidade do estigma não desenvolve o tubo polínico, ocorrendo assim o aborto. Dessa forma, nunca ocorre a autofecundação natural, sendo, portanto, um ótimo mecanismo

^{*} Comunicação pessoal (sbs@sbs.gov.br)

nunca ocorre a autofecundação natural, sendo, portanto, um ótimo mecanismo para o melhorista, pois não há necessidade de emasculação na obtenção de sementes híbridas.

Já na esterilidade masculina, que pode ocorrer tanto em espécies com flores bissexuais como hermafroditas, podem ocorrer anormalidades pré ou pós-meióticas que impossibilitam a produção de pólen normal. Nesse caso, a planta macho estéril nunca é autofecundada, e, pelas razões já apontadas, facilita a produção de sementes híbridas.

Há registros de macho esterilidade em mais de 80 espécies, envolvendo 25 gêneros pertencentes a seis famílias diferentes (Ramalho et al., 2001). Na literatura, há relatos de ocorrência de plantas auto-incompatíveis ou macho estéreis também no gênero *Eucalyptus* (Ellis & Sedgley, 1993). No Brasil, já foram identificadas plantas, pela empresa Aracruz Celulose, que apresentam anormalidades na autofecundação (Campinhos et al., 1997). Entretanto, existem informações muito restritas sobre qual o mecanismo envolvido e, principalmente, a respeito do controle genético.

A identificação de plantas macho estéreis no povoamento florestal é trabalhosa, porque os cruzamentos controlados são dificultados, devido ao porte das árvores e pela demora na comprovação da informação. A utilização de algumas estratégias que possam identificar plantas do modo mais precoce possível é fundamental. Uma das possibilidades é por meio de algum marcador. Entre eles, as marcas moleculares, pela maior abrangência do genoma e a facilidade na obtenção da informação, são as mais promissoras. Assim, a identificação de alguma marca associada à expressão de macho esterilidade é altamente desejável, uma vez que já no viveiro seria possível identificar as plantas com esse fenótipo. Além da redução do tempo, há a grande vantagem de se poder avaliar milhares de indivíduos, o que é praticamente impossível com plantas adultas. Isso porque não basta apenas a planta ser macho estéril. É

preciso que ela tenha boa capacidade de combinação também. Dessa forma, o uso de marcas, pelas razões já comentadas anteriormente, tem a vantagem adicional de fornecer condições aos melhoristas de selecionar, entre as plantas macho estéreis, as que são mais promissoras para o programa.

Considerando que esse tipo de informação é fundamental na condução de um programa de melhoramento, foi realizado o presente trabalho, com o objetivo de caracterizar citológica e geneticamente o mecanismo envolvido em uma planta macho estéril da espécie *E. urophylla* e, sobretudo, identificar alguma marca molecular associada a esse fenótipo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Eucalyptus urophylla* ST Blake

O *E. urophylla* ocorre naturalmente fora da Austrália, em algumas ilhas da extremidade do arquipélago de Sonda, nas ilhas de Timor, Wetar, Alor, Pantar, Lomblen, Adomara e Flores, nas coordenadas geográficas 119° a 128°L de longitude e 6° a 11° S de latitude, em altitudes que variam de 300 a 3000 m (Lopez, 1992). A precipitação média nestas regiões varia de 1000 a 1500 mm/ano, com maior concentração de chuvas no verão; a estação seca varia de três a seis meses, com temperatura média das mínimas entre 8°C e 12°C (Pereira, 2001).

No Brasil, o *E. urophylla* foi introduzido em 1919 por Edmundo Navarro de Andrade, no município de Rio Claro, SP. Até o ano de 1996, juntamente com *E. saligna* e *E. grandis*, o *E. urophylla* era uma das espécies do gênero mais plantadas nas regiões típicas de cerrado e com estações secas pronunciadas. Atualmente, no Brasil, existem cerca de 600.000 ha plantados com esta espécie e com seus híbridos (Pereira, 2001). O *E. urophylla* é uma espécie de grande potencialidade para regiões de clima quente e de elevados déficits hídricos. A espécie e seus híbridos são bastante utilizados em programas de reflorestamento, devido ao bom desenvolvimento em regiões tropicais, à boa qualidade de madeira para carvão, celulose, serraria e, principalmente, pela sua resistência ao fungo *Cryphonectria cubensis*, responsável pelo cancro (Pereira, 2001).

Em programas de melhoramento, essa espécie tem sido muito utilizada na obtenção de híbridos, principalmente com *E. grandis*, pois existe uma complementação entre essas espécies para várias características florestais de interesse. A maioria dos pomares destinados à produção de sementes híbridas

entre essas duas espécies foi instalada pela empresa Aracruz Celulose S.A - Espírito Santo, desde a década de setenta do século passado (Ikemori & Campinhos, 1983). Contudo, até o momento, não foi relatada na literatura a existência do mecanismo de macho esterilidade em *E. urophylla*.

2.2 Biologia floral

O bom entendimento da biologia reprodutiva do eucalipto é extremamente importante e necessário para que o melhorista possa utilizar de forma eficiente seus mecanismos reprodutivos na obtenção e produção de sementes. Isso porque o seu adequado conhecimento pode auxiliar na superação de barreiras morfológicas e genéticas para a hibridação, ou mesmo para a pureza genética da espécie (Tuchi, 1994).

O gênero eucalipto possui flores hermafroditas agrupadas em forma de inflorescência. O número de flores simples por inflorescência pode variar (1, 3, 7, 9 ou 11) e essa variação é responsável pela diferenciação taxonômica das espécies. A inflorescência é do tipo umbela, sendo cada uma presa na axila da folha por um pedúnculo (Potts & Gore, 2000).

A biologia floral do eucalipto segue o padrão da maioria das espécies pertencentes à família *Myrtaceae*, na qual o gênero se encontra. O botão floral desenvolve-se inicialmente envolvido por uma bráctea, sendo bastante uniforme dentro das espécies e variável entre elas. Pode ser peciolado ou sésil e é envolvido por uma ou duas capas que constituem o opérculo, com função de proteção das partes femininas e masculinas até a antese (Potts & Gore, 2000).

O estágio de botão compreende, portanto, a presença do opérculo. Este, por sua vez, é originado pela fusão entre pétalas e sépalas, sendo bastante variável de acordo com o subgênero (Eldridge et al., 1993). Atualmente, muitos

trabalhos de taxonomia têm utilizado esta estrutura no intuito de diferenciar principalmente os subgêneros *Monocalyptus* e *Symphyomyrtus* (Potts & Gore, 2000). Sabe-se que o opérculo pode conter duas paredes, uma mais interna e outra mais externa. A parte externa pode cair meses antes do florescimento; já a parte interna só cai quando iniciada essa fase (Eldridge et al., 1993).

A parte masculina da flor é composta pelos estames. Na maioria das espécies, cada estame consiste de um filete que suporta uma antera. Espécies como *E. sideroxylon* e algumas do gênero *Symphyomyrtus* possuem estames externos estéreis. Geralmente, os estames possuem comprimentos diferentes em uma flor (Moncur & Boland, 1989). Diferenças no formato da antera, assim como no local onde o filete se liga, ocorrem com frequência no eucalipto, sendo estes elementos também utilizados na diferenciação entre as espécies (Boland & Sedgley, 1986).

A parte feminina é composta pelo estilete, estigma e ovário. O estilete apresenta diferenças em comprimento, espessura e rigidez de acordo com a espécie. O ovário é multilocular e cada lóculo possui três tipos de estrutura: estruturas estéreis chamadas de ovulóides, óvulos viáveis e óvulos não viáveis. Cada ovário contém aproximadamente 4 ou 5 óvulos potencialmente viáveis. Esse número, contudo, varia de acordo com a espécie, por exemplo, *E. camaldulensis* (4), *E. deglupta* (3-5), *E. grandis* (5), *E. urophylla* (3-4) (Boland et al., 1985). Na maioria das angiospermas, o gametófito feminino maduro é constituído de sete células e oito núcleos. Os óvulos do eucalipto seguem esse padrão típico (Potts & Gore, 2000).

Logo após abertura do opérculo, as anteras deiscentes expõem o pólen, então já pronto para iniciar a polinização. Os agentes polinizadores do eucalipto são basicamente insetos e, em alguns casos, a polinização é realizada por pássaros; a diferença básica entre esses agentes polinizadores está na maior eficiência dos insetos em percorrer maiores distâncias e de se adaptarem a

diferentes condições climáticas (Eldridge et al., 1993). De modo geral, o eucalipto possui hábito alógamo, apresentando fecundação cruzada, com taxa de autofecundação de até 15%. Fenômenos como a macho esterilidade e auto-incompatibilidade influenciam essa elevada taxa de fecundação cruzada (Potts & Gore, 2000).

Os frutos consistem de cápsulas lenhosas e as sementes são pequenas. Sua produção varia enormemente por influência de fatores ambientais, agentes polinizadores e insetos predadores (Eldridge et al., 1993).

2.3 Microsporogênese e desenvolvimento do grão de pólen

A grande maioria dos organismos superiores se reproduzem por via sexuada, que consiste de dois acontecimentos principais, a gametogênese e a fertilização. A gametogênese é a denominação genérica para o processo de formação de gametas, tanto em animais como em vegetais. Em vegetais, a formação dos gametas masculinos é conhecida por microsporogênese, enquanto que os gametas femininos são produzidos pela megasporogênese (Ramalho et al., 2001).

A microsporogênese é o processo de formação do micrósporo, que leva à formação das primeiras células do gametófito masculino. Todo esse processo ocorre no microsporângio, dentro das anteras (Schulz-Schaeffer, 1980).

