

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONOMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÃO SELECIONADA E TESTE
DE PATERNIDADE DE UMA PROGÊNIE DE POLINIZAÇÃO ABERTA DE
Eucalyptus grandis Hill ex Maiden**

LEANDRO DE SIQUEIRA

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, como parte dos requerimentos para obtenção do título de Mestre em Ciência Florestal.

BOTUCATU – SP
Outubro de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONOMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÃO SELECIONADA E TESTE
DE PATERNIDADE DE UMA PROGÊNIE DE POLINIZAÇÃO ABERTA DE
Eucalyptus grandis Hill ex Maiden**

LEANDRO DE SIQUEIRA

Orientador: Prof. Dr. Edson Seizo Mori

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, como parte dos requerimentos para obtenção do título de Mestre em Ciência Florestal.

BOTUCATU – SP
Outubro de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S619v Siqueira, Leandro de , 1979-
Variabilidade genética de população selecionada e teste de paternidade de uma progênie de polinização aberta de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden / Leandro de Siqueira.
- Botucatu : [s.n.], 2009.
vi, 40 f., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2009

Orientador: Edson Seizo Mori

Inclui bibliografia

1. *Eucalyptus grandis*. 2. Variabilidade genética. 3. Fluxo gênico. 4. Teste de paternidade. I. Mori, Edson Seizo. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÃO SELECIONADA E
TESTE DE PATERNIDADE DE UMA PROGÊNIE DE POLINIZAÇÃO
ABERTA DE *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden"

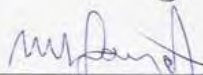
ALUNO: LEANDRO DE SIQUEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON SEIZO MORI

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. EDSON SEIZO MORI



PROF. DR. MAURÍCIO DUTRA ZANOTTO



PROD. DR. LÉO ZIMBACK

Data da Realização: 02 de outubro de 2009.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Leandro de Siqueira, filho de Carlos Irineu de Siqueira e Maria Helena de Siqueira, nasceu na cidade de Governador Valadares, estado de Minas Gerais, no dia 09 de Abril de 1979.

Diplomou-se em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Viçosa, em 2002.

Em março de 2007 iniciou-se o curso de Mestrado em Ciência Florestal na Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu, obtendo o título de Mestre em Outubro de 2009.

*À equipe de
melhoramento
genético da Suzano
Papel e Celulose,
pela lealdade e
apoio em todos os
momentos...*

Dedico

*Ao grande mestre
Professor Edson
Mori, pelo apoio,
dedicação e
paciência.*

Ofereço

AGRADECIMENTO

A Deus, meu grande amigo.

Aos meus Pais, que me proporcionaram o bem mais preciso na vida do Homem, a educação.

Aos meus irmãos Winy e Jordan pelo amor e amizade.

As minhas sobrinhas Bianca e Clara, fonte de alegria da família.

À Suzano Papel e Celulose, por essa grande oportunidade de realização profissional.

Ao amigo e mentor João Flávio da Silva pela valiosa orientação dedicada.

Ao amigo e conselheiro Eduardo Mello pelo apoio incondicional para realização desse trabalho.

Ao amigo Shinitiro Oda, historia viva do melhoramento genético e biotecnologia do eucalipto.

A todos os professores e colegas do curso de pós-graduação pela amizade e companheirismo durante as aulas e visitas técnicas.

A Daniela por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, principalmente os mais complicados.

Aos amigos de trabalho Edson Diniz, Fábio, Valter, Hamilton, Sergio Bentivenha, Gava, Atus, Ivan, Antônio Flores, Hélcio, Antônio Libério (Gavi), Milton e Eliza, agradecimento pelas recomendações, sugestões e apoio na instalação e coleta de dados.

Ao amigo Joel Madella que diagnosticou a ferrugem que desencadeou todo esse trabalho.

A todos os companheiros do Departamento de Tecnologia Florestal da Suzano Papel e Celulose.

À Lilian e Airã, secretárias do departamento de Tecnologia Florestal, pela presteza e amizade.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para realização deste trabalho, cujos nomes foram omitidos.

Meus Sinceros Agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	5
SUMMARY.....	6
1 INTRODUÇÃO.....	7
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 O Brasil Florestal.....	9
2.2 O <i>Eucalyptus grandis</i>	10
2.3 Variabilidade Genética.....	12
2.3.1 Variabilidade em populações de espécies florestais.....	13
2.3.2.1 Marcadores Moleculares.....	14
2.4 Sistemas reprodutivos e constituição genotípica das plantas.....	15
2.4.1 Sistema Reprodutivo de Espécies Florestais.....	16
2.4.2 Fecundação Cruzada em Espécies Florestais.....	17
3 MATERIAL E METODOS.....	19
3.1 Material.....	19
3.1.1 Pomar de Semente Clonal.....	19
3.1.2 Progênies de Meios Irmãos.....	20
3.2 Métodos.....	20
3.2.1 Extração de DNA e genotipagem dos microssatélites em sequenciador.....	20
3.2.2 Análise genético-biométrica.....	21
3.2.2.1 Variabilidade Genética.....	21
3.2.2.1.1 Frequência Gênicas.....	21
3.2.2.2 Sistema Reprodutivo.....	23
3.2.2.3 Identidade Genética para Teste de Paternidade.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Variabilidade Genética.....	25
4.1.1 Frequência Gênica.....	25
4.1.2 Número de Alelos observados e Número de Alelos Eféticos.....	26
4.1.3 Teste de Qui-quadrado.....	27
4.1.4 Quantidade de Heterozigose e Endogamia.....	27
4.1.5 Taxa Aparente de Cruzamentos da População Seleccionada.....	28
4.1.6 Distância Genética.....	29
4.2 Paternidade.....	29
5 CONCLUSÕES.....	33
6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	34
APENDICE.....	38

RESUMO

A espécie *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden é atualmente a mais comumente cultivada em projetos comerciais no Brasil devido as excelentes características de qualidade da madeira e o alto incremento volumétrico de madeira, a espécie é plantada como cultivar e também na forma de plantios clonais de seus híbridos interespecíficos.

O presente trabalho é um estudo da variabilidade genética de uma população selecionada de *Eucalyptus grandis* que formam um pomar de sementes clonal originário de Coff's Harbour – Austrália, Rio Claro e Zimbabwe. Este pomar, de propriedade da empresa Suzano Papel e Celulose S.A., encontra-se estabelecido na Fazenda Santa Eliza, no Município de São Miguel Arcanjo no Estado de São Paulo. Tem também como objetivo analisar um teste de paternidade de uma progênie de polinização aberta de *Eucalyptus grandis*, cuja a mãe é um dos clones componentes do pomar de sementes citado anteriormente.

Os objetivos principais do trabalho foram estudar (i) a variabilidade genética dentro de uma população selecionada de *Eucalyptus grandis*, por meio de marcadores moleculares microssatélites; (ii) o sistema reprodutivo de uma área de recombinação de genótipos superiores (Pomar de Sementes Clonal) e de entrada de fluxo gênico; (iii) a paternidade de uma progênie superior de *Eucalyptus grandis* de programa de melhoramento.

Os resultados mostraram que a população selecionada apresentou um grande polimorfismo de alelos ($n_a = 12$) e grandes distâncias genéticas entre os indivíduos selecionados mostrando alta variabilidade genética; que existe uma pequena taxa de endogamia na população selecionada (6,24%) devida a quantidade de heterozigose observada ($H_o = 0,7927$) ter sido menor que a esperada ($H_e = 0,8455$), e que a população selecionada de *Eucalyptus grandis* apresentou um sistema reprodutivo intermediário com forte tendência a alogamia (88,2%).

Palavras-chave: *Eucalyptus grandis*, variabilidade genética, fluxo gênico, teste de paternidade.

GENETIC VARIABILITY OF SELECTED POPULATION AND PATERNITY TEST OF A *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden OPEN POLLINATED PROGENY.

