

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

SILVELISE PUPIN

**DIVERSIDADE GENÉTICA, SISTEMA DE REPRODUÇÃO E PARENTESCO EM
PROGÊNIES DE *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE**

**Ilha Solteira
2018**

SILVELISE PUPIN

**DIVERSIDADE GENÉTICA, SISTEMA DE REPRODUÇÃO E PARENTESCO EM
PROGÊNIES DE *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Ilha Solteira – UNESP como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor. Especialidade
Sistema de Produção.

Prof. Dr. Mario Luiz Teixeira de Moraes
Orientador

Prof. Dr. Celso Luis Marino
Coorientador

**Ilha Solteira
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

P984d Pupin, Silvelise.
Diversidade genética, sistema de reprodução e parentesco em progênes de
Eucalyptus urophylla S. T. Blake / Silvelise Pupin. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2018
141 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia
de Ilha Solteira. Especialidade: Sistema de Produção, 2018

Orientador: Mario Luiz Teixeira de Moraes

Co-orientador: Celso Luis Marino

Inclui bibliografia

1. Coancestria. 2. Endogamia. 3. Microssatélites. 4. Pomares de sementes
por mudas. 5. Teste de progênes de segunda geração.


Raiane da Silva Santos

Supervisora Técnica de Seção
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
C311/8 - 9999

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DIVERSIDADE GENÉTICA, SISTEMA DE REPRODUÇÃO E PARENTESCO
EM PROGENIES DE *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE

AUTORA: SILVELISE PUPIN

ORIENTADOR: MARIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA,
especialidade: SISTEMAS DE PRODUÇÃO pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MARIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES

Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - SP



Prof. Dr. ALEXANDRE MAGNO SEBBENN

Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo / Instituto Florestal de São Paulo - IFSP



Prof. Dr. JOAO ANTONIO DA COSTA ANDRADE

Departamento de Biologia e Zootécnica / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Prof. Dr. RINALDO CESAR DE PAULA

Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Dr. LEONARDO NOVAES ROSSE

. / Eldorado Brasil

Ilha Solteira, 02 de fevereiro de 2018

*A minha mãe, Silvia,
minha heroína e meu exemplo,
por seu carinho e amor incondicional.*

DEDICO.

*Aos que têm minha eterna gratidão e são meu orgulho e inspiração...
Meus avós (in memoriam) Sylvio e Maria do Carmo,
Meu pai (in memoriam) Carlos Sérgio,
Meu irmão Carlos Eduardo e,
Meu parceiro Bruno.*

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Ao meu mestre e orientador, Prof. Dr. Mario Luiz Teixeira de Moraes, por ter me conduzido desde a iniciação científica, com muita sabedoria, competência e paciência, compartilhando seus valiosos ensinamentos, sempre tão inspiradores. Agradeço pela oportunidade, o incentivo, a confiança e sua dedicação e empenho para realizarmos este estudo! Muito obrigada!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Celso Luis Marino, que mesmo à distância, esteve sempre presente, com contribuições tão importantes e enriquecedoras, desde o planejamento até o desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Alexandre Magno Sebbenn, por sua contribuição essencial nas análises dos dados moleculares, para desenvolvimento do estudo e, muito além, por compartilhar seu vasto conhecimento de assuntos tão complexos, como genética de populações, de forma tão didática e instigante. Obrigada pelos ensinamentos, disponibilidade, paciência e respeito. Seu entusiasmo pela ciência é cativante e motivador.

Aos membros das bancas examinadoras: Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, Prof. Dr. Rinaldo César de Paula, Dr. Leonardo Novaes Rosse, Prof. Dr. João Antonio da Costa Andrade e Prof. Dr. Alexandre Magno Sebbenn. Agradeço por participarem dessa importante etapa para minha formação acadêmica e pelas valiosas contribuições.

Aos Professores (*in memoriam*) que colaboraram com a constituição e doação das bases genéticas de *Eucalyptus urophylla*, Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama (TP-EU) e João Valter Simões (TPR-EU).

Ao Prof. Dr. Edson Seizo Mori, ao Prof. Dr. Paulo Henrique Muller da Silva e ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF, que prestaram grande colaboração com a formação do Programa Cooperativa de Melhoramento Florestal de *E. urophylla*.

Ao Prof. Dr. Mario Tomazello Filho e a equipe do Laboratório de Anatomia, Identificação e Densitometria de Raios X, do Departamento de Ciências Florestais, da ESALQ/USP, Sr. Aparecido, Maria, Angel e Ricardo, que prontamente se disponibilizaram a me ajudar e contribuíram para enriquecimento deste estudo.

Aos pesquisadores de empresas florestais, que prestaram enorme colaboração e apoio para o desenvolvimento deste: Dr. Leonardo Novaes Rosse (Eldorado), Dra. Izabel Christina Gava de Souza (Suzano) e Dr. Shinitiro Oda (Suzano).

Aos funcionários das empresas que tive a oportunidade de conhecer e trabalhar: Rejiane, Fabiana, Núbia, João e Sr. Zé (Eldorado); Walter, Juliana Tibúrcio e Odete (Suzano).

Obrigada pelo carinho e respeito com que me trataram.

Aos funcionários da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão, da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Alexandre Marques da Silva e Alonso Ângelo da Silva, que além do auxílio nas operações e avaliações de campo, prestaram sua amizade, carinho e respeito, em especial, ao Sr. José Cambuim, por partilhar seu riquíssimo conhecimento sobre as espécies do Cerrado e por contribuir de modo expressivo com a minha formação. Aos demais funcionários, tão importantes para instalação e condução dos experimentos: César Seleguim, Juliano Borges e Baiano (Manuel Bonfim), por atender as necessidades dos testes de progênies no campo e por estar sempre à disposição para colaborar; aos senhores Buchada, Tejim, Jaú, Zé Raimundo, Alvino, Sinval, Sr. Mazola, Júlio, Ederson, Wesley e Eduardo, que tornaram o trabalho de campo leve e descontraído.

Aos colegas da Pós-graduação e do Laboratório de Silvicultura e Genética de Populações, em especial, a Selma Maria Bozzite de Moraes, por seu carinho, amizade e atenção; e aos amigos, Darlin, Murilo, Thaísa, Patrícia, Cecília, Marcela, Camila, Wanderley, Daniele, Maiara, Janaína, Walter e Marcelo, “se quiser ir rápido, vá sozinho, se quiser ir longe, vá em grupo”. Obrigada por tudo!

Aos professores, técnicos e funcionários do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia dos Alimentos e Sócio-Economia, sempre atenciosos, prestativos e cordiais; aos funcionários da seção de Pós-Graduação, Onilda, Márcia, Grazielle, Thaís e Rafael (*in memoriam*) e aos funcionários da Biblioteca e da STAEPE, em especial ao José Carlos, que sempre esteve à disposição, prestando grande auxílio como ponto de apoio da FAPESP.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão de bolsa em nível de doutorado no âmbito do CONVÊNIO FAPESP/CAPES, como auxílio ao processo nº 2014/03407-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), tão importante para dedicação integral ao estudo, para participação em eventos científicos, sendo além do incentivo financeiro, um motivo de orgulho e dedicação para os bolsistas.

Enfim, os desafios existiram, mas este estudo envolveu o apoio e a colaboração de muitas pessoas e instituições e, assim, trabalhando juntos fomos superando cada obstáculo. Desse modo, a todos que contribuíram com o desenvolvimento do estudo e com minha formação acadêmica e pessoal, que se fizeram presente e que doaram seu apoio, carinho, respeito e amizade. Meus sinceros agradecimentos...

MUITO OBRIGADA!

“Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton (1676)

RESUMO

O êxito dos programas de melhoramento florestal requer que a predição do progresso genético seja proporcional ao progresso genético real. Para isso, é possível unir a genética quantitativa com ferramentas moleculares, que permitem estimar parâmetros com maior acuidade para seleção. O objetivo foi verificar a diversidade genética, o sistema de reprodução e as relações de parentesco em populações de polinização aberta de *Eucalyptus urophylla*, para selecionar cruzamentos e genitores. Para tanto, foram utilizados dois Pomares de Sementes por Mudas (PSM) e uma amostra de indivíduos adultos em um teste de progênies (PCPN). Para compor um teste de progênies de segunda geração (TP2G) foram coletadas sementes em 23 árvores matrizes em um dos PSM. As populações estão localizadas na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão, em Selvíria-MS. Os indivíduos do TP2G (722) e os adultos (467) foram genotipados com 12 marcadores microssatélites (SSR) e os locos avaliados para verificar se são marcadores genéticos. Os caracteres silviculturais foram mensurados nos PSM e no TP2G. Os marcadores SSR formaram um conjunto consistente de marcadores genéticos. A diversidade genética das populações foi elevada e a redução foi pequena entre as gerações. O índice de fixação foi significativo para todas as populações e maior nos descendentes, a indicar a presença de endogamia. A taxa de cruzamento indicou que a reprodução ocorreu predominantemente por cruzamentos (0,964). Houve cruzamentos entre parentes, correlacionados e autofecundação. Em função disso, a endogamia nas progênies foi superior a população parental e a principal razão foi o cruzamento entre parentes, o que resultou em maior endogamia. Além disso, as relações de parentesco foram superiores no TP2G. Houve fluxo de pólen entre as populações e o número de doadores de pólen foi elevado pela análise de paternidade, que permitiu determinar o provável candidato a pai de 713 indivíduos do TP2G. Com isso foi possível estudar o teste de progênies de polinização aberta como um teste de irmãos completos, permitindo estimar as capacidades gerais e específicas de combinação. Para o diâmetro a altura do peito o ganho genético baseado no valor genotípico do cruzamento foi elevado (> 20%), assim como a seleção clonal, que indicou ganhos consideráveis (> 65%). Assim, é possível dar continuidade ao Programa de Melhoramento, indicando cruzamentos e genótipos promissores de *E. urophylla*.

Palavras-chave: Coancestria. Endogamia. Microssatélites. Pomares de sementes por mudas. Teste de progênies de segunda geração.

ABSTRACT

The success of forest breeding programs requires that the prediction of genetic progress be proportionate to actual genetic progress. For this, it is possible to join the quantitative genetics with molecular tools, which allow to estimate parameters with greater acuity for selection. The main was to verify the genetic diversity, mating system and kinship relationships in open pollinated populations of *Eucalyptus urophylla*, to select crosses and parents. In order to do, two seedlings seed orchards (SSO) and an adult sample of individuals were used in a progeny test (PCPN). To compose a second generation progenies test (2GPT) seeds were collected in 23 mother trees in one of the SSO. The populations are located in the Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão, in Selvíria-MS. The individuals from 2GTP (722) and adults (467) were genotyped with 12 microsatellite markers (SSR) and the loci evaluated for genetic markers. Silvicultural traits were measured in the SSO and 2GPT. SSR markers formed a consistent set of genetic markers. The genetic diversity of the populations was high and the reduction was small between generations. The fixation index was significant for all populations and higher in the offspring, indicating the presence of inbreeding. The multilocus estimate of outcrossing rate indicated that reproduction occurred predominantly by crosses (0.964). There were crosses between relatives, crosses correlated and self-fertilization. As a result, inbreeding in the progenies was higher than in the parental population and the main reason was cross between relatives. In addition, kinship relations were higher in 2GPT. There was pollen flow among the populations and the number of pollen donors was higher by paternity analysis, which allowed to determine the probable candidate father of 713 individuals of the 2GPT. Thus, it was possible to study the open pollinated progeny test as a full sib test, allowing the estimation of general and specific combining abilities. For the diameter at breast height, the genetic gain based on the genotypic value of the cross was high (> 20%), as well as the clonal selection, which indicated considerable gains (> 65%). Thus, it is possible to continue the Breeding Program, indicating promising crosses and genotypes of *E. urophylla*.

Keywords: Inbreeding. Kinship. Microsatellite. Seedling seed orchard. Second generation progeny test.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	<i>Eucalyptus urophylla</i> S.T. Blake	14
3.1.1	Classificação taxonômica	14
3.1.2	Ocorrência natural	14
3.1.3	Comportamento ecológico e botânico	15
3.1.4	Importância e usos	20
3.2	Melhoramento genético de <i>Eucalyptus</i> sp.	22
3.3	Pomares de sementes	25
3.4	Marcadores microssatélites	27
3.5	Diversidade genética	29
3.6	Sistema de reprodução	30
3.7	Parentesco	31
	Referências	34
4	HERANÇA MENDELIANA, LIGAÇÃO GENÉTICA E DESEQUILÍBRIO GENOTÍPICO PARA LOCOS MICROSSATÉLITES EM <i>Eucalyptus urophylla</i> S.T. BLAKE	42
4.1	Introdução	42
4.2	Material e Métodos	43
4.3	Resultados	46
4.4	Discussão	58
4.5	Conclusão	59
	Referências	60
5	DIVERSIDADE GENÉTICA, SISTEMA DE REPRODUÇÃO E PARENTESCO EM PROGÊNIES DE POLINIZAÇÃO ABERTA DE <i>Eucalyptus urophylla</i> S.T. BLAKE	62
5.1	Introdução	62
5.2	Material e Métodos	64
5.2.1	Material	64
5.2.2	Métodos	70
5.2.2.1	Caracterização genética	70
5.2.2.2	Análises do marcadores microssatélites	72
5.3	Resultados	78
5.3.1	Diversidade genética	78
5.3.2	Sistema de Reprodução	81
5.3.3	Análise de Parentesco Dentro das Populações	85
5.3.4	Análise de Paternidade, Fluxo Gênico e Parentesco	89
5.4	Discussão	97
5.5	Conclusão	101
	Referências	103

6	SELEÇÃO A PARTIR DE UM TESTE DE PROGÊNIES DE POLINIZAÇÃO ABERTA DE <i>Eucalyptus urophylla</i> S.T. BLAKE AVALIADO COMO POLINIZAÇÃO CONTROLADA	107
6.1	Introdução	107
6.2	Material e Métodos	108
6.2.1	Material	108
6.2.2	Métodos	111
6.2.2.1	<i>Caracterização fenotípica</i>	111
6.2.2.2	<i>Caracterização genética</i>	113
6.2.2.3	<i>Análises quantitativas</i>	114
6.3	Resultados	118
6.3.1	Caracteres quantitativos e qualidade da madeira	118
6.3.2	Parâmetros genéticos	119
6.3.3	Seleção de genitores	121
6.4	Discussão	125
6.5	Conclusão	129
	Referências	130
	APÊNDICE A: Tabelas de famílias remanescentes, número de indivíduos e identificação das progênies e populações de <i>Eucalyptus urophylla</i> utilizadas na pesquisa	133
	APÊNDICE B: Croqui dos pomares de sementes por mudas de <i>Eucalyptus urophylla</i>	140

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de alimentar a população mundial em crescimento contínuo é um dos principais desafios das próximas décadas e, não menos importante, é a necessidade de atender a demanda por madeira, fibras e energia. Nesse sentido, as florestas plantadas com finalidade industrial são grandes fornecedoras de matérias-primas, contribuindo com a prestação de serviços sociais e ambientais, quando mantido o comprometimento com a sustentabilidade das áreas de plantio e manejo silvicultural.

Os destaques para o setor florestal brasileiro são as florestas plantadas com espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia*, conhecidos popularmente como eucalipto. Desde sua introdução no início do século XX foram obtidos incrementos em produtividade e qualidade da madeira, devido aos esforços praticados por instituições públicas e privadas, para o desenvolvimento de genótipos superiores e adequação das técnicas de manejo. Esse empenho contribuiu para que o Brasil alcançasse a liderança mundial em produtividade florestal média ($35,7 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) e curto período de rotação (menos de cinco anos). A área cultivada abrange 5,63 milhões de hectares cultivados com eucalipto, sendo os estados de Minas Gerais (24%), São Paulo (17%) e Mato Grosso do Sul (15%), os de maior representatividade, tendo o último registrado o maior aumento: 400 mil hectares entre 2015 e 2016 (INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ, 2017).

Nos programas de melhoramento florestal, o que tem sido observado por pesquisadores do setor é uma estagnação nos ganhos de seleção, provavelmente devido ao afunilamento da base genética e negligência da interação entre genótipos e ambientes, o que pode ser potencialmente danoso, se considerar ainda o efeito das alterações climáticas. Desse modo, avaliar o estoque genético das populações constituintes dos programas de melhoramento, como pomares e áreas para produção de sementes, e monitorar a erosão genética nas populações naturais, é imprescindível para que essa situação seja superada.

Por conseguinte, o *Eucalyptus urophylla* pode ser considerado uma espécie promissora para expansão das florestas plantadas em áreas com condições climáticas limitantes. Em razão do potencial produtivo e rusticidade, essa espécie tem sido utilizada com certa frequência em plantios localizados em regiões quentes e secas, como verificado na área de abrangência do Bolsão sul-mato-grossense, que comporta 11 municípios e abriga as duas maiores indústrias de papel e celulose do mundo (SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO - SEMADE, 2015).

O Registro Nacional de Cultivares apontou que existem 119 registros para espécie de *E. urophylla*. Os genótipos pertencem a empresas florestais (80,7%), viveiros independentes (11,7%) e instituições públicas de pesquisa (7,6%). Essas empresas destinam cerca de 51% dos genótipos para indústria de papel e celulose e 42% à produção de carvão vegetal. No entanto, pouco ou nenhum genótipo de eucalipto foi desenvolvido especificamente para o plantio na região do Bolsão sul-mato-grossense. A maioria dos registros pertencem à International Paper (26%), Suzano Papel e Celulose (13,5%) e Aperam Bioenergia (11,5%), que concentram suas unidades industriais nos estados de São Paulo e Minas Gerais (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2017). Assim, esse cenário reflete a importância de buscar a seleção de genótipos produtivos com qualidade da matéria prima adequada para atender aos requisitos da indústria na região do Bolsão sul-mato-grossense.

Para contribuir com isso, o emprego de ferramentas moleculares, como os marcadores microsatélites (*Simple Sequence Repeat* - SSR), tem sido importante e frequente em estudos com eucaliptos (SUMATHI; YASODHA, 2014). Isso porque são marcadores codominantes, altamente polimórficos e informativos (KALIA et al., 2011), que permitem monitorar os níveis de diversidade genética, avaliar como a espécie recombina seus genes para formar a população descendente, quais as relações de parentesco entre indivíduos dentro de progênies, o número de árvores polinizadoras e fluxo gênico, a contribuir para obter estimativas precisas de variância genética aditiva, herdabilidade e outros parâmetros relevantes para predição de ganhos genéticos. Portanto, essa ferramenta molecular pode contribuir com a genética quantitativa clássica, de modo a viabilizar a seleção de genitores e genótipos adaptados à essa importante região produtora de papel e celulose.

2 OBJETIVOS

Verificar a diversidade genética, o sistema de reprodução e as relações de parentesco, em populações de polinização aberta de *Eucalyptus urophylla* e em progênes de segunda geração, oriundas de um pomar de sementes por mudas.

Como objetivos específicos têm-se:

i) Obter genótipos promissores que foram selecionados naturalmente por 20 anos, em condições ambientais propensas aos estresses hídrico, nutricional e térmico, para clonagem ou cruzamentos;

ii) Propor a análise de um teste de progênes de polinização aberta como um teste de progênes de irmãs completas;

iii) Ajustar a estimativa de variância genética aditiva, com base no coeficiente de parentesco, permitindo estimar ganhos genéticos acurados;

iv) Determinar a dinâmica de como a espécie recombina seus genes em um pomar de sementes por mudas para formação dos descendentes;

v) Verificar a distribuição da variação genética entre e dentro de progênes dos pomares de sementes e no teste de progênes de segunda geração.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake

3.1.1 Classificação taxonômica

Eucalyptus urophylla pertence à família botânica Myrtaceae, gênero *Eucalyptus*, subgênero *Symphyomyrtus*, seção *Latoangulatae*, série *Transversae*, subsérie *Robustae*, junto de espécies como *E. resinifera*, *E. macta*, *E. scias*, *E. notabilis*, *E. robusta* e *E. pellita* (NICOLLE, 2015).