A antera é constituída por duas tecas separadas por uma zona de tecido estéril, o conectivo. Cada teca, em uma antera jovem, é constituída por dois microsporângios ou sacos polínicos que contêm os microsporócitos ou células mães dos micrósporos (PMCs) (Foster & Gifford, 1974). A parede da antera é constituída pela epiderme, que pode formar papilas ou pêlos. Abaixo dela encontram-se o endotécio, camada mecânica com função na deiscência da antera; os extratos parietais, com células achatadas de curta duração e o tapete,

cujas células têm citoplasma abundante apresentando um ou mais núcleos e que rodeia as PMCs, tendo por função nutrir os micrósporos durante sua formação e contribuir na organização de sua parede. Na antera madura só persistem a epiderme e o endotécio. Observando-se a típica antera madura de uma espermatófita, pode-se notar a existência de quatro microsporângios, os quais se desenvolvem em microsporócitos ou células mães do grão de pólen. Essas células, também chamadas de meiócitos, passam por duas sucessivas divisões meióticas, originando, ao final da microsporogênese, quatro células filhas. Cada célula filha forma quatro micrósporos haplóides, uninucleados, onde cada micrósporo funcional desenvolve-se em um grão de pólen, que consiste no jovem gametófito masculino (Schulz-Schaeffer, 1980).

A regulação do desenvolvimento do grão de pólen, bem como do tubo polínico, tem sido muito estudada. Alguns tópicos podem ser abordados de acordo com o desenvolvimento dessas estruturas. São eles: o papel do desenvolvimento do tapete, a atividade genética no micrósporo e no grão de pólen antes da antese, a síntese de DNA no micrósporo e tubo polínico, os tipos de RNA e proteínas sintetizadas no tubo polínico, incluindo a bioquímica dos núcleos vegetativos e reprodutivos e sua finalidade e, finalmente, as interações entre o pólen e o pistilo após a polinização (Mascarenhas, 1975). Para um melhor entendimento da formação, funcionamento e desenvolvimento do grão de pólen, estudos utilizando a microscopia eletrônica foram bastante valiosos.

As células esporogênicas jovens estão rodeadas pelo tapete. As PMCs são produzidas por mitose no tecido esporogênico, até que, após a meiose, formem-se micrósporos. Estudos realizados têm demonstrado que, antes da meiose, as células esporogênicas, dentro das anteras, encontram-se conectadas por pontes citoplasmáticas, denominadas de plasmodesmatas. Essas pontes ocorrem entre elas e as células do tapete (Maheshwari, 1950).

Antes das células-mães dos grãos de pólen iniciarem a fase do leptóteno, uma parede de calose irá recobri-las. A calose é um polímero de β -1,3 glucose e é depositada entre a parede celular e a parede plasmática da célula-mãe do pólen (Mascarenhas, 1975).

No início do leptóteno, os plasmodesmatas, que conectam as PMCs às células do tapete, desaparecem. Enquanto isso, a parede de calose continua a se espessar. Em certas regiões da parede celular das células mães dos grãos de pólen não ocorre a deposição da calose e, nestas regiões, formam-se conexões citoplasmáticas denominadas de citomixia, entre as PMCs vizinhas. Os canais de citomixia diminuem no final da prófase meiótica. Na telófase I, poucos canais ainda estão presentes e esse número cai gradativamente até que no início da meiose II, as células-mães tornam-se completamente individualizadas, sendo cada uma rodeada por uma parede de calose independente. Após a meiose II, a parede de calose agrupa os quatro esporos haplóides numa tétrade, sendo cada micrósporo separado dos outros três por essa fina camada. O Complexo de Golgi também está envolvido no desenvolvimento dessa parede de calose. Todas essas alterações que ocorrem na parede e nas membranas contribuem para que exista uma intensa comunicação das células durante a prófase e depois da meiose, para que as células permaneçam individualizadas (Mascarenhas, 1975).

A parede de calose, que rodeia as tétrades e os micrósporos individuais, desaparece com o tempo. Ao liberarem-se da tétrade, os micrósporos passam por um rápido aumento de tamanho, volume e alterações em sua forma. Essas alterações ocorrem até que seja atingido o máximo volume do grão de pólen antes da deiscência da antera (Mascarenhas, 1975).

Com a utilização da microscopia eletrônica, é possível identificar as camadas que formam a parede do grão de pólen. Ela é composta por diferentes componentes químicos e sua formação inicia-se logo após o término da meiose.

O grão de pólen adulto encontra-se rodeado por uma fina camada contendo microfibrilas de celulose, pectina, hemicelulose e proteínas, a intina. É a parede interna do grão de pólen, que inicia sua formação logo após a liberação dos esporos da tétrade. Por fora desta há uma outra camada, a exina, composta de esporopolenina, uma substância que confere grande resistência ao grão de pólen (Heslop-Harrison, 1966).

Na superfície do grão de pólen podem ocorrer áreas em que a exina encontra-se adelgada ou, então, ausente, denominadas aberturas ou poros. Através dessas aberturas, emerge o tubo polínico no momento da germinação. Após dispersos, os grãos de pólen são transportados ao estigma por agentes polinizadores diversos, onde germinam. O tubo polínico atravessa os tecidos do estilete e, finalmente, penetra nos tecidos do óvulo, entrando no saco embrionário (Heslop-Harrison, 1966).

2.4 Mecanismos que impedem a autofecundação

Em plantas, de modo geral, existem mecanismos que impedem a autofecundação. Um desses mecanismos é denominado de incompatibilidade e encontra-se regularmente em várias espécies.

O termo incompatibilidade refere-se à ausência de desenvolvimento de tubos polínicos, impossibilitando assim a autofecundação.

Cerca de metade das famílias das angiospermas hermafroditas – aproximadamente 150 famílias, representadas por mais de 3.000 espécies, apresenta esse fenômeno. Entre elas, estão plantas de valor econômico, como a macieira, o repolho, o centeio, o girassol e o fumo (Ramalho et al., 2001).

Mediante cruzamentos inapropriados, constatou-se que a incapacidade de crescimento do tubo polínico é explicada, geneticamente, pela presença de

uma série alélica. Os alelos dessa série são simbolizados pela letra S – do inglês “self-incompatibility”. Existem dois sistemas de incompatibilidade em angiospermas hermafroditas: o sistema esporofítico e o sistema gametofítico (Ramalho et al., 2001).

A consequência principal dos sistemas de incompatibilidade é impedir a autogamia e promover o livre cruzamento, ou alogamia, entre indivíduos não aparentados. Portanto, nas espécies em que ocorre, as plantas são altamente heterozigóticas (Bueno et al., 2001). Além disso, a auto-incompatibilidade tem sido relatada para muitas espécies como um sistema genético no controle da dispersão de pólen dentro das populações (Campinhos et al., 1997).

Contudo, não se deve confundir esses sistemas com os mecanismos de esterilidade, pois nestes não há formação de sementes viáveis devido a alterações genéticas e/ou cromossômicas ou por alguma forma de alteração funcional que afeta a formação dos gametas ou o desenvolvimento do embrião. Na macho esterilidade, os gametas masculinos geralmente são inviáveis, ao passo que na auto incompatibilidade eles são férteis, havendo apenas uma barreira genético-fisiológica para que ocorra a fertilização (Bueno et al., 2001).

A esterilidade masculina é o fenômeno pelo qual plantas hermafroditas ou monóicas apresentam o aparelho reprodutivo feminino normal, mas não produzem pólen viável. Não podem assim ser autofecundadas e só irão produzir sementes por pólen proveniente de outra planta. Esse caráter, denominado macho esterilidade, é de grande importância, pois facilita a produção de sementes híbridas F_1 sem a necessidade de emasculação, que encarece o custo de produção (Ramalho et al., 2001).

Há registros de macho esterilidade em mais de 80 espécies, envolvendo 25 gêneros pertencentes a seis famílias diferentes. Como já mencionado, o conhecimento desse fenômeno possibilitou o emprego comercial da produção de

DNA de aproximadamente 2.350 pares de nucleotídeos. O tipo S foi o primeiro citoplasma a ser identificado nos EUA e o citoplasma do tipo C foi descoberto no Brasil, numa variedade denominada Charrua. Nesses dois últimos casos, a esterilidade está associada à presença de DNA nuclear junto ao DNA mitocondrial. Esse DNA adicional é de origem plasmidial e o modo como esse DNA extra afeta a macho esterilidade ainda não foi esclarecido (Ramalho et al., 2001).

Algumas plantas que possuem o sistema de esterilidade citoplasmática apresentam genes nucleares restauradores da fertilidade. Esse sistema, conhecido como macho esterilidade genético-citoplasmática, é um mecanismo muito conhecido no milho. Também tem sido relatado em um grande número de espécies, em que o seu controle facilita a produção de sementes híbridas (Horner & Palmer, 1995).

A macho esterilidade também pode ser induzida pela interação de fatores ambientais com genes nucleares. Esse procedimento tem sido muito utilizado no desenvolvimento de muitos híbridos em algumas culturas na China. No processo, a duração e concentração de um fator ambiental em particular, em um determinado estágio de desenvolvimento da planta, pode induzir a macho esterilidade. Entretanto, nesse caso, o processo é reversível (Virmani, 2001).