2009. 40p. Dissertation (Master Degree in Forestry Science) School of Agronomic Sciences (FCA) – São Paulo State University (UNESP)

Author: Leandro de Siqueira

Adviser: Edson Seizo Mori

SUMMARY

The species *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden is the most commonly cultivated in commercial plantings in Brazil due to its excellent wood quality characteristics and the high wood volume increment. The species is planted as a cultivar and also by clonal plantings of its interspecific hybrids. The research is a study of the genetic diversity of a *Eucalyptus grandis* selected population originated from Coff's Harbour – Australia, Rio Claro – Brazil, and Zimbabwe, set up as a clonal seed orchard. The orchard is of Suzano Papel e Celulose private company, located on Santa Elisa Experimental Station, in São Miguel Arcanjo County, S.P., Brazil. It has also as objective to analyze a paternity test of an open pollinated progeny of *Eucalyptus grandis*, which mother clone is part of the orchard. The objectives of this research were to study (i) the genetic variability within the one selected population of *Eucalyptus grandis*, by microsatellite molecular markers; (ii) the mating system of recombination area of superior genotypes (Clonal Seed Orchard) and gene flow; and (iii) the paternity of a superior progeny of *Eucalyptus grandis* breeding program. The results have shown that the selected population presented a high polymorphism of alleles ($n_a = 12$) and large genetic distances between selected individuals showing high genetic variability. There is a small inbreeding rate into the selected population (6.24%) because of the observed heterozygosity ($H_o = 0.7927$) to be lower than the expected ($H_e = 0.8455$). The selected *Eucalyptus grandis* population presented to have an intermediate mating system with high tendency of alogamy.

Key words: *Eucalyptus grandis*, genetic variability, gene flow, paternity test.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é reconhecido não somente como um dos principais países em termos de área de plantações florestais com espécies de eucalipto, ou como grande produtor e exportado de papel e celulose, mas como grande detentor de elevado nível científico-tecnológico nas diversas áreas da eucaliptocultura, isso graças às pesquisas avançadas realizadas nas Empresas Florestais, Institutos de Pesquisas e sobretudo nas Universidades.

As áreas de conhecimento são inúmeras, mas cabe aqui destacar às áreas de melhoramento genético, proporcionando o domínio das técnicas de propagação vegetativa e da obtenção de híbridos, fisiologia vegetal, solos e nutrição florestal, desenvolvimento silvicultural, planejamento silvicultural e da tecnologia da madeira ampliando as possibilidades da utilização da madeira das árvores de eucaliptos.

A cultura do eucalipto apresenta várias vantagens que a torna importante no reflorestamento comercial, como o seu rápido crescimento, a diversidade inerente ao gênero, adaptabilidade, alta produtividade e baixo custo. O melhoramento genético, dessa cultura permitiu o aumento da produtividade num menor período de tempo, levando à obtenção de espécies ou linhagens geneticamente puras (INSTITUTO DE PESQUISA E ESTUDOS FLORESTAIS – IPEF, 2005), exploração do vigor híbrido como resultado de cruzamentos interespecíficos e a seleção de árvores de características silviculturais superiores (BERTOLUCCI et al., 1995).

Segundo Bueno (2001), a diversidade genética das espécies é uma importante forma de manter a capacidade natural de responder às mudanças climáticas e a todos os tipos de estresses bióticos e abióticos. Na atualidade existe grande preocupação em avaliar a biodiversidade em razão da perda acentuada da diversidade genética, sobretudo devido à ação do homem, substituindo variedades locais por variedades modernas, híbridos e, mais recentemente clones, de forma que grandes extensões de área são ocupadas por uma ou poucas variedades ou material de base genéticas estreita.

De maneira geral, são definidas duas medidas da diversidade. Uma é a variabilidade genética, que expressa as diferenças entre indivíduos de uma mesma espécie ou de espécie diferente que resulta na biodiversidade. A outra é inerente a uma população, geralmente em equilíbrio de Hardy-Weinberg e tratada como variância genotípica. A variância genotípica, além de expressar a diversidade entre indivíduos de uma população, pode ser tratada com contexto biométrico e subdividida em causas de variação (aditiva, dominante e epistática) importantes para estabelecimento de estratégia de seleção (CRUZ, 2005).

A estrutura genética de uma população alógama deve ser entendida considerando-se que cada loco pode ter a alternativa de ser homozigoto ou heterozigoto, combinando-se com os demais de todas as maneiras possíveis. Assim, a distribuição da composição genética numa população, considerando a frequência dos indivíduos, é binomial. Nesse tipo de distribuição, a frequência mais alta corresponde à frequência dos indivíduos que têm a metade dos locos em homozigose e a outra metade em heterozigose. O equilíbrio de Hardy-Weinberg, referente a populações panmíticas, não é alterado a não ser que ocorram fatores como mutação, migração ou redução do tamanho da população (BUENO, 2001).

O estudo aqui proposto pretende relatar a variabilidade genética de uma população selecionada, no caso um Pomar de sementes clonal e analisar testes de paternidades de uma progênie de população aberta de *Eucalyptus grandis*.

Portanto o presente trabalho teve por objetivo estudar:

- a. A variabilidade genética dentro de uma população selecionada de *Eucalyptus grandis*, por meio de marcadores moleculares microssatélites;
- b. O sistema reprodutivo de uma área de recombinação de genótipos superiores (Pomar de Sementes Clonal) e de entrada de fluxo gênico;
- c. A paternidade de uma progênie superior de *Eucalyptus grandis* de programa de melhoramento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Brasil Florestal

O Brasil possui área total absoluta de 851 milhões de hectares. Desse total, 477,7 milhões correspondem a florestas naturais e 6,6 milhões a florestas plantadas. Estas ocupam apenas 0,77% do território nacional e 1% do solo agropecuário. O País conta, ainda, com 61,8 milhões de hectares de unidades de conservação federais sob regime de proteção integral (45,5%) e de uso sustentável (54,5%) (ABRAF, 2006 e ABRAF, 2009).

A área de plantações existentes corresponde a aproximadamente 6,6 milhões de hectares, sendo 4,2 milhões de hectares com eucalipto, 1,8 milhão de hectares com pinus e 456 mil hectares com outras espécies, como acácia-negra, gmelina, pópulus, seringueira, teca e araucária (ABRAF, 2009).

O valor total da produção do setor de base florestal em 2005 foi de US\$27.8 bilhões, ou seja, 3.5% do PIB nacional. Nesse valor estão incluídos celulose, papel, madeira industrializada sob todos os processos, móveis, siderurgia a carvão vegetal e produtos florestais não madeireiros (ABRAF, 2006).

O segmento de celulose e papel é composto por 220 empresas localizadas em 450 municípios, em 16 estados e utiliza madeira exclusivamente de florestas plantadas. A área plantada em 2008 era de 1,62 milhão de hectares de eucalipto e pinus e 18 mil hectares de outras espécies, com uma área de preservação permanente e de reserva legal

de 2,6 milhões ha. A produção de celulose alcançou 12,8 milhões de toneladas e a de papel, 9,19 milhões de toneladas (ABRAF, 2006 e ABRAF, 2009).

A crise mundial que assolou o mundo em 2008, expôs o setor a reduções de vendas internas e externas de celulose, aço e de consumo de painéis de madeira reconstituída e de móveis, levando a adiamentos e até mesmo a suspensão de vários investimentos, desde viveiros de mudas e grandes aquisições de novas áreas destinadas a florestas, até grandes empreendimentos em novas plantas industriais em vários estados do país, com os naturais desdobramentos na readequação de quadros de pessoal próprio e terceirizado das empresas. (ABRAF, 2009).

2.2 O *Eucalyptus grandis*

O gênero *Eucalyptus* é originário da Austrália, um país de dimensões continentais e uma enorme diversidade de clima e solo. Em função da variação ambiental e do isolamento geográfico, originou-se uma grande diversidade genética que culminou com a separação de inúmeras espécies de acordo com o conceito tipológico (MAYR, 1977), uma vez que na maioria dos casos não ocorre isolamento reprodutivo entre elas, o que facilita o trabalho de melhoramento. Além do mais, devido à necessidade de adaptação aos diferentes nichos ecológicos existentes na Austrália, houve a formação de subpopulações dentro de uma mesma espécie, também denominadas procedências. Por esse motivo é que, dentro de uma mesma espécie de eucalipto, são encontradas procedências com diferenças em várias características de importância econômica, como taxa de crescimento, formato do tronco, resistência a geadas, à seca, aos insetos, aos fungos, tolerância à salinidade, à alcalinidade, à acidez e ao alagamento do solo (ELDRIDGE et al., 1993). Assim, na introdução do eucalipto em uma região nova, a avaliação de espécies e procedências é fundamental para se iniciar um programa de melhoramento.

O *Eucalyptus grandis* ocorre naturalmente na Austrália, ao norte do Estado de New South Wales, ao sul de Queensland (próximo a região costeira e na parte central), e ao norte de Queensland em área de altitude (300 a 900 m). A precipitação pluviométrica varia de 1.000 a 1.700 mm, predominantemente no verão. Estação seca não ultrapassando 3 meses. Geadas ocasionais nas regiões mais interiores da área de ocorrência natural. Temperatura média das máximas do mês mais quente compreendida entre 29 a 32°C, e a média das mínimas do mês mais frio entre 5 a 6°C (FERREIRA, 1980).

