

RENATA SILVA



**BANDEAMENTO FLUORESCENTE E MARCADOR DE RAPD EM
ESPÉCIES PRÓXIMAS AO *Pinus* DE TECUN UMÁN.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof^a Dr^a LISETE CHAMMA DAVIDE

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1996**

41390

RENATA SILVA

**BANDEAMENTO FLUORESCENTE E MARCADOR DE RAPD EM
ESPÉCIES PRÓXIMAS AO *Pinus* DE TECUN UMÁN.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof^a Dr^a LISETE CHAMMA DAVIDE

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1996**

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da
Biblioteca Central da UFLA

Silva, Renata

Bandeamento fluorescente e marcador de RAPD em espécies próximas
ao *Pinus* de Tecun Umán / Renata Silva. -- Lavras : UFLA, 1996.

55p. : il.

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. *Pinus* de Tecun Umán - Espécie - Classificação - 2. Espécie florestal
- taxonomia. 3. Citogenética - Bandeamento fluorescente - RAPD. 4. Marcador
molecular. 5. Similaridade genética. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

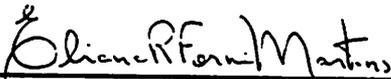
CDD - 585 . 2
634 . 9751

RENATA SILVA

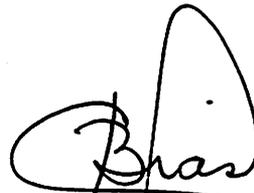
**BANDEAMENTO FLUORESCENTE E MARCADOR DE RAPD EM
ESPÉCIES PRÓXIMAS AO *Pinus* DE TECUN UMÁN.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 29 de fevereiro de 1996



Prof^a. Eliana Regina Forni Martins



Prof. César Augusto Brasil Pereira Pinto



Prof^a. Dr^a. Lisete Chamma Davide
(Orientador)

A meus pais, Vitor e Josefa.

Aos meus irmãos Anízio, Glória e Elma

Ofereço

Ao meu amado Eliseu N. Mann,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por cultivar e fazer crescer a conquista de um ideal.

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio constante em todas as escolhas.

À Universidade Federal de Lavras, à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela oportunidade e pela bolsa concedida.

Às empresas Duratex S/A, Melhoramentos S/A e Pisa Papéis de Imprensa S/A, pela concessão do material botânico.

À amiga e orientadora Lisete Chamma Davide, pela orientação, pela educação científica e confiança.

Ao professor João Bosco dos Santos, pela orientação e ensinamentos transmitidos, sugestões para o trabalho, apoio e amizade.

Às amigas Iara, Maria das Graças C. Vieira e Dulcinéia, pelo apoio, amizade e sugestões durante a execução do trabalho.

À professora Eliana R. F. Martins, pelo incentivo e apoio durante a execução do trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas, pela utilização do Laboratório de Biossistemática e Evolução.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia da UFLA, pela convivência e amizade.

Aos amigos do laboratório de anatomia e citologia-UFLA: Ângela, Edilene, Francisley, Gabriela, Ivan, Roselaine, Rupert e Vilma.

Às amigas de república, Ângela e Cátia, pela convivência, amizade e respeito compartilhados.

Aos bolsistas Marcelo e Juliano, pelo auxílio nas preparações citológicas.

Aos professores Eduardo Bearzotti, Daniel Furtado e Samuel Pereira de Carvalho, pela valiosa contribuição na área estatística.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas: André, Ângela Abreu, Cíntia, Claudia, Cristian, Eduardo, Flávia Avelar, Flávia França, Glauber, Gustavo, Haroldo, Hélia, Jaime, João, Joelson, Luciana, Maurício, Mônica, Osvaldo e Paulo Rogério.

Aos amigos que contribuíram para o êxito deste trabalho: Ana Hortência, Ângela Hallak, Giovana Torres, Leonardo C. Melo, José Magno Luz, Marcelo Nascimento, Patrícia Santos e Valéria Momenté.

BIOGRAFIA

Renata Silva, filha de Vitor Batista da Silva e Josefa Brasilina Vieira da Silva, nasceu em 22 de dezembro de 1964, em Campinas, Estado de São Paulo.

No período de 1980 a 1983, cursou o curso Técnico em Bioquímica na Escola Técnica Estadual "Conselheiro Antonio Prado", em Campinas - SP.

Em agosto de 1988 foi aprovada no concurso vestibular para o curso de Engenharia Agrônômica.

De 1989 a 1990 foi monitora da disciplina Citologia, pelo Departamento de Biologia-ESAL.

No período de 1990 a 1993 foi bolsista de Iniciação Científica-CNPq.

Diplomou-se em Engenharia Agrônômica, em julho de 1993, pela Escola Superior de Agricultura de Lavras- MG (ESAL).

Em agosto de 1993, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas, na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Em 29 de fevereiro de 1996, defendeu dissertação, requisito indispensável para obtenção do título de Mestre.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Taxonomia no gênero <i>Pinus</i>	4
2.2 <i>Pinus</i> de Tecun Umán: descoberta e controvérsias	5
2.3 Técnicas empregadas para a elucidação de problemas taxonômicos no gênero <i>Pinus</i>	9
2.3.1 Técnicas morfológicas e taxonomia no gênero <i>Pinus</i>	9
2.3.2 Citogenética e taxonomia no gênero <i>Pinus</i>	11
2.3.3 Marcadores moleculares e taxonomia no gênero <i>Pinus</i>	14
2.3.4 Divergência genética	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Condução do experimento	20
3.2 Material botânico	20
3.3 Análise citogenética	22
3.4 Análise de RAPD	24
3.5 Extração do DNA	24
3.6 Amplificação do DNA	25
3.7 Eletroforese	26
3.8 Análise dos resultados	26

	Página
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Análise citogenética	29
4.2 Análise de RAPD	35
4.2.1 Extração de DNA	35
4.2.2 Amplificação	36
4.3 Distância genética entre o <i>Pinus</i> de Tecun Umán, <i>P. patula</i> , <i>P. oocarpa</i> , e <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	47
5 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Valores médios em micrômetros das variáveis cromossômicas da procedência Mountain Pine Ridge do <i>Pinus</i> de Tecun Umán (PR), <i>P. oocarpa</i> (PO), <i>P. patula</i> (PP) <i>P. caribaea</i> . var. <i>hondurensis</i> (PC).....	31
2	Estimativas de similaridades genéticas (método Simple Matching) (posicionadas acima da diagonal) e erro padrão (posicionados abaixo da diagonal) entre 28 genótipos de <i>Pinus</i> , baseadas em dados de RAPD.....	38
3	Estimativas das distâncias genéticas (Distância Euclidiana Quadrada) entre 28 genótipos de <i>Pinus</i> , baseadas em dados de RAPD	41
4	Formação de grupos segundo o método aglomerativo de Tocher, usando Distância Euclidiana Quadrada	42
5	Estimativas das similaridades genéticas (método Simple Matching acima da diagonal) e erro padrão (abaixo da diagonal) entre 16 genótipos de <i>Pinus</i> baseadas em dados de RAPD	43
6	Estimativas das distâncias genéticas (método Distância Euclidiana Quadrada) entre 16 genótipos de <i>Pinus</i> , baseadas em dados de RAPD	45
7	Formação de grupos segundo o método aglomerativo de Tocher, usando Distância Euclidiana Quadrada	46

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mapa da América Central mostrando a distribuição geográfica do <i>Pinus</i> de Tecun Umán (■)	5
2	Metáfases mitóticas apresentando cromossomas de <i>Pinus</i> de Tecun Umán procedência Mountain Pine Ridge (A); <i>Pinus oocarpa</i> (B); <i>Pinus patula</i> (C) e <i>Pinus caribaea</i> var. <i>Hondurensis</i> (D), bandeadas com o fluorocromo CMA	30
3	Idiogramas dos cromossomas de I a XII bandeados pelo fluorocromo CMA, de <i>Pinus</i> de Tecun Umán, procedência Mountain Pine Ridge (A), <i>P. oocarpa</i> (B), <i>P. patula</i> (C) e <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> (D) ...	31
4	Gel de agarose mostrando padrão dos produtos amplificados obtidos com o primer E2 da marca Operon. (da esquerda para a direita) 1 e 2 - <i>P. patula</i> , 3 e 4 - <i>P. caribaea</i> , 5 e 6 - <i>Pinus</i> de Tecun Umán procedência Napite, 7 e 8 - <i>Pinus</i> de Tecun Umán procedência Rancho Nuevo e 9 e 10 - <i>P. oocarpa</i>	32
5	Agrupamento entre genótipos de <i>Pinus</i> de Tecun Umán e <i>Pinus patula</i> , baseado em coeficientes de similaridades Simple Matching	36
6	Agrupamento de diferentes genótipos de <i>Pinus</i> , baseado em coeficientes de similaridades Simple Matching	39

RESUMO

SILVA, Renata. **Bandeamento fluorescente e marcador de RAPD em espécies próximas ao *Pinus* de Tecun Umán.** Lavras: UFLA, 1996. 55p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)

Buscando verificar a proximidade do *Pinus* de Tecun Umán com as espécies *Pinus patula*, *Pinus oocarpa* e *Pinus caribae* var. *hondurensis*, realizou-se um estudo comparativo usando técnicas de bandeamento fluorescente CMA, e de marcadores de RAPD. Num primeiro experimento foram comparados os padrões de bandas em metáfases mitóticas da procedência Mountain Pine Ridge do *Pinus* Tecun Umán, de *Pinus patula*, *Pinus oocarpa* e *Pinus caribae* var. *hondurensis*. As metáfases mostraram variação na posição das bandas entre os taxa avaliados. Não se observou variação no número de bandas entre *P. caribae*, *P. oocarpa* e da procedência Mountain Pine Ridge, a qual foi igual a 6. No complemento cromossômico de *P. patula* observou-se 8 bandas. Os resultados obtidos permitiram concluir que o padrão de bandas CMA da procedência Mountain Pine Ridge do *Pinus* de Tecun Umán apresentou-se mais semelhante ao *P. oocarpa*. Em outros dois experimentos, o coeficiente de similaridade "Simple Matching" e a Distância Euclidiana Quadrada foram obtidos através de marcadores de RAPD para vinte e oito genótipos de *Pinus*, sendo que quinze eram de *P. patula*, cinco de Mountain Pine Ridge e oito de San Rafael, estas

Orientador: Lisete Chamma Davide. Membros da Banca: Eliana Regina Forni Martins e César Augusto Brasil Pereira Pinto.

últimas procedências do *Pinus* de Tecun Umán encontradas em baixas altitudes (< 1500 m). Os valores encontrados mostraram similaridades, variando de $0,37 \pm 0,08$ para *P. patula*-San Rafael, até $0,94 \pm 0,04$ para o par de genótipos dentro de *P. patula*. O valor máximo obtido de Distância Euclidiana foi igual a 20 para *P. patula*-San Rafael e *P. patula*-Mountain Pine Ridge e o valor mínimo encontrado foi igual a 2, entre genótipos de *P. patula*. Observou-se no dendrograma obtido pelo método UPGMA (unweighted pair-group method, arithmetic average) o distanciamento do *Pinus* de Tecun Umán do *P. patula*. Para confirmação deste resultado foi empregado o método aglomerativo de Tocher, usando as Distâncias Euclidianas Quadradas. Em outro experimento foram estimadas as similaridades genéticas e as distâncias entre dezesseis genótipos de *Pinus*, sendo 3 de *P. oocarpa*, 4 de *P. patula*, 3 de *P. caribae* var. *hondurensis* e 6 do *Pinus* de Tecun Umán, onde 3 eram da procedência Napite e os outros 3 da procedência Rancho Nuevo, ambas encontradas em regiões de alta altitude (> 1500 m). Os valores encontrados mostraram similaridades variando de $0,44 \pm 0,05$ para as árvores da procedência Napite-*P. patula* e para as árvores de *P. oocarpa*-*P. patula*, até $0,80 \pm 0,04$ para pares dentro da procedência Napite e dentro da procedência Rancho Nuevo. O maior valor de distância encontrado foi igual a 56 para os pares de árvores *P. patula*-Mountain Pine Ridge e San Rafael-Mountain Pine Ridge. O menor valor encontrado foi de 20 para árvores dentro da procedência San Rafael. Observou-se no dendrograma obtido pelo método UPGMA, o posicionamento do *Pinus* de Tecun Umán em um mesmo grupo que o *P. oocarpa*, e um distanciamento destes dois do *P. patula* e *P. caribae*. O método aglomerativo de Tocher confirmou estes resultados. Verifica-se, portanto, que as duas metodologias empregadas demonstram a maior proximidade do *Pinus* de Tecun Umán com o *Pinus oocarpa*.

SUMMARY

FLUORESCENT BANDING AND RAPD MARKER IN SPECIES CLOSE TO *Pinus* OF TECUN UMÁN.

Aiming to verify the closeness of *Pinus* of Tecun Umán with the species of *Pinus patula*, *Pinus oocarpa* e *Pinus caribaeae* var. *hondurensis*, a comparative study was undertaken using of CMA fluorescent banding and RAPD markers. The band fluorescent patterns in mitotic metaphases of the Mountain Pine Ridge provenance of *Pinus* Tecun Umán were compared with *Pinus patula*, *Pinus oocarpa* e *Pinus caribaeae* var. *hondurensis*. The metaphases showed variation in band positioning between the taxa evaluated. No variation in the number of bands between *P. caribaeae*, *P. oocarpa* and the Mountain Pine Ridge provenance was noticed, which was equal to 6. In the *P. patula*, complement cromossomic where 8 bands were observed. This way, it followed that the CMA fluorescent band pattern of the Mountain Pine Ridge provenance of *Pinus* of Tecun Umán showed itself more similar to *P. oocarpa*. In further two experiments, the similarity coefficient "Simple Matching" and Square Euclidian Distance were obtained through RAPD markers for twenty eight *Pinus* genotypes, being fifteen were of *P. patula*, five of Mountain Pine Ridge and eight of San Rafael, these latter ones coming from *Pinus* Tecun Umán found in low altitudes (< 1500 m). The values found showed similarity, ranging from 0.37 ± 0.08 for *P. patula*-San Rafael to 0.94 ± 0.04 for the pair of

P. patula trees. The maximum value of Euclidian Distance obtained was equal to 20 for *Patula*-San Rafael and *P. patula*-Mountain Pine Ridge and, the least value found was equal to 2 among genotypes of *P. patula*. The distancing of the *Pinus* of Tecun Umán from *P. patula* was observed in the dendrogram obtained by the UPGMA method (unweighted pair-group method, arithmetic average). For support of this result, Tocher's clustering method was employed, using the Square Euclidian Distances. In another experiment, genetical similarities and the distance among sixteen *Pinus* genotypes, beeing 3 of *P. oocarpa*, 4 of *P. patula*, 3 of *P. caribaea* var. *hondurensis*, 6 of the *Pinus* of Tecun Umán, where 3 were of the Napite provenance and the other 3 of Rancho Nuevo precedence, both found in regions of high altitude (> 1500 m). The values found showed similarities ranging from 0.44 ± 0.05 for genotypes of Napite-*P. patula* provenance for *P. oocarpa* *P. patula* genotypes, till 0.80 ± 0.04 for pairs within the Napite provenance and within the Rancho Nuevo provenance. The greatest value of distance found was equal to 56 for the pairs of genotypes *P. patula*-Mountain Pine Ridge and San Rafael-Mountain Ridge. The least value found was of 20 for genotypes within the San Rafael provenance. The positioning of *Pinus* of Tecun Umán in a same group as *P. oocarpa* and a distancing of these two from *P. patula* and *P. caribaea* were observed in the dendrogram obtained by the UPGMA method. Tocher's clustering method supported these results. Verified, this way, that the two metodologies used showed the an increased closeness between *Pinus* of Tecun Umán with the *P. oocarpa*.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as espécies tropicais de coníferas introduzidas no Brasil, o *Pinus* de Tecun Umán tem apresentado um bom desempenho em várias regiões (Wright e Osorio, 1992).