Para o eucalipto, a macho esterilidade constitui-se de um importante mecanismo na prevenção natural de autopolinizações em populações florestais. Embora o eucalipto apresente flores bissexuais e árvores só com flores hermafroditas, há um número crescente de relatos sobre árvores que apresentam anteras estéreis e todas as flores funcionalmente femininas (Ellis & Sedgley, 1993). Essas árvores tornam-se, então, obrigatoriamente de fecundação cruzada. A formação de anteras estéreis em algumas espécies de eucalipto, segundo (Carr, 1962), seria devido ao fechamento das anteras pelos estames ou pelo desenvolvimento incompleto das anteras (Ellis & Sedgley, 1992). Esses níveis

significantes de macho esterilidade individuais são relatados em *E. pulverulenta* (Peters et al., 1990) e em *E. leucoxyton* (Ellis et al., 1991). Pryor (1971) também relatou a ocorrência de pólen estéril em algumas árvores de *E. grandis* e Davis (1969) identificou alta proporção de flores macho estéreis em algumas árvores de *E. stellulata*.

2.5 Métodos de identificação da esterilidade masculina

2.5.1 Estudos citológicos e anatômicos

Os mecanismos responsáveis pela macho esterilidade são bastante variados. Vários relatos na literatura apresentam anomalias que poderão ser associadas a essa característica (Edwardson, 1970; Laser, 1972; Harvey et al., 1972). Contudo, avaliações feitas pela microscopia têm sido geralmente usadas para determinar diferenças entre indivíduos normais (férteis) e anormais (estéreis).

Muitos autores apresentam explicações para a macho-esterilidade em várias espécies sugerindo que mais de um mecanismo esteja envolvido no aborto de pólen (Horner & Rogers, 1974).

Laser & Lestern (1972) realizaram estudos anatômicos e citológicos comparativos para diferenciar linhagens macho estéreis em angiospermas. Eles utilizaram diferentes técnicas para a investigação e sugeriram que o mecanismo é bastante complexo. Daí serem necessárias várias técnicas diferentes para que se chegue a um resultado comum.

Segundo Chauhan & Singh (1966), em um grande número de plantas cultivadas, o aborto do grão de pólen está ligado ao comportamento anormal das

células do tapete. O comportamento e desenvolvimento desse tecido têm se mostrado variáveis.

No caso do trigo, por exemplo, o aborto do pólen pode estar relacionado com os seguintes fenômenos: (1) o tapete é desorganizado nos estágios pré-meióticos; (2) a degeneração do tapete é retardada e os grãos de pólen são destituídos de poro germinativo, citoplasma e núcleo; (3) um tapete periplasmodium é formado quando as células-mães dos micrósporos entram em meiose, comunicam-se e degeneram. Esses fenômenos estão representados em espiguetas e em seqüências definidas, contudo, apenas um tipo ocorre em cada flor. O tipo (1) ocorre na flor central, enquanto que os tipos (2) e (3) são encontrados nas flores laterais. (Chauhan & Singh, 1966).

Horner & Rogers (1974) também realizaram um estudo sobre macho esterilidade citoplasmática em *Capsicum Annuum* e puderam observar e comparar por meio da microscopia de luz e eletrônica linhagens normais e estéreis dessa espécie. Em seus estudos identificaram quando o aborto do pólen ocorria precisamente e quais eventos celulares apresentavam diferenças entre esses materiais. Os autores puderam concluir que o mecanismo era devido a uma série de eventos, entre eles o mal funcionamento das células do tapete, o que foi indicado pela intensa vacuolação, tornando o citoplasma denso e impossibilitando a deposição da exina, necessária para o desenvolvimento adequado dos micrósporos. Esse mecanismo talvez seja o mais expressivo para a ocorrência da esterilidade. Além disso, os meiócitos também apresentaram anormalidades no início da microsporogênese, que se expressaram ao final da meiose.

Outra identificação da macho esterilidade por meio do estudo comparativo da microsporogênese utilizando a microscopia foi realizada com girassol por (Horner, 1977). Neste estudo, verificou-se que a esterilidade era

devido à desintegração e degeneração do tapete e dos micrósporos, logo após a segunda divisão da meiose.

Estudos anátomo-citológicos realizados por Horner & Palmer, (1995) permitiram dividir, didaticamente, o desenvolvimento das células masculinas em dez estágios: (1) pré-meiose (massa de esporângios), (2) meiócitos, (3) díades, (4) tétrades, (5) micrósporo jovem, (6) micrósporo intermediário, (7) micrósporo maduro, (8) grão de pólen jovem, (9) grão de pólen intermediário, (10) grão de pólen maduro. Esse desenvolvimento normal das células masculinas pode ser interrompido por uma série de fatores que levam à macho esterilidade. No sistema de esterilidade genética, a expressão de genes nucleares que levam à esterilidade pode afetar tecidos esporofíticos e gametofíticos do estágio 1 ao 10 (Kaul, 1988; Palmer et al., 1992).

Já no sistema genético-citoplasmático, muitos estudos sugerem que o tapete é o tecido primário onde ocorrem as anormalidades, levando ao aborto das células masculinas (Laser & Lester, 1972; Kaul, 1988; Palmer et al., 1992). Além disso, há demonstrações de que o mal funcionamento do tapete deve ocorrer durante a microesporogênese, sendo mais comum nas fases de tétrade e em estágios iniciais do desenvolvimento dos micrósporos nos estágios 4 e 5 (Kaul, 1988).

Para o eucalipto, o estudo mais detalhado sobre o mecanismo da macho-esterilidade foi realizado por Ellis & Sedgley, (1993) em uma avaliação da espécie *E. leucoxylon*. Nas anteras estéreis, as células-mãe dos micrósporos realizaram meiose e formaram-se tétrades. Seis semanas antes da antese, existiam poucas diferenças em relação às anteras férteis. No período da antese, os lóculos da antera e os grãos de pólen estavam alterados e rodeados por células remanescentes da degeneração incompleta do tapete. Com isso, os grãos de pólen não apresentam o correto desenvolvimento da intina, prejudicando sua formação.

2.5.2 Marcadores moleculares RAPD

Um marcador pode ser definido como todo e qualquer fenótipo decorrente de um gene expresso. É o que ocorre no caso das proteínas e caracteres morfológicos, ou de um segmento específico de DNA, que pode ou não corresponder a regiões expressas do genoma, cuja sequência e função podem ou não ser conhecidas e que possui comportamento de acordo com as leis básicas da herança (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O termo marcador indica que sua função é de identificação e, no caso de marcadores moleculares, uma de suas funções é marcar alelos cuja expressão seja de difícil avaliação, a fim de poder selecionar esse alelo indiretamente. Além disso, os marcadores também podem ser utilizados para amostrar o genoma de uma espécie qualquer e, a partir daí, determinar a diversidade genética de um grupo de indivíduos, bem como o grau de parentesco relativo entre eles. Um ponto essencial é que o marcador seja herdável (Ramalho et al., 2001). Há quatro classes de marcadores que podem ser utilizados em vegetais: marcadores morfológicos, citológicos, bioquímicos e moleculares (Castanheira, 2001).

Os marcadores de DNA têm sido amplamente explorados por apresentarem várias características desejáveis como herança mendeliana simples e ausência de efeitos epistáticos, além de poderem ser utilizados em qualquer fase de desenvolvimento da planta. Isso abre a possibilidade de acelerar o processo de recombinação e seleção dos indivíduos desejados, o que, conseqüentemente, reduz o tempo necessário para se completar uma geração de melhoramento, aumentando a eficiência do programa. Além disso, podem ser obtidos em grande número e, pelo fato de utilizarem o próprio DNA (genótipo) e não seus produtos (fenótipo), apresentam resultados experimentais mais

consistentes e altamente eficientes para identificar variabilidade do DNA em plantas (Grattapaglia et al., 1995).

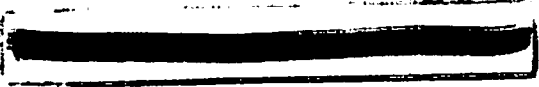
A descoberta dessa nova classe de marcadores gerou uma revolução na genética e nos programas de melhoramento. Muitas técnicas de biologia molecular são utilizadas hoje para se detectar polimorfismos genéticos em DNA. Essas técnicas forneceram um ilimitado número de marcadores moleculares com herança mendeliana, gerando um número considerável de informações (Brondani & Grattapaglia, 1997).

A tecnologia dos marcadores moleculares na área florestal teve início na década de 1990. Esse rápido avanço foi encorajado pela tecnologia dos marcadores baseados em PCR (Polimerase Chain Reaction). Desde então, os marcadores de DNA têm prometido uma próspera união com o melhoramento florestal, sobretudo com relação ao eucalipto (Gaiotto et al., 1997).

O melhoramento utilizando técnicas moleculares oferece um grande potencial para incrementar a área florestal, uma vez que pode melhorar a identificação, combinação e predição de materiais que apresentem boa complementação e sejam superiores geneticamente (Dale & Chaparro, 1997).

A tecnologia da PCR gerou algumas variações, entre elas o RAPD, os marcadores SSR – microssatélites e o AFLP.

A metodologia do RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990) abriu uma perspectiva inteiramente nova para análise genômica de indivíduos e populações (Xavier, 2001). Além disso, viabilizou o estudo genético por meio de marcadores moleculares devido ao seu baixo custo e simplicidade, possibilitando sua fácil utilização na maioria dos programas de melhoramento, sendo, portanto, uma ferramenta útil, acessível e de fácil aplicabilidade (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Algumas limitações são encontradas no método e uma delas é a baixa informação contida por loco. Isso é devido ao fato deste ser um marcador dominante e, assim, apenas detectar um



de que o polimorfismo entre as linhagens e os marcadores também o seja para o gene de interesse.