A madeira de *Eucalyptus grandis* é leve e fácil de ser trabalhada. Utilizada intensivamente, na Austrália e na República Sul Africana, com madeira de construção, quando oriunda de plantações de ciclo longo. A madeira produzida em ciclos curtos é utilizada para caixotaria. Normalmente a madeira oriunda de árvores com rápido crescimento, apresenta problemas de empenamento, contrações e rachaduras quando do desdobro. Plantações, convenientemente manejadas, podem produzir madeira excelente para serraria e laminação. É a principal fonte de matéria prima para celulose e papel do Estado de São Paulo (FERREIRA, 1980).

Nos estudos efetuados pela Ex Cia. Paulista de Estradas de Ferro, a espécie no horto de Guarani, aos 7 anos, espaçamento 2 x 2 m, sementes colhidas em Rio Claro, apresentou rendimento volumétrico em torno de 130,0 estéreos/há, enquanto que, nas mesmas condições, o *E. saligna* rendeu 161,7 estéreos/há. Tanto o *E. saligna* como o *E. grandis* apresentaram alta porcentagem de falhas (52,9% para o *E. saligna* e 72,4% para o *E. grandis*). No Horto de Aimorés (Bauru), aos 6 anos, espaçamento 2,0 x 2,0m, em solo arenito de Botucatu, vegetação típica de cerrado, os resultados foram: *E. grandis* – 273,0 estéreos/ha para 25,2% de falhas; *E. saligna* – 254,0 estéreos/ha para 27,6% de falhas. Esses resultados conflitantes demonstravam que o problema de saúva, dos cupins, da ausência de fertilização e da procedência das sementes, poderiam ser fatores altamente importantes no rendimento volumétrico das espécies (FERREIRA, 1980).

Considera-se, atualmente, como muito importante para o Estado de São Paulo, o *E. saligna*, especialmente quando as plantações são estabelecidas com sementes produzidas pelo convênio FEPASA/ESALQ, nas localidades de Mairinque e Itatinga. No caso do *E. grandis*, que conjuntamente com o *E. saligna* são as espécies mais importantes do Estado, existem sementes, em escala comercial, produzida em talhões produtores de sementes na localidade de Mogi-Guaçu (Champion Celulose e Papel S.A.). Esses talhões foram originalmente estabelecidos com sementes importadas da Austrália, do Estado de New South Wales, da localidade Coff's Harbour. Considera-se, atualmente, que a utilização de sementes de procedências conhecidas, produzidas por entidades idôneas, aliada às boas técnicas de produção de mudas e implantação, poderá elevar a produtividade média das nossas plantações de 20 estéreos/ha/ano, para 30 a 40 estéreos/ha/ano (FERREIRA, 1980).

O *Eucalyptus grandis* ocorre em diversos tipos de solo, mas geralmente ocupa solos com fertilidade moderada, em vales menos declivosos, nas adjacências das florestas tropicais úmidas. Entretanto, o *Eucalyptus grandis*, pode também ocupar lugares declivosos (ELDRIDGE et al., 2001).

O *Eucalyptus grandis* é uma árvore alta, variando entre 20 a 40 m, podendo chegar a mais de 75 m de altura. Seu tronco é retilíneo, com casca pulverulenta, desprendendo-se em tiras longas deixando aparecer em baixo uma superfície lisa branca, acinzentada, esverdeada ou salmão. Sua ramagem é longa e robusta, formando copa aberta ou alongada (ELDRIDGE et al., 2001; LORENZI et al., 2003).

As folhas do *Eucalyptus grandis*, quando juvenis são opostas, depois alternas oval-lanceoladas pecioladas, e quando adultas, são lanceoladas falcadas, verde-escuras, brilhantes, com ápice agudo e margens levemente onduladas, com 10 a 20 cm de comprimento e pecíolos de 2 a 3cm (LORENZI et al., 2003).

As flores, de 6 a 12, brancas, ocorrem em inflorescências do tipo umbelas axilares, com pedúnculo achatado. Seus botões são sésseis, piriformes, com opérculo ligeiramente apiculado. Os frutos são cápsulas piriformes, geralmente verde-azulados, deiscentes, com valvas encurvadas de aproximadamente 7 mm de diâmetro, com sementes pequenas e marrons (LORENZI et al., 2003).

MORA & GARCIA (2000) relatam que o *Eucalyptus grandis* supera qualquer outra espécie de *Eucalyptus* pelo incremento volumétrico, em condições ambientais adequadas, sendo a espécie do gênero mais plantada no Brasil, e também pela sua plasticidade genética, muito utilizada na obtenção de híbridos e na clonagem de árvores selecionadas.

2.3 Variabilidade Genética

Estudos sobre diversidade genética e o nível de diferenciação genética entre as populações das espécies são essenciais para definir os estoques genéticos e subsidiar políticas de exploração e manejo desses recursos, bem como para traçar estratégias de conservação em escalas regional e geográfica (BUENO, 2001).

A diversidade genética das espécies é uma importante forma de manter a capacidade natural de responder às mudanças climáticas e a todos os tipos de estresses bióticos e abióticos. Na atualidade existe grande preocupação em avaliar a biodiversidade em razão da perda acentuada da diversidade genética, sobretudo devido à ação do homem, substituindo variedades locais por variedades modernas, híbridos e, mais recentemente clones, de forma que grandes extensões de área são ocupadas por uma ou poucas variedades ou material de base genéticas estreita. A perda dessa diversidade provavelmente diminuirá a capacidade dos organismos em responder às mudanças ambientais e eliminará também informações biológicas potencialmente úteis

aos homens, como diversidade genética de espécies cultivadas e valiosos compostos bioquímicos ainda nem conhecidos (BUENO, 2001).

Programas de melhoramento responsáveis pelo desenvolvimento de variedades superiores, que são a base da agrosilvicultura moderna, são considerados a maior causa da erosão genética. Assim na busca de genótipos cada vez mais eficientes há muitos desafios na área de conservação que necessitam ser enfrentados e superados. O melhorista deve ver a variabilidade genética como fator indispensável à obtenção de ganhos genéticos, e suas técnicas devem ser direcionadas para o desenvolvimento de materiais genéticos superiores, mas com o comprometimento de que a recuperação e manutenção de populações de espécies ameaçadas de extinção sejam também metas prioritárias, para a própria sobrevivência da humanidade (CRUZ, 2005).

De maneira geral, são definidas duas medidas da diversidade. Uma é a variabilidade genética, que expressa as diferenças entre indivíduos de uma mesma espécie ou de espécie diferente que resulta na biodiversidade. A outra é inerente a uma população, geralmente em equilíbrio de Hardy-Weinberg e tratada como variância genotípica. A variância genotípica, além de expressar a diversidade entre indivíduos de uma população, pode ser tratada no contexto biométrico e subdividida em causas de variação (aditiva, dominante e epistática) importantes para estabelecimento de estratégia de seleção. Geralmente, a variância genotípica pode ser entendida e modelada como resultado de fatores intrínsecos da população, como a sua frequência gênica, e da ação gênica sobre o caráter estudado (CRUZ, 2005).

2.3.1 Variabilidade em populações de espécies florestais

Em programas de seleção recorrente no melhoramento florestal, a formação de progênes em sistemas de polinização livre, pode possibilitar o aparecimento de problemas como a endogamia ocasionada por polinização preferencial ou autofecundação, assim como outros fatores que permitem a redução da variabilidade, trazendo prejuízos em gerações avançadas de melhoramento (RUDIN, 1976).

O problema da manutenção da variação genética em populações pequenas pode ser dividido em duas preocupações gerais: i) o efeito da variação de perdas de alelos no processo evolutivo das populações; ii) e o efeito da endogamia, cruzamentos e heterose nos indivíduos. Ambas são afetadas pelo número efetivo populacional (N_e) e são dependentes da taxa de dispersão, intervalo e sistema de cruzamento (AMOS & HOELZEL, 1992). Segundo os autores, se uma população tem seu tamanho

substancialmente reduzido, é importante estimar as perdas de variância genética no tempo e sua subsequente taxa de reestabelecimento.

Segundo HAMRICK (1989), citado por MORI (1993), as medidas mais comumente utilizadas no estudo da variabilidade de uma população são as estimativas dos parâmetros: percentagem de locos polimórficos, número de alelos por locos e quantidade de heterozigose média.