Apesar de apresentar excelentes qualidades silviculturais como rápido crescimento, mais de 50 m de altura, 1,50 m de DAP e copa com poucos ramos; este táxon ainda não teve sua posição taxonômica bem definida, o que constitui um problema. Algumas procedências foram denominadas *P. oocarpa* Schiede var. *ochoterenai* Martinez, por Martinez (1948). Outras foram denominadas *Pinus tecunumanii* (Schw.) Eguiluz e Perry por Eguiluz-Piedra e Perry (1983). Styles (1985) sustenta o ponto de vista de que ambos, *Pinus oocarpa* var. *ochoterenai* e *Pinus tecunumanii* pertencem ao mesmo táxon, isto é, *Pinus patula*, Schiede & Deppe ssp. *tecunumanii* (Eguiluz e Perry) Styles.

Na tentativa de solucionar este problema, Davide e Araújo (1993b) realizaram estudos comparativos sobre a estrutura da madeira e acículas da procedência Yucul do *Pinus* de Tecun Umán e verificaram que ela é mais relacionada com *Pinus patula*, concordando com Styles (1985). No entanto os autores analisaram poucas árvores de uma única procedência o que limita este tipo de estudo.

Dando prosseguimento a este trabalho, Leão e Davide (1993) estudaram quatro diferentes procedências: Yucul, San Rafael, Camelias e Mountain Pine Ridge, coletadas em Agudos-SP, Lavras-MG e Esplanada-BA. Em seus estudos os autores analisaram características anatômicas e morfológicas de acículas e os resultados encontrados concordaram novamente com Styles (1985), sugerindo o uso da categoria subespecífica para o *Pinus* de Tecun Umán.

Grattapaglia, O'Malley e Dvorak (1992), utilizando marcadores de RAPD, analisaram a relação filogenética entre *P. caribaea* var. *hondurensis*, *P. oocarpa*, *P. patula*, *P. pringlei*, *P. greggii* e *P. tecunumanii*, dentre outros e sugeriram que o *P. tecunumanii* é mais relacionado com *P. oocarpa* e *P. caribaea* var. *hondurensis*. Esse estudo propôs mudanças nas relações filogenéticas realizadas até então por métodos morfológicos clássicos.

Observa-se portanto, que as controvérsias ainda persistem, mostrando a necessidade de se continuar estudando este assunto utilizando técnicas refinadas na tentativa de solucionar este problema.

Uma das alternativas seriam as técnicas citogenéticas de bandeamento cromossômico. Os fluorocromos Cromomicina A3 e 4-6-diamidino-2-fenilindol mostram um padrão de bandas denominadas CMA e DAPI, respectivamente; as quais têm sido eficientes para identificação de diferentes cromossomas de algumas espécies de *Pinus* (Hizume, Ohgiku e Tanaka, 1989a,1989b; Hizume, Arai e Tanaka,1990; Doudrick et al., 1995). Esta técnica apresenta ainda a vantagem de ser rápida e específica para ácido nucléico.

A técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) consiste em um marcador molecular que utiliza o DNA apresentando vantagens por ser rápida, podendo processar um grande número de amostras por dia; não utilizar sondas e radioisótopos proporcionando redução nos custos e aumento na segurança; utilização de pequena quantidade de DNA e também, de não serem necessárias informações sobre as seqüências nucleotídicas do genoma para detectar um grande polimorfismo genético. Os marcadores de DNA têm sido considerados úteis para determinar o relacionamento genético, pois além de identificarem grande polimorfismo, não apresentam interação entre caracteres e podem ser avaliados em qualquer estágio de desenvolvimento (Williams et al., 1990).

Assim, o objetivo deste trabalho foi o de utilizar técnicas citogenéticas (bandeamento fluorescente) e moleculares (RAPD) para avaliar o grau de parentesco entre o *Pinus* de Tecun Umán, *P. patula*, *P. oocarpa* e *P. caribaea* var. *hondurensis*; e assim contribuir para a definição da categoria taxonômica do *Pinus* de Tecun Umán.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Taxonomia no gênero *Pinus*

O gênero *Pinus* é dividido em 9 seções, de acordo com a classificação feita por Martinez (1948), onde o autor empregou caracteres de acículas, cones e sementes, caducidade ou persistência das bainhas dos fascículos e outros caracteres macro e microscópicos. *Pinus oocarpa* Schiede e *P. patula* Schiede & Deppe pertencem à seção Serotinos, a qual se caracteriza por englobar espécies que apresentam cones que não têm uma sincronia na abertura de suas escamas. As plantas dessa seção são divididas em três grupos principais: oocarpa, patula e peninsulares. O grupo oocarpa compreende as espécies que apresentam cones simétricos, ovóides ou parcialmente ovóides e coloração ocre ou vermelho-marron. Nesse grupo encontram-se *P. oocarpa* Schiede e suas variedades *microphyla*, *manzonoi*, *trifoliata* e *ochoterenai*. No grupo patula estão *Pinus patula* Schiede & Deppe e sua variedade *longepedunculata*, *P. greggii* Engelm. e *P. pringlei* Shaw. Neste grupo as plantas apresentam cones oblíquos, brilhantes, duros e muito persistentes.

Segundo a classificação feita por Little e Critchfield (1969), *P. oocarpa* e *P. patula* pertencem ao subgênero 3. *Pinus*, Seção 5. *Pinus* e Subseção 15. *Oocarpae*.

A subseção Oocarpae compreende três espécies da Califórnia (*Pinus radiata* D. Don, *P. attenuata* Lemm. e *P. muricata* D. Don) e quatro do México e América Central (*P. patula* Schiede & Deppe, *P. oocarpa* Schiede, *P. greggi* Engelm. e *P. pringlei* Shaw.).

2.2 *Pinus* de Tecun Umán: descoberta e controvérsias

De acordo com Eguiluz-Piedra e Perry (1983), o *Pinus* de Tecun Umán pode ser encontrado em áreas de solos bem variados, desde solos argilosos até solos profundos de origem vulcânica, cujo pH é ligeiramente ácido, variando de 4,5 a 5,5. Com relação à distribuição geográfica populações de *Pinus* de Tecun Umán foram observadas nas montanhas centrais da Guatemala, estendendo-se até El Salvador, Honduras e provavelmente Chiapas, no México (Figura 1).

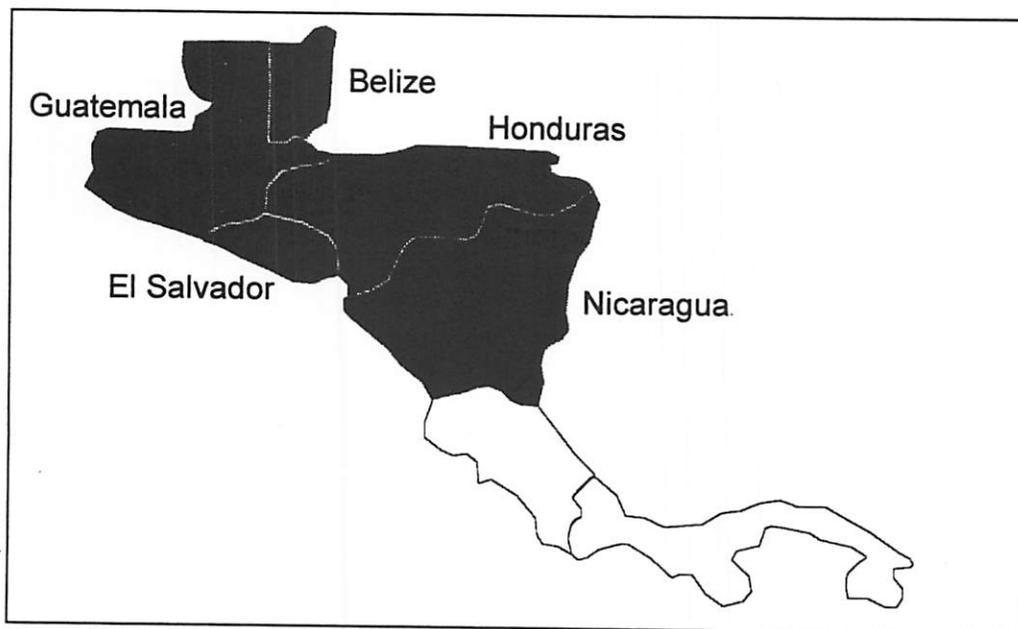


FIGURA 1. Mapa da América Central mostrando a distribuição geográfica do *Pinus* de Tecun Umán (■).

O *Pinus* de Tecun Umán foi primeiramente encontrado em 3 locais da Guatemala, em altitudes variando de 1900 a 2700 m, mas existem confirmações de que sua distribuição é maior na América Central, particularmente em Honduras, Nicarágua e El Salvador, em altitudes variando de 600 a 2000 m. É também encontrado nos estados de Oaxaca e Chiapas (sul do México), em habitats similares. Na Guatemala e Honduras as árvores crescem em altitudes acima das quais normalmente se encontram espécies de *Pinus oocarpa*, em vales férteis com abundância de chuvas e solos profundos, podendo estar associadas com outras espécies de *Pinus* como *P. ayacahuite* Ehr., *P. maximinoi* e *P. pseudo-strobus* (Styles, 1985).

A descoberta do *Pinus* de Tecun Umán é descrita por Styles (1985) que menciona que na década de 40 o patologista alemão, Fritz Schwerdtfeger, foi requisitado para investigar e avaliar os danos que vinham sendo causados pelo coleóptero *Dendroctonus* sp. (Scolytidae) em algumas florestas de *Pinus* da Guatemala e América Central. Contudo, as pesquisas sobre a biologia do inseto foram prejudicadas, pois, não existiam informações sobre a distribuição destas florestas e sobre a ocorrência das espécies de *Pinus* nelas existentes. Schwerdtfeger fez uma revisão apurada da taxonomia das árvores, e descreveu um novo táxon. No entanto, o autor não considerou o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (1978), e erroneamente, o descreveu em espanhol e não em latim, chamando-o de *Pinus tecumumanii*.

Estudos envolvendo o *Pinus* de Schwerdtfeger têm sido feitos por vários autores e cada um propõe denominações diferentes (Aguilar, 1962; Stanley e Steyermark, 1958; Mittak, 1977, Eguiluz-Piedra e Perry, 1983 e Styles, 1985). Eguiluz-

Piedra e Perry (1983), através de seus estudos abrangendo ensaios de campo e laboratório, com relação à morfologia, anatomia foliar e análise de terpenos presentes em resinas, sugerem que o *Pinus* de Tecun Umán deva ser considerado uma espécie. Os autores fizeram sua descrição de acordo com as Código Internacional de Normenclatura Botânica (1978) e conferiram-lhe a categoria específica, alterando o epíteto específico denominando-o *Pinus tecunumanii* (Schw.) Eguiluz e Perry .Além disso consideram o *Pinus* de Tecun Umán muito próximo do *Pinus oocarpa* var. *ochoterenai*.

Contudo, Styles (1985) a partir de estudos baseados em características morfológicas, anatômicas e de distribuição geográfica, sugere que o *Pinus* de Tecun Umán é mais relacionado com *Pinus patula* e confere-lhe a categoria subespecífica: *Pinus patula* subespécie *tecunumanii* (Styles).

Davide e Araújo (1993) tentando auxiliar na elucidação destes problemas taxonômicos, realizaram estudos sobre a estrutura da madeira e das acículas da procedência Yucul, plantada em Agudos-SP. Os resultados obtidos mostraram uma proximidade do *Pinus* de Tecun Umán com o *Pinus patula*, concordando com Styles (1985). Dando continuidade a este estudo, Leão e Davide (1993) trabalharam com 4 procedências do *Pinus* de Tecun Umán: Yucul, Mountain Pine Ridge, Camélias e San Rafael, plantadas em Agudos-SP, Lavras-MG e Esplanada-BA, os resultados persistiram, sugerindo que o *Pinus* de Tecun Umán deva ser considerado uma subespécie do *Pinus patula*.

Dvorak (1985) relataram que procedências do *Pinus* de Tecun Umán de regiões de alta altitude, no México e América Central diferem daquelas de baixa

altitude, particularmente quanto às características morfológicas, e em padrão de florescimento. Estas informações indicam uma possível interação genótipo ambiente, a qual pode ser eliminada pela avaliação direta do genótipo através de técnicas de marcadores moleculares, como o RAPD. Assim sendo, Grattapaglia, O'Malley e Dvorak (1992), estudando procedências de *Pinus tecunumanii* do norte e sul do México, de alta e de baixa altitude, utilizaram dados obtidos por marcadores do tipo RAPD para o estudo da análise filogenética envolvendo *P. patula*, *P. caribaea* e *P. oocarpa*, entre outros. Os autores observaram uma diferenciação genética a nível de seqüência de DNA entre os 2 ecótipos do *Pinus* de Tecun Umán e que o mesmo não se apresenta fortemente relacionado com *P. patula*, apresentando uma proximidade com *P. oocarpa* seguida do *P. caribaea* var. *hondurensis*.

Tem-se, portanto, estudos utilizando técnicas morfológicas que sugerem duas categorias taxonômicas diferentes ao táxon em questão, a específica (Eguiluz-Piedra e Perry, 1983) e a subespecífica (Styles, 1985; Davide e Araújo, 1993 e Leão e Davide, 1993) e, análises de marcadores de DNA, que sugerem a categoria específica Grattapaglia et al. (1992). Desta forma a associação de técnicas que avaliam diretamente o genoma de espécies do gênero *Pinus*, como o bandeamento cromossômico e marcadores RAPD, poderão constituir mais uma contribuição para a elucidação desse problema taxonômico.

2.3 Técnicas empregadas para a elucidação de problemas taxonômicos no gênero *Pinus*

2.3.1 Técnicas morfológicas e taxonomia no gênero *Pinus*

Várias metodologias têm sido utilizadas com o objetivo de solucionar problemas taxonômicos. A avaliação de características morfológicas como tamanho de cone e das sementes, número e comprimento de acículas e aspecto da casca dos caules, já foram utilizadas por vários autores para avaliar espécies de *Pinus*.

Styles e Mc Vaugh (1990) basearam-se em diferenças na anatomia de acículas e morfologia dos ramos entre *P. oocarpa* típico e *P. oocarpa* Schiede var. *microphyla* Schaw para promover a variedade a uma nova espécie denominada *P. pratermissa*.

Outros autores também têm utilizado características de acículas para identificar espécies e variedades de *Pinus* (Mancilla e Tomazello Filho, 1984; Rojo, 1978; Stead, 1983; Calamassi, 1986). Contudo a influência do ambiente nas características de acículas deve ser considerada. Xu e Guo (citados por Leão 1992) fizeram um estudo biosistemático em *P. tabulaeformis* Carr. e encontraram variação em 18 características de acículas, cones e sementes em diferentes regiões para 56 populações da China. Observaram que as diferenças entre as populações foram todas altamente significativas e que a variação de algumas características como anatomia e morfologia de acículas e morfologia de ramos esteve intimamente relacionada às condições climáticas.