Após a identificação de um marcador RAPD, é possível realizar a conversão desse marcador obtido por meio de primers arbitrários em marcadores de seqüência específica (Kasai, 2000). Essa conversão tornou-se, assim, uma estratégia muito interessante na geração de informações. Esta classe de marcadores foi batizada de SCAR “Sequence Characterized Amplified Regions” (Paran & Michelmore, 1993), ou seja, regiões amplificadas caracterizadas por seqüência. SCAR são fragmentos de DNA genômico localizados em um loco geneticamente definido que são identificados por amplificação via PCR, utilizando um par de oligonucleotídeos específicos como “primers”. Os marcadores SCAR podem ser utilizados tanto como pontos físicos de referência no genoma como marcadores genéticos (Paran & Michelmore, 1993), citados por (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para atingir os objetivos colimados nesse trabalho, foram utilizadas algumas estratégias experimentais.

3.1 Material genético

Avaliou-se um clone da espécie *E. urophylla*, cujas informações indicavam tratar-se de um material macho estéril. Esse clone foi utilizado também como fêmea em um top cross. Pólen dos descendentes (geração F₁) também foram avaliados. Além desses, foram também utilizadas diferentes árvores comprovadamente macho férteis. Este material foi gentilmente cedido pela empresa Aracruz Celulose S.A., sediada no município de Aracruz no Espírito Santo.

3.2 Metodologia

3.2.1 Determinação da viabilidade e tamanho dos grãos de pólen

Para verificar a viabilidade e estimar o tamanho dos grãos de pólen, foram realizadas análises citológicas no Laboratório de Citogenética Vegetal da UFLA. Utilizaram-se de amostras de pólen oriundas de árvores do clone supostamente macho estéril e de 18 descendentes do top cross. Adicionalmente, como testemunha, utilizaram-se amostras de pólen de um clone comprovadamente macho fértil.

Os grãos de pólen foram amostrados em flores completamente abertas. Em seguida, eles foram colocados em dessecador com sílica gel por 24 horas e,

posteriormente, colocados em ampolas de vidro hermeticamente fechadas, de maneira que a umidade fosse a menor possível. Essas ampolas foram enviadas à UFLA para a realização das análises.

No laboratório, inicialmente foram confeccionadas lâminas contendo “pólen” da suposta planta macho estéril com o corante carmin propiônico a 0,5%, de acordo com a metodologia proposta por Davide et al. (1996). Posteriormente, utilizando a mesma metodologia foram avaliadas as amostras dos descendentes do top cross. Nesse caso, as análises foram efetuadas por etapas. Isto é, dois tratamentos de cada vez, junto com a testemunha fértil. Desse modo, foram efetuadas nove etapas. Em todas as avaliações, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo empregadas cinco repetições, onde cada repetição constitui-se de uma lâmina. Foram avaliados 100 grãos de pólen por lâmina. Realizaram-se, utilizando o microscópio Amplival com a ocular milimetrada (OSM), medições do diâmetro do pólen, sendo obtidas duas leituras por campo, em cinco campos diferentes por lâmina, num total de 100 medições por amostra. A viabilidade do pólen foi estimada pela porcentagem de grão de pólen corado.

A viabilidade do pólen foi também avaliada por meio da germinação *in vitro*, utilizando o mesmo delineamento citado anteriormente. Para isso, foi preparado meio de cultura contendo 30% de sacarose e 0,8% de ágar (Sousa, 1988). Os elementos constituintes do meio foram diluídos em água destilada e dissolvidos em forno de microondas até a dissolução completa do ágar. O meio, ainda quente, foi colocado em lâminas de vidro adaptadas com anéis plásticos que substituíram o uso de lâminas escavadas. Os grãos de pólen foram espalhados sobre o meio, ligeiramente morno, com o auxílio de um pincel. As lâminas foram colocadas em placas de Petri, com papel de filtro umedecido e incubadas em estufa com temperatura de 27°C, durante 24 horas. Novamente, as avaliações foram realizadas em etapas, com duas amostras do top cross e a

testemunha por vez. Também foram avaliadas cinco lâminas por amostra, sendo avaliados 100 grãos de pólen por lâmina. A viabilidade foi dada em função da porcentagem de germinação, sendo considerados como germinados aqueles pólenes que emitiram o tubo polínico, conforme sugerido por Cook & Stanley (1960), enfatizado por Sousa (1988), citados por Pereira (2001).

Os dados médios da dimensão do pólen e das porcentagens de pólenes corados e germinados foram submetidos à análise de covariância, utilizando como covariável a testemunha fértil (Ramalho et al., 2000). Foi utilizado o software SAS para a realização das análises. As médias foram comparadas pelo teste de scott e knott.

3.2.2 Aspectos do desenvolvimento dos estames ao microscópio eletrônico de varredura

Essa etapa foi conduzida no Laboratório de Microscopia da Aracruz Celulose S.A.. Foram utilizadas amostras do clone supostamente macho estéril e também da testemunha fértil. Cada tratamento foi avaliado em três estádios de desenvolvimento diferentes, com três repetições.

Aspectos do desenvolvimento dos estames foram observados por meio de microscopia eletrônica de varredura (SEM).

Os diferentes estádios de desenvolvimento foram definidos de acordo com o tamanho dos botões. O primeiro (I) compreendia botões com aproximadamente 4,8mm de diâmetro; no segundo (II), os botões tinham tamanho intermediário entre 5,0 a 5,5mm de diâmetro e, finalmente, o terceiro (III), incluía os botões maiores com 6,5mm de diâmetro.

A fixação foi realizada com glutaraldeído 2% em tampão cacodilato 0,1M, de acordo com Rodriguez (2001). Os cortes longitudinais com diâmetro de 12mm foram submetidos a baixo vácuo (a -4°C) durante a primeira hora,

sendo depois colocados na geladeira durante toda a noite. Em seguida, foram realizadas três lavagens sucessivas dos cortes em tampão cacodilato 0,1M, durante 20 a 30 minutos cada. A desidratação foi feita utilizando-se uma série crescente de etanol (35%, 50%, 60%, 75%, 85%, 95%, 100%), durante 20 a 30 minutos cada. Após estarem secos até o ponto crítico com CO₂, os cortes foram cobertos com ouro no metalizador e armazenados no dessecador.

Os cortes foram avaliados no microscópio eletrônico de varredura (SEM) da JEOL-modelo JSM-T330A, seguindo a metodologia proposta por Rodriguez (2001). As imagens foram digitalizadas e os aumentos empregados foram: 15, 75, 100, 200, 1000, 2000X.

3.2.3 Identificação de marcas moleculares associadas ao fenótipo macho estéril.

As avaliações foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada pertencente ao CNPMS –Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais.

O material genético utilizado nas avaliações consistiu de folhas jovens retiradas de nove diferentes clones da espécie *E. urophylla*. Desses nove clones, um apresentava distúrbios na microsporogênese, sendo considerado estéril, sendo que os demais não apresentaram problemas com relação à fertilidade.

Para extração do DNA, foram utilizadas em torno de 2,0 gramas de folhas novas. O processo de extração das amostras foi realizado segundo a metodologia de Doyle-Doyle (1987) e, logo após a quantificação, foram realizadas reações do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), de acordo com Santos et al. (1994).

Para a identificação de polimorfismo relacionado à fertilidade/esterilidade, foram testados em torno de 700 primers comerciais de 10 bases da Operon Technology®.

Primeiramente, foi realizada uma pré-seleção de primers, utilizando duas amostras de DNA: uma do clone macho-estéril e a outra contendo uma mistura de DNA das oito árvores consideradas férteis da mesma espécie.

Quatro primers polimórficos para a característica de interesse foram identificados: OP AC-2, OP AG-7, OP T-17, OP Q-20 e empregados para a confirmação das marcas obtidas. Para isso, foram utilizados 40 indivíduos oriundos do top cross citado anteriormente.

Após essas avaliações, foi realizado um SCAR (Paran & Michelmore, 1993) com esses primers, visando à obtenção de um possível marcador para a identificação do fenótipo macho estéril em eucalipto.

O desenvolvimento dessa metodologia foi realizado no Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da EMBRAPA (CNPMS), em Sete Lagoas, Minas Gerais.

Para obtenção do DNA das bandas utilizou-se o kit de purificação QIA quick da Quiagen Inc.®, por meio do qual foi possível purificar as bandas polimórficas a partir do gel de agarose.

Para a clonagem dos insertos foi utilizado o kit de clonagem TA Cloning Kit da Invitrogen®, sendo empregado o vetor o pCR 2.1 com 3.9 kb.

Apenas em um dos quatro primers a clonagem e o seqüenciamento foram bem sucedidos. Todo o processo de seqüenciamento foi realizado nos aparelhos ABI Prism 377 DNA sequencer e ABI Prism 3100 genetic analyser da Perkin Elmer® e da HITACHI, respectivamente. Além da síntese dos primers específicos, os dados foram comparados no banco de genes mundial.

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade e tamanho dos grãos de pólen

Como já mencionado, a viabilidade do pólen foi avaliada por duas metodologias, sendo a primeira por meio da coloração. Inicialmente é preciso enfatizar que, durante esta avaliação, nas lâminas com amostras do clone supostamente macho estéril não foi possível individualizar qualquer grão de pólen, confirmando, como se imaginava, que a referida planta é realmente macho estéril (Figura 1). Esse fato indica que o fenômeno envolvido na ausência de fertilidade atuou antes da liberação dos grãos de pólen pelas anteras.

O segundo aspecto era verificar se os descendentes do top cross que tiveram como mãe o clone supostamente estéril estavam segregando para a viabilidade do pólen ou não. A análise de variância da porcentagem de pólen viáveis está mostrada na Tabela 1. Ressalta-se, inicialmente, que não se constatou efeito significativo da covariável, indicando que o comportamento da testemunha foi o mesmo com o decorrer das avaliações. Sendo assim, o armazenamento não afetou a porcentagem de pólen corados e, em futuras avaliações, o emprego da testemunha a cada avaliação será desnecessário.