3.1.2 Ocorrência natural

Eucalyptus urophylla, conhecido internacionalmente como “Timor mountain gum”, é uma das poucas espécies que não ocorre naturalmente na Austrália. Seu habitat está limitado a pequenas ilhas localizadas ao leste da Indonésia e a sudeste do Arquipélago de Sonda, em Timor, Wetar, Alor, Pantar, Lembata, Adonara e Flores (Figura 1). O grupo de ilhas apresenta solos de origem vulcânica e se encontra isolado ao norte pelo mar de Flores e ao sul pelo mar de Timor (Savu), restringindo a disseminação da espécie entre a latitude de 7°30’S a 10°S e longitude de 127°E a 122°E (ELDRIGDE et al., 1993).

Figura 1 - Localização das Ilhas ao leste da Indonésia e sudeste de Sonda, onde o *Eucalyptus urophylla* ocorre naturalmente.



Fonte: Elaboração da própria autora.

A distribuição geográfica do *E. urophylla* é de aproximadamente 476 km de leste a oeste e 230 km de norte a sul, ao longo do grupo de ilhas (DVORAK; HODGE, PAYN, 2008). As altitudes vão de 70 m (Wetar) até 2960 m (Timor) (GUNN; MC DONALD, 1991). A temperatura varia entre 17°C a 21°C (1900 m) até 27°C a 30°C (400 m) (ELDRIDGE et al., 1993). A precipitação é influenciada pelo regime de Monções e cadeia montanhosa de Timor. Levantamentos recentes indicaram que a precipitação anual é variável (820 mm a 2000 mm) nas Ilhas, assim como o período seco. Em Wetar e algumas províncias de altas altitudes em Timor, esse período pode durar três meses (< 50 mm por mês), enquanto nas demais Ilhas, prolonga-se por mais de cinco meses entre junho e outubro (HODGE; DVORAK, 2015).

E. urophylla é frequentemente encontrado como espécie dominante em florestas montanas secundárias. No entanto, nas encostas de baixa altitude em Timor, essa espécie ocorre em mosaicos com florestas de *Eucalyptus alba*, dominante em regiões secas (ELDRIDGE et al., 1993) e que, inclusive, pode influenciar a estrutura genética populacional devido a introgressões e a hibridação natural (DVORAK; HODGE; PAYN, 2008).

Aparentemente, *E. urophylla* prefere elevações acima de 200 m, devido ao solo desfavorável em baixas altitudes (calcário) (GUNN; MC DONALD, 1991). Seu desenvolvimento é adequado em zonas climáticas úmidas e subúmidas (SELN; MITLÖHNER, 2011). Nessas áreas, formam-se florestas do tipo aberta e alta, ecologicamente similares às florestas localizadas no nordeste da Austrália, conhecidas como “*Wet Sclerophyll Eucalypt Forest*”, podendo ocorrer populações puras com mais de 55 m de altura (SCANAVACA JUNIOR; GARCIA, 2003). O desenvolvimento em substratos basálticos parece fornecer condições mais adequadas para o *E. urophylla* (GUNN; MC DONALD, 1991).

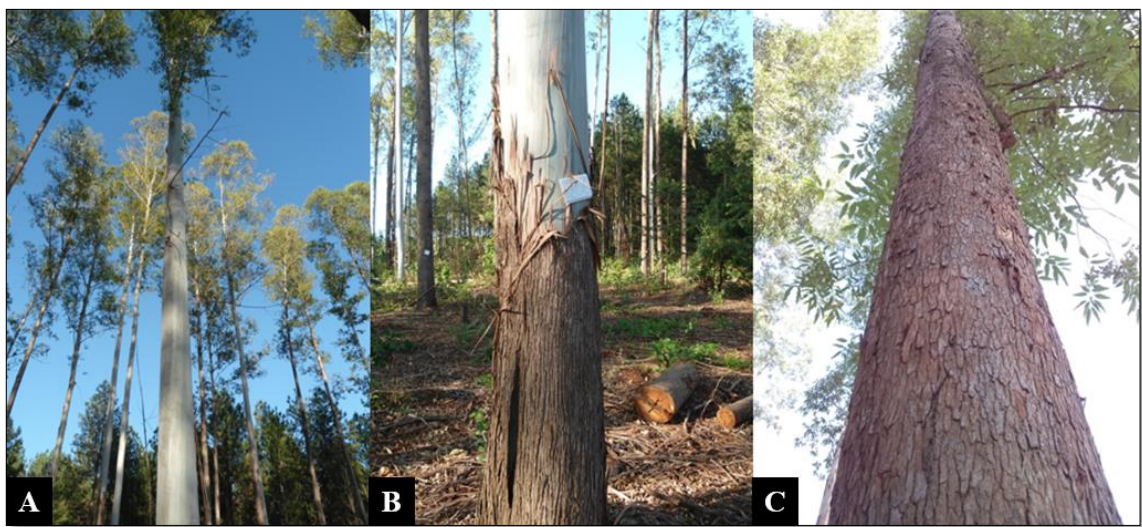
3.1.3 Comportamento ecológico e botânico

Eucalyptus urophylla é considerado como a única espécie ocupante de uma ampla gama de microhabitats e altitudes (ELDRIDGE et al., 1993), sendo inclusive, declarada como uma das mais variantes do gênero. Em função disso, foi proposta a separação em duas espécies: *E. wetarensis* e *E. orophila*, procedentes das Ilhas de Wetar e Timor, respectivamente (PRYOR; WILLIAMS; GUNN, 1995), classificação que de acordo com Brooker (2000), não foi aceita.

As diferenças morfológicas e fenológicas foram verificadas para o *E. urophylla* de acordo, principalmente, com a distribuição altitudinal (BÔAS et al., 2009). Variações quanto ao tipo de casca, folhas e a morfologia de frutos foram citadas por Gunn e Mc Donald (1991). Para Eldridge et al. (1993), a variação quanto a textura da casca pareceu ser influenciada pela

altitude e umidade. Em altitudes baixas e sob condições climáticas secas foram encontradas árvores com fuste de casca totalmente lisa (*smooth bark* ou *gum*) (Figura 2A) e abaixo de 1000 m em Alor e Flores, foram encontradas árvores com base rugosa e lisa em diferentes proporções do fuste (Figura 2B). Entre 1000 m e 2000 m de altitude em Timor, onde as condições são úmidas e com ocorrência de nevoeiros, as árvores geralmente são cobertas com casca totalmente rugosa (*rough bark*) (Figura 2C).

Figura 2 - Fuste do tipo casca lisa (A), meia casca (B) e casca rugosa (C), de árvores de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.



Fonte: Elaboração da própria autora.

E. urophylla é uma árvore de grande porte, que pode atingir de 30 a 40 metros de altura e 60 a 80 centímetros de diâmetro. No entanto, já foram localizadas em populações naturais, árvores com mais de 50 metros de altura e dois metros de diâmetro (DVORAK; HODGE; PAYN, 2008).

As folhas juvenis são diferentes das folhas adultas. Elas são menores e arredondadas, com 10 a 15 centímetros de comprimento e 5 a 8 centímetros de largura (Figura 3A). As folhas adultas são longas e estreitas, com 12 a 20 centímetros de comprimento e 2 a 5 centímetros de largura, lanceoladas e que se estreitam abruptamente em uma ponta curta (Figura 3B) (JØKER, 2004; SELN; MITLÖHNER, 2011). A coloração das folhas é variável e dependente do estágio de maturação, podendo ser arroxeada em estágios iniciais até verde escuro.

Figura 3 - Formato e coloração de folhas jovens (A) e folhas adultas (B), de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.



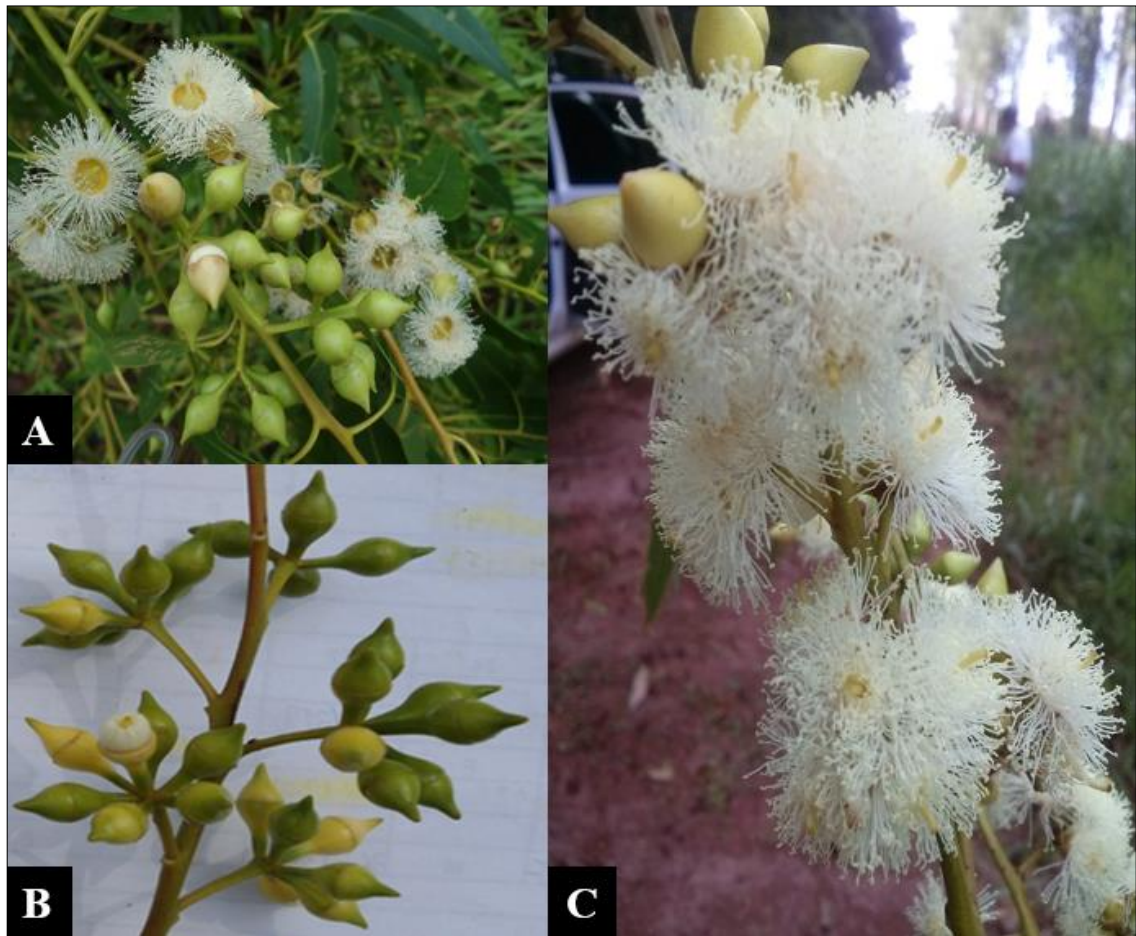
Fonte: Elaboração da própria autora.

Os botões florais do *E. urophylla* podem ser ovóides ou elipsóides (Figura 4A e 4B), formados por um cálice (parte inferior) e um opérculo (parte superior) que se abre na antese, liberando numerosos estames. As flores são hermafroditas e ocorrem em inflorescências axilares do tipo umbeliforme (Figuras 4C). As umbelas são solitárias, com cinco a dez flores em cada uma e os pedúnculos podem medir de 8 a 22 milímetros de comprimento. O florescimento inicia-se de dois a três anos após o plantio, mas é abundante a partir do quarto ano, ocorrendo durante a estação seca. A maturação das sementes ocorre seis meses após o florescimento (JØKER, 2004; SELN; MITLÖHNER, 2011). A polinização do *E. urophylla* é realizada principalmente por insetos e em menor proporção pelo vento (SELN; MITLÖHNER, 2011). Estudos para estimar parâmetros do sistema de reprodução indicaram que esta espécie se reproduz preferencialmente por cruzamentos (taxa de cruzamento $\geq 90\%$) (HOUSE; BELL, 1994; GAIOTTO; BRAMUCCI; GRATTAPAGLIA, 1997).

Em geral, os eucaliptos são protândricos, ou seja, o estigma só se torna receptivo dias após a antese, sendo o início e período de receptividade variável entre espécies e afetado pelas condições ambientais (ASSIS et al., 2004). Porém, isso não elimina a possibilidade de autofecundação, devido aos diferentes estágios de desenvolvimento da flor e fenologia. Além disso, os eucaliptos apresentam um sistema de autoincompatibilidade, controlada geneticamente e de intensidade variável (PRYOR, 1976). Horsley e Johnson (2007) estudaram sistemas de autofecundação e polinização cruzada em *E. urophylla*. Os resultados indicaram que para o sistema de autofecundação, a taxa de crescimento do tubo polínico foi menor em comparação ao outro sistema ($120 \text{ h} > 96 \text{ h}$) e, embora não tenha sido quantificada, as

anormalidades (como torção) também foram superiores. Assim, os autores concluíram que o *E. urophylla* apresenta um sistema de autoincompatibilidade críptica, que não inibe por completo o crescimento do tubo polínico. Em geral, esses mecanismos são responsáveis pela preferência dos sistemas de cruzamento e seleção contra indivíduos endogâmicos.

Figura 4 - Botões florais do tipo ovóide (A), elipsóide (B) e inflorescências (C) de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.



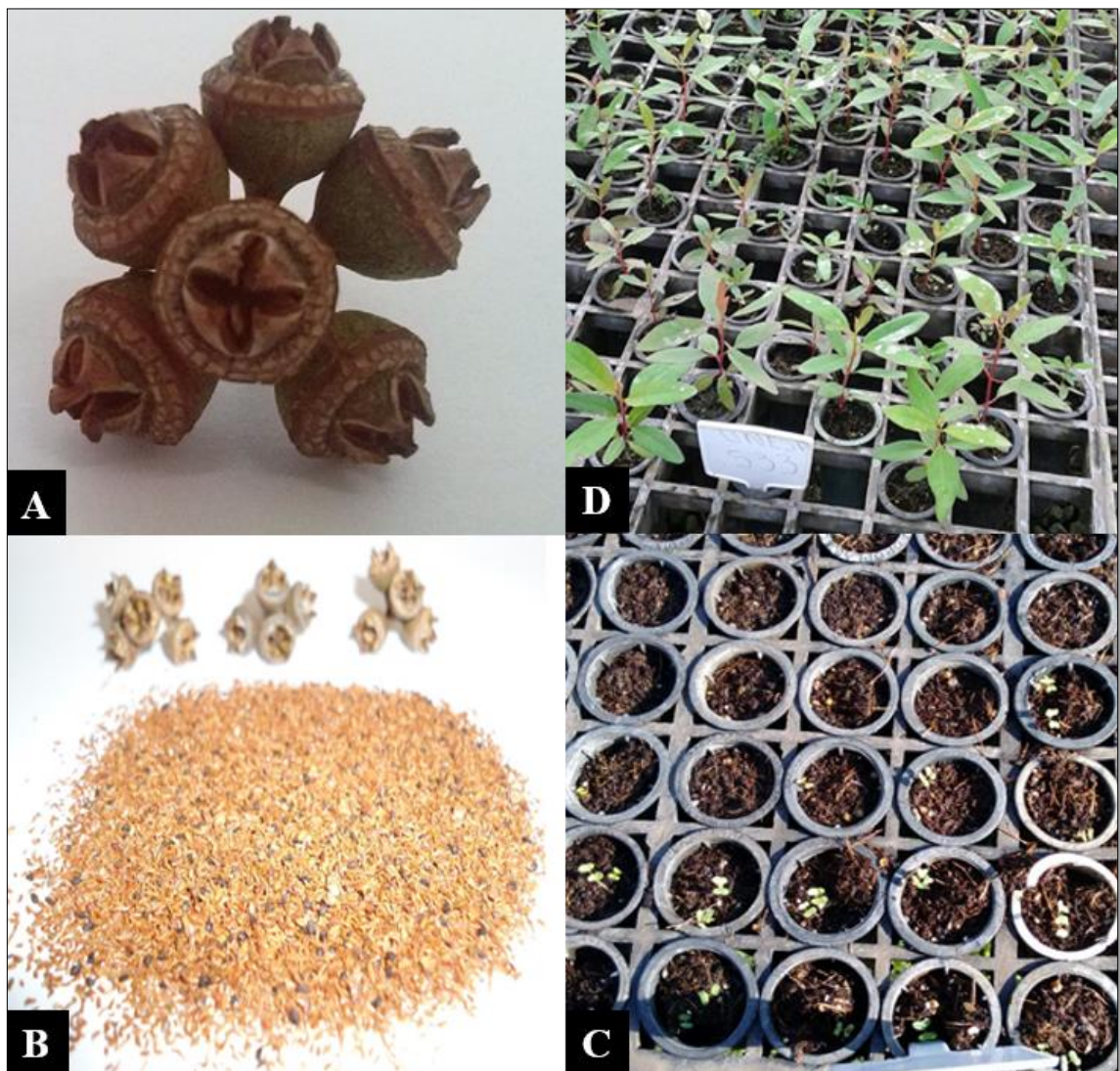
Fonte: Elaboração da própria autora.

Os frutos são do tipo cápsulas, secos e deiscentes, com opérculos que se abrem em três a cinco valvas (Figura 5A). As sementes encontram-se maduras quando o fruto se apresenta duro e de coloração amarronzada, iniciando a abertura das valvas (JØKER, 2004; SELN; MITLÖHNER, 2011). Os frutos podem apresentar diferenças morfológicas de acordo com a distribuição em altitude, podendo ser de duas formas: campanulada ou hemisférica, em altitudes superiores a 1000 m; ou cônico, em altitudes inferiores a 1000 m (MARTIN; COSSALTER, 1975).

As sementes são pequenas e aproximadamente semicirculares (Figura 5B) (SELN;

MITLÖHNER, 2011), sendo geralmente dispersas pela gravidade e pelo vento (POTTS; WILTSHIRE, 1997). São ortodoxas e podem ser conservadas por vários anos, desde que armazenadas a baixa temperatura e umidade (4% - 8%). Em média, um quilograma pode conter de 400 a 700 mil sementes de *E. urophylla* (JØKER, 2004).

Figura 5 - Frutos maduros e com as valvas abertas (A); sementes (B); início da germinação (C); mudas com cerca de quatro pares de folhas (D) de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.



Fonte: Elaboração da própria autora.

A germinação das sementes do *E. urophylla* é epígea e os cotilédones são geralmente bilobados próximos ao centro (Figura 5C). Os primeiros cinco a sete pares de folhas são opostas (Figura 5D), e os subsequentes, subopostos a alternados (SELN; MITLÖHNER, 2011). Em geral, a maioria das sementes de eucaliptos germina facilmente e não apresenta dormência. Por

isso, não existe a necessidade de tratamento. A temperatura adequada para germinação é de 20°C e ocorre entre 10 a 21 dias após a semeadura (JØKER, 2004).

A densidade básica da madeira varia de 0,42 g cm⁻³ (14 anos) a 0,71 g cm⁻³ (18 anos) (SCANAVACA JUNIOR; GARCIA, 2004; LOPES et al., 2011; HEIN et al., 2012; DENIS et al., 2013; PUPIN et al., 2017). As fibras são relativamente curtas ($\pm 1,0$ mm de comprimento) e adequada para produção de polpa celulósica, com rendimento médio de 49,5%. A produção de carvão vegetal também é apropriada ($> 0,54$ g cm⁻³), proporcionando rendimento e resistência mecânica (SANTOS et al., 2011).

A madeira do *E. urophylla* apresenta alburno branco, creme ou levemente rosado, com 2 a 6 cm de espessura e que pode ser facilmente separado do cerne (Figura 6A), que possui coloração claro a marrom-avermelhado e pode ser marrom escuro quando exposto (Figura 6B). O cerne é geralmente resistente ao tratamento preservativo e o alburno permeável (SELN; MITLÖHNER, 2011).

Figura 6 - Coloração do cerne e alburno da madeira de *Eucalyptus urophylla*, em um disco recém-cortado (A) e outro em tora seca (B), em Selvíria-MS.



Fonte: Elaboração da própria autora.