Leão e Davide (1993) analisando procedências do *Pinus* de Tecun Umán ainda sugerem que as características de acículas são influenciadas por fatores ambientais, e que muito provavelmente são controladas pela ação de vários genes, pois estas características não apresentam classes distintas, mas sim uma gradação de fenótipos.

Salazar (1983) estudou a variação na proporção de fascículos em acículas de *P. caribaea* var. *hondurensis* Barr e Golf. De acordo com o autor, genes responsáveis pelas características de fascículos têm, muito provavelmente, sua expressão influenciada por fatores climáticos. Desta forma, a influência do ambiente sobre essas características deve ser considerada.

Outra metodologia que tem sido utilizada para caracterização do gênero *Pinus*, é a anatomia de madeira.

Zobel (1965) analisou a variação no comprimento dos traqueóides de algumas espécies de *Pinus* mexicanos e verificou que eles têm uma variação na estrutura da madeira entre árvores, entre povoamentos, entre sítios dentro da espécie e entre espécies.

Características anatômicas, assim como a morfologia de acículas, são condicionadas por vários genes, sendo portanto, características quantitativas, que sofrem grande influência do ambiente (Strauss, Lande e Namkoong, 1992).

2.3.2 Citogenética e taxonomia no gênero *Pinus*.

Uma forma de avaliar características particulares, que não são diretamente influenciadas pelo ambiente, é analisar diretamente o complemento cromossômico.

Muitos trabalhos têm sido conduzidos partindo do pressuposto da ocorrência de variações nos complementos cromossômicos de diferentes espécies. Esta variação pode ser observada no tamanho, número, relação de braços e posição do centrômero dos cromossomas.

Em muitos grupos de plantas e animais, o cariótipo pode ser usado como critério definitivo para distinguir diferentes espécies (Swanson, 1960; Saylor, 1961).

Espécies como as pertencentes ao gênero *Emilia*, mostram uma variação distinta no número de cromossomas, onde *E. sonchifolia* apresenta $2n = 10$ e *E. fosbergii* apresenta $2n = 20$ (Guerra e Nogueira, 1990), permitindo assim uma distinção precisa entre as mesmas.

No entanto, em alguns gêneros, as espécies que o compõe mostram cariótipos muito homogêneos, dificultando a distinção interespecífica usando esta metodologia. No gênero *Pinus*, onde Sax e Sax (1933) fizeram os primeiros estudos informando que o cariótipo é constituído por 12 pares de cromossomas sendo que 11 pares são metacêntricos e com comprimentos muito semelhantes, e apenas 1 par é submetacêntrico, o menor deles.

Saylor (1972) realizou descrições cariotípicas baseadas principalmente no comprimento dos cromossomas e localização do centrômero para 46 espécies de

Pinus. Todas as espécies apresentaram basicamente cariótipos similares, apesar de características distintas terem sido encontradas em certas subseções, grupos de espécies relacionadas e ocasionalmente em espécies individuais.

Apesar dessa grande homogeneidade entre os cariótipos das espécies de *Pinus*, Pederick (1970), baseando-se principalmente no tamanho e localização de constrições secundárias, conseguiu distinguir nove espécies de *Pinus*. O autor utilizou tecido do gametófito feminino haplóide e estudou os cromossomas na prófase mitótica, onde eles estão mais distendidos e mostram grande número de constrições secundárias de tamanho variáveis.

No entanto, a maioria dos autores enfatiza a uniformidade do complemento cromossômico nas espécies de *Pinus*, e, vários deles sugerem o emprego do bandeamento cromossômico como uma alternativa para diferenciar cromossomas dentro de uma espécie e cariótipos de espécies diferentes (Borzan e Papes, 1978; Mac Pherson e Fillion, 1981; Davide e Araújo, 1993a).

Várias técnicas visando a evidenciação de regiões específicas presentes em cromossomas têm sido empregadas em *Pinus* e em outras espécies. A técnica de bandeamento Giemsa para localizar heterocromatina C, foi aplicada em cromossomas de várias espécies de *Pinus* (Borzan e Papes, 1978; MacPherson e Fillion, 1981), bandas intercalares e centroméricas foram observadas, mas foram insuficientes devido a pouca variabilidade para auxiliar na identificação da maioria dos cromossomas.

Constrições secundárias para a região organizadora do nucléolo (NOR) têm sido identificadas em cromossomas de *Pinus*, mas são de valor limitado para

distinguir cromossomas, pois não mostram variação entre e dentro de espécies (Natarajan, Ohba e Simak, 1961; Saylor 1961, 1964).

A distinção de cromossomas de *Pinus* tem sido obtida, mais recentemente, com o uso dos fluorocromos Cromomicina A3 (CMA), que tem afinidade por regiões ricas em C-G; e 4,6-diamidino 2-fenilindol (DAPI), com afinidade por regiões ricas em A-T. Estes fluorocromos, com ação antibiótica, foram primeiramente empregados por Schweizer (1976), e padrões específicos de bandas puderam ser observados em 3 espécies vegetais (*Vicia faba*, *Scilla siberica* e *Ornithogalum caudatum*) e em cromossomas metafásicos humanos.

Hizume, Ohgiku e Tanaka (1989a), explorando a afinidade diferencial por fluorocromos (CMA/DAPI) das diferentes regiões que compõe os cromossomas, verificaram o aparecimento de bandas intercalares e/ou proximais na maioria dos cromossomas. Com este padrão de bandas, cromossomas individuais puderam ser identificados em *P. nigra*. Os mesmos autores tentando estudar as relações filogenéticas entre duas espécies diferentes de *Pinus*, constataram que ocorriam diferenças entre as bandas CMA e DAPI entre *P. densiflora* e *P. thunbergii*, apesar da similaridade entre os cromossomas das espécies (Hizume, Ohgiku e Tanaka, 1989b).

Doudrick et al. (1995), através de técnicas de bandeamento fluorescente utilizando CMA e DAPI e hibridação *in situ*, identificaram todos os 12 pares de cromossomas e estabeleceram um cariótipo padrão para *P. elliotii* var. *elliotii*, e ainda sugerem o uso da técnica em outras espécies de *Pinus* e talvez até outros gêneros de coníferas.

Assim, a utilização de técnicas que permitam diferenciar linearmente os cromossomas, explorando a afinidade diferencial das várias seqüências de DNA através de fluorocromos específicos são úteis para auxiliar na elucidação de problemas taxonômicos como os que ocorrem com o *Pinus* de Tecun Umán.

2.3.3 Marcadores moleculares e taxonomia no gênero *Pinus*

Muitas árvores florestais são plantas não domesticadas e tem um alto nível de diversidade (Grattapaglia et al., 1992). Visando analisar esta diversidade muitas técnicas têm sido utilizadas tais como os marcadores moleculares de proteínas (isoenzimas) e marcadores de DNA, como RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphisms), PCR (Polymerase Chain Reaction) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Os marcadores de proteínas que se baseiam na migração de proteínas em um suporte de gel em função de suas cargas elétricas e das suas estruturas, mostra que a variação fenotípica (bandas visualizadas) está diretamente relacionada com a variação genética, uma vez que as proteínas são produtos diretos dos genes (Alfenas et al., 1991).

Thormann e Stephan (1993) analisaram e interpretaram padrões isoenzimáticos de malato desidrogenase em *P. sylvestris* L. Informações sobre tipo de herança e mapas de ligação de variantes isoenzimáticos em populações naturais de *P. leucodermis* e *P. pumila*, também foram estudados por Morgante, Vendramin e Gianini (1993). Informações úteis têm sido obtidas em *Pinus* e outras espécies como feijão,

batata, girassol, cevada dentre outras (Koenig e Gepts, 1989; Groza e Kahn, 1991; Quillet, Vear, Branlard, 1992; e Fedak, 1974). Embora esta técnica seja relativamente barata, possui desvantagens de ser pouco variável, principalmente quando se analisa populações de genótipos altamente relacionados. Além disso, por ser um produto gênico, pode também apresentar interações com outros genes, o que é um complicador adicional (Neale e Williams, 1991).

Os marcadores de DNA, em relação aos de proteína, têm vantagens por serem muito mais variáveis, não apresentam interação com outros caracteres e podem ser identificados em plantas em qualquer idade. Os marcadores de DNA têm se mostrado altamente eficientes para identificar variabilidade do DNA em plantas (Santos et al., 1994).

A técnica RFLP, que significa polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição, vem sendo empregada em várias espécies. Consiste no uso de enzimas de restrição que cortam o DNA em sítios específicos e uso de sondas marcadas para identificar os fragmentos.

A técnica RFLP já foi empregada em estudo para o entendimento da filogenia de *Pinus* (Strauss e Doerksen, 1990) bem como para o mapeamento e aplicações genéticas no melhoramento de coníferas (Neale e Williams, 1991; Devey et al., 1991). Esta técnica tem sido amplamente empregada e tem fornecido bons resultados em estudos de variabilidade em germoplasma, na determinação de distância genética e pureza de híbridos, na identificação de caracteres quantitativos, dentre outros. No entanto é relativamente complexa, demorada e cara.

O PCR (Polymerase Chain Reaction) surgiu como uma técnica alternativa para eliminar o uso de radioisótopos, baseando-se na amplificação de fragmentos específicos de DNA, identificados sob luz ultravioleta. Mas, apresenta a desvantagem de exigir o conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos de tais fragmentos, para a síntese dos primers (McPherson, Quirke e Taylor, 1992).

Uma nova técnica, baseada no PCR (Welsh e McClelland, 1990; Williams et al., 1990), o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), vem permitindo acelerar a aplicação da tecnologia de marcadores moleculares, avaliando a diversidade genética observada em várias espécies. Ao invés de marcar o segmento de DNA alvo, ocorre a síntese diferencial de segmentos aleatórios de DNA genômico *in vitro*, através de uma DNA polimerase termorresistente. Esta técnica utiliza primers aleatórios de 10 nucleotídeos e por isso dispensa o conhecimento da seqüência de fragmentos de DNA, diminuindo seu custo. Os produtos são facilmente separados por eletroforese e visualizados por iluminação ultravioleta de géis corados com brometo de etídio.

As marcas de RAPD são altamente polimórficas e podem ser detectadas diretamente em gel de eletroforese, sem a necessidade de sondas e radioisótopos usados em RFLP. A tecnologia RAPD é mais acessível que RFLP e promove um número equivalente de marcas para cobrir o genoma inteiro (Grattapaglia et al., 1992).

Nas espécies de *Hordeum*, o RAPD também tem sido usado com sucesso. O gênero *Hordeum* apresenta um grande número de espécies com similaridades morfológicas que dificultam a identificação e diferenciação entre elas. O uso de RAPD foi eficiente no estudo sistemático e taxonômico das espécies pertencentes a este gênero (Gonzales e Ferrer, 1993).

Tulsieram et al. (1992), mostraram que é possível a utilização de tecido de megagametófito para a confecção de mapas de ligação em coníferas usando RAPD. Os autores utilizaram esta metodologia em *P. brutia* Ten., e construíram um mapa de ligação onde o número de locos por primer testado foi baixo, variando de 0,28 a 0,59. Mapas de ligação de *P. elliotii* Engelm var. *elliotii*, também foram feitos empregando RAPD em DNA extraído de megagametófitos. A análise de marcadores de RAPD cobriu aproximadamente 782 cM do genoma, e permitiu avaliar o tamanho do genoma, que foi estimado variar de 2880 a 3360 cM (Nelson, Nance e Doudrick, 1993).

Usando também tecido de megagametófitos, Nelson, Kubisiak, Nance (1994), propuseram o mapa de ligação de *P. palustris* Mill., empregando RAPD. Neste estudo, os autores cobriram 85% do genoma e os grupos de marcadores de RAPD permitiram estimar um tamanho de genoma de aproximadamente 2265 cM.

Apesar da maioria dos trabalhos com marcadores moleculares em coníferas empregarem tecido do megagametófito, Carlson et al. (1991) utilizaram em seus estudos acículas jovens de *Pseudotsuga menziesii* e *Picea glauca*. Neste trabalho, as condições de reações foram otimizadas para que pudessem fornecer produtos de amplificação claros e específicos. Foi realizada a análise dialélica, confirmando a herança apropriada de marcas de RAPD na geração F1.

2.3.4 Divergência genética

A análise de divergência genética tem sido utilizada pelos melhoristas de plantas, por mais de duas décadas, principalmente, para investigar a natureza da

variação genética e as relações entre divergência genética, grau de parentesco, diversidade de origem geográfica, capacidade de combinação e heterose (Behl, Singh e Paroda, 1985; Peixoto, Silva, Barreto, 1986; Punia, Hooda e Paroda, 1982; Raveedran, Comstock e Harvey, 1951; Sugiyarto, Soemartono e Mangoendidjojo, 1984; Viana, 1990).

A diversidade genética é, em geral, quantificada por estatísticas multivariadas que permitem ao melhorista melhor inferência sobre os genótipos disponíveis.

Entre técnicas estatísticas multivariadas pode-se citar a análise pelos métodos aglomerativos sendo, neste caso, empregada principalmente a Distância Euclidiana, dentre outros, e também o método de médias aritméticas não ponderadas (Cruz, 1990; Morais, 1992; Soares, 1991; Viana, 1990). Para melhor visualização e análise dos dados são feitas análises de agrupamento.

A análise de agrupamento tem por finalidade reunir por algum critério de classificação, as unidades amostrais em vários grupos, de tal forma que exista homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre grupos (Mardia, Kent, Bibby, 1979; Sneath, Sokal, 1979). Alternativamente, as técnicas de análise de agrupamento têm por objetivo dividir um grupo original de observações em vários grupos homogêneos, segundo algum critério de similaridade ou dissimilaridade (Cruz, 1990; Morais, 1992).

Segundo RAO et al., 1981, o processo de agrupamento envolve basicamente, duas etapas. A primeira relaciona-se com a estimativa da similaridade, ou dissimilaridade entre os indivíduos; a segunda, com a técnica de agrupamento para a formação dos grupos. Destaca, ainda, que a adoção de determinada medida de

similaridade depende da natureza das unidades amostrais avaliadas, da precisão das estimativas e da facilidade de computação dos dados.

Entre os métodos de agrupamento, destacam-se os hierárquicos e os de otimização. Os hierárquicos subdividem-se em: a) aglomerativos, como o método do vizinho mais próximo, o do vizinho mais distante, o da ligação média (ponderada ou não) e o do centróide (também ponderado ou não); e b) divisivos, como os apresentados por Edwards e Cavalli-Sforza (1965). Como exemplo de método de otimização, tem-se o apresentado por Tocher, citado por RAO(1952).

Nos métodos hierárquicos, os indivíduos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido um dendrograma ou diagrama de árvores, sem preocupação com o número ótimo de grupos, uma vez que o interesse maior está na árvore e nas ramificações (Cruz, 1990; Cruz, Regazzi, 1994; Rao,1981). As delimitações dos grupos podem ser definidas por exame visual de dendrograma, quando se procura detectar os pontos de alta mudança de nível (Cruz e Regazzi, 1994). Ao se efetuar cortes nesses pontos do dendrograma, estabelecem-se os grupos e os números de indivíduos de cada grupo (Cruz e Regazzii, 1994; Miranda, Cruz e Costa, 1988).

Nos métodos de otimização os grupos são estabelecidos pela adequação de algum critério de agrupamento e diferem-se dos métodos hierárquicos pelo fato dos grupos serem mutuamente exclusivos (Barros, 1991; Morais, 1992). No método de otimização, proposto por Tocher, adota-se o critério de manter a distância média intragrupo sempre inferior a qualquer distância intergrupos (Cruz, 1990; Morais, 1992).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condução do experimento

O bandeamento cromossômico fluorescente (CMA/DAPI) foi realizado no Laboratório de Citologia e Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia-UFLA. As fotomicrografias foram feitas em microscópio de fluorescência Carl-Zeiss, no Laboratório de Biosistemática e Evolução da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

As análises de RAPD foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia-UFLA.