ROTHE (1991) enfatizou que estudos de frequência de isoenzimas podem ser utilizados para se quantificar tanto a variabilidade genética dentro de uma população, como entre populações e, também, para se inferir sobre os possíveis fatores envolvidos na variabilidade observada.

As diferenças genéticas entre os indivíduos podem ser caracterizadas através de marcadores genéticos, ou seja, através de características morfológicas, de processos bioquímicos e metabólicos, e também através de fragmentos de DNA. Os marcadores genéticos mais utilizados em plantas são os morfológicos, citológicos, bioquímicos e moleculares (BORÉM, 1997).

Dentre os marcadores moleculares, os mais utilizados são as isoenzimas, RFLPs (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), RAPDs (fragmentos de polimórficos de DNA amplificado randomicamente), microssatélites e AFLPs (fragmentos amplificados de comprimentos polimórficos) (STRAUSS, 1992; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Alem de servir ao propósito de identificação para certificação clonal, os marcadores moleculares são extremamente úteis para analisar a estrutura da diversidade genética, estimar as taxas de cruzamentos, endogamia e autofecundação em populações naturais ou em plantios comerciais (BARIL ET AL., 1997; GAIOTTO ET AL., 1997; LEITE ET AL., 1997). Também podem ser empregados nos estudos de linhagens para comparação de similaridade genética e planejar cruzamentos nos programas de melhoramento (COSTA E SILVA & GRATTAPAGLIA, 1997).

2.3.2.1. Marcadores Moleculares

De acordo com GUIMARÃES E MOREIRA (1999), como os marcadores moleculares possibilitam análises genéticas mais detalhadas, eles podem ser utilizados no melhoramento genético de plantas, por exemplo: em programas de introgressão de genes por retrocruzamento; na detecção e no mapeamento de QLTs (*Quantitative Trait Loci*); na avaliação da diversidade genética com aplicações filogenéticas e evolutivas; no mapeamento genético, na clonagem de genes; e na caracterização de variedades,

linhagens ou híbridos por meio de marcadores de DNA na proteção do direito intelectual do melhorista, nos países onde já vigoram as leis de proteção de cultivares. No Brasil, no processo de proteção de clones de eucaliptos, os marcadores moleculares são descritores complementares, sendo sua apresentação não-obrigatória. FERREIRA E GRATTAPAGLIA (1998) detalham as aplicações de marcadores moleculares no melhoramento clássico de plantas em curto e médio prazo e no melhoramento transgênico.

Os principais marcadores moleculares utilizados na análise genética de plantas são: isoenzimas, RFLP – Polimorfismo no comprimento de Fragmentos de Restrição, RAPD– Polimorfismo Amplificado ao Acaso, microssatélites e AFLP – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998).

Estudos da variabilidade isoenzimática nos eucaliptos foram realizados por MORI (1993), em *Eucalyptus grandis*, e por MARTINS-CORDER (1994) em *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*. SATO E MORI (1996) aplicaram a técnica de eletroforese de isoenzimas para detectar o nível de endogamia em lote de sementes de um pomar de sementes comerciais de *Eucalyptus grandis*. MARTINS-CORDER et al. (1996) quantificou a variabilidade isoenzimática de *Eucalyptus urophylla*, procedência Ilha Flores, que foi submetida a uma seleção, visando o florescimento precoce. JUNGHANS (2000) identificou um gene de resistência à ferrugem em uma progênie de *Eucalyptus grandis* constituída de 994 indivíduos segregantes para resistência à ferrugem. Foram identificados seis marcadores RAPD ligados ao gene denominado *Ppr1* (*Puccinia psidii* resistance, gene 1), que confere resistência à ferrugem, mediante o uso da técnica de BSA. O marcador AT9/917 foi constatado apenas nas plantas resistentes. Segundo o autor, tendo em vista a proximidade genética e provavelmente física, esse marcador poderá ser utilizado na clonagem posicional de *Ppr1*.

2.4 Sistemas reprodutivos e constituição genotípica das plantas

Quando se pretende aplicar um programa de melhoramento genético a uma espécie é necessário que se conheça primeiramente a constituição genética da população inicial. É o modo de reprodução da espécie que vai determinar se a população base, ou de trabalho, será homogênea ou heterogênea e se os indivíduos que a compõem serão predominantemente homozigotos ou heterozigotos (BUENO, 2001).

Em autógamas os gametas que se unem provem da mesma planta e provavelmente são geneticamente idênticos, produzindo, conseqüentemente, plantas homozigotas. Se a planta é alógama, os gametas provem de indivíduos distintos, sendo portanto diferentes, originando plantas heterozigotas. A autogamia e a alogamia absolutas estão limitadas a poucas espécies na natureza. O que ocorre mais comumente é uma predominância de um ou outros desses tipos de reprodução (BUENO, 2001).

Segundo BRAUER (1974), uma planta somente é estritamente homozigota quando sua progênie obtida por reprodução sexual é exatamente igual a ela, ou seja, não há variação. Considerando o que sucede numa população inteira de polinização cruzada, onde a herança dos caracteres de cada indivíduo está determinada por um grande número de genes com vários alelos cada um, pode afirmar-se com certeza, que a probabilidade de se achar uma planta totalmente homozigota em uma população alógama é extremamente baixa. Supondo que só interesse a herança determinada por 20 genes, com dois alelos cada um, os homozigotos totais se achariam na população com a probabilidade de $(1/2)^{20}$, ou seja, um em 1.048.000 indivíduos. Nessas circunstâncias é perfeitamente justificável afirmar que uma população alógama é heterozigota.

A estrutura genética de uma população alógama deve ser entendida considerando-se que cada loco pode ter a alternativa de ser homozigoto ou heterozigoto, combinando-se com os demais de todas as maneiras possíveis. Assim, a distribuição da composição genética numa população, considerando a freqüência dos indivíduos, é binomial. Nesse tipo de distribuição, a freqüência mais alta corresponde à freqüência dos indivíduos que têm a metade dos locos em homozigose e a outra metade em heterozigose. O equilíbrio de Hardy-Weinberg, referente a populações panmíticas, não é alterado a não ser que ocorram fatores como mutação, migração ou redução do tamanho da população (BUENO, 2001).

O homem pode modificar a proporção de alogamia mediante a polinização artificial e variar o tamanho das populações que utiliza para a reprodução, conduzindo a seleção no sentido que lhe convenha, ou pode também introduzir novo germoplasma à população, e ainda provocar mutações artificiais, alterando assim as freqüências dos genótipos conforme seu interesse (BUENO, 2001).

2.4.1 Sistema Reprodutivo de Espécies Florestais

As flores de todas as espécies de *Eucalyptus* são hermafroditas e tem como principais vetores de polinização os insetos, sobretudo Hymenopteros, Dipteros, Lepdopteros, Coleópteros e Hemípteros. Nas áreas de ocorrência natural, pequenos

marsupiais e alguns pássaros também figuram como polinizadores importantes. As espécies são preferencialmente alógamas (PRYOR 1975), mas apresentam sistema reprodutivo misto podendo ocorrer até 30% de autogamia. A alogamia é favorecida pela protandria, ou seja, o estigma alcança sua receptividade antes do período de viabilidade máxima dos grãos de pólen. Entretanto esse mecanismo não elimina a possibilidade de ocorrência de autopolinização, pois uma mesma planta apresenta flores com diferentes estágios de maturação (ELDRIDGE, 1978).

Além da protandria, PRYOR (1976), descreve ainda a existência de um sistema de auto-incompatibilidade controlado geneticamente, que varia em intensidade, dependendo da espécie e grupos de espécies, mas que de maneira geral parece ser característico do gênero. Desta maneira, este mesmo autor define o gênero *Eucalyptus*, além de preferencialmente alógamo, tendo suas populações compostas por indivíduos heterozigotos e observando-se uma depressão geral no vigor com a autofecundação.

Os eucaliptos possuem flores hermafroditas, com ocorrência de protandria na maior parte das espécies. Segundo (HODGSON, 1976) citado por MORI, (1993), a protandria é um mecanismo que contribui para a panmixia e sua ocorrência vem reforçar a predominância de cruzamentos no gênero *Eucalyptus*.

Na década de 1990 marcadores isoenzimáticos foram utilizados para se estimar o grau de dispersão efetiva e contaminação de pólen em pomares de sementes. Estudos sobre dispersão de pólen em dois pomares de sementes de *Pinus sylvestris*, através de marcadores isoenzimáticos, foram citados por ADAMS (1983), relatando que estudos dessa natureza tem muita importância, tanto para programas de melhoramento, como para se obter informações sobre a estrutura genética de populações.