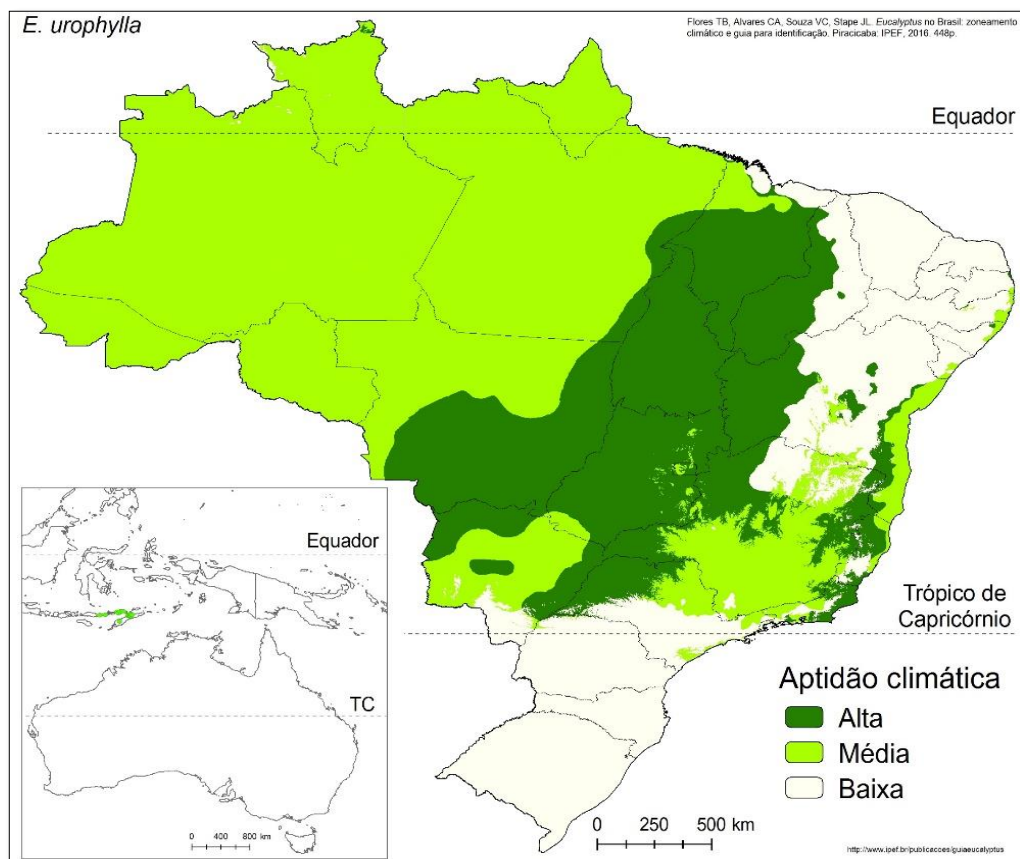
3.1.4 Importância e usos

Eucalyptus urophylla é um dos representantes do grupo conhecido como “big nine” identificado por Harwood (2011), como as nove espécies do gênero, majoritariamente cultivadas no mundo. As maiores plantações florestais do *E. urophylla* estão localizadas no

Brasil, em regiões tropicais e subtropicais (GUNN; MC DONALD, 1991; ROSADO et al., 2009). Na literatura existem relatos afirmando que plantios com essa espécie e seus híbridos, viabilizaram o cultivo de eucalipto em regiões até então impróprias para a cultura, como no Espírito Santo, devido a tolerância ao distúrbio fisiológico SPEVRD (seca dos ponteiros do eucalipto do Vale do Rio Doce) (ROCHA et al., 2006), apresentando ainda, potencial para expandir as fronteiras florestais nas regiões Norte e Nordeste (SCANAVACA JUNIOR; GARCIA, 2003).

Flores et al. (2016) propuseram um mapa para regiões de aptidão alta, média e baixa para *E. urophylla* no Brasil (Figura 7). Apesar da zona de ocorrência natural se limitar a latitude de 7°30'S a 10°S, a amplitude de distribuição no Brasil é alta e permite abranger regiões ao sul, até aproximadamente 23°S, próximas ao trópico de capricórnio.

Figura 7 - Mapa de aptidão climática para o cultivo de *Eucalyptus urophylla* no Brasil.



Fonte: Flores et al. (2016).

Sperandio et al. (2010) também classificaram áreas em aptas e inaptas para o zoneamento de *E. urophylla*. De acordo com esses autores, as áreas para plantios consideradas como aptas devem apresentar aptidão para todas as variáveis: temperatura média mensal entre

19°C a 26°C; precipitação entre 720 mm a 1800 mm; e déficit hídrico entre 15 mm e 170 mm. Os tipos de solos podem ser, conforme classificação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (2013): Organossolos, Cambissolos, Latossolos, Chernossolos, Argissolos, Luvisolos, Nitossolos, Plintossolos, Espodossolos e Neossolos. São consideradas inaptas, áreas que apresentam inaptidão a pelo menos uma das variáveis e solos: Neossolos litólicos, Neossolos flúvicos, Neossolos regolíticos, Neossolos aluviais e Gleissolos. Em função disso, exalta-se a habilidade do *E. urophylla* em colonizar uma ampla gama de ambientes com diferentes condições edafoclimáticas.

Entre as características favoráveis do *E. urophylla*, destacam-se: altas taxas de crescimento, boa capacidade de rebrota e rusticidade das plantas (ROCHA et al., 2006). Apresenta ainda: resistência ao fungo causador da ferrugem (*Puccinia psidii*), a murcha do eucalipto (*Ceratocystis fimbriata*) e aos cancrios do eucalipto (*Chrysoporthe cubensis* e *Coniothyrium zuluense*) (CARVALHO et al., 1998; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS, 2011; FIRMINO et al., 2013); e tolerância a vespa da galha (*Leptocybe invasa*) (THU et al., 2009). Em geral, o fuste apresenta boa forma e forte dominância apical. Apresenta também tolerância ao déficit hídrico e suscetibilidade a geada. Além disso, possui lignotúber na base da árvore, estrutura que favorece a brotação na segunda rotação (FERREIRA, 1992).

Em virtude dessas características, a espécie tem sido muito utilizada para produção de híbridos interespecíficos, fornecendo progênies com notável vigor para crescimento e produção de sementes viáveis. Entre os cruzamentos, o mais comumente utilizado é com *E. grandis*, gerando um híbrido (urograndis) que produz plantações clonais de crescimento rápido no hemisfério sul, tolerante a algumas doenças que atingem as folhas e o tronco e que apresenta alta densidade da madeira. Recentemente no Brasil, *E. urophylla* tem sido cruzado com *E. pellita* e *E. brassiana*, para produção de híbridos com alta densidade da madeira e que atendam a demanda bioenergética do País (HODGE; DVORAK, 2015).

A industrialização da madeira do *E. urophylla* apresenta ampla utilização pelo mercado consumidor: produção de celulose e papel; carvão vegetal e bioenergia; chapas de fibras, móveis e estruturas para construção civil; postes, dormentes e mourões (WILCKEN et al., 2008). Existe ainda a possibilidade de usos secundários, como na projeção de sombra em sistemas silvipastoris, produção de mel, entre outros (SELN; MITLÖHNER, 2011).

3.2 Melhoramento genético de *Eucalyptus* sp.

As primeiras pesquisas envolvendo o melhoramento de espécies florestais surgiram há quase 200 anos, mas apenas a partir de 1950, tornaram-se frequentes (WRIGHT, 1976). Em 1941, foram iniciados os programas envolvendo as espécies de *Eucalyptus* no Brasil, mas apenas em 1967, a seleção de árvores superiores tornou-se abundante (CASTRO et al., 2016), devido a implantação da Lei de Incentivos Fiscais, em 1966, que viabilizou o aumento das áreas de florestas plantadas (LEÃO, 2000).

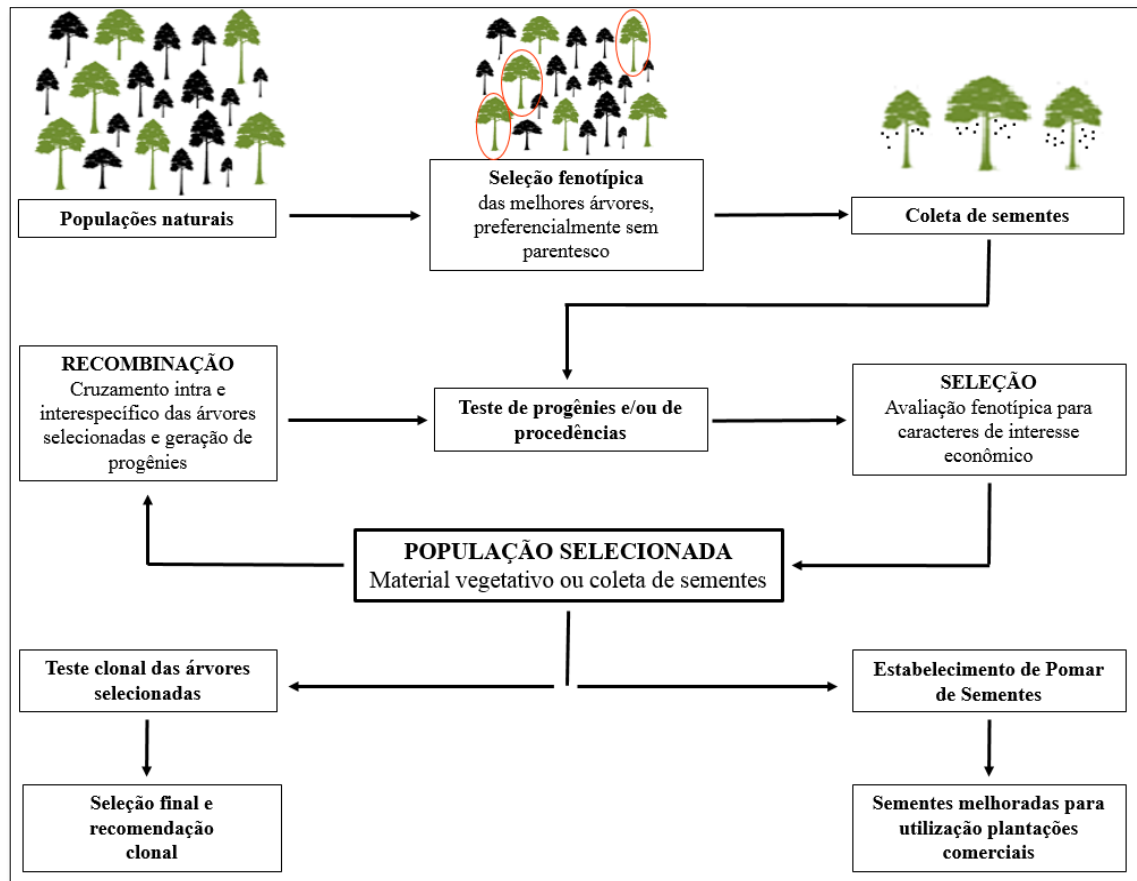
Nos estágios iniciais da domesticação do eucalipto foram obtidos incrementos expressivos em produtividade. A princípio foram identificadas espécies e populações promissoras, avaliadas sob diversos tipos de condições e ambientes, buscando a seleção de caracteres de interesse econômico. Entre 1960 a 1980, foram realizados testes de espécies e procedências. Em seguida, intensificaram-se os testes de progênies e os programas de seleção recorrente intrapopulacional. A partir de 1990, foram intensificados os programas de hibridação, e em 2000, iniciaram-se os programas de seleção recorrente recíproca, para o melhoramento do híbrido entre espécies divergentes, em especial, entre *E. grandis* × *E. urophylla* (FONSECA et al., 2010).

Atualmente, as plantações florestais são majoritariamente de clones derivados de híbridos. A seleção baseia-se na eleição de genitores e os cruzamentos são realizados dentro do programa de seleção recorrente recíproca entre populações divergentes e, também, na seleção recorrente intrapopulacional, em população híbrida sintética e oriunda do cruzamento entre clones elite, com incorporação de novos clones elite a cada geração (Seleção Recorrente Intrapopulacional em População Sintética) (ASSIS; RESENDE, 2011). Desse modo, os métodos de melhoramento genético florestal são baseados na seleção recorrente, que busca o aumento gradual na frequência de alelos favoráveis a cada geração da população (NAMKOONG; KANG; BROUARD, 1988). Além desses, grandes avanços ocorreram a partir do advento da propagação vegetativa na década 1970, com aumento dos ganhos genéticos por capturar os efeitos aditivos e não aditivos em clones elite (Figura 8) (GRATTAPAGLIA; KRIST, 2008).

Em geral, a seleção é baseada no fenótipo, para um ou vários caracteres de interesse econômico: volume, densidade da madeira, resistência ou tolerância a pragas, doenças e a estresses abióticos; mas com prioridade para crescimento e produção. Caracteres como fenologia, resistência à seca e às pragas, têm recebido atenção especial devido as preocupações perante às alterações climáticas, que ressaltam a importância do conhecimento sobre o potencial genético adaptativo das populações de espécies florestais (NEALE; KREMER, 2011).

A expansão das áreas de plantio esbarra em um novo desafio aos melhoristas: desenvolver genótipos produtivos e adaptados a condições edafoclimáticas limitantes, como deficiência hídrica e extremos térmicos, tanto alto como baixo. Áreas com longos períodos de estiagem, associada a temperatura e radiação elevada, intensificam o déficit hídrico, considerado o fator mais estressante e limitante ao crescimento do eucalipto. No entanto, a ampla base genética e a diversificação das espécies no Brasil, viabiliza os programas de melhoramento, permitindo empregar espécies não convencionais para hibridação interespecífica (PAULA; PAULA; MARINO, 2011).

Figura 8 - Representação esquemática de um programa básico de melhoramento de eucalipto envolvendo ciclos de seleção recorrente, estabelecimento de um pomar de sementes e/ou testes clonais de genótipos promissores.



Fonte: Adaptado de Grattapaglia e Krist (2008).

Decisões importantes quanto a estratégia, intensidade, método de seleção e delineamento de cruzamento são tomadas pelos melhoristas que buscam atender aos objetivos do programa. Correlações genéticas e fenotípicas entre caracteres, aplicação de índices de seleção e covariáveis, análises de competição e da interação entre genótipos e ambientes,

estudos de estabilidade e adaptabilidade, são algumas das abordagens essenciais. Além disso, a metodologia experimental demanda preocupação quanto à disponibilidade de área, facilidade para o manejo, delineamento experimental, tamanho de parcelas, número de tratamentos e de repetições. Esse conjunto de fatores afeta a precisão experimental, acurácia e a eficiência de seleção, tornando tangíveis os ganhos genéticos preditos, que devem ponderar ainda aspectos como a manutenção da diversidade genética, tamanho efetivo populacional e controle da endogamia, a fim de manter a viabilidade do programa em longo prazo. Concomitantemente, deve-se atentar para as restrições quanto ao financiamento do programa e características biológicas da espécie (GAIOTTO; BRAMUCCI; GRATTAPAGLIA, 1997).

Além desses, a redução do ciclo e aumento na eficiência de seleção vêm sendo enfatizada pelos melhoristas. Para isso, têm sido propostas abordagens recentes como a seleção assistida por marcadores (*Marker-assisted Selection* - MAS) e a seleção genômica ampla (*Genome-Wide Selection* - GWS) (NEALE; KREMER, 2011). A primeira inclui a redução dos custos, aumento da intensidade de seleção e aumento na eficiência de seleção para caracteres de baixa herdabilidade, porém, apresenta uso limitado e ganhos em eficiência reduzidos (FONSECA et al., 2010). A segunda surge como uma ferramenta promissora, onde espera-se melhorar a eficiência e rapidez na obtenção dos resultados, utilizando modelos estatísticos para predição do valor genético genômico (VGG), baseado na avaliação de milhares de marcadores de DNA amplamente distribuídos pelo genoma (RESENDE et al., 2012; LIMA, 2014).

3.3 Pomares de Sementes

Os pomares de sementes compoem um dos meios mais utilizados no mundo para o estabelecimento de estratégias de melhoramento de *Eucalyptus* que envolvam a reprodução sexuada. Consiste na seleção de genitores geneticamente superiores ou de suas progênes, apresentando como objetivo principal, a produção de sementes geneticamente melhoradas, em quantidade adequada e de fácil acesso, agregando ainda a manutenção elevada da variabilidade genética e a possibilidade de adaptação a ambientes específicos (NAMKOONG; KANG; BROUARD, 1988; FUNDA; EL KASSABY, 2012).

Basicamente, para eliminar árvores inferiores ao propor um pomar de sementes por mudas, podem ser utilizadas as estratégias: seleção individual, ou seleção massal, que classifica os indivíduos com base em uma só informação e elimina os que estão abaixo de um nível mínimo; seleção de famílias (meios-irmãos ou irmãos completos), que mantém todos os indivíduos da família, com base no comportamento médio de seus n integrantes,

independentemente da performance individual (próprios indivíduos avaliados são selecionados); seleção de irmãos, em que um grupo de indivíduos são selecionados com base no comportamento médio dos seus irmãos (os indivíduos selecionados não são avaliados); seleção de progênie, os genitores masculinos ou femininos (mais comum) são selecionados com base no comportamento de suas progênies de meias-irmãs; seleção entre e dentro de famílias, seleciona um número específico de indivíduos dentro das melhores famílias; seleção combinada, que cria um *ranking* dos melhores indivíduos, fundamentado na performance ponderada com base nos coeficientes de herdabilidade individual e média de progênies (DAVID, PIKE; STINE, 2003; PIRES et al., 2011).

Os pomares de sementes podem ser classificados de acordo com o material ou a geração de melhoramento – pomar de sementes por mudas, produzido de pais selecionados por meio de sementes de polinização aberta ou controlada; pomar de sementes clonal, produzido por clones selecionados e propagados vegetativamente (SCHMIDT, 1997). Os pomares de primeira geração são plantados com pais selecionados fenotipicamente, em populações não melhoradas e seus valores genéticos são desconhecidos. Esses pomares podem ser melhorados pelo desbaste de indivíduos inferiores (1,5 geração), obtidos por resultados em testes de progênies. Para avançar gerações são estabelecidos os pomares de polinização controlada, empregando indivíduos e cruzamentos entre genótipos elite, ou de suas progênies de polinização aberta, com subsequente reconstrução de *pedigree* (FUNDA; EL KASSABY, 2012).

Os pomares de polinização aberta são simples e de custo reduzido. Em função disso, tem sido muitas vezes preferido aos pomares de polinização controlada, onde os parentais masculino e feminino são conhecidos. Para a utilização de progênies de polinização aberta visando estimar parâmetros genéticos e ganhos de seleção, é necessário assumir pressuposições, como a de que todas as progênies de uma árvore materna são puramente meias-irmãs, exigindo que cada filho tenha um pai diferente (panmixia perfeita) e não sejam resultado de autofecundação. Um evento de florescimento pobre e irregular pode violar essas pressuposições, gerando resultados superestimados de variância genética aditiva ($\sigma_a^2 = \frac{\sigma_p^2}{r_{xy}}$)

e ganhos genéticos, que são consequência não apenas do coeficiente de parentesco e coancestria ($r_{xy} = 2\Theta$), mas também podem ocorrer como resultado da depressão endogâmica

$\left(h_a^2 = \frac{\sigma_a^2(1+F)}{\sigma_f^2} \right)$ e fatores como a variância genética de dominância (HALLINGBÄCK; JANSSEN, 2013; SWAIN; VERRYIN; LAING, 2015).

É neste sentido que o uso de marcadores moleculares tem sido fundamental no estudo da genética de populações de *Eucalyptus* e utilizado com sucesso para estimar as taxas de cruzamento, estudar as relações de parentesco entre progênes, avaliar os níveis de diversidade genética nos programas de melhoramento, a contaminação por pólen externo aos pomares de sementes e fluxo gênico, reconstrução do *pedigree* para gerenciamento eficiente da endogamia e de cruzamentos promissores, substituindo as estratégias demoradas e de alto custo dos programas de polinização controlada (TORRES-DINI et al., 2011; EL-KASSABY; FUNDA; LIEWLAKSANEEYANAWIN, 2015; TELFER et al., 2015; BARRANDEGUY; GARCIA, 2016).

3.4 Marcadores Microsatélites

Os marcadores moleculares do tipo microsatélites são conhecidos como STR (*Short Tandem Repeats*), SLP (*Simple Sequence Length Polymorphism*) ou, mais comum, SSR (*Simple Sequence Repeat*). A existência desses marcadores foi demonstrada por Hamada et al. (1982), sendo um dos mais utilizados em *Eucalyptus* desde 1996, abrangendo aplicações, tanto em programas de melhoramento quanto para conservação e estudos de genética de populações (BYRNE et al., 1996; KALIA et al., 2011).