3.2 Material botânico

Para as análises citogenéticas e de RAPD, foram utilizados os seguintes genótipos listados a seguir.

- *Pinus* de Tecun Umán:

a) Procedência San Rafael: sementes coletadas a partir de povoaamentos estabelecidos na região de Agudos-SP, pela empresa Duratex S/A. Material originário da Nicarágua e encontrado em altitudes variando de 1080 a 1330 m.

b) Procedência Mountain Pine Ridge: sementes coletadas a partir de povoaamentos estabelecidos na região de Agudos-SP, pela empresa Duratex S/A. Material originário de Belize e encontrado em altitudes variando de 440 a 730 m.

c) Procedência Napite: mudas obtidas a partir de coleções de sementes da CAMCORE (Central America and Mexico Coniferous Resources Cooperative) e fornecidas pela empresa Pisa Papéis de Imprensa S/A (Jaguariaíva-PR). Material originário de Chiapas, México e encontrado em altitudes médias de 2210 m.

d) Procedência Rancho Nuevo: mudas obtidas a partir de coleções de sementes da CAMCORE e fornecidas pela empresa Pisa Papéis de Imprensa S/A (Jaguariaíva-PR). Material originário de Chiapas, México e encontrado em altitudes variando 2280 a 2340 m.

- ***Pinus patula*** Schiede e Deppe: foram coletadas acículas de árvores de um plantio estabelecido em Camanducaia - MG, pela empresa Melhoramentos S/A.

- ***Pinus oocarpa*** Schiede: foram coletadas sementes de árvores de um plantio estabelecido em Agudos - SP, pela empresa Duratex S/A. Devido à falta de

arquivos na empresa não se conhece a origem precisa deste material sendo a origem provável na América Central.

-*Pinus caribaea* var. *hondurensis*: mudas obtidas a partir de coleções de sementes da e fornecidas pela empresa Pisa Papéis de Imprensa S/A (Jaguariaíva-PR). Material originário de Alamikamba, Nicarágua

3.3 Análise citogenética

Sementes de *Pinus patula* (Camanducaia - MG), *Pinus oocarpa*, *Pinus caribaea* var. *hondurensis* e da procedência Mountain Pine Ridge do *Pinus* de Tecun Umán (Agudos - SP) foram coletadas e colocadas para germinar por 7 a 10 dias em germinador com temperatura de 27°C. Após germinação, as radículas com aproximadamente 0,5 cm foram pré-tratadas com colchicina 0,05% por 24h, fixadas em mistura de etanol-ácido acético-clorofórmio (2:1:1) a 4°C por 24h e transferidas para álcool etílico 70% onde permaneceram armazenadas a 4°C até o uso. Para confecção das lâminas as radículas foram hidrolisadas em ácido acético 45% a 60°C por 10 minutos. Após este período as radículas foram transferidas para água gelada para interrupção da reação de hidrólise. A região meristemática foi excisada e macerada em ácido acético 45%. As lamínulas foram removidas pelo método do gelo seco e lâminas contendo o material a ser analisado foram armazenadas em dessecador a temperatura ambiente até o uso.

O método de coloração fluorescente com Cromomicina A3 (CMA) e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) foi empregado segundo Hizume, Ohgiku e Tanaka (1989a e 1989b), com algumas modificações. As lâminas foram pré-incubadas por 10 minutos em tampão McIlvane (ácido cítrico-fosfato monohidratado de sódio, pH 7,0) e tratadas com solução de cromomicina A3 (2 µg/ ml) por 1 hora em ambiente escuro. As lâminas foram lavadas rapidamente em tampão McIlvane e tratadas com 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) por 30 minutos, lavadas e montadas em glicerol 50% em tampão McIlvane- MgCl₂ 2%.

Para a observação das bandas CMA e DAPI foram utilizados filtros com comprimentos de ondas que variaram de 390 a 490 nm para CMA e 340 a 380 nm para a coloração DAPI em microscópio fluorescente (Diaplan/Leitz). Foram feitas fotomicrografias empregando-se filmes de 400 asas Tri Xpan da Kodak. Para o fluorocromo DAPI o tempo de exposição do filme fotográfico foi de 1 minuto e para o CMA foi de 5 segundos.

Foram analisadas 4 metáfases por táxon estudado e as bandas observadas foram localizadas em seus respectivos idiogramas.

Para a montagem do idiograma foram feitas medições dos cromossomas através de compasso de ponta seca e transferência para escala milimetrada. Foram obtidas as seguintes variáveis:

- a) comprimento do braço longo (bl);
- b) comprimento do braço curto (bc);
- c) comprimento total do cromossoma i: $CT_i = (bl + bc)$;

d) relação de braços (Saylor, 1961) $RB = bc/ bl$;

e) comprimento total do lote haplóide: $CTLH = \sum CT_i$;

f) comprimento relativo do cromossoma i: $CR_i = (CT_i / CTLH) \times 100$;

onde: (i) variou de 1 a 24.

3.4 Análise de RAPD

Foram empregados em um primeiro ensaio genótipos de Mountain Pine Ridge e San Rafael, ambas procedências do *Pinus* de Tecun Umán encontradas em baixas altitudes (inferiores a 1500m segundo a CAMCORE), e genótipos de *P. patula*. No segundo experimento foram utilizados genótipos de duas procedências do *Pinus* de Tecun Umán Rancho Nuevo e Napite encontradas em altas altitudes (superiores a 1500 m segundo a CAMCORE), *P. patula*, *P. oocarpa* e *P. caribaea* var. *hondurensis*.

3.5 Extração do DNA

Empregou-se para a extração do DNA, aproximadamente 5g de acículas jovens, as quais foram colhidas e imediatamente conservadas sob baixas temperaturas, na presença de gelo.

As extrações foram feitas por maceração do material vegetal com nitrogênio líquido. Foram adicionados 10 ml de tampão de extração (2% de CTAB; 100 mM Tris-HCl (pH = 8); 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 1% PVP, 0,5% de sarkosyl). Após maceração, foram adicionados 20 μ l de 2- β -mercaptoetanol para 10 ml de tampão

para retardar a oxidação de metabólitos secundários, obtendo-se um homogeneizado, o qual foi incubado a 65°C por 30 minutos.

Ao final deste período, foram adicionados 10 ml de mistura de clorofórmio-álcool isoamil-fenol (24:1:2), e verteu-se os tubos 20 vezes para a obtenção de uma emulsão, que foi posteriormente centrifugada a 5000 r.p.m., em centrífuga Fanen (modelo 206-R), por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado do tubo com o auxílio de uma pipeta e vertido em 30 ml de álcool 95%-acetato de amônio 7,5M (6:1), levado ao freezer, durante 1 hora, para a precipitação dos ácidos nucleicos.

Após a precipitação, os ácidos nucleicos foram dissolvidos em TE (1,0mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA) seguindo-se uma nova precipitação em álcool isopropílico e dissolução final em TE.

As amostras de DNA tiveram a concentração de DNA determinada com o auxílio de um fluorômetro (TKO 100), onde foram empregadas alíquotas de 2 µl de amostra para cada 2 ml de tampão TNE 10x (1,3% Tris base; 0,37% Na₂EDTA. 2 H₂O; 11,68% NaCl- pH= 7,4).

3.6 Amplificação do DNA

A amplificação foi baseada em método descrito por Williams et al. (1990) usando primers de 10 bases de seqüência arbitrária, com algumas modificações, onde as reações foram otimizadas para a obtenção de produtos de amplificação claros. Cada reação continha 3 µl de DNA de concentração 10 ng/µl, e mais 10 µl de mix (2,8 µl de água pura; 2,0 µl de tampão Promega; 0,2 µl de Taq polimerase Promega; 2,0 µl de

nucleotídeos; 3,0 μ l de primer), obtendo-se no final 13 μ l de reação. Foram empregados 130 primers, obtidos da Operon Technologies, para identificação de polimorfismo. As amplificações foram feitas em Termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400), programado para 1 primeiro ciclo a 94°C por 5 minutos, 45 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por 15 segundos, temperatura de alongação de 36°C por 30 segundos e temperatura de renaturação de 72°C por 1 minuto. Foram acrescentados a estes ciclos, dois ciclos finais de manutenção de 72°C por 5 minutos.

3.7 Eletroforese

Os produtos da amplificação foram separados em géis de 1,0% de agarose, e posteriormente corados com brometo de etídio (0,5 μ g/ml) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne.

3.8 Análise dos resultados

Na avaliação dos géis, a presença de uma banda em um indivíduo foi designada por um e a ausência em outro indivíduo, por zero. De posse desses dados, construiu-se uma matriz de zero e um, para cada experimento. A estimativa da similaridade genética (S_{gij}) entre cada par de genótipos foi efetuada pelo coeficiente "Simple Matching", através da seguinte expressão (Rohlf, 1992):

$$S_{gij} = m/n$$

onde;

$m = a + d$ (presença e ausência de uma dada banda nos dois genótipos considerados);

$n =$ número total de bandas.

As variáveis da expressão foram obtidas como demonstrado no esquema abaixo:

		GENÓTIPO i	
		1	0
GENÓTIPO j	1	a	b
	0	c	d

A representação simplificada das similaridades foi feita através da construção de um dendrograma, obtido através do método de agrupamento UPGMA (unweighted pair-group method, arithmetic average) (Rohlf, 1992). Os erros associados a cada similaridade foram estimados segundo Skroch, Tivang, Nienhuis (1992) usando a seguinte expressão:

$$\text{variância (s)} = ns(1-s)/(n-1)$$

$$\text{erro padrão estimado} = (\text{var } s / n)^{1/2}$$

onde;

$s =$ similaridade genética obtida através do método Simple Matching;

$n =$ número total de bandas.

Foram realizadas também estimativas das distâncias genéticas entre as diferentes árvores usando o método de distância genética Euclidiana Quadrada (E^2_{ij}) e o agrupamento proposto por Tocher (citado por RAO, 1952).

$$E^2_{ij} = \sum_j (x_{ij} + x_{rj})^2$$

onde;

X_{ij} = é a observação no i-ésimo genótipo, em referência ao j-ésimo caráter estudado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise citogenética

No estudo citogenético das metáfases mitóticas da procedência Mountain Pine Ridge do *Pinus* de Tecun Umán, bem como das espécies *P. patula*, *P. oocarpa* e *P. caribaea* var. *hondurensis* avaliadas neste trabalho apresentaram $2n= 24$ cromossomas, com 11 pares metacêntricos e 1 par submetacêntrico, o 12º (Figura 2). Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados para estas taxa e demais espécies do gênero *Pinus* (Saylor, 1961, 1972; Pederick, 1970; Borzan e Papes, 1978; Mac Pherson e Fillion, 1981; Davide e Araújo, 1993 Doudrick et al., 1995).

Observou-se também, que em todos os taxa analisados a distinção entre os 10 primeiros pares de cromossomas, feita através do tamanho e posição do centrômero foi muito difícil, pois os mesmos mostraram-se muito semelhantes (Tabela 1). A procedência Mountain Pine Ridge apresentou o Comprimento Total do Lote Haplóide de 143,63 μm , com o tamanho dos cromossomas variando de 13,38 a 9,08 μm . *P. oocarpa*, *P. patula* e *P. caribaea* apresentaram, respectivamente, CTLH de 140,50 μm , 158,99 μm , 174,91 μm e variação no comprimento dos cromossomas de 13,30 a 7,84 μm , 15,00 a 9,74 μm e 16,92 a 11,70 μm (Tabela 1). Esses dados estão de acordo com os obtidos por Davide e Araújo (1993a), onde o CTLH de *P. oocarpa*

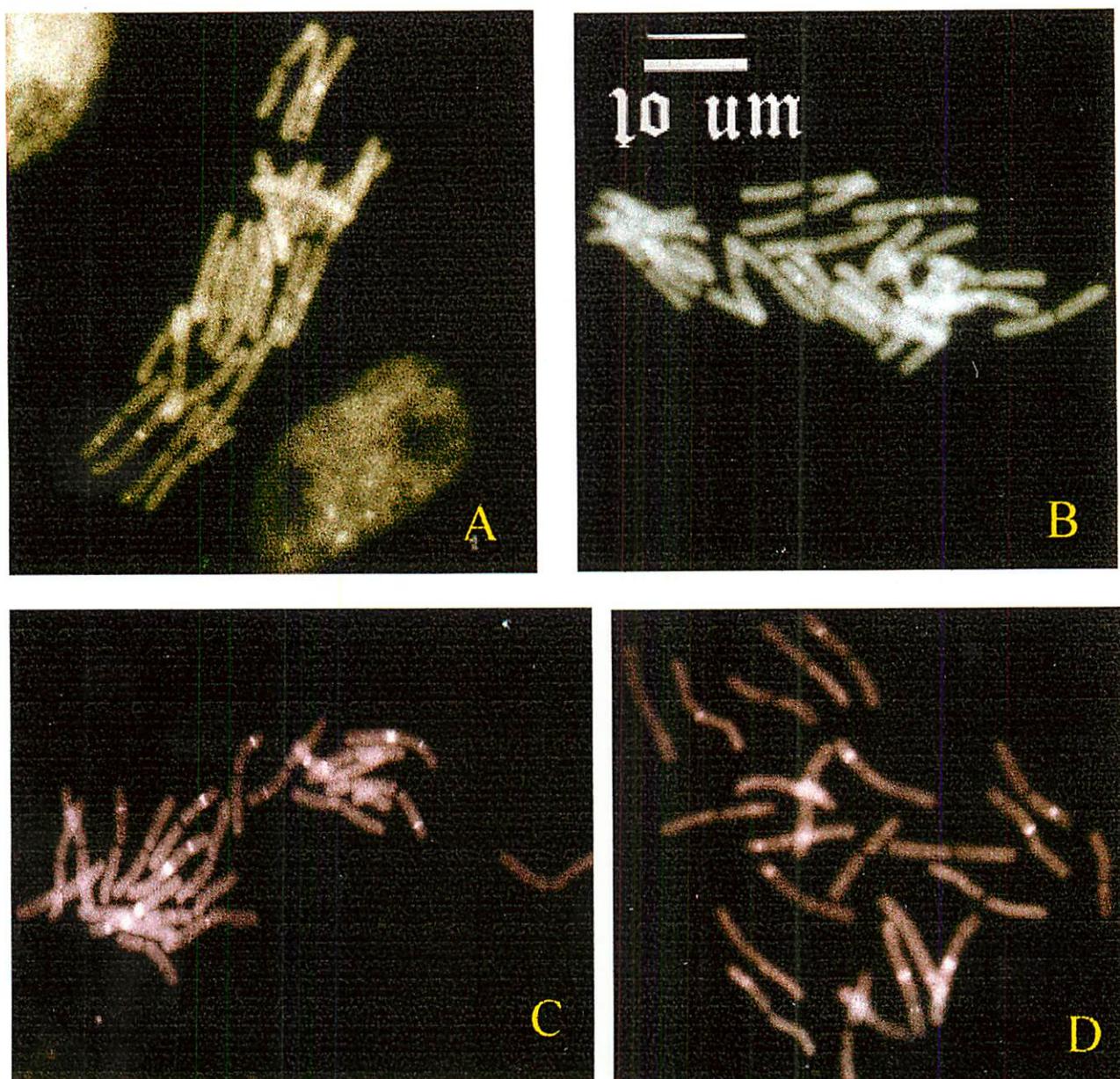


FIGURA 2. Metáfases mitóticas apresentando cromossomas de *Pinus* de Tecun Umán procedência Mountain Pine Ridge (A); *Pinus oocarpa* (B); *Pinus patula* (C) e *Pinus caribaea* var. *Hondurensis* (D), bandeadas com o fluorocromo CMA.