Veja, contudo, que ocorreu diferença significativa ($P \leq 0,01$) entre os "top crosses". Isso demonstra que eles apresentaram diferença na porcentagem de pólen corado. Constatou-se, entretanto, que mesmo o descendente 17 que apresentou a menor porcentagem de pólen corado (52,5%) (Tabela 2) ainda mostrou um valor expressivo, evidenciando que toda a geração F_1 do top cross pode ser considerada macho fértil.

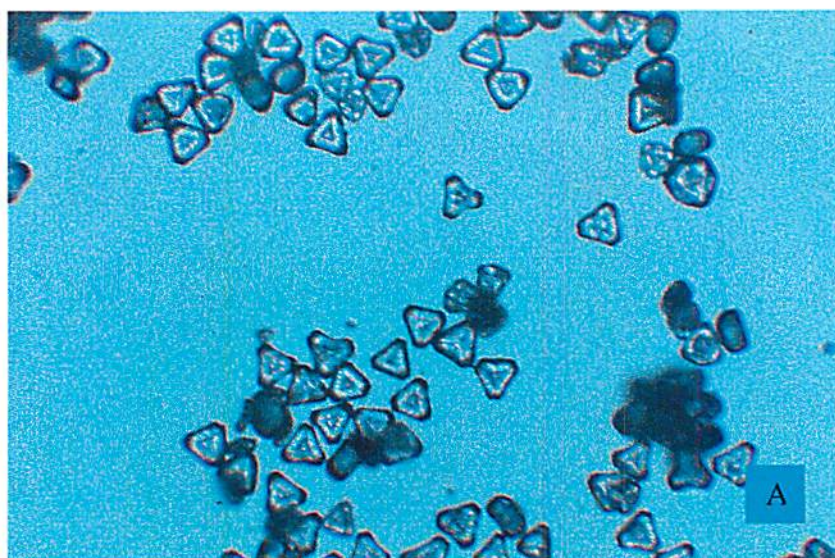


Figura 1. A - Grãos de pólen do clone fértil. B - Restos de tecido do clone supostamente macho estéril. Note a ausência do pólen.

Considerando o tamanho do pólen, também foi constatada diferença significativa ($P \leq 0,01$), porém a amplitude de variação foi menor que no caso anterior, variando de 21,5 μ m para o top cross 17 e 28,4 μ m para o 8.

Quando se avaliou a viabilidade do pólen por meio de germinação *in vitro*, os resultados foram semelhantes aos já mencionados com a coloração. Novamente não se constatou efeito da covariável e ocorreu diferença significativa ($P \leq 0,01$) entre os clones. Contudo, quando se observa a porcentagem média de germinação (Tabela 2), verifica-se que os valores não são coincidentes. Estimou-se, por exemplo, a correlação (r) entre o desempenho médio da coloração e da germinação e a estimativa de r foi muito pequena ($r = -0,20$). Evidencia-se, assim, que as duas metodologias não podem ser utilizadas com a mesma finalidade. A porcentagem de germinação variou de 0,38% para o top cross 10 a 65,7% para o top cross 4 (Tabela 2).

Foi possível notar também variação na precisão experimental, avaliada pelo coeficiente de variação entre os caracteres. Ele foi maior no caso da germinação.

TABELA 1 Resumo das análises de variância para os caracteres viabilidade por coloração, diâmetro e germinação do pólen (Dados transformados arcsen \sqrt{x} rad)

FV	GL	Coloração		Diâmetro		Germinação	
		QM	P	QM	P	QM	P
Entre	17	0,1699	0,00	18,5132	0,00	0,3149	0,00
Dentro	71	0,0066		3,2468		0,0114	
Covar.	1	0,0034	0,48	3,8013	0,28	0,0095	0,36
Média		1,28		24,19		0,46	
CV (%)		6,32		7,45		23,19	

TABELA 2 Médias dos caracteres viabilidade por coloração, diâmetro e germinação do pólen (dados não transformados).

Amostras	Coloração(%)	Diâmetro	Germinação(%)
Top cross 1	63,71 b	23,40 a	12,25 b
Top cross 2	86,71 d	24,14 a	51,85 d
Top cross 3	75,15 c	26,36 b	42,72 d
Top cross 4	96,95 e	24,78 a	65,72 e
Top cross 5	93,53 e	27,37 b	34,69 c
Top cross 6	96,53 e	25,92 b	3,09 a
Top cross 7	98,12 e	23,83 a	11,53 b
Top cross 8	93,92 e	28,45 b	8,33 b
Top cross 9	95,74 e	24,08 a	0,41 a
Top cross 10	95,74 e	23,44 a	0,38 a
Top cross 11	85,45 e	22,34 a	29,31 c
Top cross 12	97,05 e	23,25 a	50,51 d
Top cross 13	96,34 e	24,75 a	7,67 b
Top cross 14	94,94 e	23,58 a	12,67 b
Top cross 15	93,63 e	23,06 a	33,25 c
Top cross 16	98,43 e	23,38 a	6,45 b
Top cross 17	52,47 a	21,47 a	24,33 c
Top cross 18	94,27 e	21,68 a	18,33 b

* Médias numa mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

4.2 Aspectos do desenvolvimento dos estames ao microscópio eletrônico de varredura

Por comparação entre as seções longitudinais dos botões florais de amostras do clone fértil e do clone supostamente estéril, observou-se, no estágio I, que o aspecto geral do botão floral mostrou-se semelhante nos clones macho fértil e macho estéril, de acordo com as descrições feitas para algumas espécies do gênero (Hodgson, 1976; Eldridge *et al.*, 1993). Nas Figuras 2a e 2d verifica-se o opérculo protegendo o gineceu e os estames. Os estames estão flexionados, com as anteras organizadas na base do opérculo. Em aumentos maiores (Figuras 2b e 2e), os filetes e as anteras apresentam aparência normal, podendo-se notar a presença de pólen nos dois clones.

No estágio II, as mesmas estruturas são observadas e, aparentemente, o desenvolvimento das anteras prossegue normalmente nos clones macho fértil e macho estéril (Figuras 3a e 3d). No entanto, quando são observadas seções das anteras, verifica-se que existem diferenças entre os dois clones (Figuras 3b e 3e). No clone macho fértil, os grãos de pólen estão bem formados e igualmente distribuídos no interior da teca (Figura 3c), enquanto que no macho estéril notam-se massas de pólen em processo de degeneração (Figura 3f), respectivamente.

Novamente, no terceiro estágio, o aspecto geral do botão floral é normal e semelhante nos dois clones (Figuras 4a e 4d). No entanto, neste estágio mais avançado do desenvolvimento da antera fica evidente que os grãos de pólen do clone macho estéril já estão completamente degenerados, quando comparados com o macho fértil (Figuras 4c e 4f).

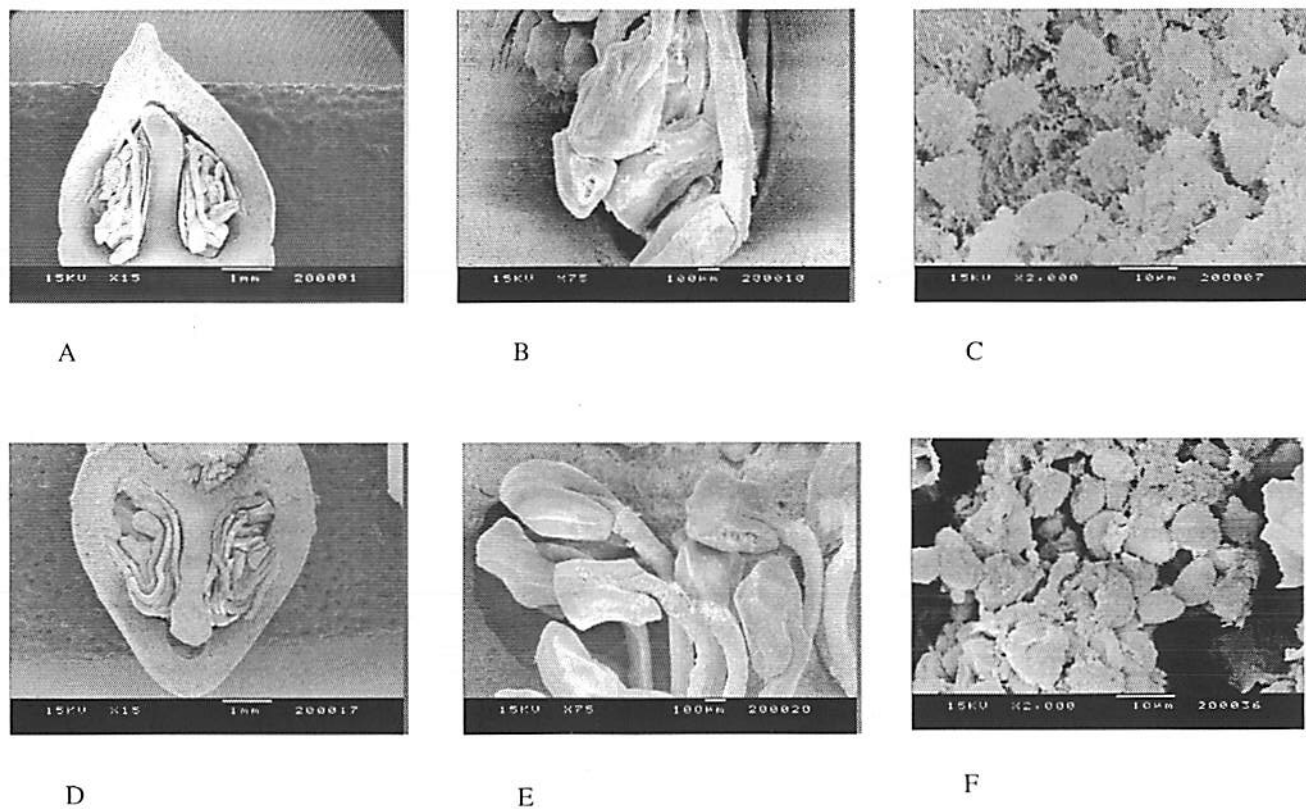
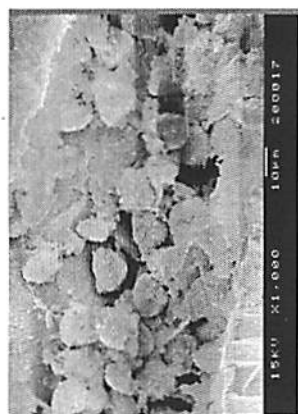