Os microsatélites são definidos como repetições em *tandem* de pequenos motivos que contêm sequências curtas, com um a seis pares de bases, denominadas de regiões microsatélites, exibindo variação no número de repetições em um determinado loco (SANSALONI, 2008). As regiões microsatélites são amplamente distribuídas pelo genoma e apresentam elevado grau de polimorfismo, detecção multialélica e herança codominante (SANTOS; DUCROQUET; NODARI, 2011). As vantagens de utilização incluem reprodutibilidade dos resultados, transferibilidade entre espécies relacionadas (que pode variar de 80% a 100% entre as espécies do subgênero *Symphyomyrtus*), conteúdo informativo e alto rendimento de genotipagem (GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008; KALIA et al., 2011).

De acordo com Kalia et al. (2011), os microsatélites podem ser classificados de acordo com seu tamanho, tipo de unidade de repetição e localização no genoma. Dependendo do número de nucleotídeos por unidade de repetição, as regiões podem ser classificadas em mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ou hexanucleotídeos. Sumathi e Yasodha (2014) afirmaram a preferência pela utilização de dinucleotídeos, devido ao alto polimorfismo e maior variação entre indivíduos. Faria et al. (2011) reafirmaram essa opção, relatando que os SSR exibem em média, dez alelos por loco e heterozigiosidade entre 0,70 e 0,80. No entanto, apesar do favoritismo, o

emprego de SSR de dinucleotídeos podem ocorrer equívocos quanto a leitura das bandas na eletroforese. Assim, em aplicações onde a precisão é fundamental, como casos forenses, somente repetições tetra- e pentanucleotídeos são aceitas.

De acordo com o arranjo de repetição dos nucleotídeos, as regiões microssatélites podem ser classificadas: simples perfeita, são repetições em *tandem* dos arranjos de uma única sequência de repetição ($[AGG]_n$); simples imperfeita, consistem em uma ou mais unidades de repetição de diferentes comprimentos ($[AAC]_n([ACT]_n([AAC]_{n+1}))$; composta perfeita, quando os arranjos são compostos por dois ou mais repetições de motivos com mesmo comprimento ($[AGG]_n[AATC]_n$); ou, composta imperfeita, quando motivos são interrompidos por uma ou mais repetições de diferentes comprimentos ($[GGAT]_n[ACT][GTAA]_{n+1}$) (WANG; BARKLEY; JENKINS, 2009).

Com relação a localização no genoma, a maioria dos microssatélites é nuclear (nuSSR), mas também podem ser encontrados em mitocôndrias (mtSSR) e cloroplastos (cpSSR) (KALIA et al., 2011). De acordo com Wang, Barkley e Jenkins (2009) marcadores cpSSR são mais polimórficos que os mtSSR.

As regiões microssatélites podem ser classificadas ainda em SSR-genômica, quando são desenvolvidas de sequências aleatórias, localizadas em regiões não codificantes, como por exemplo, bibliotecas genômicas enriquecidas e; SSR-gênicas (*Expressed Sequence Tag* – EST-SSR), quando as sequências são de cDNA e, portanto, localizadas em regiões codificantes (SHIRASAWA et al., 2014). Para Faria et al. (2010), os marcadores microssatélites desenvolvidos a partir de regiões transcritas, são geralmente mais robustos, exibem melhor resolução do alelo e transferibilidade interespecífica.

Com o advento do sequenciamento de nova geração, o emprego de marcadores SNP's (*Single Nucleotide Polymorphism*) tem crescido exponencialmente. Entretanto, Telfer et al. (2015) e Kullán et al. (2016), reportaram que, em geral, os marcadores microssatélites podem ser mais informativos que os SNP's, devido ao alto polimorfismo e heterozigosidade. No entanto, deve-se considerar que as duas técnicas acessam de modos diferentes a diversidade genética e isso influencia os resultados obtidos. Outro ponto importante é a quantidade de marcadores empregados nos estudos. Quando um número pequeno de SNP's são utilizados, os SSR's se sobressaem, assim como quando o objeto de estudo é uma população pequena. Desse modo, a aplicabilidade de uma ou outra técnica deve-se adequar às condições de cada projeto e à disponibilidade de recursos.

Telfer et al. (2015) citaram ainda que, outra vantagem dos SSR sobre os SNP, refere-se à quantidade de informação que pode ser obtida a partir de um único loco, exigindo menos

locos para reconstrução de *pedigree*. Contudo, para estrutura populacional, resultados similares podem ser acessados aumentando o número de SNP para aproximadamente dez vezes o número de SSR. Para Hodel et al. (2016), devido à enorme quantidade de dados que são gerados pelos SNP, é necessária uma sólida formação em bioinformática e recursos computacionais mais robustos. Ainda de acordo com esses autores, em função de razões como alto polimorfismo, neutralidade e herança mendeliana, os SSR continuam a ser uma boa escolha e apropriado para projetos da Fundação Nacional de Ciência, dos Estados Unidos, e outras fundações.

3.5 Diversidade Genética

Os marcadores microssatélites têm provado ser uma ferramenta valiosa na caracterização da diversidade genética (CHEZHIAN; YASODHA; GHOSH, 2010), pilar que sustenta a biodiversidade, diversidade dentro e entre populações, espécies e ecossistemas (GOVINDARAJ; VETRIVENTHAN; SRINIVASAN, 2015).

De acordo com Ertekin (2012), a diversidade genética refere-se a riqueza de informação no *pool* gênico de uma espécie. Wang, Barkley e Jenkins (2009) a descrevem como qualquer variação na sequência de nucleotídeos, genes, cromossomos ou genoma de um organismo. Funda e El-Kassaby (2012) a definem como a quantidade total de variação genética, dentro ou entre unidades genéticas, em decorrência de vias evolutivas que consistem na base para responder às influências bióticas e abióticas.

Diversos parâmetros podem ser utilizados para o monitoramento dos níveis de diversidade genética, tipicamente calculados em nível de loco por meio do emprego de marcadores moleculares. Para população podem ser obtidos parâmetros como: número total de alelos, número médio de alelos por loco, riqueza alélica, coancestria, tamanho efetivo populacional, heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (diversidade genética), heterozigosidade observada e índice de fixação; entre populações, podem ser estimados os índices de diferenciação genética, como o F_{ST} e seus análogos (PORTH; EL-KASSABY, 2014).

Informações a respeito dos níveis e distribuição da diversidade genética são importantes, tanto para conservação, quanto para o estabelecimento e continuidade de programas de melhoramento genético. De acordo com Dillon et al. (2015), a diversidade genética é determinante na capacidade para adaptação e na resiliência evolutiva de espécies em ecossistemas sujeitos a alterações climáticas. Em casos de forte declínio, a diversidade alélica e em particular, a diversidade de alelos raros, pode ser perdida nas populações como resultado

da deriva genética e da endogamia. No melhoramento genético, informações sobre a natureza e grau de diversidade genética auxiliam o melhorista na caracterização do *pool* gênico e escolha de genitores divergentes para hibridação, além de esclarecer causas genéticas da inviabilidade de híbridos (SHEPHERD; JONES, 2005; SINGH et al., 2013). Outras contribuições são possíveis, como a identificação de duplicatas em bancos de germoplasma; avaliação do fluxo gênico em longo prazo; e identificação de variedades derivadas de variedade de planta protegida (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

3.6 Sistema de Reprodução

O sistema de reprodução refere-se ao modo de transmissão das informações genéticas de uma geração para outra (BROWN; BARRET; MORAN, 1985). Sebbenn (2014) define-o como a forma em que indivíduos ou populações recombina seus genes a cada evento reprodutivo para formar sua descendência. Para Fuchs e Hamrick (2011), ele influencia diretamente o movimento de pólen entre os indivíduos, afetando a composição genética das progênes descendentes.

De acordo com Coates, Sampson e Yates (2007), o sistema de reprodução é dinâmico e pode ser afetado por fatores genéticos, como estrutura floral e mecanismos de autoincompatibilidade, e/ou por fatores ecológicos, que incluem o modo de polinização, a disponibilidade e comportamento dos polinizadores, tamanho e densidade populacional, sincronismo de florescimento e o isolamento da população na paisagem.

Nas angiospermas existem sistemas que viabilizam a reprodução sexuada (espécies de cruzamento, cruzamentos mistos e autógamias). Esses sistemas são responsáveis por determinar os níveis de endogamia, a estrutura genética, o tamanho efetivo populacional e o grau em que as populações se subdividem devido à seleção ou deriva genética (BURCZYK et al., 2002). Além disso, desempenha importante função na distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações (GAJOTTO; BRAMUCCI; GRATTAPAGLIA, 1997), influencia a dinâmica do fluxo gênico entre populações fragmentadas (SORK; SMOUSE, 2006) e pode provocar ganho ou a perda de diversidade genética ao longo de gerações (LOWE et al., 2005).

Em geral, as plantas perenes são preferencialmente espécies de cruzamento, enquanto nas plantas anuais, verifica-se comumente o sistema de autogamia (STEBBINS, 1974). Como o sistema de reprodução influencia a estrutura genética populacional, espera-se em espécies autógamias, homogeneidade genética dentro das populações e maior diferenciação entre elas.

Em contrapartida, em espécies de cruzamento, espera-se menor diferenciação entre as populações e maior potencial de rearranjo da diversidade genética dentro da população.

Em espécies classificadas como autógamas o principal custo atribuído é a depressão por endogamia, que manifesta alelos letais ou deletérios quando expressos em homozigose, mas que são eliminados por vias seletivas (GODWILLIE; KALISZ; ECKERT, 2005). Em função disso, a carga genética em espécies de cruzamento é superior às espécies autógamas, devido aos genes letais, semi-letais e deletérios que ficam camuflados nos locos em heterozigose. Em *Eucalyptus pauciflora*, Phillips e Brown (1977) estimaram a taxa de cruzamento de 63% e confirmaram que, sementes provenientes de cruzamento apresentaram germinação superior as obtidas por autofecundação, indicando que a seleção agiu contra os descendentes autofecundados. Resultados semelhantes foram encontrados em *Eucalyptus camaldulensis* (JAMES; KENNINGTON, 1993).

Em termos gerais, o sistema de reprodução pode ser medido como a proporção de sementes resultantes de cruzamentos ou autofecundação (MURAWSKI; HAMRICK, 1991). Em *Eucalyptus*, as estimativas do sistema de reprodução são baseadas no modelo de sistema misto de reprodução (RITLAND; JAIN, 1981) e no modelo de cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1989), existindo a possibilidade de haver autofecundações, cruzamentos aleatórios e cruzamentos correlacionados, resultando em diferentes graus de parentesco dentro de progênies: meias-irmãs, irmãs-completas, meias-irmãs endogâmicas, irmãs-completas endogâmicas e irmãs de autofecundação (SEBBENN, 2014). Em função disso, a pressuposição de que as sementes de uma árvore em populações de polinização aberta são meias-irmãs, inflaciona a variância genética aditiva, resultando em parâmetros genéticos viesados, como a herdabilidade individual no sentido restrito e os valores genéticos. Desse modo, o *ranking* dos indivíduos e famílias tornam-se imprecisos e os ganhos genéticos superestimados (BUSH; THUMMA, 2012; EL-KASSABY; FUNDA; LIEWLAKSANEEYANAWIN, 2015).

3.7 Parentesco

Após o surgimento dos marcadores moleculares, as informações a respeito do grau de parentesco entre indivíduos passaram a ser obtidas sem a necessidade do conhecimento genealógico (RITLAND, 1996). Entre os marcadores, os microssatélites se destacaram como uma ferramenta eficiente para estimar e elaborar as matrizes de parentesco (maternidade e paternidade), devido à natureza altamente informativa - locos polimórficos e codominantes (TELFER et al., 2015), a ressaltar que podem inclusive, superar os marcadores SNP's, em virtude do multialelismo (CAPPA et al., 2016).

Em plantas diplóides, como é o caso dos *Eucalyptus* ($2n = 22$), cada loco apresenta dois alelos, um herdado da árvore matriz (mãe) e outro do doador de pólen (pai). Quando a árvore matriz é conhecida e todas as progênes e possíveis pais são genotipados, o alelo materno de cada loco é identificado e todas as árvores adultas são examinadas para encontrar o alelo paterno. Com um poder de exclusão entre 97% e 99%, a paternidade pode ser determinada com um grau adequado de confiabilidade (ASHLEY, 2010).

Entre as aplicações da análise de parentesco destacam-se: acessar o fluxo gênico contemporâneo (BURCZYK et al., 2002); determinar o nível de contaminação em pomares de sementes e a possibilidade de ocorrer fluxo gênico entre organismos geneticamente modificados para espécies selvagens (ASHLEY, 2010); controlar a endogamia e manter a diversidade genética adequada, inibindo que um parente paterno contribua mais que quatro vezes com a formação da geração descendente (TELFER et al., 2015); combinar o uso de progênes com informações incompletas de *pedigree* (polinização aberta) com um subconjunto de progênes com informações completas, para construir os valores genéticos das progênes e dos pais (EL-KASSABY et al., 2011).

Vários estimadores podem ser empregados para análise de parentesco entre pares de indivíduos e eles são influenciados por aspectos como poder informativo dos marcadores (número de locos, número de alelos e frequência gênica), tamanho da amostra, ligação genética entre locos, erros de genotipagem, mutação e endogamia (causada pelo tamanho pequeno de populações e/ou sistema de reprodução) (CAPPA et al., 2016). Entre as técnicas, a análise de parentesco baseada no método de verossimilhança para determinação da paternidade se tornou a mais popularizada com o advento do programa CERVUS (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007; ASHLEY, 2010).

Entre os métodos para análise de paternidade destacam-se o método de exclusão simples, que se baseia nas regras de herança Mendeliana, testando incompatibilidades genotípicas entre pais e seus descendentes, a fim de rejeitar genitores que não possuem alelos na prole (ELLSTRAND, 1984); e o método de máxima verossimilhança introduzido por Meaguer (1986), que busca identificar o mais provável pai dentro de uma população definida de possíveis pais, quando a mãe é conhecida. Nessa avaliação, é estimada a razão entre a probabilidade de um indivíduo ser o pai de uma determinada prole e a probabilidade desses indivíduos não estarem relacionados. Para comparar essas probabilidades são calculados *score* (LOD) para cada possível pai como logaritmo para base *e* da razão de verossimilhança, fornecendo um valor nulo, positivo ou negativo de LOD (SPANOGHE et al., 2015).

Outra abordagem importante, tanto para o melhoramento genético quanto para conservação *ex situ*, é o entendimento das relações de parentesco entre as plantas dentro de progênies. Isso porque progênies de polinização aberta são muito utilizadas devido ao baixo custo e facilidade para sua obtenção, mas a falta de conhecimento da verdadeira relação de parentesco entre as plantas e a suposição de que trata-se de meias-irmãs, derivadas de cruzamentos aleatórios entre os indivíduos, podem conduzir a estimativas imprecisas baseadas na pressuposição de que a covariância genética entre plantas dentro de progênies ($COV_g = 2\hat{\theta}_{xy}\sigma_A^2$) é $\frac{1}{4}$ da variância genética aditiva, quando na realidade o coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) é maior que 0,125 (SQUILLACE, 1974).

Em pomares de sementes, os estudos de parentesco têm demonstrado padrões complexos e variáveis quanto a dispersão de pólen. Proporções consideráveis devido a contaminação de pólen foram relatadas (29% a 46%), assim como distâncias máximas referentes ao fluxo de pólen (1,94 km em *Eucalyptus loxophleba*) (SAMPSON; BYRNE, 2008). Em um pomar de sementes de *E. camaldulensis*, Gonzaga et al. (2016) encontraram 14,7% de pólen migrante e um padrão de dispersão de pólen entre árvores vizinhas, o que influenciou os ganhos genéticos que haviam sido preditos para caracteres quantitativos. Jones et al. (2008) encontraram 54% dos doadores de pólen em 329 progênies de *E. grandis*, sendo que os pais estavam a uma distância de 0 a 192 m das árvores matrizes e os padrões de polinização não apresentaram preferência pelo vizinho mais próximo, sendo que 92% dos doadores de pólen encontravam-se localizados a distâncias superiores a 10 m. De acordo com Ellstrand (1992), as variações quanto as distâncias de dispersão de pólen em *Eucalyptus* são particulares conforme espécie e local, o que dificulta estabelecer generalizações.

REFERÊNCIAS

- ASHLEY, M.V. **Plant parentage, pollination, and dispersal: how dna microsatellites have altered the landscape**. 2010. 36 f. Department of biological Sciencis, University of Illinois at Chicago, Chicago, 2010. Disponível em: <<http://indigo.uic.edu/bitstream/handle/10027/7668/AshleyCritRevPlantSciFinal.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 03 out. 2016.
- ASSIS, T. F.; RESENDE, M. D. V. Genetic improvement of forest tree species. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, p. 44-49, v. 11, n. esp., 2011. Disponível em: <DOI: dx.doi.org/10.1590/S1984-70332011000500007>. Acesso em: 09 jan. 2018.
- ASSIS, T.; WARBURTON, P.; HARWOOD, C. Artificially induced protogyny: an advance in the controlled pollinization of *Eucalyptus*. **Australian Forestry**, Canberra, v. 68, n. 1, p. 27-33, 2004.
- BARRANDEGUY, M.E.; GARCIA, M.V. Microsatellites as a tool for the study of microevolutionary process in native forest trees. In: ABDURAKHMONOV, I. Y. **Microsatellite markers**. [S. l]: InTech, 2016. 27 p. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/microsatellite-markers>>. Acesso em: 02 ago. 2017.
- BÔAS, O.V; MAX, J.C. M; MELO, A.C.G. Crescimento comparativo de espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia* no município de Marília, SP. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v. 21, n.1, p. 63-72, 2009.
- BROOKER, M.I.H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrataceae). **Australlian Systematic Botany**, Clayton, v.13, n.1, p.79-148, 2000.
- BROWN, A.H.D.; BARRETT, S.C.H.; MORAN, G.F. Mating system estimation in forest trees: models, methods and meanings. In: _____. **Population genetics in forestry**. Berlin: Springer, 1985. p.32-49,
- BURCZYK, J.; ADAMS, W.T.; MORAN, F.; GRIFFINS, A.R. Complex patterns of mating revealed in a *Eucalyptus regnans* seed orchard using allozyme markers and the neighbourhood model. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, n.11, p.2379-2391, 2002.
- BUSH, D.; THUMMA, B. Characterising a *Eucalyptus cladocalyx* breeding population using SNP markers. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v.9, n.3, p.741-752, 2013.
- BYRNE, M.; MARQUEZ-GARCIA, M.I.; UREN, T.; SMITH, D.S.; MORAN, G.F. Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. **Australlian Journal Botany**, Melbourne, v. 44, n.3, p.331-341, 1996.
- CAPPA, E.P.; KLAPSTE, J.; GARCIA, M.N.; VILLALBA, P.V.; MARCUCCI-POLTRI, S.N. SSRs, SNPs and DArTs comparison on estiamation of relatedness and genetic parameters' precision from a small half-sib sample population of *Eucalyptus grandis*. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 36, n.7, p. 96-115, 2016.
- CARVALHO, A.O.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; CARMO, M.G.F. Resistência de espécies, progênes e procedências de *Eucalyptus* à ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 33, n. 2, p. 139-147, 1998.
- CASTRO, C.A.O.; RESENDE, R.T.; BHERING, L.L.; CRUZ, C.D. Brief history of *Eucalyptus* breeding in Brasil under perspective of biometric advances. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n.9, p.1585-1593, 2016.

CHEZHIAN, P.; YASODHA, R.; GHOSH, M. Genetic diversity analysis in a seed orchard of *Eucalyptus tereticornis*. **New Forests**, Heidelberg, v.40, n.1, p.85-99, 2010.

COATES, D.J.; SAMPSON, J.F.; YATES, C.J. Plant mating systems and assessing population persistence in fragmented landscapes. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.55, n.3, p.239-249, 2007.

CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L.A. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2011, 620p.

DAVID, A.; PIKE, C.; STINE, R. Comparison of selection methods for optimizing genetic gain and gene diversity in red pine (*Pinus resinosa* Ait.) seedling seed orchard. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.107, n.5, p.843-849, 2009.