TABELA 1. Valores médios em micrômetros das variáveis cromossômicas da procedência Mountain Pine Ridge do *Pinus de Tecun Umán* (PR), do *P. occarpa* (PO), *P. patula* (PP) e *P. caribaea var. hondurensis* (PC)

	BRAÇO LONGO			BRAÇO CURTO			RELAÇÃO BRAÇOS						COMP. RELATIVO						COMP. TOTAL					
	PR	PO	PC	PR	PO	PC	PR	PO	PP	PC	PR	PO	PP	PC	PR	PO	PP	PC	PR	PO	PP	PC		
1	6,69	6,92	7,69	8,46	6,69	6,38	7,31	8,46	1,00	0,92	0,95	1,00	9,31	9,47	9,43	9,67	13,38	13,30	15,00	16,92				
2	6,69 (4,61)	6,31	7,46	8,08	6,23	6,31	7,31	7,69 (6,15)	0,93	1,00	0,98	0,95	8,99	8,98	9,29	9,02	12,92	12,62	14,77	15,77				
3	6,61	6,77	7,31	8,00	6,15 (3,85)	5,61 (3,85)	7,31	7,62	0,93	0,83	1,00	0,95	8,88	8,81	9,19	8,93	12,76	12,38	14,62	15,62				
4	6,38 (4,61)	6,38 (4,61)	7,46* (4,61)	7,69	6,15	5,92	6,69	7,31	0,96	0,93	0,90	0,95	8,72	8,75	8,90	8,57	12,53	12,30	14,15	15,00				
5	6,15* (3,85)	6,38 (3,85)	7,23 (5,38)	7,69	6,15	5,92	6,38	7,31	1,00	0,93	0,88	0,95	8,56	8,75	8,56	8,57	12,30	12,30	13,61	15,00				
6	6,15	6,31	6,92	7,61	6,15	5,92	6,54	7,31 (4,61)	1,00	0,94	0,94	0,96	8,56	8,70	8,46	8,53	12,30	12,23	13,46	14,92				
7	6,15* (3,85)	6,15* (4,61)	6,77* (5,00)	7,38* (5,00)	5,92	5,77	6,62 (4,61)	7,00 (4,61)	0,96	0,94	0,98	0,95	8,40	8,48	8,42	8,22	12,07	11,92	13,39	14,38				
8	6,00	6,00	6,69	7,23	5,92	5,77	6,31	7,00 (4,61)	0,99	0,96	0,94	0,97	8,30	8,38	8,18	8,13	11,92	11,77	13,00	14,23				
9	5,92	6,00*	6,69 (4,23)	6,92	5,92	5,46	6,15 (4,61)	6,92 (4,61)	1,00	0,91	0,92	1,00	8,24	8,16	8,08	7,91	11,84	11,46	12,84	13,84				
10	5,92	5,85	6,31 (5,00)	6,92	5,46	5,54	6,15	6,92	0,92	0,95	0,97	1,00	7,92	8,11	7,84	7,91	11,38	11,39	12,46	13,84				
11	5,77	5,61	6,15 (5,00)	6,92*	5,38	5,38	5,77	6,77	0,93	0,96	0,94	0,98	7,76	7,82	7,50	7,83	11,15	10,99	11,92	13,69				
12	5,23	4,61	5,77	6,85	3,38	3,23	4,00	4,85	0,74	0,70	0,69	0,71	6,32	5,58	6,14	6,69	9,08	7,84	9,77	11,70				
CTLH	143,63/140,50/158,99/174,91																							

CTLH: Comprimento Total do Lote Haplóide

(...): posicionamento da banda intersticial em relação ao centrômero.
*.: banda centromérica

apresentou-se menor que o do *P. patula* (122, 96 e 126, 05 μm , respectivamente).

A diferença de tamanho entre o cromossoma 1 e o 12 foi maior para *P. oocarpa* (5,46 μm) e menor para Mountain Pine Ridge (4,30 μm). A maior contribuição para esta diferença foi dada pelo comprimento do braço curto para a procedência do *Pinus* de Tecun Umán, *P. oocarpa* e *P. patula* (51%, 73% e 58%, respectivamente). A diferença entre o cromossoma maior e menor em *P. caribaea* foi de 5,22 μm , sendo que o braço longo contribuiu com 55% para essa diferença. Observa-se portanto, que os dados sobre o tamanho dos cromossomas mostram que a procedência Mountain Pine Ridge apresenta seu complemento cromossômico muito próximo em tamanho do *P. oocarpa*, diferindo deste por somente 3,13 μm . A diferença entre o tamanho do genoma haplóide desta procedência e os de *P. patula* e *P. caribaea* foi de 15,36 e 31,28 μm , respectivamente.

Com relação a contribuição do comprimento do braço para a diferença entre o primeiro e o último cromossoma, Mountain Pine Ridge apresentou resultado mais próximo ao do *P. patula*.

Diferente do que foi observado por Davide e Araújo (1993a) para *P. oocarpa* e *P. patula*, os cromossomas, das espécies estudadas neste trabalho não apresentaram valores de relação de braços em sequência decrescente do primeiro ao último cromossoma (Tabela 1).

Segundo Saylor (1972), os 3 cromossomas que apresentaram centrômero mais próximo da região mediana foram 3, 5 e 8 em *P. oocarpa* e 2, 3, e 7 em *P. patula*. Davide e Araújo (1993a) verificaram para as mesmas espécies que os 4 cromossomas com esta característica foram 1, 2, 3 e 5 em *P. oocarpa* e 1, 2, 4 e 5 em *P. patula*.

Neste trabalho verificou-se que *P. oocarpa* apresentou os cromossomas 2, 8 e 11 como os mais metacêntricos e, em *P. patula* os cromossomas 2, 3 e 7 tiveram seus centrômeros mais medianos. Quanto às outras duas espécies estudadas os centrômeros mais próximos da região mediana ocorreram nos cromossomas 1, 5, 6 e 9 na procedência Mountain Pine Ridge e 1, 9, 10 e 11 no *P. caribaea*. Verifica-se desta forma que os dados de relação de braços nas espécies de *Pinus* não constituem uma boa característica para a comparação entre espécies como sugeriu Saylor (1972). Provavelmente, a utilização de metodologias que permitam medições mais precisas dos cromossomas, como os programas de análise de imagens através de computadores, venham contribuir para o emprego desta característica nas análises cariotípicas de espécies com complementos cromossômicos homogêneos.

Figura 3 apresenta os idiogramas de cada táxon com seus respectivos padrões de bandas fluorescentes, os quais foram montados utilizando somente as bandas CMA. As bandas DAPI foram observadas nas preparações citológicas mas não foram usadas porque não sensibilizaram o negativo. No entanto, as fotografias obtidas com o filtro para o comprimento de onda DAPI, foram úteis na confirmação das bandas CMA, uma vez que estas fotografias constituem o negativo das bandas CMA.

Com relação ao número de bandas, presentes em cada espécie, observou-se 6 bandas para *Pinus* de Tecun Umán procedência Mountain Pine Ridge, *P. oocarpa* e *P. caribaea* var. *hondurensis*. Em *P. patula* foram observadas 8 bandas (Figura 3). Observa-se nesta Figura que a procedência Mountain Pine Ridge do *Pinus* de Tecun Umán apresentou o mesmo número de bandas centroméricas (2) e intersticiais (4) que o *P. oocarpa* e o *P. caribaea* var. *hondurensis*. *P. patula* apresentou além destas, duas bandas intersticiais a mais.

Com relação à posição das bandas a procedência do *Pinus* de Tecun Umán mostrou-se mais próxima do *P. oocarpa*, (4 bandas nos cromossomas 3, 4 e 7) seguido do *P. patula* (3 bandas nos cromossomas 4 e 7) e, mais distante do *P. caribaea* (1 banda no cromossoma 7). Houve coincidência também na posição de 4 bandas entre o *P. oocarpa* e *P. patula*. A banda centromérica do cromossoma 7 foi a única que o *P. caribaea* apresentou em comum com os demais taxa.

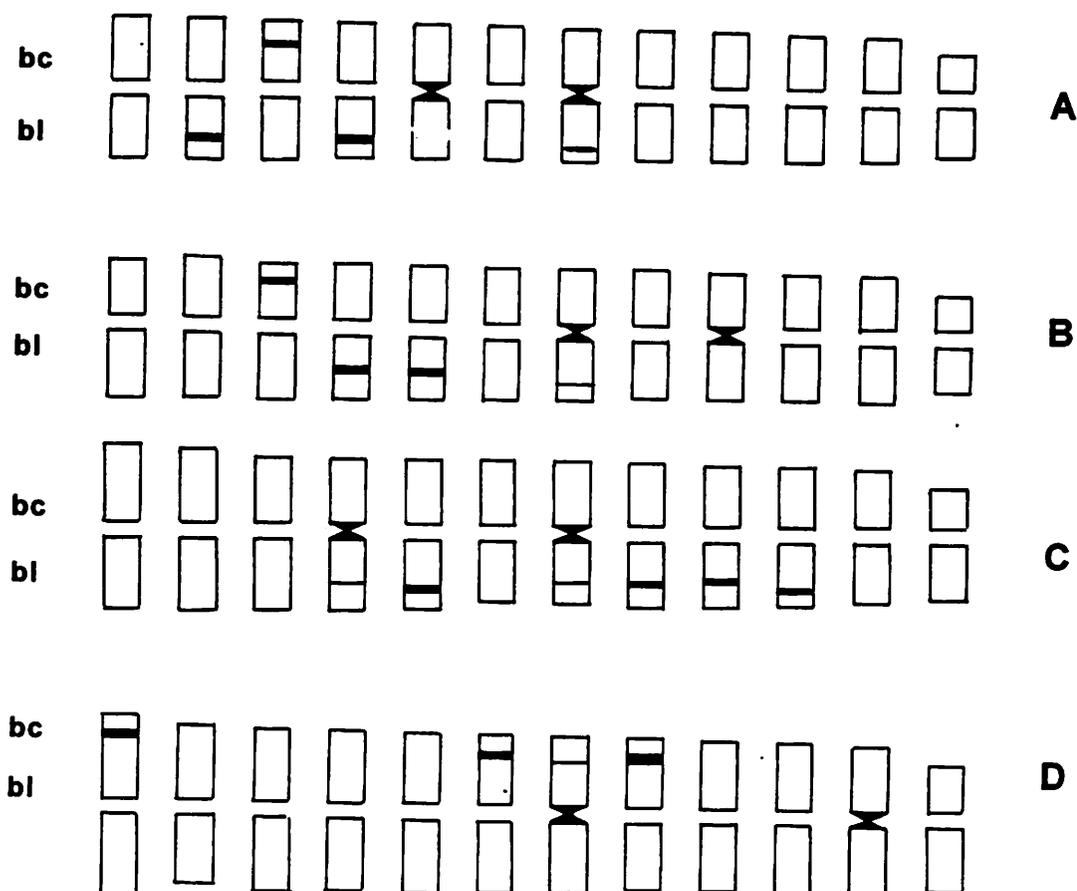


FIGURA 3. Idiogramas dos cromossomas de I a XII bandeados pelo fluorocromo CMA, de *Pinus* de Tecun Umán, procedência Mountain Pine Ridge (A), *P. oocarpa* (B), *P. patula* (C) e *P. caribaea* var. *hondurensis* (D).

Os dados de bandeamento cromossômico acrescidos daqueles obtidos para as variáveis cariotípicas mostram a maior proximidade entre a procedência do *Pinus* de Tecun Umán com o *P. oocarpa*. No entanto, esses resultados indicam também que o *P. patula* não divergiu muito em relação à esses dois taxa. Já o *P. caribaea* apresentou-se mais divergente

Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos através de técnicas morfológicas e anatômicas por Eguiluz-Piedra e Perry (1983) e também por marcadores de DNA por Grattapaglia, O'Malley e Dvorak (1992), onde os autores afirmam que há maior proximidade do *Pinus* de Tecun Umán com o *P. oocarpa* e são contrários aos dados obtidos por Styles (1985), Davide e Araújo (1993) e Leão e Davide (1993) que afirmam que há maior proximidade entre este táxon e o *P. patula*.

4.2 Análise de RAPD

4.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi mais eficiente quando foi utilizado material vegetal jovem, obtido a partir de plântulas e/ou mudas de 0 a 1 ano. Em acículas obtidas de árvores adultas, não se obteve sucesso na extração de DNA, provavelmente devido à presença de fenóis e/ou devido a lignificação do material.

4.2.2 Amplificação

Dos 130 primers testados, 28 provenientes dos kits de A a M, foram escolhidos por apresentarem padrões de bandas polimórficos. As bandas mais intensas observadas nos géis foram utilizadas para a análise (Figura 4).

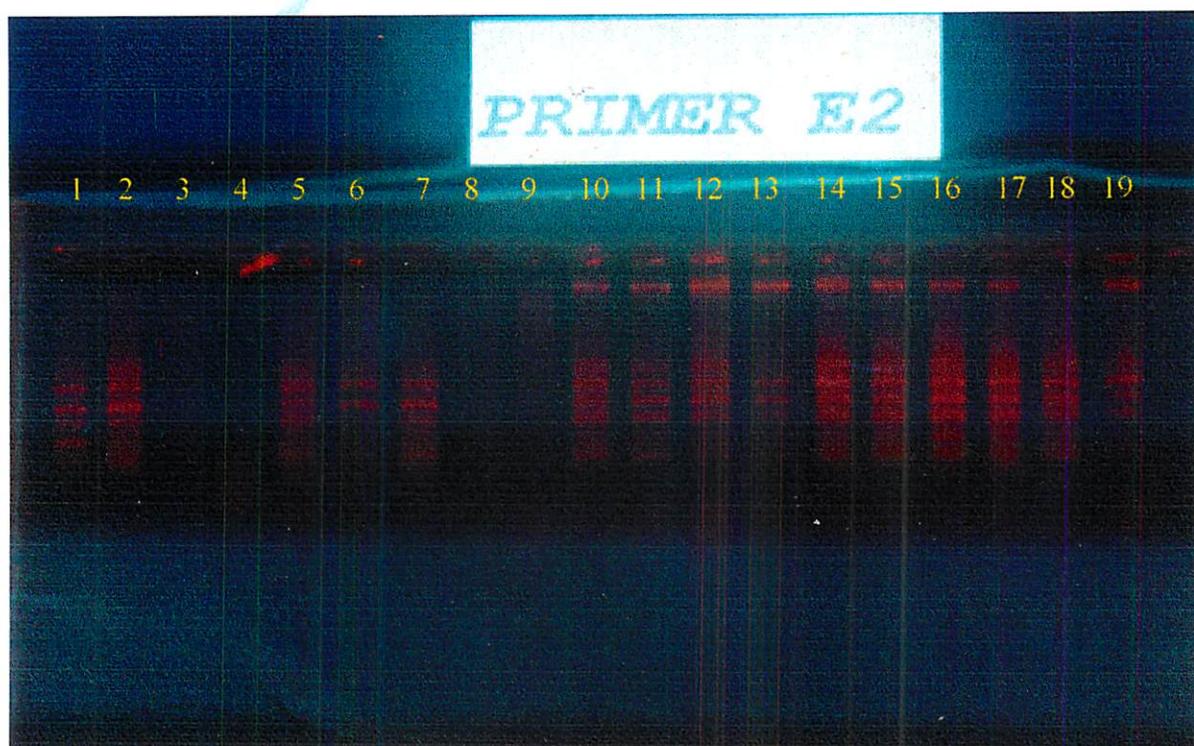


FIGURA 4. Gel de agarose mostrando padrão dos produtos amplificados obtidos com o primer E2 da marca Operon. (da esquerda para a direita) 1 a 4 - *P. patula*, 5 a 7 - *P. caribaea*, 8 a 11 - *Pinus* de Tecun Umán procedência Napite, 12 a 14 - *Pinus* de Tecun Umán procedência Rancho Nuevo e 15 a 19- *P. oocarpa*.