FIGURA 2. Botões florais, anteras e grãos de pólen dos clones macho fértil (A a C) e macho estéril (D a F) no estágio I



C



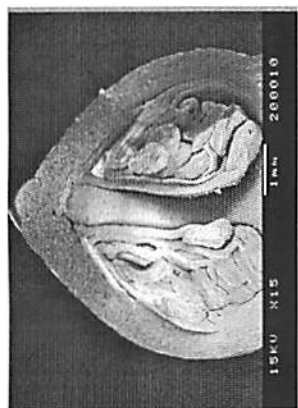
F



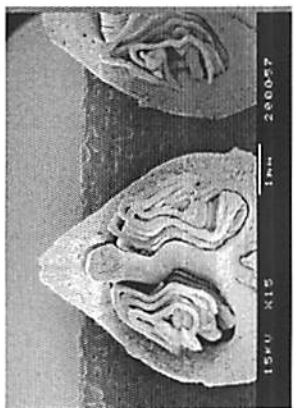
B



E

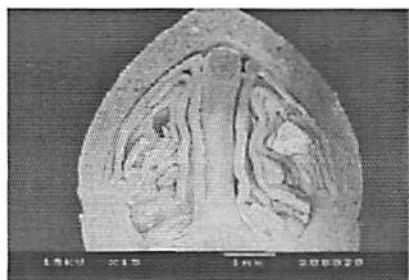


A

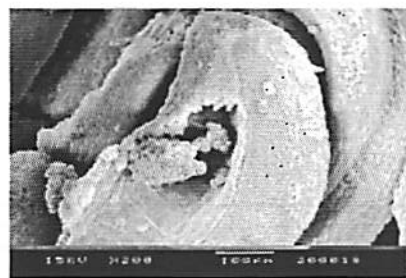


D

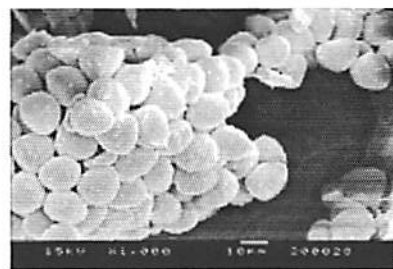
FIGURA 3. Botões florais, anteras e grãos de pólen dos clones macho fértil (A a C) e macho estéril (D a F) no estágio II. Note a presença do tapete (F)



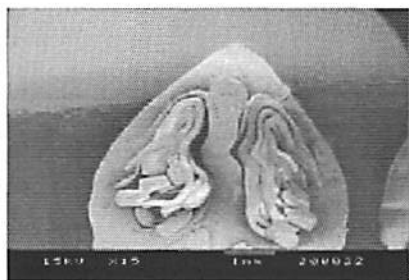
A



B



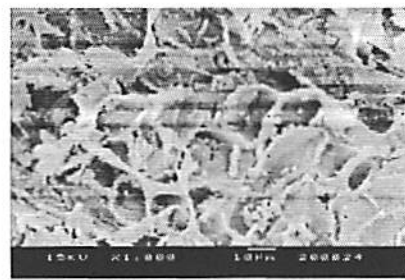
C



D



E



F

FIGURA 4. Botões florais, anteras e grãos de pólen dos clones macho fértil (A a C) e macho estéril (D a F) no estágio III. Note em F a ausência de grãos de pólen e a invasão do tecido do tapete.

4.3 Identificação de marcas moleculares associadas ao fenótipo macho estéril

Como não foi possível utilizar o método do bulk segregante, procurou-se um método para identificar marcas que estivessem presentes nos clones macho férteis e ausentes no clone estéril. Considerando o número de clones férteis utilizados, a probabilidade de que esse fato ocorresse para um outro caráter que não a macho esterilidade seria muito remota. Constatou-se que, dos setecentos primers utilizados, apenas quatro forneceram a diferença almejada (Figura 21), sendo eles: OP AC-2, OP AG-7, OP Q-20, OP T-17.

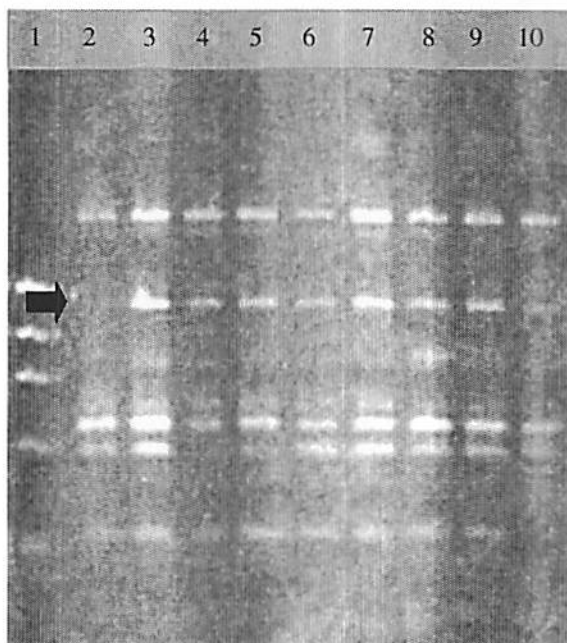


FIGURA 21. Identificação de primers relacionados com macho fertilidade. O primer OP Q-20 (colunas 2 a 10) amplifica uma banda (seta) apresentando o polimorfismo almejado (coluna 2 = clone estéril-ausência), (colunas 3 a 10 = clones macho férteis-presença)

Para confirmar se as marcas mencionadas anteriormente estavam ou não associadas ao fenótipo da macho esterilidade, 40 descendentes do top cross, em que o clone macho estéril foi utilizado como fêmea, foram também avaliados individualmente (Figura 22). Ressalte-se que apenas o clone macho estéril e em três das quarenta plantas a marca não se manifestou. Infelizmente, não foi possível inferir se as três plantas do top cross sem as marcas eram ou não macho estéreis, pois não havia disponibilidade de botões para serem avaliados.

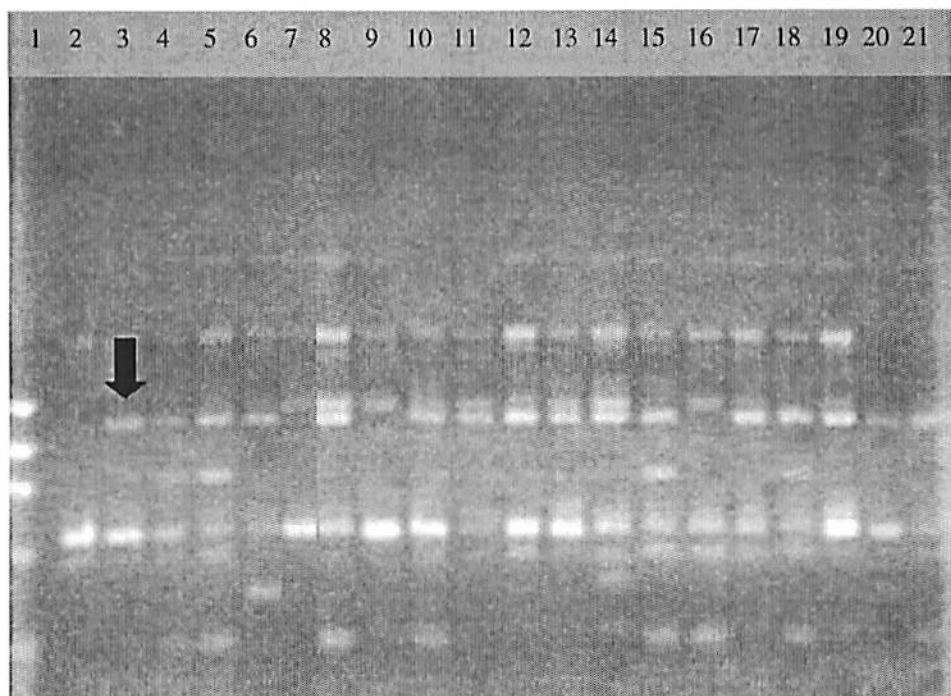


FIGURA 22. Confirmação da marca para 20 indivíduos da geração F_1 , para o primer OP Q-20 (colunas de 2 a 21) amplifica uma banda (seta) apresentando polimorfismo semelhante ao esperado, ausente no estéril (coluna 2) e nos clones das colunas 7, 9 e 16 e presente nos demais.

Pelo fato dos marcadores do tipo RAPD serem obtidos por primers arbitrários e apresentarem baixa reprodutibilidade, a conversão do RAPD em um marcador estável seria extremamente interessante. Sendo assim, a utilização da metodologia SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (Paran & Michelmore, 1993) para conversão das possíveis marcas encontradas para fertilidade em eucalipto poderia gerar a construção de um primer específico para esta característica. Isto porque esta metodologia estende o número de bases do primer arbitrário do RAPD pela clonagem e seqüenciamento das extremidades dos produtos de RAPD (Wang et al., 2000).