DENIS, M.; FAVREAU, B.; UENO, S.; CAMUS-KULANDAIVELU, L.; CHAIX, G.; GION, J-M.; NOURRIER-MOUNTOU, S.; POLIDORI, J.; BOUVET, J-M. Genetic variation of wood chemical traits and association with underlying genes in *Eucalyptus urophylla*. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v.9, n.4, p.927-942, 2013.

DILLON, S.; McEVOY, R.; BALDWIN, D.S.; REES, G.N.; PARSONS, Y.; SOUTHERTON, S. Characterisation of adaptive genetic diversity in environmentally contrasted populations of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. (River Red Gum). **PLoS ONE**, São Francisco, v. 9, n. 8, p.1-15, 2014.

DVORAK, W. S.; HODGE, G. R.; PAYN, K. G. The conservation and breeding of *Eucalyptus urophylla*: a case study to better protect important populations and improve productivity. **Southern Forests: a journal of forest science**, Londres, v. 70, n. 2, p.77-85, 2008.

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

ELLSTRAND, N.C. Gene flow among seed plant populations. **New Forests**, Heidelberg, v. 6, n.1-4, p. 241-256, 1992.

EL-KASSABY, Y.A.; CAPPA, E.P.; LIEWLAKSANEYANAWIN, C.; KLAPSTE, J.; LSTIBUREK, M. Breeding without breeding: Is a complete pedigree necessary for efficient breeding? **PLoS ONE**, Londres, v. 6, n.10, p. 1-11, 2011.

EL-KASSABY, Y.A.; FUNDA, T.; LIEWLAKSANEYANAWIN, C. Increasing breeding without breeding (BwB) efficiency: Full – vs. partial-pedigree reconstruction in logepole pine. **Symbiosis Online Journal**, v. 2, n.1, p.1-16, 2015. Disponível em: <<http://www.symbiosisonlinepublishing.com/genetic-science/genetic-science07.pdf>>. Acesso em: 08 out. 2016.

ERTEKIN, M. Genetic diversity of seed orchard crops. In: CALISKAN, M. The molecular basis of plant genetic diversity. (Ed.) InTech. 370p. 2012. Disponível em: <<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/33923.pdf>>. Acesso em: 03 out. 2016.

FARIA, D.A.; MAMANI, E.M.C.; PAPPAS JR, G.J.; GRATTAPAGLIA, D. Genotyping systems for *Eucalyptus* based on tetra-, penta-, and hexanucleotide repeat EST microsatellites and their use for individual fingerprinting and assignment tests. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 7, n. 1, p. 63-77, 2011.

FARIA, D.A.; MAMANI, E.M.C.; PAPPAS, M.R.; PAPPAS JR, G.J.; GRATTAPAGLIA, D. A selected set of EST-Derived microsatellite, polymorphic and transferable across 6 species of *Eucalyptus*. **Journal of Heredity**, Oxford, n. 4, p. 512-520, 2010.

FERREIRA, M. Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal. **IPEF**, Piracicaba, n.45, p.22-30, 1992.

FIRMINO, A.C.; TOZZE JUNIOR, H.J.; SOUZA, I.C.G.; FURTADO, E.L. Resistencia de genótipos de eucalipto a *Ceratocystis* spp. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 41, n. 98, p. 165-173, 2013.

FLORES, T.B.; ALVARES, C.A.; SOUZA, V.C.; STAPE, J.L. ***Eucalyptus no Brasil***: zoneamento climático e guia para identificação. Piracicaba: IPEF, 2016. 447 p. Disponível em: <<http://www.ipef.br/publicacoes/guiaeeucalyptus/mapas.asp>>. Acesso em: 02 ago. 2017.

FONSECA, S.M.; RESENDE, M.D.V.; ALFENAS, A.C.; GUIMARÃES, L.M.S.; ASSIS, T.F.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2010. 200 p.

FUNDA, T.; EL-KASSABY, Y.A. Seed orchard genetics. In: HEMMING, D. **Plant sciences reviews**. 2012. 280 p.

FUCHS, E.J.; HAMRICK, J.L. Mating system and pollen flow between remnant populations of the endangered tropical tree, *Guaiaecum sanctum* (Zygophyllaceae). **Conservation Genetics**, Dordrecht, v.12, n.1, p.175-185, 2011.

GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 95, n. 5, p. 842-849, 1997.

GONZAGA, J.M.S.; MANOEL, R.O.; SOUZA, A.C.B.; SOUZA, A.P.; MORAES, M.L.T.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A.M. Pollen contamination and nonrandom mating in a *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh seedling seed orchard. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 65, n. 1, p. 1-11, 2016. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/sg.2016.65.issue-1/sg-2016-0001/sg-2016-0001.pdf>>. Acesso em: 03 out. 2017.

GOODWILLIE, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C.G. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Ocurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. **Annals Review of Ecology Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 36, p. 47-79, 2005.

GOVINDARAJ, M.; VETRIVENTHAN, M.; SRINIVASAN, M. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. **Genetics Research International**, New York, p.1-14. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/431487>>. Acesso em: 28 ago. 2017.

GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist**, Lancaster, v.179, n.4, p.911-929, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; VAILLANCOURT, R.E.; SHEPHERD, M.; THUMMA, B.R.; FOLEY, W.; KÜLHEIM, C.; POTTS, B.M.; MYBURG, A.A. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 8, n.3, p.463-508, 2012.

GUNN, B.V.; McDONALD, M.W. *Eucalyptus urophylla* seed collections. In: _____. **Forest Genetic Resources Information**. [S. l.], 1991. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/006/u5380e/U5380E09.htm>>. Acesso em: 29 set. 2016.

HALLINGBÄCK, H.R.; JANSSON, G. Genetic information from progeny trials: a comparison between progenies generated by open pollination and by controlled crosses. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 9, n. 3, p. 731-740, 2013.

- HARWOOD, C. New introduction: doing right. In: WORKSHOP - DEVELOPING A EUCALYPT RESOURCE: LEARNING FROM AUSTRALIA AND ELSEWHERE, [S. l.], 2011. **Proceedings...** [S. l.: s. n.], 2011. p. 43-54. Disponível em: <<http://nzdfi.org.nz/wp-content/uploads/2014/12/Developing-a-Eucalypt-Resource-Workshop-Proceedings-November2011.pdf>>. Acesso em: 29 ago. 2015.
- HEIN, P. R. G.; BOUVET, J-M.; MANDROU, E.; VIGNERON, P.; CLAIR, B.; CHAIX, G. Age trends of microfibril angle inheritance and their genetic and environmental correlations with growth, density and chemical properties in *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake wood. **Annals of Forest Science**, Paris, v. 69, n. 6, p. 681-691, 2012.
- HODEL, R.G.J.; SEGOVIA-SALCEDO, M.C.; LANDIS, J.B.; CROWL, A.A.; SUN, M.; LIU, X.; GITZENDANNER, M.A.; DOUGLAS, N.A.; GERMAIN-AUBREY, C.C.; CHEN, S.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. The report of my death was an exaggeration: A review for researchers using microsatellites in the 21st century. **Applications in Plant Sciences**, Saint Louis, v. 4, n. 6, p. 1-13, 2016.
- HODGE, G.R.; DVORAK, W.S. Provenance variation and within- provenance genetic parameters in *Eucalyptus urophylla* across 125 test sites in Brazil, Colombia, Mexico, South Africa and Venezuela. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 11, n. 3, p. 11-57, 2015.
- HORSLEY, T.N.; JOHNSON, S.D. Is *Eucalyptus* cryptically self-incompatible? **Annals of Botany**, Oxford, v.100, n.6, p.1373-1378, 2007.
- HOUSE, A.P.N.; BELL, J.C. Isozyme variation and mating system in *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, n. 2/3, p. 167-176, 1994.
- IBÁ, Indústria brasileira de árvores. Relatório **IBÁ 2017**. 80p. 2017. Disponível em: <http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf> Acesso: 03 out. 2017.
- JAMES, S.H.; KENNINGTON, W.J. Selection against homozygotes and resource allocation in the mating system of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 41, n.3, p.381-391, 1993.
- JØKER, D. *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. Seed leaflet. **Forest & Landscape Denmark**, Hørsholm, n.89, p.1-2, 2004. Disponível em: <http://curis.ku.dk/ws/files/20547032/eucalyptu__urophylla_89_int.pdf> Acesso em: 29 set. 2016.
- JONES, M.E.; SHEPHERD, M.; HENRY, R.; DELVES, A. Pollen flow in *Eucalyptus grandis* determined by paternity analysis using microsatellite markers. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 4, n. 1, p. 37-47, 2008.
- KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recente progress in plants. **Euphytica**, Dordrecht, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.
- KULLAN, A.R.K.; KULKARNI, A.V.; KUMAR, R.S.; RAJKUMAR, R. Development of microsatellite markers and their use in genetic diversity and population structure analysis in *Casuarina*. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 12, n. 49, p. 1-12, 2016.
- LEÃO, R.M. **A floresta e o homem**. Editora da Universidade de São Paulo: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2000. 448 p.
- LIMA, B. M. **Bridging genomics and quantitative genetics of Eucalyptus**: genome-wide prediction and genetic parameter estimation for growth and wood properties using high-density SNP data. 2014. 92 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 2014.

- LOPES, C.S.D.; NOLASCO, A.M.; TOMAZELLO FILHO, M.; DIAS, C.T.S.; PANSINI, A. Estudo da massa específica básica e da variação dimensional da madeira de três espécies de eucalipto para a indústria moveleira. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 315-322, 2011.
- LOWE, A.J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C.F.E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, Londres, v. 95, n. 4, p. 255-273, 2005.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PESCUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Registro nacional de cultivares. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/guia-de-servicos/registro-nacional-de-cultivares-rnc>>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- MARTIN, B.; COSSALTER, C. Les eucalyptus des îles de la Sonde. **Bois et forêts des tropiques**. Nogent-sur-Marne, v. 163, n. 164, p. 3-25, 1975.
- MURAWSKI, D. A.; HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, Londres, v. 67, p. 167-174, 1991.
- NAMKOONG, G.; KANG, H. C.; BROUARD, J. S. **Tree breeding**: principles and strategies. New York: Springer-Verlag, 1988. 180 p.
- NEALE, D.B.; KREMER, A. Forest tree genomics: growing resources and applications. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v. 12, n. 2, p. 111-122, 2011.
- NICOLLE, D. **Classification of the eucalypts (*Angophora*, *Corymbia* and *Eucalyptus*) Version 2**. 2015. 56p. Disponível em: <<http://www.dn.com.au/Classification-Of-The-Eucalypts.pdf>>. Acesso em: 02 ago. 2017.
- PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. **Programa de melhoramento genético de eucalipto da Embrapa Florestas**: resultados e perspectivas. Colombo: Embrapa Florestas., 2011. 64 p. (Séries Documentos, 214). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/898045/1/Doc214.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2016.
- PAULA, R.C.; PAULA, N.F.; MARINO, C.L. Melhoramento de espécies perenes para condições de estresses abióticos. In: Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos. FRIESCHENETO, R.; BÓREM, A. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011, p.227-250.
- PHILLIPS, M.A.; BROWN, A.H.D. Mating system and hybridity in *Eucalyptus pauciflora*. **Australian Journal of Biological Sciences**, Clayton, v. 30, n. 4, p. 337-344, 1977.
- PIRES, I.E.; RESENDE, M.D.V.; SILVA, R.L.; RESENDE JUNIOR, M.F.R. **Genética florestal**. Editora Arka: Viçosa, MG, 2011. 318 p.
- PORTH, I.; EL-KASSABY, Y.A. Assessment of the genetic diversity in forest tree populations using molecular markers. **Diversity**, Basiléia, v. 6, n. 2, p. 283-295, 2014.
- POTTS, B.M.; WILTSHIRE, R.J.E. Eucalypt genetics and genecology. In: WILLIAMS, J.E.; WOINARSKI, J.C.Z (Ed.). **Eucalypt ecology**: individuals to ecosystems. Cambridge: University, 1997. 442 p.
- PRYOR, L.D. **Biology of Eucalyptos**. Canberra: Edward Arnold, 1976. 78 p. (Studies in Biology, 61).

PRYOR, L.D.; WILLIAMS, E.R.; GUNN, B.V. A morphometric analysis of *Eucalyptus urophylla* and related taxa with descriptions of two new species. **Australian Systematic Botany**, Melbourne, v. 8, n. 1, p. 57-70, 1995.

PUPIN, S.; ZARUMA, D.U.G.; SOUZA, C.S.; CAMBUIM, J.; ALVES, P.F.; COLETO, A.L.; PAVAN, B.E.; MORAES, M.L.T. Parâmetros genéticos para caracteres de crescimento, espessura de casca e densidade básica da madeira em progênies de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 45, n. 115, p. 455-465, 2017. Disponível em: <DOI: 10.18671/scifor.v45n115.04>. Acesso em: 17 dez. 2017.

RESENDE, M.D.V.; SILVA, F.F.; LOPES, P.S.; AZEVEDO, C.F. **Seleção genômica ampla (GWS) via modelos mistos (REML/BLUP), inferência bayesiana (MCMC), regressão aleatória multivariada (RRM) e estatística espacial**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2012. 291 p. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/gws/selecao_genomica.pdf> Acesso em: 29 set. 2016.

RITLAND, K. A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations. **Evolution**, Lancaster, v. 50, n. 3, p. 1062-1073, 1996.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, Lancaster, v. 43, n. 4, p. 848-859, 1989.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, London, v. 47, n. 1, p. 35-52, 1981.

ROCHA, M. G. B.; PIRES, I. E.; XAVIER, A.; CRUZ, C. D.; ROCHA, R. B. Avaliação genética de progênies de meios-irmãos de *Eucalyptus urophylla* utilizando os procedimentos REML/BLUP e E(QM). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 369-379, 2006.

ROSADO, A. M.; ROSADO, T. B.; RESENDE JÚNIOR, M. F. R.; BHERING, L. L.; CRUZ, C. D. Ganhos genéticos preditos por diferentes métodos de seleção em progênies de *Eucalyptus urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 12, p. 1653-1659, 2009.

SAMPSON, J. F.; BYRNE, M. Outcrossing between na agroforestry plantation and remnant native populations of *Eucalyptus loxophleba*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 11, p. 2769-2781, 2008.

SANSALONI, C. P. **Desenvolvimento, caracterização e mapeamento de microssatélites de tetra e pentanucleotídeos em *Eucalyptus* spp.** 2008. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SANTOS, R. C.; CARNEIRO, A. C. O.; CASTRO, A. F. M.; CASTRO, R. V. O.; BIANCHE, J. J.; SOUZA, M. M.; CARDOSO, M. T. Correlações entre os parâmetros de qualidade da madeira e do carvão vegetal de clones de eucalipto. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 39, n. 90, p. 221-230, 2011a.

SANTOS, K.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O. Caracterização genética de populações naturais de goiabeira serrana (*Acca sellowiana*) com marcadores moleculares heterólogos. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 24, n. 4, p. 75-83, 2011b.

SCANAVACA JÚNIOR, L.; GARCIA, J. N. Determinação das propriedades físicas e mecânicas da madeira de *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 65, p. 120-129, 2004.

SCANAVACA JÚNIOR, L.; GARCIA, J. N. Potencial de melhoramento genético em *Eucalyptus urophylla* procedente da Ilha de Flores. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 23-32, 2003.

SCHMIDT, L. H. **Tree improvement glossary**: illustrated glossary of terms used in forest tree improvement. Humlebaek: Danida Forest Seed Centre, 1997. 57 p. (Technical note, n. 46). Disponível em: <<http://curis.ku.dk/ws/files/20710875/tn46.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2016.

SEBBENN, A.M. Estudo do sistema de reprodução e fluxo gênico em espécies arbóreas para fins de conservação e melhoramento florestal. In: WORKSHOP DE MELHORAMENTO FLORESTAL, 20., 2014, Piracicaba. **Proceedings...** Piracicaba: IPEF, 2014.

SELN, C. C.; MITLÖHNER, R. **Eucalyptus urophylla** S.T. Blake: ecology and silviculture in Vietnam. Bogor: CIFOR, 2011. 26 p. Disponível em: <http://www.cifor.org/publications/pdf_files/Books/BCIFOR1108.pdf>. Acesso em: 29 set. 2016.

SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO - SEMADE. **Perfil Estatístico de Mato Grosso do Sul 2015**: ano base 2014. SEMADE: Campo Grande, 2015. 111 p.

SHEPHERD, M.; BIHUA, C.; HENRY, R. Microsatellite markers for *Eucalyptus pilularis* (Subgenus *Eucalyptus*) sourcing genetic markers outside the subgenus. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 62, n. 4-5, p. 246-256, 2013.

SHEPHERD, M.; JONES, M. E. Molecular markers in tree improvement: characterisation and use in *Eucalyptus*. In: LORZ H, WENZEL, G (Ed.) **Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement**. Heidelberg: Springer, 2005. p. 399-409.

SHIRASAWA, K.; ISOBE, S.; TABATA, S.; HIRAKAWA, H. Kazuza marker database: a database for genomics, genetics, and molecular breeding in plants. **Breeding Science**, Tsukuba, v. 64, n. 3, p. 264-271, 2014.

SINGH, S.R.; AHMED, N.; LAL, S.; GANIE, S.A.; AMIN, M.; JAN, N.; AMIN, A. Determination of genetic diversity in onion (*Allium cepa* L.) by multivariate analysis under long day conditions. **African jornal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 8, n. 45, p. 5599-5606, 2013.

SORK, V.L. SMOUSE, P.E. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. **Landscape Ecology**, Dordrecht, v. 21, n. 6, p. 821-836, 2006.

SPANOGHE, M.; MARIQUE, T.; RIVIÈRE, J.; LANTERBECQ, D.; GADENNE, M. Investigation and development of potato parentage analysis methods using multiplexed SSR fingerprinting. **Potato Research**, Dordrecht, v. 58, n. 1, p. 43-65, 2015.

SPERANDIO, H.V.; CAMPANHARO, W.A.; CECÍLIO, R.A.; NAPPO, M.E. Zoneamento agroecológico para espécies de eucalipto no estado do Espírito Santo. **Revista Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v. 11, n. 34, p. 203-216, 2010.

SQUILLACE, A. E. Average genetic correlations among offspring from open-pollinated forest trees. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 23, n. 5, p. 149-156, 1974.

SUMATHI, M.; YASODHA, R. Microsatellite resources of *Eucalyptus*: current status and future perspectives. **Botanical Studies**, Heidelberg, v. 55, n. 73, p. 1-18, 2014.

SWAIN, T.L.; VERRYIN, S.D.; LAING, M.D. An investigation of assumptions made in estimating genetic parameters and predicting genetic gain in a *Eucalyptus nitens* breeding programme in South Africa. **New Forests**, Heidelberg, v. 46, n. 4, p. 7-21, 2015.

- TELFER, E.J.; STOVOLD, G.T.; LI, Y.; SILVA-JUNIOR, O.B.; GRATTAPAGLIA, D.; DUNGEY, H.S. Parentage reconstruction in *Eucalyptus nitens* using SNPs and microsatellite markers: a comparative analysis of marker data power and robustness. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 10, n. 7, p.1-18, 2015.
- THU, P.Q.; DELL, B.; BURGESS, T.I. Susceptibility of 18 eucalypt species to the gall wasp *Leptocybe invasa* in the nursery and Young plantations in Vietnam. **ScientiaAsia**, Bangkok, v. 35, p. 113-117, 2009.
- WANG, M.L.; BARKLEY, N.A.; JENKINS, T.M. Microsatellite markers in plants and insects. Part I: Applications of Biotechnology. **Genes, Genomes and Genomics**, Bethesda, v. 3, n. 1, p. 54-67, 2009.
- WILCKEN, C. F.; LIMA, A. C. V.; DIAS, T. K. R.; MASSON, M. V.; FERREIRA FILHO, P. J.; POGETTO, M. H. F. A. D. **Guia prático de manejo de plantações de eucalipto**. Botucatu: FEPAF, 2008. 25 p. Disponível em: <<http://www.iandebo.com.br/pdf/plantioeucalipto.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2016.
- WRIGHT, J.W. **Introduction to forest genetics**. New York: Academic Press. 1976. 463 p.
- YAUN, H.; NIU, S.; EL-KASSABY, Y.A.; LI, Y.; LI, W. Simple genetic distance-optimized field deployments for clonal seed orchards based on microsatellite markers: As a case of Chinese pine seed orchard. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 11, n. 5, p. 1-15, 2016.