FRIPP (1982), estudando nove locos envolvendo cinco isoenzimas em *Eucalyptus kitsoniana*, observou que a variabilidade entre e dentro das populações foi pequena. A análise de dados de isoenzimas sugeriu que o sistema reprodutivo desta espécie é uma mistura de autopolinização e de cruzamento, com um subsequente seleção natural contrária às progênies de autofecundação. Resultados semelhantes foram encontrados por MORAN e BROWN (1980).

2.4.2 Fecundação Cruzada em Espécies Florestais

MORAN & BROWN (1980), estudando uma população de *Eucalyptus delegatensis*, encontraram uma taxa média de cruzamentos de 77%. Variações que ocorreram nas taxas de cruzamentos da espécie, em períodos diferentes, podem ser resultados de influências ambientais. Os autores citados observaram, também, diferentes

estimativas para taxas de cruzamento: plantios mais jovens apresentaram 66% de cruzamentos e para plantios mais velhos uma taxa de 85%.

MORAN ET alii (1989), estudando 10 locos isoenzimáticos em um pomar de sementes de *Eucalyptus regnans*, observaram que a taxa de cruzamentos foi alta, com estimativa global o pomar de 91%. Comparativamente, em populações naturais, a taxa de cruzamento foi de 74%. Essa taxa de cruzamento mais baixa em populações naturais, pode ser devida a endogamia causada por cruzamentos entre indivíduos aparentados que, normalmente, se distribuem na vizinhança.

MARTINS-CORDER ET alii (1996) estudando 9 locos de uma população de *Eucalyptus urophylla* procedente das ilhas de Flores, obteve taxa de cruzamento de 64%, concluindo que o sistema reprodutivo do material em estudo era intermediário, sendo preferencialmente por alogamia.

O parâmetro t_m (taxa de cruzamentos obtida a partir de multilocos) é o melhor estimador de cruzamentos. Se a taxa de t_s (taxa de cruzamentos obtida a partir de cada loco) para a população, for menor que t_m , isso significa que está havendo autofecundação e endogamia LEWANDOWSKI ET alii (1991). Valores de t_s maiores que 1,0 são eventos biologicamente não reais. Poderiam ser explicados por cruzamentos de combinação negativas seguidas de diferenças fenológicas entre e dentro de árvores, ou talvez devido a erro de amostragem.

A tabela 1 apresenta taxas médias de cruzamentos (t_s) para 11 espécies de *Eucalyptus*. Os valores das taxas são semelhantes sugerindo que as espécies do gênero, de modo geral, obedecem a um modelo de sistema reprodutivo misto, com predominância de cruzamento.

Tabela 1. Estimativas médias de taxa de cruzamentos (t_s) para algumas espécies de *Eucalyptus* em populações naturais.

ESPECIE	Nº de POPULAÇÕES	Nº de LOCOS	t_s (%)	REFERÊNCIA
<i>E. obliqua</i>	4	3	76	BROWN et alii (1975)
<i>E. pauciflora</i>	3	7	63	PHILLIPS & BROWN (1977)
<i>E. delegatensis</i>	4	3	77	MORAN & BROWN (1980)
<i>E. regnans</i>	1	4	69	MORAN & BELL (1983)
<i>E. regnans</i>	1	10	74	MORAN et alii (1989)
<i>E. regnans</i> (*)	1	10	91	MORAN et alii (1989)
<i>E. stellulata</i>	1	3	77	MORAN & BELL (1983)
<i>E. stoatei</i>	1	3	82	HOPPER & MORAN (1981)
<i>E. kitsoniana</i>	2	3	77	FRIPPS (1982)
<i>E. citriodora</i>	1	3	86	YEH et alii (1983)
<i>E. grandis</i>	2	6	84	MORAN & BELL (1983)
<i>E. saligna</i>	1	6	77	MORAN & BELL (1983)
<i>E. grandis</i>	5	8	88	MORI (1993)
<i>E. urophylla</i>	1	9	64	MARTINS-CORDER (1996)
MÉDIA			77,5	

3. MATERIAL E METODOS

3.1 Material

3.1.1 Pomar de Sementes Clonal

Utilizou-se uma área de recombinação de uma população selecionada (pomar de sementes clonal) de espécie *Eucalyptus grandis*, obtido dentro do programa de melhoramento genético, em andamento, na empresa florestal Suzano Papel e Celulose. A população é composta por 27 clones das procedências Coff's Harbour - Austrália, Rio Claro e Zimbabwe. O pomar de sementes localiza-se no município de São Miguel Arcanjo – SP, ocupando uma área de 3,03 hectares. Os clones, com 8 anos de idades, estão dispostos em espaçamento 5,50 x 5,50 metros entre rametes.

Para os procedimentos de microssatélites foram utilizadas amostras de 97 rametes do clone 14, e um ramete de cada um de outros 26 clones. O tabela 2 apresenta as informações com os números dos clones utilizados no presente estudo para esclarecimentos complementares.

Tabela 2. Número e procedências dos clones que formam o pomar de sementes clonal de *Eucalyptus grandis* localizado no município de São Miguel Arcanjo-SP.

CLONE	PROCEDENCIA	NÚMERO DE RAMETS
1	Coff's Habour	36
2	Coff's Habour	32
3	Coff's Habour	27
4	Coff's Habour	12
5	Coff's Habour	33
6	Coff's Habour	25
7	Coff's Habour	1
8	Coff's Habour	36
9	Coff's Habour	39
10	Coff's Habour	21
11	Coff's Habour	96
12	Coff's Habour	22
13	Rio Claro	98
14	Rio Claro	97
15	Coff's Habour	25
16	Coff's Habour	35
17	Rio Claro	68
18	Coff's Habour	98
19	Rio Claro	46
20	Rio Claro	17
21	Zimbabwe	44
22	Zimbabwe	17
23	Coff's Habour	13
24	Coff's Habour	75
25	Zimbabwe	24
26	Coff's Habour	10
27	Coff's Habour	3

3.1.2 Progênes de Meios Irmãos

Utilizou-se um plantio com progênes de *Eucalyptus grandis*, obtidas dentro do pomar de sementes clonal descrito acima, cujas sementes foram coletadas no clone 14 de procedência Rio Claro. O plantio localiza-se na cidade de Itatinga-SP ocupando uma área de 100 hectares. As progênes com um ano de idade, estão dispostas em espaçamento 3,00 x 1,80 metros entre plantas.

3.2. Métodos

3.2.1 Extração de DNA e genotipagem dos microssatélites em seqüenciador.

Para a realização dos microssatélites foram coletadas, em campo, 100 gramas de folhas nos clones e nas progênes, identificados, armazenados em gelo seco ainda no

campo e enviadas para o laboratório. As folhas coletadas foram aquelas jovens, no tamanho adulto e evitando-se colher folhas muito jovens e também daquelas em senescência.

A extração de DNA genômico total foi realizada utilizando um protocolo padrão com base em CTAB, previamente utilizado e descrito para *Eucalyptus* (GRATTAPAGLIA e SEDEROFF 1994 Genetics 137:1121-1137; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995 Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Editora SPI Embrapa). Uma purificação adicional em coluna de troca iônica foi utilizada para algumas das amostras que apresentavam um elevado conteúdo de polifenóis. Cerca de 50 mg de folha fresca foram utilizados e a pulverização do tecido conduzida em máquina BIO101. Duas extrações independentes foram realizadas por equipes distintas em dias separados correspondendo à prova e contraprova para verificação de genótipos minimizando, portanto, a possibilidade de erro humano.

Para obtenção dos dados para análise genético-biométrica os rametes foram genotipados pela separação molecular de produtos da reação de polimerase em cadeia (PCR) em géis de eletroforese de poliacrilamida com detecção semi-automatizada via laser de espectro de fluorescência em seqüenciador automático de DNA.

3.2.2 Análise genético-biométrica

Para a obtenção de estimativas de frequência alélicas e genotípicas, testes de contingência, medida de variabilidade genética, distância genética e identidade de NEI (1978), utilizou-se o pacote estatístico TFPGA (MILLER, 1997) e POPGENE (YEH, F. C.; BOYLE, T., 1997), que apresentaram as seguintes estimativas de parâmetros.