Experimento nº 1

Para se verificar a proximidade do *Pinus* de Tecun Umán com o *P. patula* utilizou-se genótipos de *P. patula*, e das procedências Mountain Pine Ridge e San Rafael do *Pinus* de Tecun Umán, ambas encontradas em regiões de baixa altitude.

A Tabela 2 mostra as estimativas das similaridades genéticas, obtidas através do método "Simple Matching" e os erros associados encontrados para cada par combinado de genótipos.

O menor valor encontrado para este experimento foi para o par de genótipos constituído por *P. patula* e pela procedência San Rafael (genótipos 27 e 2), sendo de $0,37 \pm 0,08$; e o maior valor encontrado foi de $0,94 \pm 0,04$ para o par de genótipos de *P. patula* (genótipos 17 e 19).

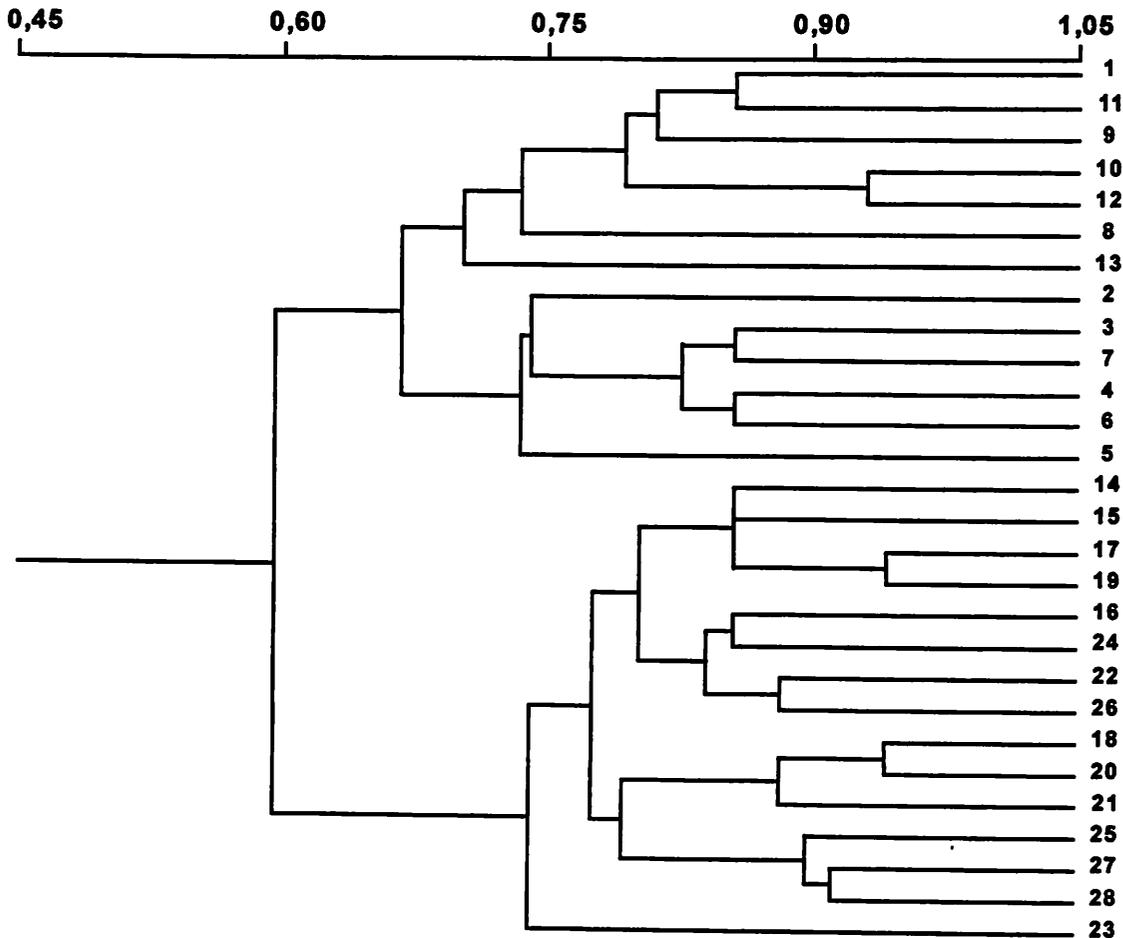
A pesquisa de agrupamento usando o método UPGMA (unweighted pair-group method, arithmetic average), mostrou duas árvores, as quais apresentaram padrão de agrupamento semelhante.

Pode-se observar pelo dendrograma obtido (Figura 5) que as procedências do *Pinus* de Tecun Umán posicionaram-se num mesmo grupo, diferente daquele onde foram agrupados os genótipos de *P. patula*. Além disto houve uma variação muito maior entre genótipos do *Pinus* de Tecun Umán, do que entre genótipos de *P. patula*. Esta maior variação entre *Pinus* de Tecun Umán sugere uma maior possibilidade de seleção e também adaptação dos diferentes genótipos em vários ambientes. A menor variação do *P. patula* talvez se deva, muito provavelmente, ao fato

TABELA 2. Estimativas de similaridades genéticas (método Simple Matching) (posicionadas acima da diagonal) e erro padrão (posicionados abaixo da diagonal) entre 28 genótipos de *Pinus*, baseadas em dados de RAPD.

Genótipo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
1		0.77	0.71	0.63	0.66	0.77	0.69	0.71	0.83	0.77	0.86	0.80	0.66	0.63	0.49	0.51	0.63	0.57	0.63	0.57	0.49	0.46	0.54	0.54	0.63	0.57	0.60	0.63		
2	0.07		0.77	0.69	0.71	0.71	0.80	0.60	0.66	0.66	0.69	0.69	0.60	0.57	0.49	0.57	0.51	0.51	0.51	0.51	0.43	0.46	0.49	0.43	0.46	0.51	0.37	0.40		
3	0.08	0.07		0.80	0.83	0.83	0.86	0.71	0.66	0.77	0.68	0.74	0.60	0.51	0.54	0.63	0.51	0.51	0.51	0.51	0.49	0.51	0.43	0.66	0.63	0.63	0.54	0.51		
4	0.08	0.08	0.07		0.69	0.86	0.83	0.69	0.57	0.63	0.60	0.60	0.63	0.60	0.63	0.71	0.60	0.60	0.60	0.66	0.57	0.66	0.46	0.74	0.66	0.71	0.57	0.54		
5	0.08	0.08	0.06	0.08		0.71	0.74	0.68	0.60	0.71	0.63	0.74	0.66	0.63	0.66	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.54	0.51	0.49	0.54	0.63	0.63	0.54	0.51		
6	0.07	0.08	0.06	0.06	0.08		0.86	0.66	0.66	0.66	0.69	0.63	0.66	0.69	0.60	0.74	0.69	0.63	0.69	0.63	0.54	0.63	0.54	0.63	0.54	0.71	0.63	0.74	0.60	0.63
7	0.08	0.07	0.06	0.06	0.07	0.06		0.74	0.69	0.69	0.66	0.66	0.69	0.66	0.63	0.77	0.66	0.66	0.66	0.66	0.57	0.60	0.51	0.63	0.60	0.66	0.51	0.54		
8	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07		0.71	0.83	0.69	0.74	0.71	0.63	0.66	0.51	0.69	0.69	0.69	0.69	0.66	0.57	0.54	0.60	0.74	0.63	0.66	0.63		
9	0.06	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08		0.83	0.80	0.80	0.71	0.63	0.54	0.57	0.69	0.57	0.63	0.57	0.49	0.51	0.49	0.60	0.63	0.57	0.60	0.63		
10	0.07	0.08	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.06	0.06		0.80	0.91	0.71	0.63	0.54	0.51	0.63	0.57	0.63	0.57	0.54	0.51	0.43	0.60	0.69	0.63	0.66	0.63		
11	0.06	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07		0.77	0.69	0.66	0.51	0.64	0.66	0.60	0.66	0.60	0.57	0.49	0.46	0.57	0.66	0.60	0.63	0.66		
12	0.07	0.08	0.07	0.08	0.07	0.08	0.08	0.07	0.07	0.05	0.07		0.74	0.66	0.57	0.54	0.66	0.60	0.66	0.60	0.57	0.54	0.51	0.63	0.71	0.66	0.69	0.66		
13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07		0.80	0.77	0.74	0.80	0.63	0.74	0.63	0.66	0.74	0.60	0.71	0.69	0.74	0.66	0.63		
14	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07		0.86	0.77	0.83	0.71	0.88	0.71	0.74	0.77	0.69	0.69	0.71	0.77	0.74	0.77		
15	0.09	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.08	0.07	0.06		0.86	0.86	0.74	0.86	0.74	0.83	0.86	0.77	0.77	0.80	0.80	0.77	0.74		
16	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.07	0.07	0.06		0.89	0.77	0.83	0.77	0.74	0.83	0.74	0.86	0.77	0.83	0.69	0.71		
17	0.08	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.06	0.06	0.05		0.83	0.94	0.83	0.80	0.83	0.80	0.80	0.83	0.83	0.80	0.83		
18	0.08	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.06		0.83	0.94	0.91	0.71	0.80	0.63	0.83	0.77	0.74	0.77			
19	0.08	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.05	0.06	0.06	0.04		0.83	0.86	0.83	0.80	0.74	0.83	0.83	0.86	0.88			
20	0.08	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.06	0.06		0.86	0.77	0.74	0.69	0.83	0.77	0.74	0.77	0.74			
21	0.09	0.08	0.09	0.08	0.09	0.09	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.07	0.06	0.07	0.06		0.80	0.83	0.66	0.86	0.80	0.83	0.80	0.83			
22	0.09	0.09	0.09	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.09	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06		0.74	0.86	0.77	0.89	0.80	0.83	0.80				
23	0.09	0.08	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.08	0.09	0.09	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07		0.60	0.74	0.69	0.71	0.74					
24	0.09	0.08	0.08	0.07	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.06	0.07	0.08	0.07	0.08	0.08	0.06	0.08		0.80	0.86	0.77	0.74			
25	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07		0.89	0.91	0.89			
26	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.07	0.06	0.07	0.07	0.05	0.08	0.06	0.05		0.86	0.83		
27	0.08	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.08	0.07	0.07	0.06	0.07	0.06	0.07	0.06	0.07	0.07	0.05	0.06		0.91		
28	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.08	0.06	0.07	0.05	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.05	0.06	0.05				

genótipos 1 a 5 -*Pinus* de Tecun Umán procedência Mountain Pine Ridge
6 a 13 *Pinus* de Tecun Umán procedência San Rafael
14 a 28 *Pinus patula*.



GENÓTIPOS: 1 a 8 = *Pinus* de Tecun Umáni, proc. Mountain Pine Ridge; 9 a 13 = *Pinus* de Tecun Umán, proc. San Rafael; 14 a 28 = *Pinus patula*.

FIGURA 5. Agrupamento entre genótipos de *Pinus* de Tecun Umán e *Pinus patula*, baseado em coeficientes de similaridades Simple Matching.

desta espécie já ter sido explorada há mais tempo e por isso, mais selecionada, e conseqüentemente apresentar menor variação genética.

Utilizando o método de distância Euclidiana Quadrada, foram observados valores máximos de 20 para os genótipos *P. patula*-procedência San Rafael e *P.*

patula-procedência Mountain Pine Ridge; e valor mínimo de 2 entre genótipos de *P. patula* (Tabela 3).

Os agrupamentos obtidos pelo método de Tocher (Tabela 4), para estes dados de distância Euclidiana Quadrada, mostraram grande proximidade com os níveis obtidos pelos dendrogramas, confirmando os resultados.

Desta forma os resultados obtidos mostraram um distanciamento bem claro entre genótipos do *Pinus* de Tecun Umán dos de *P. patula*, concordando com Eguiluz-Piedra e Perry (1983).

Uma maior distância entre o *Pinus* de Tecun Umán e *P. patula* também foi observada por Grattapaglia, O'Malley e Dvorak (1992) quando usou marcadores de RAPD e o comparou com outras espécies de *Pinus* tropicais. Neste trabalho os autores observaram que houve diferenciação genética a nível de DNA entre ecótipos do *Pinus* de Tecun Umán de alta e de baixa altitude.

Para verificar as similaridades genéticas entre o *Pinus* de Tecun Umán e as espécies que estão envolvidas nas questões que tratam da sua classificação taxonômica foi realizado um segundo experimento.

Experimento nº 2

Neste experimento as procedências Rancho Nuevo e Napite, ambas encontradas em regiões de alta altitude foram comparadas com *P. oocarpa*, *P. patula* e *P. caribaea* var. *hondurensis*.

TABELA 3. Estimativas das distâncias genéticas (Distância Euclidiana Quadrada) entre 28 genótipos de *Pinus*, baseadas em dados de RAPD.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1	0	8	10	13	12	8	11	10	6	8	5	7	12	13	18	17	13	15	13	15	18	19	16	16	13	15	14	13
2		0	8	11	10	10	7	14	12	12	11	11	14	15	18	15	17	17	17	17	20	19	18	20	19	13	16	17
3			0	7	6	6	5	10	12	8	11	9	14	17	16	13	17	17	17	17	18	17	20	19	13	13	16	17
4				0	11	5	6	11	15	13	14	14	13	14	13	10	14	14	14	14	12	15	12	9	12	10	15	16
5					0	10	9	12	14	10	13	9	12	13	12	15	15	15	15	15	16	17	18	16	13	13	16	17
6						0	5	12	12	12	11	13	12	11	14	9	11	13	11	13	16	13	16	10	13	9	14	13
7							0	9	11	11	12	12	11	12	13	8	12	12	12	12	15	14	17	13	14	12	17	16
8								0	10	6	11	9	10	13	12	13	11	11	11	11	12	15	16	14	9	13	12	13
9									0	6	7	7	10	13	16	15	11	15	13	15	18	17	18	14	13	15	14	13
10										0	7	3	10	13	16	17	13	15	13	15	16	17	20	14	11	13	12	13
11											0	8	11	12	17	16	12	14	12	14	15	18	19	15	12	14	13	12
12												0	9	12	15	16	12	14	12	14	15	16	17	13	10	12	11	12
13													0	7	8	9	7	13	9	13	12	9	14	10	11	9	12	13
14														0	5	8	6	10	4	10	9	8	11	11	10	8	9	8
15															0	5	5	9	5	9	6	5	8	7	7	7	8	9
16																0	4	8	6	8	6	9	6	8	5	8	6	11
17																	0	4	6	2	7	6	7	7	6	6	7	6
18																		0	6	2	3	10	7	13	6	8	9	8
19																			0	6	5	6	7	9	6	6	5	4
20																				0	5	8	9	11	6	8	9	8
21																					0	7	6	12	5	7	6	7
22																						0	9	5	8	4	7	8
23																							0	9	5	8	4	7
24																							0	14	9	11	10	9
25																								0	7	5	8	9
26																									0	4	3	4
27																										0	5	6
																											0	3

Genótipos: 1 a 5 *Pinus* de Tecun Umán procedência Mountain Pine Ridge
6 a 13 *Pinus* de Tecun Umán procedência San Rafael
14 a 28 *Pinus patula*

TABELA 4. Formação de grupos segundo o método aglomerativo de Tocher, usando Distância Euclidiana Quadrada.