4 HERANÇA MENDELIANA, LIGAÇÃO GENÉTICA E DESEQUILÍBRIO GENOTÍPICO PARA LOCOS MICROSSATÉLITES EM *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE

4.1 Introdução

A contribuição da genética quantitativa clássica para alcançar o patamar de produtividade das florestas plantadas com *Eucalyptus* é incontestável. No entanto, nos últimos 25 anos, as possibilidades de progresso foram ampliadas em virtude do avanço tecnológico de marcadores moleculares, dos métodos de sequenciamento e da engenharia genética (HARFOUCHE et al., 2014; BARABASCHI et al., 2016). Os marcadores microssatélites (SSR) têm sido desde 1996, empregados como ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento genético e de conservação (BYRNE et al., 1996), provendo informações essenciais sobre os níveis de diversidade genética entre e dentro de populações, endogamia, tamanho efetivo populacional, sistema de reprodução e fluxo gênico (SPOLADORE et al., 2017).

Entre as espécies cultivadas em regiões de clima tropical, destaca-se *Eucalyptus urophylla*, utilizada comercialmente como pura ou em combinação híbrida, principalmente com o *E. grandis* (HODGE; DVORAK, 2015). A madeira pode ser utilizada na construção civil e, preferencialmente na indústria, para produção de celulose e carvão vegetal (WILCKEN et al., 2008). Entre as características favoráveis destacam-se: potencial produtivo, qualidade da madeira, capacidade de rebrota e resistência a doenças, como a ferrugem do eucalipto (*Puccinia psidii*), a murcha (*Ceratocystis fimbriata*) e os cancrios (*Chrysosporthe cubensis* e *Coniothyrium zuluense*) (CARVALHO et al., 1998; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS, 2011).

A preferência por marcadores SSR decorre principalmente da herança codominante e alto polimorfismo dos locos, permitindo acessar informações altamente relevantes (HOSHINO et al., 2012). Entretanto, é fundamental confirmar se os locos SSR empregados nas análises de genética de populações, são de fato, marcadores genéticos e, portanto, não sofrem distorções de segregação. Além disso, é importante verificar se existe ligação entre dois ou mais locos, a fim de contrariar o princípio da associação aleatória entre alelos de diferentes locos e evitar a geração de informações redundantes.

Assim, optou-se por verificar a herança mendeliana, a ligação genética e o desequilíbrio genotípico, entre 15 locos SSR em *E. urophylla*, para constituir um conjunto robusto de

marcadores genéticos, que permitirá obter com precisão os níveis de diversidade genética, os parâmetros do sistema de reprodução e as relações de parentesco entre indivíduos, em um programa de melhoramento genético dessa espécie.

4.2 Material e Métodos

Foram utilizados dois pomares de sementes por mudas de *Eucalyptus urophylla* (PSM) que possuem 25 anos de idade e um teste de progênes de segunda geração, todos instalados na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE), da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - FEIS/UNESP, no município de Selvíria-MS.

Os PSM são constituídos por: i) PSM-TPR-EU: 79 indivíduos adultos de 22 progênes (Tabela 1A); ii) PSM-TP-EU: 298 indivíduos adultos de 55 progênes (Tabela 2A), sendo que nesse pomar foram coletadas sementes em 23 árvores matrizes e produzidas as mudas, para estabelecer um teste de progênes de segunda geração (TP2G-TP-EU), que foi instalado em outubro de 2016, com 605 indivíduos, em número desbalanceado por progênie (9 a 30 indivíduos).

Para extração do DNA genômico total foram utilizados tecido cambial das árvores do PSM-TPR-EU e PSM-TP-EU e tecido foliar das mudas do TP2G-TP-EU, totalizando 982 indivíduos para caracterização genética.

A extração e purificação do DNA foi realizada com base no método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1991) e a amplificação ocorreu por meio de reação via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), com pequenas modificações no protocolo, conforme descrito em Faria et al. (2010) e Faria et al. (2011). A genotipagem dos microsatélites foi realizada em sistemas *multiplex*, com detecção de multi-fluorescência, em sequenciador automático capilar ABI 3100XL (Applied Biosystems). Os dados genotípicos brutos (eletroferogramas) foram exportados do sequenciador pelo programa Genotyper (Applied Biosystems) e ajustados para unidade utilizando o TANDEM (MATSCHINER; SALZBURGER, 2009).

O sistema *multiplex* baseia-se na amplificação, via PCR de um ou mais locos microsatélites, utilizando iniciadores específicos marcados com fluorocromos que flanqueiam o DNA; a separação e visualização dos fragmentos ocorrem em máquinas que permitem a detecção de fluorescência. As vantagens desse sistema incluem: rapidez e acurácia na geração de dados; avaliação simultânea de vários locos microsatélites em uma única pista de gel de eletroforese de alta resolução; geração e armazenamento de dados computadorizados, reduzindo a manipulação manual (SANSALONI, 2008).

Para genotipagem foram empregados marcadores microssatélites EMBRA - *Eucalyptus* Microssatélites Brasil (Tabela 4.1) (BRONDANI et al., 1998; BRONDANI et al., 2002; BRONDANI et al., 2006), que de acordo com Telfer et al. (2015), foram bem-sucedidos na atribuição de parentesco, confirmando o alto poder de exclusão quando utilizado um painel com número suficiente de marcadores microssatélites.

Tabela 4.1 - Características de 15 locos microssatélites para *Eucalyptus urophylla* utilizados para caracterização genética dos indivíduos.

Loco SSR	Sequências do <i>Primer</i>	Motivo	T _m	Pb
EMBRA2	5'-CGTGACACCAGGACATTAC-3' 5'-ACAAATGCAAATTCAAATGA-3'	(AG) ₁₅	56	121
EMBRA3	5'-AATTCAATTCATCCAAAGC-3' 5'-GATCGGATTGGAGGAGAC-3'	(AG) ₁₉	56	123
EMBRA10	5'-AGACAGTACGTTCTCTAGCTC-3' 5'-GTAAAGACATAGTGAAGACATTCC-3'	(CCT) ₃ (AG) ₁₄	56	95
EMBRA11	5'-GCTTAGAATTTGCCTAAACC-3' 5'-GTAAAATCCATGGGCAAG-3'	(AG) ₄ GG(AG) ₁₃	56	97
EMBRA12	5'-AGGATTTGTGGGGCAAGT-3' 5'-GTTCCCCATTTTCATGTCC-3'	(AG) ₂₂	56	98
EMBRA28	5'-CAAGACATGCATTTCTAGT-3' 5'-ACTCTTGATGTGACGAGACA-3'	(AG) ₂₅	56	178
EMBRA38	5'-GGTCTCTAGTGAAAATGTCG-3' 5'-ATACATCCATCAAAGCACAA-3'	(AG) ₁₁ (TA) ₄	56	126
EMBRA63	5'-CATCTGGAGATCGAGGAA-3' 5'-GAGAGAAGGATCATGCCA-3'	(AG) ₂₁	58	201
EMBRA128	5'-CCAAGTTTCGAGTGGTGA-3' 5'-CAAATGTCTTCTCCAACCAC-3'	(TC) ₂₅	58	110
EMBRA157	5'-TCTGGCTTCTTTCTTGTTG-3' 5'-TGCCAGAATGTATCGTCC-3'	(GT) ₁₆	56	150
EMBRA204	5'-CTCGTGTGGTTATGTGAACT-3' 5'-GCTTGTCTACTATGCACATGA-3'	(TC) ₂₅	56	147
EMBRA210	5'-CGTGTGGTTATGTGAACT-3' 5'-CCTAACAATGCATAAGCTC-3'	(TC) ₂₅	57	213
*EMBRA219	5'-GATTCCACTGCGGCCAGACA-3' 5'-CGAACGTAAGACTAGGTCCGAAGA-3'	(GA) ₁₇	57	268
*EMBRA333	5'-CTATTAGCCTGCAGTTGACC-3' 5'-GGATGTTTCATGTGACCTCCA-3'	(TC) ₇ AG(TC) ₅	56	218
EMBRA681	5'-GAGTTCATCGCCGAAGAGAG-3' 5'-TGGTTGACAAAGAACAGCCA-3'	(AG) ₁₃	56	205

Fonte: GenBank (NCBI) 07/04/2016. Pb: pares de base; T_m: temperatura de anelamento (°C). *Ausente para o PSM-TPR-EU.

Para investigar a herança mendeliana dos locos SSR foi empregado o método descrito

por Gillet e Hattemer (1989), que baseia-se na comparação do genótipo da árvore matriz heterozigota com a segregação em suas progênie de polinização aberta. Esse método assume que todos os locos possuem segregação regular e seus alelos seguem os padrões de herança Mendeliana, que baseia-se nas principais condições: i) segregação meiótica regular durante a produção de óvulos; ii) fertilização aleatória de óvulos por cada um dos tipos de pólen; iii) ausência de viabilidade seletiva diferencial nas progênie antes da investigação por marcadores genéticos. O modelo também assume que existe uma relação de codominância entre todos os alelos. O método requer, ainda, que toda progênie de uma árvore, deve possuir um alelo materno e no caso de uma árvore matriz heterozigota (A_iA_j , $i \neq j$) são necessários os seguintes requisitos: a) cada indivíduo dentro da progênie deve possuir um alelo materno, A_i ou A_j ; b) o número de progênie heterozigotas A_iA_j (n_{ij}) deve ser igual a soma das progênie homozigotas A_iA_i (n_{ii}) e A_jA_j (n_{jj}), ou $n_{ij} = n_{ii} + n_{jj}$; c) o número de progênie heterozigotas A_iA_k (n_{ik}) deve ser igual ao número de progênie heterozigotas A_jA_k (n_{jk}), ou $n_{ik} = n_{jk}$, ou seja, $k \neq i, j$. A segregação observada de cada progênie de árvore matriz heterozigota para um dado loco foi estatisticamente comparada com a hipótese de segregação esperada de 1:1, por meio da aplicação do teste G de máxima verossimilhança (SOKAL; ROHLF, 1981). Foram utilizadas as seguintes expressões para calcular o teste G:

$$G = 2 \left[n_{ij} \ln \left(\frac{n_{ij}}{E(n_1)} \right) + (n_{ii} + n_{jj}) \ln \left(\frac{(n_{ii} + n_{jj})}{E(n_1)} \right) \right]$$

em que: $\ln$ é o logaritmo natural; $E(n_1)$ é o número esperado de genótipos descendentes A_iA_j (n_{ij}) e $A_iA_i + A_jA_j$ ($n_{ii} + n_{jj}$): $E(n_1) = 0,5(n_{ij} + n_{ii} + n_{jj})$, ou:

$$G = 2 \left[n_{ik} \ln \left(\frac{n_{ik}}{E(n_2)} \right) + n_{jk} \ln \left(\frac{n_{jk}}{E(n_2)} \right) \right]$$

sendo que: $E(n_2)$ é o número esperado de genótipos para os alelos A_iA_k (n_{ik}) e A_jA_k (n_{jk}): $E(n_2) = 0,5(n_{ik} + n_{jk})$. Para evitar falsos positivos, o teste G foi determinado somente quando n_1 e n_2 foram ≥ 10 , e o desvio do teste G entre a segregação esperada e a observada foi determinada como estatisticamente significativa usando a correção de Bonferroni para múltiplas comparações (95%, $\alpha = 0,05$).

Para determinar se dois locos diferentes estavam geneticamente ligados foi realizado o

teste entre pares de locos, empregando informações genéticas de árvores matrizes duplamente heterozigotas (A_iA_j , B_lB_m) e observando-se a segregação em suas progênie. Nesse caso, a hipótese nula (H_0) refere-se à segregação Mendeliana regular de 1:1:1:1, que foi aceita ou rejeitada com base no teste G de máxima verossimilhança (SOKAL; ROHLF, 1981), realizado para cada progênie, conforme a equação:

$$G = 2 \left[n_{il} \ln \left(\frac{n_{il}}{E(n_e)} \right) + n_{im} \ln \left(\frac{n_{im}}{E(n_e)} \right) + n_{jl} \ln \left(\frac{n_{jl}}{E(n_e)} \right) + n_{jm} \ln \left(\frac{n_{jm}}{E(n_e)} \right) \right]$$

em que: n_{il} , n_{im} , n_{jl} e n_{jm} , são os números observados de genótipos A_iB_l , A_iB_m , A_jB_l e A_jB_m , respectivamente; $E(n_e)$ é o número esperado de cada genótipo A_iB_l , A_iB_m , A_jB_l e A_jB_m , calculado por: $E(n_e) = 0,25(n_{il} + n_{im} + n_{jl} + n_{jm})$. Novamente, aplicou-se a correção de Bonferroni (95%, $\alpha = 0,05$) para múltiplas comparações, a fim de evitar falsos positivos.

Por fim, o desequilíbrio genotípico entre pares de locos foi realizado somente para as árvores adultas do PSM-TPR-EU e PSM-TP-EU, considerando 13 locos SSR comuns. O programa utilizado foi o FSTAT (GOUDET, 2002). As probabilidades do teste de significância foram obtidas por permutação de alelos entre indivíduos, associada a uma correção de Bonferroni (95%, $\alpha = 0,05$) para comparações múltiplas.

4.3 Resultados

Não foram detectados desvios de segregação Mendeliana 1:1 para 13 dos 15 locos microsatélites (86,6%), analisados em progênie de árvores matrizes heterozigotas de *Eucalyptus urophylla* (Tabela 4.2). Valores significativos foram verificados para pouquíssimos casos, como no loco EMBRA2 (18,29) da matriz 95 e no EMBRA63 (12,67) para o agrupamento da matriz 10 e 155. Dos 734 testes G utilizados para comparar os valores observados com os esperados, sob a hipótese de segregação Mendeliana 1:1:1:1, apenas 26 foram significativos (3,5%) (Tabela 4.3). Contudo, esses casos foram observados para diferentes progênie. Os resultados não apresentaram evidências sólidas de desequilíbrio genotípico (Tabela 4.4). Para os dois pomares de sementes, apenas 5,8% dos resultados entre pares de locos mostraram-se significativos. A maioria foi detectada no PSM-TP-EU (9,0%). Em ambos os pomares verificou a significância entre os locos EMBRA681 $\times$ EMBRA2 e EMBRA204 $\times$ EMBRA210.

Tabela 4.2 - Testes de herança mendeliana para 15 locos microssatélites em *Eucalyptus urophylla*.

(Continua)

Matriz	n_1	$n_{ij} : n_{ii} + n_{jj}$	G_1	n_2	$n_{ik} : n_{jk}$	G_2	Matriz	n_1	$n_{ij} : n_{ii} + n_{jj}$	G_1	n_2	$n_{ik} : n_{jk}$	G_2
EMBRA2							EMBRA12						
10, 21, 86	66	26:40	2,99	10	5:5	NE	10, 212	18	11:7	0,90	41	14:27	4,19
20, 45	40	18:22	0,04	20	15:5	5,25	20	11	6:5	NE	19	11:8	0,48
55	21	14:7	2,38	6	6:0	NE	45	18	10:8	0,22	12	7:5	NE
95	7	4:3	NE	23	21:2	18,29*	55	19	8:11	0,48	8	2:6	NE
104	17	7:10	0,53	8	8:0	NE	86, 95, 458, 2473	50	24:26	0,08	43	24:19	0,58
116	23	13:10	0,39	7	3:4	NE	101	26	16:10	1,40	4	0:4	NE
155	10	5:5	NE	20	14:6	3,29	104	7	5:2	NE	18	13:5	3,68
212, 2612	38	13:25	3,86	20	14:6	3,29	116	18	10:8	0,22	12	3:9	NE
214	11	2:9	NE	19	14:5	4,44	118	11	8:3	NE	17	4:13	5,02
EMBRA3							155, 2612	25	18:7	5,01	31	14:17	0,29
1	20	9:11	0,20	6	2:4	NE	214	6	2:4	NE	24	10:14	0,67
10, 86, 155	12	6:6	NE	67	46:21	9,56	533	11	8:3	NE	19	6:13	2,64
20, 2612	18	9:9	0	41	19:22	0,22	EMBRA28						
21, 513	9	0:9	NE	47	23:24	0,02	1	19	9:10	0,05	6	5:1	NE
45	6	1:5	NE	24	15:9	1,52	10	12	6:6	NE	18	4:14	5,88
55	4	2:2	NE	23	16:7	3,62	21	2	1:1	NE	24	8:16	2,72
95	3	1:2	NE	27	19:8	4,61	45	19	12:7	1,33	11	2:9	NE
104, 236	26	11:15	0,62	22	16:6	4,72	55	4	3:1	NE	23	10:13	0,39
116	11	3:8	NE	19	10:9	0,05	101	22	15:7	2,98	8	7:1	NE
EMBRA10							104	7	3:4	NE	18	11:7	0,90
533	19	9:10	0,05	11	5:6	NE	116	11	6:5	NE	19	8:11	0,48
2612	6	4:2	NE	22	11:11	0	155	17	5:12	2,97	13	8:5	NE
EMBRA11							212	2	0:2	NE	28	17:11	1,30
10	12	5:7	NE	18	9:9	0	214	10	0:10	NE	20	12:8	0,80
20	15	6:9	0,60	15	10:5	1,70	236	6	2:4	NE	17	9:8	0,06
45, 86	35	22:13	2,34	15	8:7	0,07	241	13	6:7	NE	16	8:8	0
55	16	11:5	2,31	11	2:9	NE	458	9	4:5	NE	21	13:8	1,20

Tabela 4.2 - Testes de herança mendeliana para 15 locos microssatélites em *Eucalyptus urophylla*.

(Continuação)

Matriz	n_1	$n_{ij} : n_{ii} + n_{jj}$	G_1	n_2	$n_{ik} : n_{jk}$	G_2	Matriz	n_1	$n_{ij} : n_{ii} + n_{jj}$	G_1	n_2	$n_{ik} : n_{jk}$	G_2
EMBRA38							EMBRA157						
21	7	0:7	NE	19	11:8	0,48	2612	18	4:14	5,88	9	4:5	NE
45	22	11:11	0	8	5:3	NE	EMBRA204						
55, 65, 95, 101, 104	95	47:46	0,01	37	18:21	0,23	10	18	6:12	2,04	12	7:5	NE
86, 118	14	10:14	NE	25	11:14	0,36	20, 2612	30	10:20	3,40	30	12:18	1,21
116, 241	42	23:19	0,38	18	7:11	0,90	21	5	4:1	NE	21	10:11	0,05
155	23	9:14	1,10	7	5:2	NE	45	23	7:16	3,62	7	4:3	NE
212	2	0:2	NE	27	10:17	1,84	95, 212	11	6:5	NE	48	17:31	4,14
214	18	5:13	3,68	10	5:5	NE	116	11	8:3	NE	19	6:13	2,64
EMBRA63							118	18	10:8	0,22	12	12:0	NE
10, 155	35	11:24	4,95	25	4:21	12,67*	155	19	7:12	1,33	11	6:5	NE
21, 45, 101, 118	103	65:38	7,16	13	10:3	NE	214, 533	36	17:19	0,11	24	18:6	6,28
55	21	7:14	2,38	6	2:4	NE	458	6	2:4	NE	24	9:15	1,52
95, 241	46	27:19	1,40	14	10:4	NE	EMBRA210						
104	6	1:5	NE	19	11:8	0,48	21	8	5:3	NE	19	8:11	0,48
2612	21	8:13	1,20	7	2:5	NE	45	18	12:6	2,04	13	7:6	NE
EMBRA128							55	7	5:2	NE	20	9:11	0,20
1, 116, 214	57	21:36	3,99	27	14:13	0,04	95	5	3:2	NE	23	8:15	2,16
10	6	0:6	NE	24	9:15	1,52	116	9	2:7	NE	22	7:15	2,98
21	16	4:12	4,19	10	4:6	NE	118	19	10:9	0,05	11	4:7	NE
118	11	3:8	NE	19	4:15	6,78	155	14	7:7	NE	16	9:7	0,25
212	23	5:18	7,80	7	4:3	NE	212	13	10:3	NE	15	6:9	0,60
EMBRA157							214	18	9:9	0	12	12:0	NE
20, 45, 118, 212	72	23:49	9,60	47	23:24	0,02	533	20	12:8	0,80	10	4:6	NE
21, 116	49	16:33	6,02	7	2:5	NE							
65	17	4:13	5,02	2	0:2	NE							
95	6	3:3	NE	24	17:7	4,30							
458	11	1:10	NE	19	8:11	0,48							

Tabela 4.2 - Testes de herança mendeliana para 15 locos microssatélites em *Eucalyptus urophylla*.