Após o processo de clonagem e seqüenciamento de produtos dos quatro primers que geraram polimorfismo para a característica, apenas em um deles o processo foi realizado com sucesso. Dessa forma, foi obtida uma seqüência em torno de 600 pares de base, que apresentou uma homologia em 80 pares de base com um gene responsável pelo controle da produção de pólen em *Brassica sp* no banco de dados mundial (Gene Bank).

A partir dessa seqüência de 600 pares de base foi possível estender o primer arbitrário do RAPD e confeccionar um primer específico para PCR. No entanto, é preciso lembrar que este primer deverá ser testado em gerações segregantes posteriormente, para que se verifique sua validade, bem como para que se obtenham informações mais precisas. Os resultados das seqüências obtidas não serão mencionados nesta dissertação, pois os mesmos pertencem à empresa Aracruz Celulose S.A.

5 DISCUSSÃO

A macho esterilidade é um mecanismo natural que evita a ocorrência de autofecundações. Seu conhecimento e identificação são muito importantes, uma vez que auxiliam na produção de sementes híbridas. Em eucalipto, a ocorrência desse mecanismo é pouco comum, existindo apenas poucos relatos (Ellis & Sedgley, 1993).

Nos pomares comerciais da empresa Aracruz Celulose S.A, foi identificado um clone da espécie *E. urophylla*, com problemas com relação à produção de pólen. A comprovação de que tratava-se de material macho estéril veio a partir de testes de coloração em microscopia de luz e pela avaliação de seções longitudinais dos botões florais por meio da microscopia eletrônica de varredura.

A microscopia de luz mostrou que, no final da microsporogênese, as anteras maduras do clone supostamente macho estéril apresentavam somente resíduos teciduais e ausência de qualquer estrutura semelhante a pólen. Pela microscopia eletrônica de varredura, pôde-se constatar que os grãos de pólen são formados, embora fiquem envolvidos por fragmentos de células e tecidos e, à medida que a antera torna-se mais desenvolvida, estes degeneram-se. Todo esse processo ocorre sem que alterações na estrutura externa do opérculo, pistilo e estames possam ser observadas neste tipo de microscopia e de aumento.

Todas as observações realizadas possibilitam inferir que, provavelmente, a anormalidade dos grãos de pólen ocorra por algum mecanismo que atue após a meiose. Isso ocorre, sobretudo, porque, em estádios iniciais do desenvolvimento das anteras, tudo indica que o pólen tem desenvolvimento normal, uma vez que o botão floral forma-se e a meiose produz micrósporos e,

Entretanto, no caso do eucalipto não foi encontrada nenhuma menção a esse respeito na literatura. A comprovação só será possível com o estudo de gerações segregantes. Mesmo assim, pelo fato de não se ter certeza que o genitor masculino seja homozigoto, ainda poderá permanecer alguma dúvida.

Um outro aspecto observado foi a ampla variação na porcentagem de germinação entre as plantas consideradas macho férteis. Certamente esse caráter está sob o controle genético. São comuns relatos na literatura de que grande parte dos genes da planta pode manifestar nos grãos de pólen, afetando alguns caracteres como, por exemplo, o vigor (Sari-Gorla et al., 1986). Muito provavelmente, esse controle da porcentagem de germinação seja poligênico. Entretanto, considerando-se a quantidade de pólen que uma planta pode produzir, o efeito dessa variação tem restritas implicações nos programas de melhoramento.

Para a identificação de uma marca molecular associada a um determinado caráter de importância para o melhorista, o melhor é a utilização do método do bulk segregante. Ele exige que a população esteja em desequilíbrio de ligação, como por exemplo uma geração F_2 e/ou os retrocruzamentos. Nesse caso, o DNA de plantas com fenótipos contrastantes são separados e o DNA coletado dentro de cada grupo é misturado. Espera-se, com isso, que ocorra uma boa amostragem genética e só haja polimorfismo para o caráter em questão (Michelmore et al., 1991). Essa metodologia tem sido amplamente utilizada. No caso do eucalipto, os maiores problemas são o tempo que demanda na obtenção da geração F_2 e o fato de que o caráter se expresse para que se faça a seleção fenotípica e, assim, estabeleçam-se os dois bulks. Por essa razão, optou-se por uma estratégia que, embora não seja freqüente na literatura, pode dar alguma indicação de possíveis marcas associadas a este fenótipo.

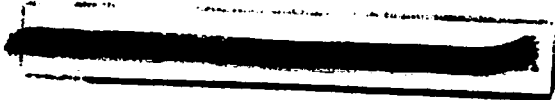
Foram testados 700 primers e observou-se um amplo polimorfismo entre os clones. No entanto, em apenas quatro casos (primers), constatou-se

polimorfismo entre a planta macho estéril e os clones macho férteis, os quais não diferiram entre si para as referidas marcas. Como a probabilidade desse fato ocorrer é muito pequena, optou-se por verificar se este mesmo fato seria confirmado com os descendentes do top cross, cuja mãe é macho estéril. Dos quarenta descendentes testados, em 37 deles os quatro primers forneceram bandas que estiveram presentes nos férteis e ausentes no macho estéril. Infelizmente, não foi possível verificar, pela análise de viabilidade de pólen, se estes clones apresentavam produção de pólen normal ou não, uma vez que seus botões não estavam disponíveis. Novamente, é preciso salientar que a probabilidade que esse fato ocorra sem estar associado ao fenótipo de fertilidade do pólen é muito pequena.

Considerando que a identificação de uma marca associada ao caráter irá trazer inúmeros benefícios para o programa, procurou-se obter um primer mais específico para essa característica, por meio da metodologia SCAR (Paran & Michelmore, 1993). Ressalte-se que esse procedimento já vem sendo utilizado em outras espécies com sucesso na identificação de macho esterilidade.

Em arroz, Wang et al. (1995) e Lang et al., (1997, 1999), citados por Virmani (2001), identificaram bandas ligadas à esterilidade por meio de RAPD. Os resultados permitiram o mapeamento dos genes, bem como sua localização nos cromossomos, o que gerou informações sobre o controle e herança desse mecanismo.

Para o eucalipto ainda não se têm relatos registrados a esse respeito. Dessa forma, deverão ser realizadas várias avaliações para que se tenha o conhecimento necessário para a melhor utilização e, sobretudo, aplicação deste mecanismo. Primeiramente deve-se comentar sobre os descendentes do top cross. Como citado anteriormente, não basta a planta ser macho estéril, é importante que ela tenha uma boa capacidade de combinação para que se tire o melhor proveito possível na produção de sementes híbridas. Outro fato é que a



confirmação do controle do mecanismo só será possível quando a geração F₂ do top cross estiver disponível. Com relação aos marcadores moleculares, com a geração F₂ será possível obter os bulks segregantes e utilizar o referido primer para a confirmação da sua associação com a expressão do caráter macho esterilidade. Além do mais, dependendo da distância da marca ao gene, será possível identificar o gene responsável por esta característica, podendo obter inferências mais fidedignas sobre o controle genético do caráter e até mesmo manipulá-lo no processo de transformação de plantas

6 CONCLUSÕES

O clone da espécie *E. urophylla* é macho estéril, provavelmente devido a anormalidades que ocorrem após a meiose.

O controle genético da macho esterilidade do referido clone, até onde foi possível estudar, é devido a genes nucleares, sendo recessivo o alelo que confere a esterilidade.

Foram identificados quatro primers que geraram marcas moleculares. Ao que tudo indica, é possível identificar marcas moleculares associadas ao fenótipo macho fertilidade que, por sua vez, permite a identificação de plantas macho estéreis mais fácil e rapidamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLAND, D. J.; BROOKER, M. I. H.; CHIPPENDALE, G. M.; HALL, N.; HYLAND, B. P. M.; JOHNSTON, R. D.; KLEINIG, D. A.; TURNER, J. D. **Forest Trees of Australia**. Melbourne: Australian Government Publishin Service, 1985.

BOLAND, D. J.; SEDGLEY, M. Stigma and style morphology in relation to taxonomy and breeding systems in *Eucalyptus* and *Angophora* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 34, n. 5, p. 569-584, 1986.

BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Comparative mapping in *Eucalyptus* reveals significant RAPD locus linkage and order conservation between trees and greater meiotic recombination in females. In: **IUFRO - Conference on silviculture and improvement of eucalypts**. Salvador, Brazil, 1997. p. 24-29.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento de plantas: princípios e procedimentos**. Lavras: UFLA, 2001. 282 p.

CAMPINHOS, E. N.; JUNGHANS, T. G.; ROBINSON, I. P.; BERTOLUCCI, F.; ALFENAS, A. C. A comparison between the efficiency of male-sterility and self-incompatibility in *Eucalyptus grandis* to promote interspecific hybridization. In: **IUFRO - Conference on silviculture and improvement of eucalypts**. Salvador, Brazil, 1997. p. 8-13.

CÂNCIO, O. N. **Diversidade genética de progênes de meios-irmãos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake por meio de metodologia quantitativa e marcadores moleculares RAPD**. 1999. 52 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CARR, D. J.; CARR, S. G. M. Natural groups within the genus *Eucalyptus*. **The evolution of living things**. Melbourne, p.426-445, 1962.

CASTANHEIRA, A L. M. **Marcadores RAPD na avaliação do potencial de métodos de condução de população segregante de feijão**. 2001. 76 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade federal de Lavras, Lavras, MG.

CHAUHAN, S. V. S.; SINGH, S. P. Pollen abortion in male-sterile hexaploid wheat (Norin) having *Aegilops ovata* L. cytoplasm. **Crop Science**, Madison, v. 6, n. 6, p. 532-535, Nov./Dec. 1966.