Grupo	Indivíduos										
1	17	19	14	15	16	22	26	25	21	27	28
2	18	20									
3	10	12	9	1	11						
4	3	7	6	4							
5	2										
6	5										
7	8										
8	24										
9	13										
10	23										

Genótipos 1 a 5 - *Pinus* de Tecun Umán procedência Mountain Pine Ridge
 6 a 13 - *Pinus* de Tecun Umán procedência San Rafael
 14 a 28 - *Pinus patula*

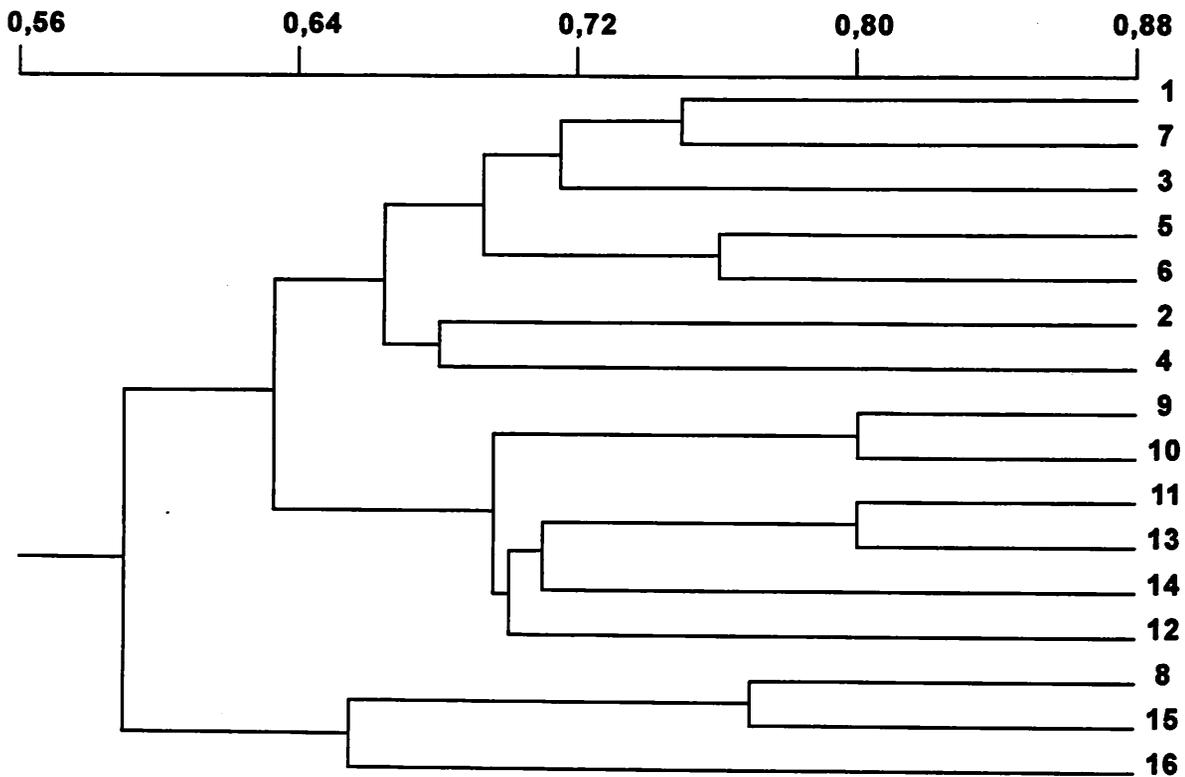
A Tabela 5 mostra as estimativas das similaridades genéticas e os erros associados encontrados para cada par combinado de genótipos. O menor valor encontrado ($0,44 \pm 0,05$) foi para a procedência Napite e *P. patula* (genótipos 8 e 2) e para *P. oocarpa* e *P. patula* (genótipos 16 e 2). O valor máximo encontrado foi de $0,80 \pm 0,04$ dentro da procedência Napite e dentro da procedência Rancho Nuevo (genótipos 10 e 9, e genótipos 11 e 13, respectivamente).

Uma visão geral das similaridades entre os genótipos avaliados neste experimento foi fornecida pela pesquisa de agrupamento usando o método UPGMA. Pode-se observar através do dendrograma obtido (Figura 6) que existe uma maior proximidade entre genótipos de *P. oocarpa* com os do *Pinus* de Tecun Umán (procedências Napite e Rancho Nuevo) e uma divergência destes em relação aos outros genótipos das espécies *P. caribaea* var. *hondurensis* e *P. patula*.

TABELA 5. Estimativas das similaridades genéticas (método Simple Matching acima da diagonal) e erro padrão (abaixo da diagonal) entre 16 genótipos de *Pinus* baseadas em dados de RAPD.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1		0.68	0.72	0.70	0.66	0.67	0.76	0.62	0.69	0.59	0.51	0.68	0.59	0,64	0.67	0.52
2	0.05		0.68	0.68	0.68	0.67	0.64	0.44	0.65	0.63	0.63	0.68	0.61	0.64	0.55	0.44
3	0.05	0.05		0.66	0.68	0.73	0.72	0.64	0.63	0.65	0.63	0.62	0.67	0.70	0.75	0.52
4	0.05	0.05	0.05		0.64	0.63	.070	0.56	0.69	0.63	0.59	0.56	0.55	0.56	0.61	0.56
5	0.05	0.05	0.05	0.05		0.77	0.72	0.46	0.71	0.67	0.55	0.64	0.65	0.66	0.55	0.48
6	0.05	0.05	0.04	0.05	0.04		0.73	0.55	0.68	0.64	0.60	0.63	0.66	0.65	0.62	0.55
7	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05		0.62	0.73	0.67	0.59	0.62	0.65	0.68	0.69	0.58
8	0.04	0.05	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04		0.63	0.69	0.61	0.48	0.59	0.54	0.77	0.60
9	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05		0.80	0.64	0.69	0.66	0.69	0.70	0.57
10	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05		0.72	0.67	0.78	0.71	0.66	0.55
11	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04		0.73	0.80	0.69	0.60	0.59
12	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05		0.67	0.70	0.57	0.60
13	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04		0.73	0.60	0.51
14	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05		0.67	0.56
15	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04		0.65
16	0.05	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	

genótipos 1, 2, 3 e 4 *Pinus patula*
 5, 6 e 7 *Pinus caribaea*
 8, 9 e 10 *Pinus tecunumanii* proc. Napite
 11, 12 e 13 *Pinus tecunumanii* proc. Rancho Nuevo
 14, 15 e 16 *Pinus oocarpa*.



GENÓTIPOS: 1, 2, 3, 4 = *Pinus patula*; 5, 6, 7 = *P. caribae*; 8, 9, 10 = *Pinus* Tecun Umán, proc. = Napite; 11, 12, 13 = *Pinus* de Tecun Umán, proc. Rancho Nuevo; 14, 15, 16 = *P. occarpa*.

FIGURA 6. Agrupamento de diferentes genótipos de *Pinus*, baseado em coeficientes de similaridades Simple Matching.

Na Tabela 6 pode-se observar as distâncias Euclidianas Quadradas, onde foram obtidos valores máximos iguais a 56 para genótipos de *P. patula*-procedência Napite(pares de genótipos 8 e 2; 16 e 2). O menor valor obtido foi igual a 20 para os genótipos procedência San Rafael-San Rafael.

Os grupos obtidos com o método aglomerativo de Tocher (Tabela 7) mostraram grande proximidade com os resultados dos níveis obtidos com os dendrogramas, confirmando os resultados.

Por comparação pode-se notar valores de erro padrão maiores para o experimento 1 (Tabela 2) e menores para o experimento 2 (Tabela 5). Estes resultados ocorreram em função da utilização da metodologia proposta por Skroch; Tivang e Nienhuis (1992), segundo a qual há uma diminuição do erro padrão com o aumento do número de bandas analisadas, sendo ideal um número igual ou maior que 100. Os erros associados às estimativas resultam da amostragem do genoma através das bandas analisadas e, evidentemente, quanto maior o número de bandas melhor será a amostragem do genoma. No caso particular do *Pinus*, que possui grande quantidade de DNA, possivelmente o número ideal de bandas seja maior do que 100.

TABELA 6. Estimativas das distâncias genéticas (método Distância Euclidiana Quadrada) entre 16 genótipos de *Pinus*, baseadas em dados de RAPD.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1		32	28	30	34	33	24	38	31	41	49	32	41	36	33	48
2			32	32	32	33	36	56	35	37	37	32	39	36	45	56
3				34	32	27	28	36	37	35	37	38	33	30	25	48
4					36	37	30	44	31	37	41	44	45	44	39	44
5						23	28	54	29	33	45	36	35	34	45	52
6							27	45	32	36	40	37	34	35	38	45
7								38	27	33	41	38	35	32	31	42
8									37	31	39	52	41	46	23	40
9										20	36	31	34	31	30	43
10											28	33	22	29	34	45
11												27	20	31	40	41
12													33	30	43	40
13														27	40	49
14															33	44
15																35

Genótipos: 1, 2, 3 e 4 - *Pinus patula*
 5, 6 e 7 - *Pinus caribaea*
 8, 9 e 10 - *Pinus* de Tecun Umán procedência Napite
 11, 12 e 13 - *Pinus* de Tecun Umán procedência Rancho Nuevo
 14, 15 e 16 - *Pinus oocarpa*.

TABELA 7. Formação de grupos segundo o método aglomerativo de Tocher, usando Distância Euclidiana Quadrada.

Grupo	Indivíduos											
1	9	10	13	11	14	12	7	3	6	5	1	2
2	8	15										
3	16											
4	4											

Genótipos: 1, 2, 3 e 4 - *Pinus patula*
 5, 6 e 7 - *Pinus caribaea*
 8, 9 e 10 - *Pinus* de Tecun Umán procedência Napite
 11, 12 e 13 - *Pinus* de Teun Umán procedência Rancho Nuevo
 14, 15 e 16 - *Pinus oocarpa*.

Desta forma o estudo desses marcadores obtidos por RAPD é certamente mais seguro, pois o DNA é relativamente estável para amostrar o genoma de uma dada espécie, no entanto, a natureza de fragmentos amplificados não está ainda bem definida, permitindo sugerir que, muito provavelmente, muitos desses fragmentos possam conter seqüências repetidas de DNA, as quais não são codificadas (Devos e Gale, citados por Gonzales e Ferrer, 1993). Este fato pode comprometer o estudo taxonômico de espécies estreitamente relacionadas.

Provavelmente um estudo semelhante usando um grande número de primers poderá contribuir para se obter informações de marcadores de RAPD que se relacionem mais com caracteres fenotípicos, como já verificado em milho, onde a distância genética baseada em dados de RFLP, mostraram alta correlação com características de produção de grãos (Smith et al., 1990). Entretanto, deve ser enfatizado que o relacionamento genético estimado a partir de marcadores tem sido considerado mais preciso do que aquele determinado por meio de estudos genealógicos (Lee, 1995).

4.3 Distância genética entre o *Pinus* de Tecun Umán, *P. patula*, *P. oocarpa* e *P. caribaea* var. *hondurensis*

Até o momento tem-se que para alguns autores que utilizaram técnicas morfológicas e anatômicas (Aguilar, 1962; Stanley e Steymark, 1958; Mittak, 1977; Eguiluz-Piedra e Perry, 1983; Styles, 1985; Davide e Araújo, 1993 e Leão e Davide, 1993) para tentar resolver a questão da classificação taxonômica do *Pinus* de Tecun Umán, a categoria de subespécie do *P. patula*, lhe foi atribuída. Por outro lado, trabalhos utilizando técnicas anatômicas, morfológicas e bioquímicas de análise de terpenos (Eguiluz-Piedra e Perry, 1983) e marcadores de RAPD (Grattapaglia, O'Malley e Dvorak, 1992) têm demonstrado a proximidade deste táxon com o *P. oocarpa* e atribuem-lhe a categoria específica (*P. tecunumanii*).

Neste trabalho, dados citogenéticos e marcadores de DNA confirmam que o *Pinus* de Tecun Umán apresenta-se mais próximo do *P. oocarpa*. No entanto, percebe-se também que não existe uma distância muito grande entre estes dois taxa e o *P. patula*. Avaliando os resultados obtidos neste e nos outros trabalhos sobre a taxonomia do *Pinus* de Tecun Umán permanece ainda a dúvida sobre a sua posição como espécie (*P. tecunumanii*) ou como subespécie do *P. oocarpa*, uma vez que a distância entre eles é menor que a distância observada entre o *P. oocarpa* e o *P. patula* que pertencem a mesma subseção- *Oocarpae*.

5 CONCLUSÕES

- O padrão de bandas fluorescentes CMA da procedência Mountain Pine Ridge do *Pinus* de Tecun Umán apresentou-se mais semelhante ao *P. oocarpa*, seguido do *P. patula*.