(Conclusão)

Matriz	n_1	$n_{ij} : n_{ii} + n_{jj}$	G_1	n_2	$n_{ik} : n_{jk}$	G_2	Matriz	n_1	$n_{ij} : n_{ii} + n_{jj}$	G_1	n_2	$n_{ik} : n_{jk}$	G_2
EMBRA219							EMBRA681						
1, 101	45	24:21	0,20	11	8:3	NE	10	11	2:9	NE	19	12:7	1,33
10	13	4:9	NE	17	7:10	0,53	45	19	13:6	2,64	11	3:8	NE
20, 21, 55, 116, 155, 2612	96	34:62	8,29	75	33:42	1,08	116	12	3:9	NE	18	10:8	0,22
45	17	12:5	2,97	13	4:9	NE	118	15	8:7	0,07	15	12:3	5,78
95	13	7:6	NE	17	6:11	1,49	155	20	12:8	0,80	10	1:9	NE
118	15	7:8	0,07	15	6:9	0,60	212	15	8:7	0,07	14	9:5	NE
214	12	4:8	NE	18	9:9	0	533	15	7:8	0,07	14	8:6	NE
236	15	8:7	0,07	8	4:4	NE	2612	9	3:6	NE	19	10:9	0,05
241	22	8:14	1,66	8	5:3	NE							
458	16	6:10	1,01	14	11:3	NE							
EMBRA333													
1	20	14:6	3,29	5	3:2	NE							
10	22	6:16	4,72	8	3:5	NE							
21	15	7:8	0,07	14	6:8	NE							
45, 2612	29	11:18	1,71	29	17:12	0,87							
101	23	16:7	3,62	7	5:2	NE							
116	11	2:9	NE	20	10:10	0							
155	19	9:10	0,05	11	11:0	NE							
214	7	0:7	NE	23	13:10	0,39							
241	22	9:13	0,73	8	2:6	NE							
533	24	10:14	0,67	6	0:6	NE							

Nota: n_1 e n_2 referem-se ao tamanho da amostra; G_1 e G_2 referem-se a estatística de máxima verossimilhança para a hipótese $n_{ij} = n_{ii} + n_{jj}$ e $n_{ik} = n_{jk}$, respectivamente, com um grau de liberdade. * Significativo após a correção de Bonferroni para $\alpha = 0,001$ (tabela $\chi^2 = 10,83$). NE = não estimado.

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 4.3 - Testes G para hipótese de segregação independente entre pares de locos microssatélites (1:1:1:1) em *Eucalyptus urophylla*.

(Continua)

Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G
EMBRA2×EMBRA28		EMBRA2×EMBRA11		EMBRA2×EMBRA63		EMBRA28×EMBRA3		EMBRA28×EMBRA10	
10	12,04	55	2,96	2612	5,61	214	0,58	55	0,80
21	3,97	86	1,46	EMBRA2×EMBRA12		236	1,26	86	0,95
45	5,26	104	9,28	10	2,87	241	5,33	101	2,31
55	0,25	116	3,70	20	3,58	458	0,24	104	8,73
86	3,19	155	6,67	21	2,46	2473	1,27	116	0,05
104	13,72	212	2,19	45	2,02	EMBRA28×EMBRA11		155	2,95
116	2,04	2612	4,27	55	6,15	1	2,82	212	1,07
155	6,43	EMBRA2×EMBRA10		86	2,60	10	11,05	214	23,68*
212	3,05	10	10,90	95	20,79*	21	1,87	236	9,23
214	4,69	20	7,50	104	10,58	45	3,82	241	4,34
EMBRA2×EMBRA3		21	3,67	116	3,61	55	1,30	458	1,93
10	9,57	45	2,78	155	7,48	86	0,30	2473	0,67
20	2,69	55	1,65	212	4,46	101	1,37	EMBRA28×EMBRA63	
21	2,69	86	5,60	214	5,99	104	3,31	10	31,82*
45	1,30	104	5,19	2612	1,79	116	3,00	21	4,23
55	8,02	155	7,09	EMBRA28×EMBRA3		155	4,53	45	3,61
86	6,62	212	1,94	1	1,37	212	1,76	55	6,34
95	21,19*	214	NE	10	11,57	214	0,58	101	0,95
104	16,94*	2612	1,51	21	5,20	236	9,74	104	4,34
116	1,19	EMBRA2×EMBRA63		45	3,89	241	4,36	155	15,37
155	7,77	10	19,51*	55	3,32	458	4,06	241	4,38
2612	1,98	21	5,54	86	2,89	2473	0,12	2473	5,27
EMBRA2×EMBRA11		45	4,89	101	1,11	EMBRA28×EMBRA10		EMBRA28×EMBRA12	
10	0,49	55	9,26	104	2,85	1	2,42	10	7,74
20	3,78	95	20,39*	116	1,53	10	11,97	21	6,28
21	2,43	104	5,36	155	5,44	21	7,59	45	3,38
45	1,17	155	10,62	212	1,62	45	3,03	55	1,96

Tabela 4.3 - Testes G para hipótese de segregação independente entre pares de locos microssatélites (1:1:1:1) em *Eucalyptus urophylla*.
(Continuação)

Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G
EMBRA28×EMBRA12		EMBRA3×EMBRA11		EMBRA3×EMBRA63		EMBRA3×EMBRA157		EMBRA11×EMBRA10	
86	0,20	86	1,48	45	6,57	21	3,18	55	2,97
101	0,49	104	10,39	55	5,56	45	2,16	65	0,88
104	2,61	116	2,40	95	7,34	65	0,67	86	3,25
116	0,37	155	17,28*	104	3,28	95	7,46	101	3,08
155	1,62	236	13,57	155	11,04	116	2,60	104	5,55
212	4,15	533	4,41	2473	3,23	236	7,90	155	2,47
214	0,79	2612	5,44	2612	1,74	2473	0,44	212	0,96
236	6,06	EMBRA3×EMBRA10		EMBRA3×EMBRA12		2612	2,57	236	15,98
458	2,87	1	0,73	10	4,27	EMBRA3×EMBRA204		241	2,11
2473	0,29	10	5,88	20	0,28	10	3,49	458	3,98
EMBRA28×EMBRA157		20	8,10	21	2,22	20	10,22	533	0,18
20	4,07	21	6,25	45	1,03	21	5,85	2612	1,79
45	3,01	45	6,95	55	5,27	45	4,59	EMBRA11×EMBRA63	
116	3,52	55	6,46	65	0,73	55	4,56	10	18,32*
212	4,58	65	0,45	86	4,72	86	9,77	21	8,69
236	5,15	86	5,94	95	8,26	95	8,17	45	4,79
458	2,70	104	2,60	104	5,89	116	1,43	55	11,37
2473	1,07	155	8,57	116	1,34	155	5,83	101	3,54
EMBRA3×EMBRA11		236	10,65	155	4,91	533	3,57	104	4,54
10	4,58	533	3,79	236	3,17	2612	5,20	118	1,65
20	0,07	2473	1,26	533	5,56	EMBRA11×EMBRA10		155	12,79
21	7,03	2612	0,80	2473	0,29	10	6,98	241	4,60
45	2,92	EMBRA3×EMBRA63		2612	1,12	20	6,88	2612	3,52
55	4,47	10	18,98*	EMBRA3×EMBRA157		21	6,79	EMBRA11×EMBRA12	
65	0,08	21	7,61	20	4,20	45	2,64	10	13,37

Tabela 4.3 - Testes G para hipótese de segregação independente entre pares de locos microssatélites (1:1:1:1) em *Eucalyptus urophylla*.
(Continuação)

Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G
EMBRA11×EMBRA12		EMBRA11×EMBRA157		EMBRA11×EMBRA219		EMBRA10×EMBRA12		EMBRA10×EMBRA204	
20	0,38	458	2,61	116	4,63	86	1,35	45	3,00
21	4,83	2612	0,53	118	6,34	101	2,13	55	2,75
45	0,81	EMBRA11×EMBRA204		155	0,88	104	1,83	86	9,11
55	3,33	10	1,96	236	10,04	155	3,49	155	1,73
65	0,62	20	1,00	241	0,69	212	5,04	212	3,87
86	3,82	21	2,83	458	11,61	214	NE	214	36,71*
101	2,87	45	1,79	2612	5,32	236	17,39*	458	4,86
104	1,36	55	2,03	EMBRA10×EMBRA63		458	8,66	533	2,43
116	15,08	86	6,09	10	30,24*	533	1,72	2612	0,80
118	10,56	116	5,34	21	8,80	2473	1,80	EMBRA10×EMBRA219	
155	4,43	118	7,17	45	8,03	2612	4,93	1	1,22
212	4,85	155	2,28	55	5,32	EMBRA10×EMBRA157		10	9,87
236	10,07	212	7,16	101	3,04	20	4,23	20	11,29
458	4,85	458	2,52	104	0,88	21	3,28	21	4,65
533	1,87	533	1,26	155	19,15*	45	1,57	45	9,38
2612	2,61	2612	0,84	241	6,93	65	0,98	55	3,26
EMBRA11×EMBRA157		EMBRA11×EMBRA219		2473	2,23	212	5,39	65	6,12
20	0,73	10	2,37	2612	2,15	236	22,45*	86	1,97
21	7,87	20	2,58	EMBRA10×EMBRA12		458	1,66	101	9,37
45	1,26	21	6,99	10	6,34	2473	0,57	155	4,56
65	0,90	45	3,00	20	6,01	2612	0,83	214	23,30*
116	3,08	55	2,99	21	3,89	EMBRA10×EMBRA204		236	12,52
118	2,69	65	2,16	45	0,84	10	7,03	241	5,56
212	6,05	86	0,13	55	1,19	20	4,70	458	8,80
236	16,23	101	3,42	65	0,91	21	9,32	2473	5,60

Tabela 4.3 - Testes G para hipótese de segregação independente entre pares de locos microssatélites (1:1:1:1) em *Eucalyptus urophylla*.
(Continuação)

Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G
EMBRA10×EMBRA219		EMBRA63×EMBRA12		EMBRA63×EMBRA219		EMBRA12×EMBRA157		EMBRA12×EMBRA219	
2612	3,89	155	12,93	101	1,97	116	3,03	20	20,13*
EMBRA10×EMBRA333		2473	4,73	118	11,98	118	2,40	21	5,18
1	2,96	2612	2,19	155	11,65	212	7,99	45	1,74
10	17,32*	EMBRA63×EMBRA157		241	5,40	236	13,02	55	2,19
21	6,59	21	8,90	2473	3,32	458	2,28	65	3,37
45	5,34	45	4,60	2612	4,22	2473	0,12	86	0,34
65	2,94	95	8,23	EMBRA63×EMBRA333		2612	1,74	95	0,20
86	6,40	118	0,83	10	25,43*	EMBRA12×EMBRA204		101	2,87
101	2,76	2473	5,69	21	9,59	10	0,33	116	2,85
155	9,21	2612	0,80	45	1,26	20	2,01	118	4,53
212	5,15	EMBRA63×EMBRA204		101	0,78	21	1,38	155	2,03
214	NE	10	8,50	155	16,11	45	1,46	214	0,88
241	6,11	21	2,86	241	13,84	55	1,72	236	1,13
533	2,03	45	8,61	2473	1,54	86	10,84	458	7,21
2473	1,01	55	5,17	2612	4,46	95	1,40	2473	4,72
2612	3,35	95	7,20	EMBRA63×EMBRA128		116	3,42	2612	1,48
EMBRA63×EMBRA12		118	7,45	10	15,54	118	11,78	EMBRA12×EMBRA333	
10	21,92*	155	15,17	21	6,69	155	1,74	10	1,48
21	3,75	2612	0,76	118	13,48	212	8,09	21	1,35
45	5,14	EMBRA63×EMBRA219		EMBRA12×EMBRA157		214	6,28	45	0,73
55	3,81	10	20,57*	20	1,23	458	5,48	65	5,17
95	6,59	21	4,48	21	1,36	533	2,71	86	4,44
101	2,35	45	6,00	45	0,06	2612	1,59	101	0,74
104	5,96	55	5,83	65	3,05	EMBRA12×EMBRA219		116	8,19
118	3,77	95	2,75	95	4,06	10	3,35	155	10,24

Tabela 4.3 - Testes G para hipótese de segregação independente entre pares de locos microssatélites (1:1:1:1) em *Eucalyptus urophylla*.
(Continuação)

Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G
EMBRA12×EMBRA333		EMBRA12×EMBRA38		EMBRA157×EMBRA333		EMBRA157×EMBRA210		EMBRA204×EMBRA333	
212	9,01	212	10,26	21	1,41	95	3,97	212	9,77
214	4,18	214	1,97	45	3,04	116	3,43	214	7,01
533	2,95	236	2,42	65	2,41	118	0,25	533	0,72
2473	1,54	EMBRA157×EMBRA204		116	5,48	212	10,00	2612	0,49
2612	10,73	20	4,01	212	5,92	EMBRA204×EMBRA219		EMBRA204×EMBRA128	
EMBRA12×EMBRA128		21	2,33	2473	1,02	10	1,23	10	3,21
10	2,08	45	2,37	2612	1,95	20	3,21	21	3,37
21	2,32	95	1,79	EMBRA157×EMBRA128		21	8,97	86	16,49*
86	1,66	116	1,44	21	5,38	45	9,77	116	6,20
116	2,62	118	4,23	116	1,98	55	2,02	118	6,62
118	17,19*	212	9,66	118	12,65	86	5,75	212	7,07
212	3,39	458	2,79	212	5,19	95	3,81	214	16,94*
214	12,83	2612	0,90	EMBRA157×EMBRA38		116	3,95	EMBRA204×EMBRA38	
EMBRA12×EMBRA38		EMBRA157×EMBRA219		21	3,25	118	10,97	21	1,74
21	7,83	20	0,56	45	0,47	155	3,04	45	5,21
45	0,57	21	1,53	65	1,10	214	12,61	55	0,51
55	0,73	45	4,01	95	5,94	458	9,77	86	11,22
65	0,31	65	2,89	116	1,72	2612	4,03	95	1,23
86	1,50	95	7,21	118	0,48	EMBRA204×EMBRA333		116	2,53
95	0,83	116	3,69	212	3,35	10	6,24	118	4,49
101	1,52	118	6,99	236	16,86*	21	3,15	155	3,23
104	6,68	236	10,03	EMBRA157×EMBRA210		45	4,14	212	6,81
116	1,52	458	16,27*	21	2,33	86	9,68	214	5,84
118	8,16	2473	3,76	45	0,67	116	5,33	EMBRA204×EMBRA210	
155	3,71	2612	4,47	65	4,59	155	10,75	21	8,72

Tabela 4.3 - Testes G para hipótese de segregação independente entre pares de locos microssatélites (1:1:1:1) em *Eucalyptus urophylla*.
(Continuação)

Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G
EMBRA204×EMBRA210		EMBRA219×EMBRA333		EMBRA219×EMBRA38		EMBRA219×EMBRA681		EMBRA333×EMBRA210	
45	3,72	45	3,50	101	4,33	118	7,99	45	0,97
55	12,14	65	6,22	116	4,60	155	4,24	65	6,85
86	5,29	86	4,17	118	7,82	2473	4,86	86	2,83
95	3,38	101	1,11	155	3,86	2612	9,10	116	13,28
116	7,97	116	3,25	214	5,19	EMBRA333×EMBRA128		155	5,24
118	8,56	155	11,38	236	0,23	1	0,30	212	7,84
155	3,53	214	9,03	241	1,57	10	5,04	214	11,37
212	8,48	241	2,50	EMBRA219×EMBRA210		21	2,81	533	0,90
214	14,94	2473	2,08	21	8,97	86	4,64	EMBRA333×EMBRA681	
533	1,74	2612	4,66	45	3,17	116	2,08	10	5,42
EMBRA204×EMBRA681		EMBRA219×EMBRA128		55	10,09	212	2,32	45	0,75
10	1,53	1	1,18	65	6,91	214	12,75	65	7,75
45	2,92	10	5,12	86	3,55	EMBRA333×EMBRA38		116	3,49
55	1,14	21	9,14	95	2,87	21	0,31	155	7,80
95	11,18	86	2,65	116	13,76	45	6,35	212	3,27
116	3,46	116	4,71	118	3,65	65	3,60	533	0,38
118	12,25	118	16,13	155	3,18	86	6,00	2473	4,32
155	1,05	214	12,12	214	13,16	101	1,80	2612	6,44
212	1,68	EMBRA219×EMBRA38		EMBRA219×EMBRA681		116	7,35	EMBRA128×EMBRA38	
533	0,07	21	2,56	10	1,40	155	8,86	21	5,58
2612	4,66	45	3,25	45	2,09	212	8,26	86	1,88
EMBRA219×EMBRA333		55	1,74	55	0,65	214	3,84	116	1,87
1	0,20	65	2,12	65	4,36	241	4,30	118	6,59
10	5,89	86	0,39	95	11,98	EMBRA333×EMBRA210		212	3,72
21	5,74	95	1,20	116	3,36	21	1,90	214	12,34

Tabela 4.3 - Testes G para hipótese de segregação independente entre pares de locos microssatélites (1:1:1:1) em *Eucalyptus urophylla*.
(Conclusão)

Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G	Matriz	G
EMBRA128×EMBRA210		EMBRA128×EMBRA681		EMBRA38×EMBRA210		EMBRA38×EMBRA681		EMBRA210×EMBRA681	
21	4,44	118	16,97*	116	13,66	95	12,36	95	9,33
86	3,44	212	1,73	118	3,17	116	0,75	116	6,97
116	8,44	EMBRA38×EMBRA210		155	1,30	118	5,13	118	2,88
118	11,07	21	1,74	212	5,69	155	2,57	155	1,46
212	2,35	45	0,27	214	10,27	212	4,49	212	1,27
214	15,41	55	0,53	EMBRA38×EMBRA681		EMBRA210×EMBRA681		533	0,06
EMBRA128×EMBRA681		65	5,31	45	0,58	45	0,53		
10	0,34	86	2,38	55	0,52	55	0,90		
116	1,15	95	2,08	65	2,42	65	8,47		

Nota: * Significativo após a correção de Bonferroni para $\alpha = 0,001$ (Tabela $\chi^2 = 16,27$). G refere-se ao teste de máxima verossimilhança para três graus de liberdade. NE = não estimado.

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 4.4 - Desequilíbrio genotípico entre pares de locos microssatélites EMBRA em árvores adultas de *Eucalyptus urophylla*, do PSM-TPR-EU (diagonal inferior) e PSM-TP-EU (diagonal superior).

	EMB2	EMB28	EMB3	EMB11	EMB10	EMB63	EMB12	EMB157	EMB204	EMB128	EMB38	EMB210	EMB681
EMB2	-	0,01090	0,00363	0,08419	0,37607	0,05406	0,16368	0,33718	0,32885	0,09829	0,31346	0,01068	0,00021*
EMB28	0,55449	-	0,07778	0,13120	0,12308	0,01111	0,00363	0,02308	0,07863	0,01239	0,17073	0,05449	0,13312
EMB3	0,01731	0,00278	-	0,08205	0,00385	0,00983	0,00128	0,00021*	0,00043	0,00812	0,00705	0,00192	0,03547
EMB11	0,66175	0,02970	0,06175	-	0,00406	0,08462	0,00299	0,31880	0,30299	0,14124	0,16453	0,12991	0,00641
EMB10	0,93462	0,48397	0,80321	0,45855	-	0,00556	0,10299	0,49017	0,11432	0,08868	0,00021*	0,02393	0,34979
EMB63	0,03718	0,18974	0,00534	0,27030	0,26538	-	0,27842	0,01987	0,22628	0,69380	0,04359	0,10043	0,08419
EMB12	0,14615	0,66731	0,04487	1,0000	0,08718	0,40342	-	0,00299	0,03376	0,11346	0,06132	0,04850	0,02778
EMB157	0,64017	0,10192	0,00919	0,00620	0,26410	0,06731	0,02885	-	0,02073	0,05000	0,02009	0,00256	0,01239
EMB204	0,01667	0,85128	0,03120	0,36731	0,76154	0,18568	0,85491	0,30855	-	0,13654	0,00171	0,00021*	0,00021*
EMB128	0,13889	0,00620	0,15085	0,03868	0,23974	0,21859	0,33226	0,39487	0,87286	-	0,00021*	0,18483	0,06944
EMB38	0,58932	0,30342	0,04444	0,56731	0,25833	0,88739	0,62115	0,75021	0,31346	0,27286	-	0,05983	0,00150
EMB210	0,06709	0,84167	0,02970	0,33739	0,53462	0,27970	0,83504	0,30726	0,00021*	0,86239	0,26560	-	0,00021*
EMB681	0,00021*	0,04103	0,10021	0,06261	0,04231	0,14530	0,93568	0,13355	0,64316	0,06026	0,71816	0,38590	-

Nota: *p*-valor representa a probabilidade de desequilíbrio genotípico após 4680 permutações de alelos entre indivíduos. Valores significativos (*) após aplicação da correção de Bonferroni: $p = 0,00021$ ($\alpha = 0,05$).