DALE, G.; CHAPARRO, J. Integration of molecular markers into tree breeding and improvement programs. In: **IUFRO - Conference on silviculture and improvement of eucalypts**. Salvador, Brazil, 1997. p. 80

DAVIDE, L. C.; ROCCA, M. G.; CASTRO, A. H. **Manual de práticas citogenéticas**. Lavras, UFLA, 1996. 19p.

DAVIS, G. L. Floral morphology and development of gametophytes in *Eucalyptus stellata* Sieb. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 17, n. 2, p. 177-190, 1969.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, London, n. 12, p. 13-15, 1987.

EDWARDSON, J. R. Cytoplasmic male sterility. **The Botanical Review**, New York, v. 36, n. 3, p. 341-420, July/Aug. 1970.

ELDRIDGE, K. G. Genetic improvement of *Eucalyptus*. In: **WORLD CONSULATION ON FOREST TREE BREEDING**, 3., 1977, Canberra. **Invited Special Paper...** Canberra, 1977. 12 p. (FO-FTB-77-3/5).

ELDRIDGE, K. G.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; WYC, G. V. **Eucalypt domestication and breeding**, Oxford, 1993. 288 p.

ELLIS, M. F.; SEDGLEY, M. Breeding system and floral morphology of three species of *Eucalyptus* L'Hér., section *Bisectaria* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 40, n. 3, p. 249-262, 1992.

ELLIS, M. F.; SEDGLEY, M. Gynodioecy and male sterility in *Eucalyptus leucoxylon* F. MUELL. (Myrtaceae). **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 154, n. 2, p. 314-324, June 1993.

ELLIS, M. F.; SEDGLEY, M.; GARDNER, J. A; Interspecific pollen-pistil interaction in *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae); the effect of taxonomic distance. **Annals of Botany**, London, v. 68, n. 3, p. 185-194, Sept. 1991.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220 p.

- FOSTER, A. S.; GIFFORD Jr, E. M. **Comparative Morphology of Vascular Plants**. San Francisco: W. H. Freeman, 1974. 128 p.
- GAIOTTO, F. A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. In: **IUFRO - Conference on silviculture and improvement of eucalypts**. Salvador, Brazil, 1997. p. 53-59.
- GALLETTA, G. J. Pollen and seed mangement. In: MOORE, J. N.; JANICH, J. **Methods in fruit breeding**. Purdue, USA: Purdue University Press, 1983. p. 23-47.
- GRATTAPAGLIA, D.; BERTOLUCCI, F. L.; SEDEROF, R. R. Genetic mapping of QTL' s controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, n.7/8, p. 933-947, June 1995.
- HARVEY, P. H.; LEVINGS, C. S.; WERNSMAN, E. A The role of extrachromosomal inheritance in plant breeding. **Advances in Agronomy**, New York v.24, p.1-27, 1972.
- HESLOP-HARRISON, J. Cytoplasmic connections between angiosperm meiocytes. **Annals of Botany**, London, v. 30, n. 118, p. 221-230, 1966.
- HODGSON, L. M. Some aspects of flowering and reproductive behavior in *Eucalyptus grandis* (Hill) maiden at J.D.M. Keet Forest Research Station. 2. The fruit, seedlings, self fertility, selfing and inbreeding effects. **South African Forestry Journal**, Pretoria, v. 98, p. 32-43, 1976.
- HORNER, T. H. A comparative light and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and citoplasmic male sterile sunflower (*Helianthus annuus*). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 64, n. 6, p. 745-759, June 1977.
- HORNER, T. H.; PALMER, R. G. Mechanisms of genic male sterility. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 6, p. 1527-1535, Nov./Dec. 1995.
- HORNER, T. H.; ROGERS, M. A. A comparative light and electron microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile pepper (*Capsicum annum*). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 52, n. 3, p. 435-442, Mar. 1974.

IKEMORI, Y. K.; CAMPINHOS Jr. Produção de sementes de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* por polinização aberta. *Silvicultura*, São Paulo, v. 8, n.28, p. 306-308, jan./fev. 1983.

KASAI, K.; MORIKAWA, Y.; SORRI, V. A; VALKONEN, J. P. T.; GEBHARDT, C.; WATANABE, K. N. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry_{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome*, Ottawa, v. 43, n. 1, p. 1-8, Feb. 2000.

KAUL, M.L. H. Male sterility in higher plants. *Monographs on Theoretical and Applied Genetics*. New York: Springer-Verlag, 1988. v. 10.

LASER, K. D.; LERSTEN, N. R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *Botanical Review*, New York, v. 38, n. 3, p. 425-454, July/Sept. 1972.

LOPEZ, C. R. Variações fenotípicas e genéticas de *Eucalyptus urophylla* ST BLAKE da ilha das flores (Indonésia). 1992. 125 p. Dissertação (Mestrado) – Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

MAHESHWARI, P. *An introduction to the embryology of angiosperms*. New York: McGraw Hill Book, 1950.

MASCARENHAS, J. P. The biochemistry of angiosperm pollen development. *The botanical Review*, New York, v. 41, n. 3, p. 259-314, July/Sept. 1975.

MICHELMORE, R. H.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregant populations (RAPD/RFLP). *Proceeding of the National Academy Science*, Washington, v. 88, n. 21, p. 9828-9832, Nov. 1991.

MIRANDA, L. A. Herança da restauração da fertilidade em citoplasma macho-estéril do tipo C em milho (*Zea mays* L.). 1985. 70 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MONCUR, M. W.; BOLAND, D. J. Floral morphology of *Eucalyptus melliodora* A cunn. Ex Schau. And flower architectural comparisons with other eucalypt species. *Australian Journal of Botany*, Collingwood, v. 37, n. 2, p. 125-135, 1989.

PALMER, R. G.; ALBERTSEN, M. C.; HORNER, H.T.; SKORUPSKA, H. Male sterility in soybean and maize: developmental comparisons. *The Nucleus*, Lahore, v. 35, p.1-18, 1992.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical Applied and Genetics*, Berlin, v. 85, n. 8, p. 985-993, Feb. 1993.

PEREIRA, R. C. **Alternativas para melhorar a eficiência dos cruzamentos dos programas de melhoramento de Eucalipto.** 2001. 43 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PETERS, G. B.; LONIE, J. S.; MORAN, G. F. The breeding system, genetic diversity and pollen sterility in *Eucalyptus pulverulenta*, a rare specie with small disjunct populations. *Australian Journal of Botany*, Collingwood, v. 38, n. 3, p. 559-570, 1990.

POTS, B.; GORE, P. Reproductive biology and controlled pollination of *Eucalyptus* – a review. In: SYMPOSIUM ON HYBRID BREEDING AND GENETICS, 2000, Noosa Australia.

PRYOR, L. D.; JOHNSON, L. A. S. **A classification of the *Eucalyptus*.** Canberra: Australian National University, 1971. 102 p.

RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas.** Lavras: UFLA, 2000. 326 p.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária.** Lavras: UFLA, 2001. 472 p.

RODRIGUEZ, A. P. M. **Introdução à anatomia vegetal e morfogênese *in vitro* “técnicas de análise morfo-anatômica”** Piracicaba: CENA/USP, 2001. 46 p.

SANTOS, J. B.; NIENHUIS, J.; SKROCH, P.; TIVANG, J.; SLOCUM, M. K. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theoretical Applied and Genetics*, Berlin, v. 87, n. 8, p. 909-915, Mar. 1994.

SARI-GORLA, M.; FROVA, C.; BINELLI, G.; OTTAVIANO, E. The extent of gametophytic-sporophytic gene expression in maize. *Theoretical Applied and Genetics*, Berlin, v. 72, n. 1, p. 42-47, 1986.

- SCHULZ-SCHAEFFER, J. **Cytogenetics, plants, animals, humans**. New York: Springer-Verlag, 1980. 446 p.
- SOUSA, V. A. **Manejo e viabilidade do pólen**. 1988. 155 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- SUBUDHI, P. K.; BORKAKATI, R. P.; VIRMANI, S. S.; HUANG, N. Molecular mapping of a thermosensitive male sterility gene in rice using bulked segregant analysis. *Genome*, Ottawa, v. 40, n. 2, p.188-194, Apr. 1997.
- TUCHI, V. L. **Morfologia, biologia floral, propagação e crescimento de “Rainha do Abismo” (*Sinningia leucotricha*)**. 1994. 113 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- VENCOVSKY, R.; RAMALHO, M.A.P. Contribuição do melhoramento genético de plantas no Brasil. In: PATERNIANI, E. **Agricultura brasileira e pesquisa agropecuária**. Brasília: Embrapa, 2000. 194 p.
- VIRMANI, S. S.; ILYAS-AHMED, M. Environment-sensitive genic male sterility (EGMS) in crops. *Advances in Agronomy*, New York, v. 72, p. 139-187. 2001.
- WANG, B.; XU, W. W.; WANG, J. Z.; WU, W.; ZHENG, M. G.; YANG, Z. Y.; RAY, J. D.; NGUYEN, H. T.; Tagging and mapping the thermosensitive genic male sterile gene in rice (*Oriza sativa* L.) with molecular markers. *Theoretical Applied and Genetics*, Berlin, v. 91, n. 6/7, p. 1111-1114, Nov. 1995.
- WAUGH, R.; POWELL, W. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology*, Oxford, v. 10, n. 6, p. 186-191, June 1992.
- WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSAKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- XAVIER, K. G. **Divergência genética em clones de *Eucalyptus* avaliada por marcadores RAPD e variações nas propriedades da madeira**. 2001. 107 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.