- Com o estudo das similaridades genéticas obtidas através do método Simple Matching e das distâncias genéticas obtidas com o método de Distância Euclidiana Quadrada usando a técnica de RAPD, verificou-se maiores similaridades entre genótipos do *Pinus* de Tecun Umán e de *P. oocarpa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, J. I. **Pinos de Guatemala**. Ministério da Agricultura, 1962. 33p.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, L.; BRUSSE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1991. 242p.
- BARROS, L.M. **Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), tipos comum e anão precoce, por meio de técnicas multivariadas**. Piracicaba: ESALQ, 1991. 256p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- BEHL, R. K.; SINGH, V. P.; PARODA, R. S. Genetic divergence in relation to heterosis and specific combining in triticale. **Indian Journal Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v. 45, n. 2 p. 368-375, 1985.
- BORZAN, Z.; PAPES, D. Karyotype analysis in *Pinus*: a contribution to the standardization of the Karyotype analysis and review of some applied techniques. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 27, n. 3/4, p. 144-150, 1978.
- CALAMASSI, R. Characterization of some *Pinus halepensis* provenances based on needle anatomy and morphology. **Annales des Sciences Fôtieres**, Florence, v.43, n. 3, p.281-298, 1986.
- CARLSON, J.E.; TULSIERAM, L. K.; GLÄUBITZ, J. C.; LUK, V. W. K.; KAUFFELDT, C.; RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F₁ progeny of conifers. **Theoretical Applied Genetics**, Vienna, v.83, p.194-200, 1991.
- CÓDIGO INTERNACIONAL DE NOMENCLATURA BOTÂNICA**, 1978. Adotado pelo XII Congresso Internacional de Botânica de Leningrado (1975).
- CRUZ, C. D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1990. 188p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

- CRUZ, C. D.; REGASSI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1994. 390p.
- DAVIDE, L. C.; ARAÚJO, A. J. de. Características cromossômicas para a identificação de fenótipos diferentes em povoamentos de *Pinus oocarpa* Schiede. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 17, n. 3, p. 327-338, set-dez., 1993a.
- DAVIDE, L. C.; ARAÚJO, A. J. de. Características da madeira e das acículas como uma contribuição para a definição taxonômica do *Pinus* de Tecun Umán. **Revista Árvore**, Viçosa, v.17, n.3, p.358-368, set-dez., 1993b.
- DEVEY, M. E.; JERMSTAD, K. D.; TAUER, C. G.; NEALE, D. B. Inheritance of RFLP loci in a loblolly pine three-generation pedigree. **Theoretical Applied Genetics**, Vienna, v.83 p.238-242, 1991:
- DOUDRICK, R. L.; HESLOP- HARRISON, J. S.; NELSON, C. D.; SCNHIDT, T.; NANCE, W. L.; SCHWARZACHER, T. Karyotype of Slash Pine (*Pinus elliottii* var. *elliottii*) using patterns of fluorescence in situ hybridization and fluorochrome banding. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v.86, p.289-296, 1995.
- DVORAK, D. W. One year provenance progeny test results of *Pinus tecunumanii* from Guatemala established in Brazil and Colombia. **Commonwealth Forestry Review**, Oxford, v.64, n.1, p.657-667, 1985.
- EDWARDS, A. W. F.; CAVALLI-SFORZA, L. L. A method for cluster analysis. **Biometrics**, London, v.21, 362-375, March, 1965.
- EGUILUZ-PIEDRA, T.; PERRY, J. P. JR. *Pinus tecunumanii*: uma espécie nueva de Guatemala. **Ciencia Florestal**, Guatemala, v.8, n.41, p.3-22, jan-fev, 1983.
- FEDAK, G. Allozymes as aids to canadian barley cultivar identification. **Euphytica**, Wageningen, v. 23, p.166-173, 1974.
- GONZÁLES, J. M.; FERRER, E. Random amplified polymorphic DNA analysis in *Hordeum* species. **Genome**, Ottawa, v.36, p.1029-1031, 1993.
- GRATTAPAGLIA, D. ; CHAPARRO, J.; WILCOX, P.; McCORD, S.; WERNER, D. ; AMERSON, H.; McKEAND, S.; BRIDGWATER, F.; WHETTEN, R.; O' MALLEY, D. SEDEROFF, R. Mapping in woody plants with RAPD markers: application in forestry and horticulture. In: **Proceedings of the Symposium on Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**, Minneapolis CSSA/ASHS/AGA, p. 37-40, 1 november, 1992.
- GRATTAPAGLIA, D.; O' MALLEY, D. M.; DVORAK, W. Phylogenetic analysis of Central American and Mexican pines using RAPD markers on bulked DNA samples. **Proceedings of IUFRO International Conference "Breeding tropical trees"** Section 2.02- 08 Cali, Colombia, p.132-147, 1992.

- GROZA, H. ; KAHN, R. Use of isozyme patterns in Characterization of potato mutant lines selected for agronomic quantitative traits. *Euphytica*, Wageningen, v. 57, p.189-194, 1991.
- GUERRA, M. dos S.; NOGUEIRA, M. T. The cytotaxonomy of *Emilia* spp. (Asteraceae: Senecioneae) occurring in Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, Austria, v.170, p.229-236, 1990.
- HIZUME, M.; OHGIKU, A. and TANAKA, A. Chromosome banding in the genus *Pinus*. I. Identification of Chromosomes in *Pinus nigra* by fluorescent banding method. *The Botanycal Magazine of Tokyo*, Tokyo, v.102, p.25-36, 1989a.
- HIZUME, M.; OHGIKU, A.; TANAKA, A. Chromosome banding in the genus *Pinus*. II. Interspecific variation of fluorescent banding patterns in *Pinus densiflora* and *Pinus thunbergii*. *The Botanycal Magazine of Tokyo*, Tokyo, v.102, p.25-36, 1989b.
- HIZUME, M.;ARAI, M.;TANAKA, A. Chromosome banding in the genus *Pinus*. III. Fluorescente banding pattern of *P. luchuensis* and its relationships among the Japanese Diploxylon pines. *The Botanycal Magazine of Tokyo*, Tokyo, v.103, p.103-111, 1990.
- KÖENING, R.; GEPTS, P. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centres of genetics diversity. *Theoretical Applied Genetics*, Vienna, v.78, p.809-817, 1989.
- LEÃO, F. F. **Posição taxonômica do *Pinus* de Tecun Umán: análise das características de acículas.** Lavras, ESAL, 1992. 96p. (Dissertação Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas)
- LEÃO, F.F.; DAVIDE, L. C. **Posição taxonômica do *Pinus* de Tecun Umán: análise das características de acículas.** IPEF, Piracicaba, v.46, p.1-7, 1993.
- LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy*, New York, v.55, p.265-344, 1995.
- LITTLE, J. R.; CRITCHFIELD, W. B. **Subdivision of the genus *Pinus* (pine).** Washington, USDA. Forest Service, 1969. 51p. (Miscellaneous publication, 1144).
- MACPHERSON. P.; FILION, G. Karyotype analysis and the distribution of constitutive heterochromatin in five species of *Pinus*. *The Journal of Heredity*, Baltimore, v.72, n.3, p.193-198, May-June, 1981.
- MANCILLA, F.S.G.; TOMAZELLO FILHO, M. **Caracterização anatômica de acículas de espécies e variedades de *Pinus*.** IPEF, Piracicaba, v.28, p.49-56, dez., 1984.
- MARDIA, K. V.; KENT, J. T.; BIBBY, J.M. **Multivariate analysis.** London, Academic Press, 1979. 512p.

- MARTINEZ, M. **Los pinos mexicanos**. 2.ed. Ediciones Botas, Mexico, 1948. 361p.
- MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; OLIVER, J.L. Genetic analysis of isozyme loci in tetraploid potatoes (*Solanum tuberosum* L.). **Genetics**, Winconsin, v.108, n.3, p.669-679, Nov., 1985.
- McPHERSON, M.J.; QUIRKE, P.; TAYLOR, G.R. **PCR practical approach**. Oxford University Press. 1992. 253p.
- MITTAK, W. L. **Fortalecimento al setor florestal, estudos para la reforestacion nacional**. Guatemala, FAO, 1977. 64p. (FAO/FO:DP/GUA/72/006. Documento de Trabajo, 25).
- MIRANDA, J. E. C.; CRUZ, C. D. ; COSTA, C. P. Predição do comportamento de híbridos de pimentão (*Capsicum annum* L.) pela divergência genética dos progenitores. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 11, p.929-937, 1988.
- MORAIS, O. P. **Análise multivariada da divergência genética dos progenitores, índices de seleção e seleção combinada numa população de arroz oriunda de intercruzamentos, usando macho-esterilidade**. Viçosa: UFV, 1992. 251p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento).
- MORGANTE, M.; VENDRAMIN, G.G.; GIANNINI, R. Inheritance and linkage relationships of variants of *Pinus leucodermis* Ant. **Silvae Genetica**; Frankfurt, v.42, n.4/5, p.231-236, 1993.
- NATARAJAN, A.T.; OHBA, K.; SIMAK, M. Karyotypes analysis in *Pinus sylvestris*. **Hereditas**, Lund-Sweden, v.47, p.379-382, 1961.
- NEALE, D. B.; WILLIAMS, C. G. Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and application to forest genetics and tree improvement. **Canadian Journal Forestry Resource**, Ottawa, v.21, p.5545-5554, 1991.
- NELSON, C. D.; KUBISIAK, T. L.; NANCE, W. L. A genetic linkage map of Longleaf Pine (*Pinus palustris* Mill.) based on random amplified polymorphic DNAs. **Journal of Heredity**, Baltimore, v. 85, p.433-439, 1994.
- NELSON, C. D. ; NANCE, W. L.; DOUDRICK, R. L. A partial genetic linkage map of slash pine *Pinus elliottii* Elgelm. var. *elliottii* based on random amplified polymorphic DNAs. **Theoretical Applied Genetics**, Vienna, v.87, p.145-151, 1993.
- PEDERICK, L. A. Chromosome relationship between *Pinus* species. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.19, p.171-180, 1970.

- PEIXOTO, T. C.; DA SILVA, J. G.; BARRETO, J. N. Técnicas de análises de interação genótipo por ambientes e estabilidade de clones de cana-de-açúcar. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 3, Piracicaba, 1986. **Anais...** Piracicaba, Copersucar, 1986. p.11-21.
- PUNIA, M. S.; HOODA, R. S.; PARODA, R. S. Discriminant function analysis for cane-yield attributes in sugarcane. **Indian Journal Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v.52, n.10, p.643-645, 1982.
- QUILLET, M.C.; VEAR., F.; BRANLARD, G. The use of isozyme polymorphism for identification of sunflower (*Helianthus annuus*) inbred lines. **Journal of Genetics & Breeding**, Rome, v. 46, p.295-304, 1992.
- RAO, C. R. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York, John Wiley & Sons, 1952. 390p.
- RAO, A. V.; PRASAD, A. S. R.; SAIKRISHNA, T.; SESHU, D. V.; SRINIVASAN, T. E. Genetic divergence among some brown plant thopper resistant rice varieties. **Indian Journal Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v. 41, p. 179-185, 1981.
- RAVEEDRAN, T. S.; COMSTOCK, R. E.; HARVEY, P. H. Genotypic and phenotypic correlations in corn and their implications in selection. **Agronomy Journal**, Madison, v.43, p.282-287, 1951.
- ROHLF, F. J. **Numerical Taxonomy and multivariate Analysis System**. New York version 1.70, Fev. 1992, 470p.
- ROJO, J. P. On the correct scientific name of the Benguet pine. **Sylvatrop**, Laguna, v. 3, n. 1, p.31-35, 1978.
- SALAZAR, R. Genetic variation in needles of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Barr. et Golf. from natural Stands. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.32, n.1/2, p.52-59, 1983.
- SANTOS, J. B. dos; NIENHUIS, J.; SCKROCH, P. SLOCUM, M. K. Comparison of RAPD and genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleraceae* L. genotypes. **Theoretical Applied Genetics**, Vienna, v.87, n.8, p.909-915, March., 1994.
- SAX, K. ; SAX, H. J. Chromosome number and morphology in the conifers. **Journal of the Arnold Arboretum**, Cambridge v.14, p.357-3754, 1933.
- SAYLOR, L. C. A karyotype analysis of selected species of *Pinus*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.10, p.77-84, 1961.

- SAYLOR, L. C. Karyotype analysis of *Pinus*- group Lariciones. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 13, p.165-170, 1964.
- SAYLOR, L. C. Karyotype analysis of the genus *Pinus*- Subgenus *Pinus*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 16, p.155-163, Jul., 1972.
- SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, Berlim, v.58, p.307-324, 1976.
- SCHWERDTFERGER, F. Informe al gobierno de Guatemala sobre la entomologia florestal de Guatemala. Informe FAO, 202. Los Pinos de Guatemala. Rome . ETAP. , 1953, v. 1, 58p.
- SHILLITO, R.D.; SAUL, M.W. Protoplast isolation and transformation. In: **Plant Molecular Biology - a practical approach**. New York - IRL Press, 1988, 181p.
- SKROCH, P. W.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. **Proceedings of IUFRO International Conference. "Breeding tropical trees"**Section 202-08, Cali, Colombia, p. 26-30, 1992.
- SKROCH, P.W.; SANTOS, J.B. dos; NIENHUIS, J. Genetic relationship among *Phaeolus vulgaris* genotypes based on RAPD marker data. **Bean Improvement Cooperative**, Madison, n.35, p.23-24, March 1992.
- SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification**. San Francisco, W. H. Freeman, 1973. 513p.
- SMITH, O.S.; SMITH, J.S.C.; BOWEN, S.L.; TENBORG, R.A. and WALL, S.J. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F₁ grain yield, grain yield, heterosis and RFLPs. **Theoretical Applied Genetics**, Vienna, v.80, p.833-840, 1990.
- STANLEY, B. T.; STEYERMARK, J. A. Flora of Guatemala. **Fieldiana. Botany**, Chicago, v. 24, n.1, p.40-56, 1958.
- STEAD, J. W. A study of variation and taxonomy of the *Pinus pseudostrobus* complex. **Commonwealth Forestry Review**, Oxford, v. 62, n. 1, p.25-35, 1983.
- SOARES, L. **Melhoramento de batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Brancroft): divergência genética entre clones com base em procedimentos multivariados e estimativas de parâmetros genéticos**. Viçosa: UFV, 1991. 75p. (Dissertação Mestrado em Genética e Melhoramento).
- STYLES, B.T. The identity of Schwerdtferger's Central American pine. **Forest Genetic Resources Information**, Rome, n.13, p.47-51, 1985.

to be used in the future. The
Office of the Secretary of State

American
the

SECRET
OFFICE OF THE SECRETARY OF STATE

London, 1950

Department of State

SECRET

Office of the Secretary of State

Department of State

SECRET

to be used in the future. The
Office of the Secretary of State

SECRET

to be used in the future. The
Office of the Secretary of State

SECRET

to be used in the future. The
Office of the Secretary of State

SECRET

to be used in the future. The
Office of the Secretary of State

SECRET

to be used in the future. The
Office of the Secretary of State

SECRET

to be used in the future. The
Office of the Secretary of State

SECRET

to be used in the future. The
Office of the Secretary of State

SECRET

to be used in the future. The
Office of the Secretary of State

SECRET

to be used in the future. The
Office of the Secretary of State

SECRET

- STYLES, B.T.; Mc VAUGH, R. A mexican pine promoted to specific status: *Pinus pratermissa*. **Contributions from the University of Michigan Herbarium, Oxford**, v.17, p.207-212, 1990.
- SWANSON, C.P. **Cytology and cytogenetics**. MacMillan: London, 1960. 596p.
- STRAUSS, S. H.; DOERKSEN, A. H. Restriction fragment analysis of pine phylogeny. **Evolution**, Lawrence, v. 44, n. 4, p.1081-1096, July, 1990.
- STRAUSS, S.H.; LANDE, R.; NAMKOOG, G. Limitations of molecular- marker- aided selection in forest tree breeding. **Canadian Journal Forest Resources**, Ottawa, v.22, p.1050-1061, 1992.
- SUGIYARTO, E; SOEMARTONO, D.; MANGOENDIDJOJO, W. Yield stability analysis in sugarcane cultivar trial. **Agriculture Science**, v. 3, n. 8, p.315-322, 1984.
- THORMANN, R.; STEPHAN, B.R. Interpretation of isozyme patterns of amlate dehydrogenase in scots pine using two different methods. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.42, n.1, p.5-8, March. 1993.
- TULSIERAM, L.K.; GLAUBITZ, J.C.; KISS, G.; CARLSON, J.E. Single tree genetic linkage mapping in conifers using haploid DNA from megagametophytes. **Biotechnology**, Ithaca, v.10, June, 1992.
- VIANA, N. S. **Divergência genética, estabilidade e adaptabilidade de clones de cana-de-açúcar (*Sacharum* spp.)**. Viçosa: UFV, 1990. 108p. (Dissertação Mestrado em Genética e Melhoramento).
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Resources**, Oxford, v.19, p.303-306, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. DNA polymorphisms amplified as arbitrary are useful genetics markers. **Nucleic Acids Resources**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WRIGHT, J. A. OSORIO, L. F. Results of provenance and family within provenance trials of *Pinus tecunumanni* in Colombia, South America. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.55, p.107-116, 1992.
- ZOBEL, B. J. Variation in specific gravity and tracheid length species of Mexican pine. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.14, n.1, p.1-12, 1965.

SECRET

SECRET

BIBLIOTECA CENTRAL - UFLA



[Faint, illegible markings or ghosting of text, possibly bleed-through from the reverse side of the page]