3.2.2.1 Variabilidade Genética

3.2.2.1.1 Frequências gênicas

As frequências dos alelos foram obtidas pela leitura do seqüenciamento, contando-se diretamente o número de bandas nos locos. As frequências alélicas esperadas foram estimadas a partir das frequências observadas, obedecendo-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

a. Heterozigosidade (H)

A heteroziguidade, ou seja, a quantidade de heterozigose de um determinado loco foi calculada através da expressão de BROWN e WEIR (1983):

$$H = 1 - \sum P_{ii}$$

Onde P_{ii} é a frequência observada de genótipos homocigotos do alelo i .

Segundo NEI (1975), para se calcular heteroziguidade média (H), considera-se média desses valores, obtidos em todos os locos analisados.

b. Coeficiente de Endogamia (F)

O coeficiente de endogamia desenvolvido por WRIGHT (1965) baseia-se em frequências observadas (H_o) e esperadas (H_e) de heterocigotos. A expressão é:

$$F = 1 - (H_o/H_e)$$

c. Índice de Identidade Genética (I)

Baseados em frequências alélicas de locos homólogos nas diferentes subpopulações, o índice de identidade genética (I) utilizado nesse trabalho foi baseado em NEI (1978)

$$I = J_{xy} / (J_x \cdot J_y)^{1/2}$$

Onde J_{xy} , J_x e J_y são, respectivamente, as médias aritméticas de j_{xy} , j_x e j_y sobre todos os locos monomórficos e polimórficos. Para compreensão da expressão:

$j_x = \sum x_i^2$ é a probabilidade de 2 genes escolhidos ao acaso na subpopulação x , serem idênticos.

$j_y = \sum y_i^2$ é a probabilidade de 2 genes escolhidos ao acaso na subpopulação y , serem idênticos.

$j_{xy} = \sum x_i \cdot y_i$ é a probabilidade de um gene da subpopulação x e um gene da subpopulação y , serem idênticos.

d. Distância Genética (D)

A distância genética (D) entre duas subpopulações foi estimada conforme os procedimentos descritos em NEI (1978). A expressão é:

$$D = - \ln I$$

Onde I é o índice de identidade genética.

3.2.2.2 Sistema Reprodutivo

O coeficiente de endogamia está estreitamente relacionado à taxa de fertilização cruzada (t) sendo, também, apresentada por WEIR (1990) através da expressão:

$$f = (1 - t) / (1 + t)$$

O simples desenvolvimento desta expressão matemática possibilita a estimativa da taxa de cruzamento:

$$t = (1 - f) / (1 + f)$$

Endogamia é o acasalamento de indivíduos que são relacionados por ascendência, e o grau de parentesco entre os indivíduos de uma população é dependente do seu tamanho efetivo. O coeficiente de endogamia é a medida utilizada para se obter a probabilidade de 2 genes, em qualquer loco num indivíduo, serem idênticos por ascendência (FALCONER, 1987). O coeficiente de endogamia para determinada população é estimado a partir de frequências genotípicas esperadas (H_e) e observadas (H_o) de heterozigotos, como demonstrado primeiramente por WRIGHT (1922) e por WEIR (1990). A expressão é a seguinte:

$$F = (H_e - H_o) / H_e$$

Onde:

$H_e = 1 - \sum p_u^2$, sendo p_u^2 a frequência esperada de homozigotos para o alelo u;

$H_o = 1 - \sum P_{uu}$, sendo P_{uu} a frequência observada de homozigotos para o alelo u;

As variâncias referentes à taxa de cruzamento e coeficiente de endogamia podem ser estimados através de WEIR (1992), citado por PAIVA (1992).

3.2.2.3 Identidade Genética para Teste de Paternidade

Para a análise de identidade genética foram utilizados marcadores moleculares baseados em regiões com grande variabilidade do DNA conhecidas como regiões microssatélites ou “short tandem repeats – STR”.

Com base nos genótipos multiloco observados foram estimadas as probabilidades de ocorrência ao acaso de cada perfil multiloco único encontrado nas amostras analisadas. Este cálculo se baseou na probabilidade de ocorrência de genótipos homozigotos (p^2) ou heterozigotos ($2pq$) em uma população em equilíbrio de Hardy Weinberg. Uma vez que não se conhece a composição exata dos materiais analisados, e muito menos a população a partir da qual os indivíduos de *Eucalyptus* foram derivados, para os cálculos foi utilizada uma estimativa conservadora e única de frequência alélica para todos os alelos igual a 0,25, ou seja uma situação de um loco com quatro alelos com frequências iguais. Esta frequência utilizada está muito acima das frequências tipicamente estimadas para alelos de microssatélites de *Eucalyptus*. Com isso as probabilidades de ocorrência foram em geral superestimadas e mais conservadoras e, conseqüentemente, as probabilidades de identidade subestimadas e também mais conservadoras. As probabilidades de ocorrência dos perfis multiloco foram obtidas utilizando a regra do produto, ou seja, multiplicando-se as probabilidades de ocorrência dos genótipos em cada um dos locos analisados. A análise de identidade foi realizada verificando-se a existência de amostras com perfis multiloco idênticos entre as amostras submetidas para a análise. A identidade entre amostras foi então expressa na forma de verossimilhança (“likelihood ratio”) dos dados genéticos observados condicional à hipótese das amostras serem oriundas da mesma árvore em relação à hipótese alternativa de que as amostras são oriundas de árvores diferentes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Variabilidade Genética

4.1.1 Frequência gênica

As frequências gênicas são parâmetros genéticos importantes para a medição de variabilidade de populações. Na tabela 3 são apresentadas as frequências gênicas do pomar dos clones da área de recombinação de genótipos selecionados.

Tabela 3. Frequências dos alelos dos 12 locos microssatélites dos 27 clones selecionados de *Eucalyptus grandis*.

ALELOS	LOCOS											
	EMBRA 11	EMBRA 10	EMBRA 63	EMBRA 12	EES76	EMBRA28	EG62	ES65	EMBRA 37	EMBRA 27	EMBRA 02	EMBRA 03
ALELO 1	0,1296	0,037	0,0926	0,0741	0,0185	0,0192	0,0185	0,0185	0,0741	0,0741	0,2778	0,0741
ALELO 2	0,2222	0,0185	0,0741	0,1481	0,037	0,0192	0,7778	0,037	0,0185	0,2407	0,0926	0,1111
ALELO 3	0,1296	0,0556	0,2963	0,0741	0,0926	0,0192	0,1481	0,037	0,037	0,1667	0,0185	0,037
ALELO 4	0,0926	0,1667	0,1296	0,1111	0,1852	0,0577	0,037	0,0185	0,1481	0,037	0,037	0,0556
ALELO 5	0,0185	0,0185	0,037	0,1667	0,2037	0,0769	0,0185	0,037	0,0741	0,0556	0,0556	0,037
ALELO 6	0,037	0,037	0,0926	0,1481	0,0185	0,0192		0,2222	0,1852	0,0185	0,1481	0,1111
ALELO 7	0,1296	0,0556	0,1481	0,0741	0,1111	0,0385		0,1852	0,0741	0,0556	0,037	0,0556
ALELO 8	0,2222	0,1667	0,1111	0,0556	0,2407	0,1923		0,0741	0,0926	0,0556	0,1296	0,0556
ALELO 9	0,0185	0,0556	0,0185	0,037	0,0926	0,0962		0,0741	0,0185	0,0185	0,0556	0,2037
ALELO 10		0,0556		0,0185		0,0769		0,1296	0,0370	0,037	0,185	0,1296
ALELO 11		0,0307		0,037		0,1538		0,0370	0,037	0,0185	0,0926	0,0741
ALELO 12		0,2037		0,0185		0,0192		0,0556	0,0185	0,037	0,0185	0,037
ALELO 13		0,0926		0,037		0,0769		0,0185	0,1296	0,0185	0,0185	0,0185
ALELO 14						0,0192		0,0185	0,0556	0,0556		
ALELO 15						0,0577		0,0185		0,0741		
ALELO 16						0,0385		0,0185		0,0185		
ALELO 17						0,0192				0,0185		

A presença de muitos alelos como no caso dos locos EMBRA28, ES65 e EMBRA27 significa uma boa condição de medição de variabilidade.

No geral, todos os locos apresentaram polimorfismo alélico, sendo que os locos EMBRA 28 e EMBRA 27 foram os que apresentaram o maior número, com 17 no total. Por outro lado, o loco EG62 apresentou o menor número de alelos, entre os testados, com cinco alelos. Esse polimorfismo de alelos microssatélites suportam uma boa condição de estimativas de variabilidade genética da população.

No loco EG62 observou uma grande frequência do alelo 2, apresentando com mais de 77% de frequência.

4.1.2 Número de Alelos Observados e Números de Alelos Efetivos

Na tabela 4 são apresentados os números de alelos observados e o número de alelos efetivos para os 12 locos estudados, bem como suas médias e desvios padrões.

Tabela 4. Número de alelos observados e número de alelos efetivos por loco.

LOCO	TAMANHO DA AMOSTRA	NA	NE
EMBRA 11	54	9	6,26
EMBRA 10	54	13	8,15
EMBRA 63	54	9	6,13
EMBRA 12	54	13	9,23
EES76	54	9	6,05
EMBRA28	54	17	10,01
EG62	54	5	1,59
ES65	54	16	8,19
EMBRA 37	54	14	9,41
EMBRA 27	54	17	8,68
EMBRA 02	54	13	6,98
EMBRA 03	54	13	9,29
MEDIA	54	12	7,50
DESVIO PADRÃO		4	2,32

O número médio de alelos médios efetivos foi 7,5, entretanto o número de alelos médios observados foi de 12, tendo apresentado um desvio padrão de 4 alelos em média.

As maiores diferenças ocorreram nos locos EMBRA28 e EMBRA27, onde os alelos efetivos eram 10,01 e 8,68, respectivamente e após a análise o número de alelos observado foi de 17 para ambos os locos.

4.1.3 Teste de Qui-quadrado

Os resultados do teste de qui-quadrado são apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Qui-quadrado para diferentes locos da população.

LOCUS	X ²	df	p
EMBRA 11	58,0123	36	0,0115
EMBRA 10	111,8877	78	0,0072
EMBRA 63	50,1974	36	0,0582
EMBRA 12	100,6771	78	0,0430
EES76	71,6646	36	0,0004
EMBRA28	174,6332	136	0,0142
EG62	1,2895	10	0,9995
ES65	173,1377	120	0,0011
EMBRA 37	103,7390	91	0,1704
EMBRA 27	214,7887	136	0,0000
EMBRA 02	71,6303	78	0,6812
EMBRA 03	127,6635	78	0,0003

Os locos EG62 e EMBRA02 foram os que apresentam maiores valores de probabilidade no teste de qui-quadrado, ou seja, são os locos mais próximos do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A grande maioria dos locos não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e a principal razão para que isso esteja ocorrendo é o alto grau de seleção em que a população estudada foi submetida, pois trata-se de uma população selecionada de um programa de melhoramento em terceira geração avançada, com mais de 40 anos de estudos e toda a seleção afeta o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

4.1.4 Quantidade de Heterozigose e Endogamia

As frequências esperadas (H_e) e observadas (H_o) de heterozigose e o coeficiente de endogamia (f) são apresentados na tabela 6.

O coeficiente de endogamia, que no presente trabalho foi de 6,24% é uma estimativa que pode servir como um indicativo da existência de uma parcela de endogamia no pomar de sementes clonal de *Eucalyptus grandis*, fato esse comprovado em literatura para o *Eucalyptus regnans* (MORAN ET alii, 1989) e para *Eucalyptus grandis* (MORI, 1993).

É possível observar que a média do coeficiente de endogamia (f) é 6%, inferior ao valor de 15% que ocorrem nas populações de espécies arbóreas, mais uma vez esses valores ocorreram devido o trabalho estar sendo conduzido com uma população selecionada dentro do programa de melhoramento genético da empresa.

O índice de endogamia (f) variou de -0,06084, para o loco EMBRA 02, a 0,34674, maior valor que foi apresentado pelo loco EES76.

Tabela 6. Frequência esperada (H_e) e observada (H_o) de heterozigose e o coeficiente de endogamia (f) para os diferentes locos.

LOCOS	TAMANHO DA AMOSTRA	H_o	H_e	f
EMBRA 11	54	0,8148	0,856	0,04813
EMBRA 10	54	0,8148	0,8938	0,08839
EMBRA 63	54	0,8519	0,8526	0,00082
EMBRA 12	54	0,9259	0,9085	-0,01915
EES76	54	0,5556	0,8505	0,34674
EMBRA28	54	0,8462	0,9178	0,07801
EG62	54	0,3704	0,3781	0,02036
ES65	54	0,8519	0,8945	0,04762
EMBRA 37	54	0,8889	0,9106	0,02383
EMBRA 27	54	0,9259	0,9015	-0,02707
EMBRA 02	54	0,9259	0,8728	-0,06084
EMBRA 03	54	0,7407	0,9092	0,18533
MEDIA	54	0,7927	0,8455	0,06245
DESVIO PADRÃO		0,1680	0,1492	

4.1.5 Taxa Aparente de Cruzamento da População Seleccionada

Na tabela 7 são apresentados os valores da taxa aparente de cruzamentos da população seleccionada. As taxas de cruzamentos variaram desde 0,48, para o loco EES76 até 1,12 para o loco EMBRA02, cuja média de todos os locos foi de 0,88. MORAN & BELL (1983), em revisões feitas para 11 espécies do gênero *Eucalyptus* encontrou valor de t igual a 0,775, muito abaixo do encontrado no presente trabalho. Esta diferença refere-se ao fato de que os autores consideraram trabalhos utilizando material de populações naturais, que normalmente apresentam maior coeficiente de endogamia que em populações para melhoramento.

No presente caso, o pomar de sementes foi instalado a partir de clones sabidamente não aparentados. Quase toda a endogamia estimada refere-se a própria autofecundação, ou seja, de pólen advindos da própria árvore ou de rametes do clone nas proximidades. Observou-se que o valor de 88,2% da taxa de aparente de cruzamentos, no presente trabalho, foi próximo ao encontrado por MORAN et alii (1989) em pomar de sementes de *Eucalyptus regnans* ($t=91,0\%$) e de 87,9% por MORI (1993) para população de *Eucalyptus grandis*.

Por outro lado as análises de paternidade dos descendentes P8, P9, P13, P14, P16, P17, P25 e P27 permitiu excluir 26 dos 27 clones supostos polinizadores da possibilidade de ser o pai biológico com base no não compartilhamento do alelo paterno obrigatório em tipicamente 4 a 8 locos excludentes. Para os descendentes citados acima (P8, P9, P13, P14, P16, P17, P25 e P27), somente o suposto genitor paterno clone 11 não foi excluído, ou seja, ele possui o alelo paterno obrigatório (o alelo que necessariamente foi herdado do pai biológico) em todos os locos analisados. Podemos considerar que os clones 11 e 14 apresentam uma grande dominância, uma vez que esse cruzamento representa cerca de 29,6% dos cruzamentos gerados no trabalho.

Contudo, para os mesmos descendentes P25 e P27, o suposto genitor paterno clone 12 foi excluído em apenas um loco (EMBRA 2) ou seja, ele possui o alelo paterno obrigatório o alelo que necessariamente foi herdado do pai biológico) em 10 dos 11 locos analisados. Este polinizador também pode ser considerado como um provável pai dos descendentes P25 e P27.

Para os descendentes P11 e P22 somente o suposto genitor paterno clone 9 não foi excluído, ou seja, ele possui o alelo paterno obrigatório (o alelo que necessariamente foi herdado do pai biológico) em todos os locos analisados.

Da mesma forma o descendente P15 e P10 foram testados, e os pais para esses 2 descendentes são respectivamente os clones 4 e 16, ou seja, esses clones possuem o alelo paterno obrigatório em todos os locos analisados.

Em todas as análises realizadas de paternidade utilizou-se uma estimativa conservadora de paternidade com base em frequência alélica de 0,20 para todos os alelos paternos obrigatórios, a probabilidade dos clones serem pais biológicos dos descendentes indicados anteriormente, foram estimadas com sendo maior do que 99,999%.

Os dados genotípicos gerados foram confirmados em regime de prova e contraprova, ou seja, por meio da análise independente em experimentos replicados confirmando com precisão os resultados e conclusões acima descritos

5 CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados, pode-se concluir que:

- a) a população selecionada apresentou um grande polimorfismo de alelos ($n_a = 12$) e grandes distâncias genéticas entre os indivíduos selecionados mostrando alta variabilidade genética;
- b) Existe uma pequena taxa de endogamia na população selecionada (6,24%) devida a quantidade de heterozigose observada ($H_o = 0,7927$) ter sido menor que a esperada ($H_e = 0,8455$);
- c) A população selecionada de *Eucalyptus grandis* apresentou um sistema reprodutivo intermediário com forte tendência a alogamia (88,2%);
- d) Dos 27 descendentes testados, 48% são oriundos de um evento de fluxo gênico de pólen externo ao pomar, ou seja uma outra árvore não testada neste estudo;
- e) O cruzamento entre os clones 11 e 14 foi o que apresentou maior quantidade de descendentes, dos 27 testados foram identificados 8 como sendo deste cruzamento.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF - Associação Brasileira de Florestas Plantadas, **Anuário Estatístico** da ABRAF Brasília, ano base 2008, 2009.

ABRAF – Associação Brasileira de Florestas Plantadas, **Anuário Estatístico da ABRAF** Brasília, ano 1, abril. 2006. Disponível em: (<http://www.abraflor.org.br/estatisticas.asp>). Acesso em: 10 de novembro. 2006.

ADAMS, W.T Application of isozyme intree breeding. In: TANKSLEY, D. D. & ORTON, T. J. **Isozyme in Plant Genetics and Breeding**. Amsterdam, Elsevier, 1983, v.1, p.381-400.

AMOS, B & HOELZEL, A.R. Applications of molecular genetic techniques to the conservations of small populations. **Biological Conservations**, 61: 133-144, 1992.

BERTOLUCCI, F. de L. G.; REZENDE, G. D. S. P.; PANCHEL, R.; Produção e utilização de híbridos de eucalipto. **Silvicultura**, São Paulo, v. 26, n. 51, p. 1216, 1995.

BROWN, A.H.D.; MATHESON, A.C.; ELDRIDGE, K.G. Estimation of the mating system of *Eucalyptus oblique* L'Herit using allozyme poly-morphisms. **Australian Journal of Botany**, East Melbourne, 23:931-49, 1975

BUENO, L.C.S. Melhoria Genética de Plantas: princípios e procedimentos. Lavras: UFLA, 2001.

- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; **Modelos biométricos aplicados ao Melhoramento genético**. 2. ed. rev. Viçosa, MG: UFV, 2001. 390 p.
- CRUZ, C.D. **Princípios de genética quantitativa**. Viçosa: Editora-UFV, 2005. p.394.
- ELDRIDGE, K. et al. **Eucalypt domestication and breeding**. New York: Oxford University Press, 2001. 288p.
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, I.; HARWOOD, C.; VAN WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. New York: Oxford University Press, 1993. 288 p.
- FERREIRA, M. 1980. **Terminologia de melhoramento genético** florestal. Brasília: Embrapa. 88p.
- FERREIRA, M. 1990. Tipos de florestas, base genética e populações base em *Eucalyptus*. In: Reunião Técnica “Populações-Base -*Eucalyptus*”. Piracicaba: IPEF. p.916.
- FERREIRA, M. 1992. **Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal**. IPEF 45: 22-30.
- FERREIRA, M. **Estudo da variação da densidade básica da madeira de povoamentos de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden**. Piracicaba, 1970. 62p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.
- FERREIRA, M.; Araújo, A.J. 1981. **Procedimentos e recomendações para teste de procedências**. Embrapa/ URPFCs. p. 1-28. (Documentos, 6)
- FERREIRA, M.; SANTOS, P. E. T. dos. Melhoramento genético florestal dos *Eucalyptus* no Brasil: breve histórico e perspectivas. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF *EUCALYPTUS*, 1997, Salvador. Proceedings... Colombo: EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, 1997. v. 1, p. 14-34.
- FERREIRA, M.; SANTOS, P.E.T. dos. 1990. **Caracterização de populações em programas de melhoramento**. In: Reunião Técnica “Populações-Base - *Eucalyptus*”. Piracicaba. p.17-18.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen. 220p. (Documentos, 20).
- FRIPP, Y.J. Allozyme variation and mating system in two populations of *Eucalyptus kitsoniana* (Luehn) Maiden. **Australian Forest Research**, 13:1-10, 1982.
- GUIMARÃES, C. T.; MOREIRA, M.A. 1999. **Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas**. In: **Melhoramento de espécies cultivadas**. In: Borém, A. (Ed.). Viçosa: UFV. p.715-740.
- HAMRICK, J.L. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D.E; SOLTIS, P.S (ed.). **Isozymes in plant Biology**. Portland, Dioscorides Press, 1989. p.87-105.

- HODGSON, L.M. Some aspects of flowering and reproductive behaviour in *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden at J.D.M Keet Forest Research Station. I. Flowering, Controlled Pollination Methods, pollination and receptivity. **South Africa Forestry Journal**, Johannesburg, 97:18-28, 1976.
- HOPPER, S.D. & MORAN, G.F. Bird pollination and the mating system of *Eucalyptus stoatei*. **Australian Journal of Botany**, 29:625-38, 1981.
- IPEF. 1977. **Seleção massal e individual**. Piracicaba: IPEF. p.1-14, (Circular Técnica, 21)
- JUNGHANS, D. T. 2000. **Quantificação da severidade, herança da resistência e identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis***. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 44p.
- LEWANDOWSKI, A.; BURCZYK, J.; MEJNARTOWICZ, L. Genetic structure and the mating system in an old stand of Polish Larch. **Silvae Genetica**, Frankfurt, 40:75-79, 1991.
- LORENZI, H. et al. **Árvores exóticas no Brasil**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2003. 368 p.
- MARTINS-CORDER, M.P. 1994. **Caracterização isoenzimática de híbridos de *Eucalyptus* spp.** Botucatu. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista. 113p.
- MARTINS-CORDER, M.P.; MORI, E.S.; KAGEYAMA, P.Y.K.; LOPES, C.R. 1996. Estudo da variabilidade isoenzimática em *Eucalyptus urophylla* da Ilhas Flores. **Scientia Forestalis** (50): 43-49.
- MAYR, E. **Populações, espécie e evolução**. São Paulo: Nacional, 1977. v. 5. (Biblioteca Universitária, 3).
- MCKEAND, E.; BEINEKE, F. 1980. Sublining for Half-sib breeding populations of forest trees. **Silvae Genetica** 20 (1): 14-17.
- MORA, A. L.; GARCIA, C. H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000, 112 p.
- MORAN, G.F. & BELL, J.C. *Eucalyptus*. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (eds) **Isozymes in Plant Genetics and Breeding**, part B Elsevier, Amsterdam, p.423-41. 1983.
- MORAN, G.F. & BROWN, A.H.D. Temporal heterogeneity of out-crossing rates in alpine ash (*Eucalyptus delegatensis* R.T.ak). **Theoretical and applied Genetics**, 57:101-5. 1980
- MORAN, G.F.; BELL, J.C., GRIFFIN, A.R. Reduction in levels of inbreeding in a seed orchard of *Eucalyptus regnans* F. Muell. Compared with natural populations. **Silvae Genetic**, Frankfurt, 38(1):32-35, 1989.

- MORI, E.S. 2005. **Estratégias de programas de melhoramento florestal. In: Reunião Técnica sobre Tópicos em Conservação e Melhoramento Genético de Espécies Florestais.** Piracicaba: IPEF. [CD-ROM].
- MORI, E.S. **Variabilidade genética isoenzimática em uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção.** 1993. Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 119p.
- PHILLIPS, M.A. & BROWN, A.H.D Mating system and hibridity in *Eucalyptus paucifolia*. **Australian Journal Biological Science**, 30:377-44, 1977.
- ROTHER, G.M, Eficacia y limitaciones de los estudios de isoenzimas en la genetica de los arboles forestales. **Recursos Geneticos Forestales.** Información nº 18. FAO, Roma. P. 2-15. 1991.
- RUDIN, D. Biochemical genetics and selection application of isozymes in tree breeding. In: IUFRO JOINT MEETING OF WORKING PARTIES ON POPULATION AND ECOLOGICAL GENETICS, BREEDING THEORY PROGENY TESTING, Bordeaux, proceedings, p. 145-64. 1976.
- SATO, A. S.; MORI, E.S. 1996. Detecção de endogamia em sementes de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Revista do Instituto Florestal** 8 (1): 131-134.
- YEH, F. C.; BOYLE, T. (1997) POPGENE, Versão 1,2. Disponível em: [HTTP://www.cgiar.org/cifor/pesquisa/projetos/project62/popgene.html](http://www.cgiar.org/cifor/pesquisa/projetos/project62/popgene.html) . Acesso em: 27 de Julho de 2004.
- YEH, F.C; BRUNE, A.; CHELIAK, W.N.; CHIPMAN, D.C. Mating system of *Eucalyptus citriodora* in a seed-production area. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, 13(6):1051-55, 1983.