Fonte: Elaboração do autor.

4.4 Discussão

A segregação Mendeliana 1:1 em locos individuais foi confirmada para 13, dos 15 locos SSR. Valores significativos foram encontrados para casos isolados do EMBRA2 (matriz 95) e EMBRA63 (matrizes 10 e 155), onde verificou-se a desproporcionalidade dos alelos maternos segregados em suas progênes: na matriz 95 (110/132) dos 30 descendentes, 27 receberam o alelo 110 (90%); no caso das matrizes 10 e 155 (168/172), dos 30 descendentes, 30 (100%) e 26 (86,7%) receberam o alelo 172, indicando a ocorrência de distorções de segregação pré ou pós-zigóticos. Apesar disso, esses casos não representaram indícios de desrespeito da Herança Mendeliana. Portanto, os 15 marcadores SSR EMBRA funcionaram como marcadores genéticos. Casos semelhantes de segregação significativa foram encontrados por Carneiro et al. (2012), Danner et al. (2013) e Tambarussi et al. (2013). Desvios de segregação em poucos locos SSR de algumas famílias podem ser causados por erros de amostragem, pequeno tamanho da amostra de progênie, má interpretação do tamanho de alelos ou presença de alelos nulos (GILLET; HATTEMER, 1989).

O baixo número de testes G significativos, utilizados para verificar a hipótese de segregação independente entre pares de locos (1:1:1:1), indica que os locos não estão ligados e, portanto, segregam de modo independente. Os valores significativos foram observados para diferentes progênes e ocorreram com maior frequência entre os pares: EMBRA2 $\times$ EMBRA3, EMBRA2 $\times$ EMBRA63 e EMBRA204 $\times$ EMBRA128. De fato, as ligações significativas podem ser devidas a ligação genética verdadeira ou podem ser causadas por desvios da segregação Mendeliana 1:1 (MANUEL et al., 2015; MORAES et al., 2016), conforme observado para o EMBRA2 e EMBRA63. A importância da inexistência de ligação entre os locos refere-se aos modelos empregados nas análises de genética de populações, que assumem o princípio da segregação aleatória entre alelos de diferentes locos. Manuel et al. (2015) encontraram ligação genética entre os locos SSR Gam01 $\times$ Gam24, dos seis analisados em *Genipa americana*, e sugeriram a exclusão de um desses locos para dar continuidade aos estudos envolvendo o sistema de reprodução e parentesco.

Os resultados não indicam desequilíbrio genotípico. Para ambos os pomares de sementes, apenas 5,8% dos resultados entre pares de locos mostraram-se significativos, sendo a maioria (78%) detectado para o PSM-TP-EU, devido provavelmente ao parentesco que ocorre em parte das 298 árvores adultas e a representatividade desigual de indivíduos dentro das 55 progênes que restaram após o desbaste seletivo para formação do pomar. Em ambos os PSM, verificou-se significância entre os locos EMBRA681 $\times$ EMBRA2 e

EMBRA204 × EMBRA210. O desequilíbrio pode ser afetado por causas como seleção, recombinação, migração, redução do tamanho das populações, deriva genética e estrutura populacional (KUMAR et al., 2004). Tarazi et al. (2010) encontraram desequilíbrio genotípico entre todos os pares de locos em mudas de polinização aberta de *Copaifera langsdorffii*, provavelmente devido a herança dos alelos maternos. Entretanto, quando a estrutura de progênie foi rompida com a análise baseada em um pequeno número de sementes por progênie, poucos valores significativos de desequilíbrio genotípico foram detectados, apoiando o conceito que a herança dos alelos maternos produz desequilíbrio genotípico.

4.5 Conclusão

Os 13 locos SSR formam um conjunto robusto de marcadores genéticos, que permitem elucidar questões associadas à diversidade genética, sistema de reprodução e parentesco, o que permite prosseguir com as análises de genética de populações de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.

REFERÊNCIAS

- BARABASCHI, D.; TONDELLI, A.; DESIDERIO, F.; VOLANTE, A.; VACCINO, P.; VALÈ, G.; CATTIVELLI, L. Next generation breeding. **Plant Science**, Shannon, v. 242, p. 3-13, 2016.
- BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 97, n. 5, p. 816-827, 1998.
- BRONDANI, R.P.V.; WILLIAMS, E.R.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. **BMC Plant Biology**, Londres, v. 20, n. 6, p. 1-16, 2006.
- BYRNE, M.; MARQUEZ-GARCIA, M.I.; UREN, T.; SMITH, D.S.; MORAN, G.F. Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. **Australian Journal Botany**, Melbourne, v. 44, n. 3, p. 331-341, 1996.
- CARNEIRO, F.S.; LACERDA, A.E.B.; LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; KANASHIRO, M.; SEBBENN, A.M. Mendelian inheritance, linkage and genotypic disequilibrium in microsatellite loci isolated from *Hymenaea courbaril* (Leguminosae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 3, p. 1942-1948, 2012.
- CARVALHO, A.O.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; CARMO, M.G.F. Resistência de espécies, progênies e procedências de *Eucalyptus* à ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 139-147, 1998.
- DANNER, M.A.; RIBEIRO, J.Z.; ZANETTE, F.; BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. Mendelian segregation in eight microsatellite loci from hand-and-open-pollinated progenies of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 62, n. 1-2, p. 18-25, 2013.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.
- FARIA, D.A.; MAMANI, E.M.C.; PAPPAS JR, G.J.; GRATTAPAGLIA, D. Genotyping systems for *Eucalyptus* based on tetra-, penta-, and hexanucleotide repeat EST microsatellites and their use for individual fingerprinting and assignment tests. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 7, n. 1, p. 63-77, 2011.
- FARIA, D.A.; MAMANI, E.M.C.; PAPPAS, M.R.; PAPPAS JR, G.J.; GRATTAPAGLIA, D. A selected set of EST-Derived microsatellite, polymorphic and transferable across 6 species of *Eucalyptus*. **Journal of Heredity**, Oxford, n. 4, p. 512-520, 2010.
- GILLET, E.; HATTEMER, H.H. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity**, Londres, v. 63, p. 135-141, 1989.
- GOUDET, J. FSTAT. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate *F*-statistics. **Heredity**, Londres, v. 86, n. 6, p. 485-486, 1995.
- HARFOUCHE, A.; MEILAN, R.; ALTMAN, A. Molecular and physiological responses to abiotic stress in forest trees and their relevance to tree improvement. **Tree Physiology**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 1181-1198, 2014.

- HODGE, G.R.; DVORAK, W.S. Provenance variation and within- provenance genetic parameters in *Eucalyptus urophylla* across 125 test sites in Brazil, Colombia, Mexico, South Africa and Venezuela. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 11, n. 3, p. 11-57, 2015.
- HOSHINO, A. A.; BRAVO, J. P.; NOBILE, P. M.; MORELLI, K.A. Microsatellites as tools for genetic diversity analysis. In: CALISKAN, M. **Biochemistry, genetics and molecular biology: genetic diversity in microorganisms**. [S. l.], InTech, 2012. 382 p. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/genetic-diversity-in-microorganisms>>. Acesso em: 03 ago. 2017.
- KUMAR, S.; ECHT, C.; WILCOX, P.L.; RICHARDSON, T.E. Testing for linkage disequilibrium in the New Zealand radiate pine breeding population **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 108, n. 2, p. 292-298, 2004.
- MANUEL, R. O.; FREITAS, M.L.M.; TAMBARUSSI, E.V.; CAMBUIM, J.; MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A.M. Mendelian inheritance, genetic linkage, and genotypic disequilibrium at microsatellite loci in *Genipa Americana* L. (Rubiaceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.14, n. 3, p. 8161-8169, 2015.
- MATSCHINER, M.; SALZBURGER, W. TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 15, p. 1982-1983, 2009.
- MORAES, M.A.; KUBOTA, T.Y.K.; SILVA, E.C.B.; SILVA, A.M.; CAMBUIM, J.; MORAES, M.L.T.; FURLANI JUNIOR, E.; SEBBENN, A.M. Mendelian inheritance, linkage, and genotypic disequilibrium in microsatellite loci of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 3, p. 1-8, 2015.
- PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. **Programa de melhoramento genético de eucalipto da Embrapa Florestas: resultados e perspectivas**. Colombo: Embrapa Florestas., 2011. 64 p. (Séries Documentos, 214). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/898045/1/Doc214.pdf>>. Acesso em: 06 abr. 2017.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. New York: [s. n.], 1981. 776 p.
- SPOLADORE, J.; MANSANO, V. F.; LEMES, M. R.; FREITAS, L. C. D.; SEBBENN, A. M. Genetic conservation of small populations of the endemic tree *Swartzia glazioviana* (Taub.) Glaz. (Leguminosae) in the Atlantic Forest. **Conservation Genetics**, Berlim, v. 18, n. 5, p.1-13, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10592-017-0962-6>>. Acesso em: 06 abr. 2017.
- TAMBARUSSI, E.V.; VENCOVSKY, Y.R.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A.M. Mendelian inheritance, genetic linkage, and genotypic disequilibrium at nine microsatellite loci of *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 5442-5457, 2013.
- TARAZI, R.; SEBBENN, A.M.; MOLLINARI, M.; VENCOVSKY, R. Mendelian inheritance, linkage and linkage disequilibrium on microsatellite loci of *Copaifera langsdorffii* Desf. **Conservation Genetics Resources**, Berlim, v. 2, n. 1, p. 201-204, 2010.
- WILCKEN, C.F.; LIMA, A.C.V.; DIAS, T.K.R.; MASSON, M.V.; FERREIRA FILHO, P.J.; POGETTO, M.H.F.A.D. **Guia prático de manejo de plantações de eucalipto**. FEPAP, Botucatu, 2008, 25p. Disponível em: < <http://www.iandebo.com.br/pdf/plantioeucalipto.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2016.

5 DIVERSIDADE GENÉTICA, SISTEMA DE REPRODUÇÃO E PARENTESCO EM PROGÊNIES DE POLINIZAÇÃO ABERTA DE *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE

5.1 Introdução

A diversidade dos recursos genéticos vem sendo explorada desde os primórdios da agricultura para o desenvolvimento de cultivares novas e melhoradas. No entanto, a intensificação das atividades antrópicas poderá agravar situações de erosão genética (perda de diversidade genética), extinção de genes adaptados (perda de raças locais), sob o agravante e iminente efeito das alterações climáticas. Consequências importantes são derivadas da perda ou redução da diversidade genética, considerada como o pilar da biodiversidade e diversidade entre e dentro de populações, espécies e ecossistemas (GOVINDARAJ; VETRIVENTHAN; SRINIVASAN, 2015).

Apesar de reconhecer sua importância, pouco é compreendido sobre os padrões da diversidade genética, que influencia entre outros atributos, a performance individual, a capacidade de adaptação e a evolução de novas espécies (BANKS et al., 2013). Em programas de melhoramento, a diversidade genética atua em direção oposta aos ganhos de seleção e sua redução pode conduzir à deriva genética, enquanto a coancestria e endogamia, se acumulam entre gerações (FUNDA; EL-KASSABY, 2012).

A estrutura e distribuição da diversidade genética é mantida por padrões do sistema de reprodução, que depende de atributos como a biologia reprodutiva da espécie e a estrutura espacial da população (EWÉDJÈ; AHANCHÉDÉ; HARDY, 2017). Em geral, populações de espécies florestais apresentam alta diversidade genética, devido a predominância do sistema de reprodução por cruzamento e ao fluxo gênico entre populações, particularmente, ao movimento de pólen, que pode atingir longas distâncias (HAMRICK; GODT; SHERMAN-BROYLES, 1992; GAULI et al., 2014). No entanto, a escala espacial do fluxo gênico depende de uma variedade de fatores físicos e biológicos, responsáveis por determinar a quantidade e disponibilidade dos propágulos (pólen ou sementes), movimento, viabilidade e probabilidade de polinização bem-sucedida (KREMER et al., 2012).

Holliday et al. (2017) questionaram: “*Os genótipos em programas de melhoramento também constituem recursos para conservação?*”. Para esclarecer isso, é necessário checar a origem das progênies, principalmente quando se trata de espécies sujeita a forte depressão endogâmica, como é o caso do *Eucalyptus* (HEDRICK; HELLSTEN; GRATTAPAGLIA, 2016). Além disso, é fundamental entender as relações de parentesco entre plantas dentro de

progênes, porque o maior grau de relação entre indivíduos, resulta em maior frequência de alelos idênticos por descendência (IPD), que conduz à endogamia. O coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) mede a probabilidade de que dois alelos homólogos, aleatoriamente selecionados em dois indivíduos (x e y), sejam idênticos por descendência (LYNCH; WALSH, 1998). Encontrar um conjunto de indivíduos como genitores que possuem relações mínimas entre si e determinar os melhores pares de cruzamento, pode resultar em maior heterozigosidade média da próxima geração (WANG, 2011).

Para acessar as taxas de cruzamentos, autofecundação e fluxo gênico em pomares de sementes, pode-se utilizar as análises de parentesco com reconstrução de *pedigree* (EL-KASSABY; FUNDA; LIEWLAKSANEEYANAWIN, 2015). No melhoramento florestal, os profissionais buscam formar progênes com *pedigree* estruturado para testes, seleção e recombinação, empregando o método de seleção recorrente. Características que envolvem os delineamentos de cruzamento, englobam: i) fornecimento de estimativas precisas do valor genético para seleção de genitores; ii) produção de cruzamentos suficientes para seleção dos melhores indivíduos dentro das melhores progênes; iii) parâmetros genéticos quantitativos estimados com precisão para determinar o grau de controle genético, ambiental e a interação que influencia os caracteres sob seleção e; iv) controle da endogamia por meio da estrutura de *pedigree* (LAMBETH et al., 2001).

Assim, o objetivo desse capítulo foi verificar a diversidade genética, o sistema de reprodução e as relações de parentesco, em populações de polinização aberta de *Eucalyptus urophylla*. Especificamente, pretende-se responder as seguintes questões:

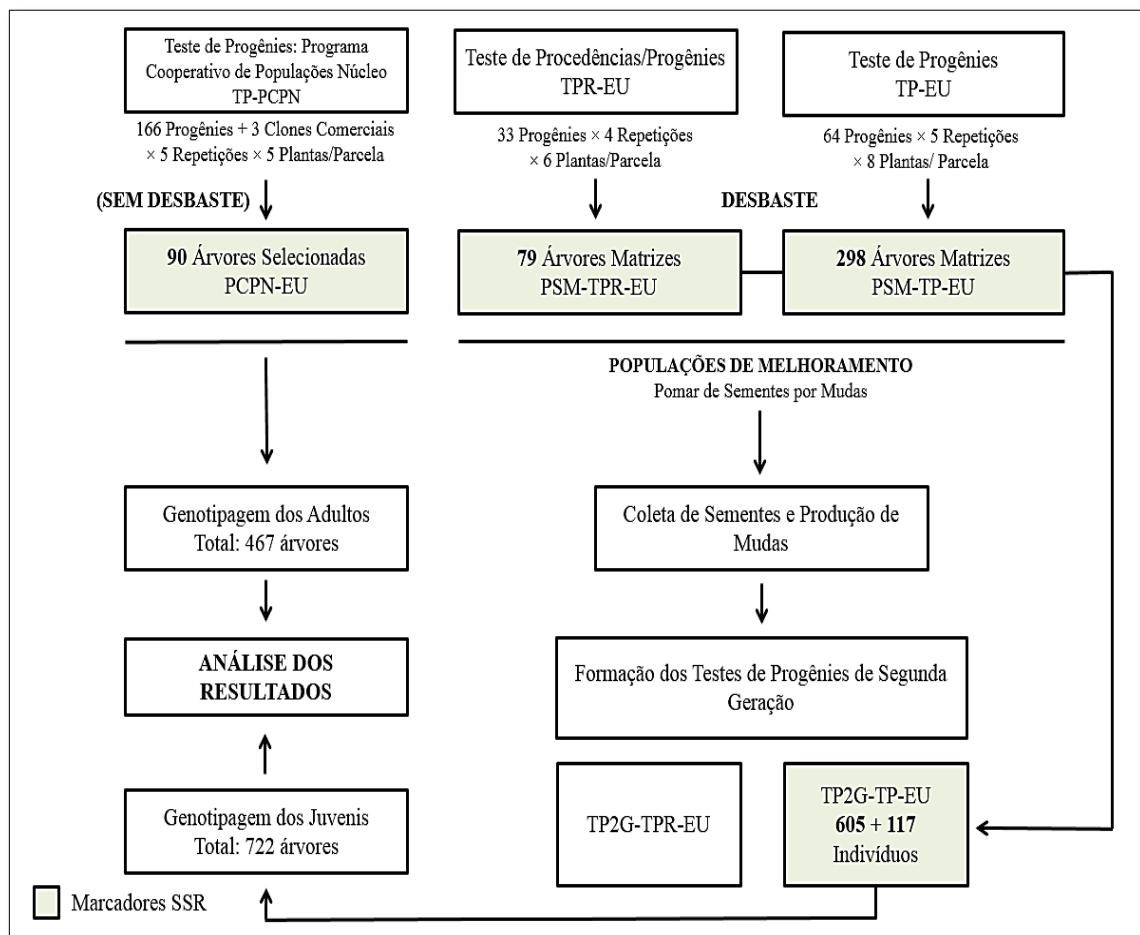
1. A diversidade genética é maior nos pomares de sementes por mudas ou no teste de progênes de segunda geração?
2. Qual a taxa de endogamia entre as duas gerações?
3. Qual é o tamanho efetivo do pomar de sementes e do teste de progênes?
4. Qual a taxa de cruzamento, cruzamento entre parentes e cruzamentos correlacionados no pomar de sementes e no teste de progênes?
5. Existe variação na taxa de cruzamento individual?
6. Existe contaminação por pólen externo no pomar de sementes?
7. Qual é o número médio de árvores doadoras de pólen, as proporções de diferentes parentescos e o coeficiente médio de coancestria?
8. Qual a implicação do coeficiente de coancestria na determinação da variância genética aditiva real?

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Material

Os genótipos que constituem as populações de polinização aberta são provenientes de dois pomares de sementes por mudas de *Eucalyptus urophylla* (PSM-TPR-EU e PSM-TP-EU), um teste de progênies de segunda geração (TP2G-TP-EU) e uma amostra dos melhores indivíduos de um teste de progênies, que compõe a rede experimental do Programa Cooperativo de Populações Núcleo (PCPN-EU), do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF. Todos os experimentos estão localizados no município de Selvíria-MS, na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE), que pertence a Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/UNESP). Um esquema das etapas do Programa de Conservação e Melhoramento Genético do *E. urophylla*, realizado na FEPE/FEIS/UNESP, destaca a formação do TP2G-TP-EU (Figura 5.1).

Figura 5.1 - Representação esquemática das etapas do Programa de Conservação e Melhoramento de *Eucalyptus urophylla*, estabelecido em Selvíria-MS.



Fonte: Elaboração da própria autora.

A) Pomares de sementes por mudas (PSM)

A base genética dos pomares de sementes de *E. urophylla* foi originada de um teste de progênes e procedências (TPR-EU) e um teste de Progênes (TP-EU), ambos instalados na FEPE/FEIS/UNESP e desbastados no 2º semestre de 2011 (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Caracterização da base genética que constitui as populações de polinização aberta: PSM-TPR-EU e PSM-TP-EU, em Selvíria-MS.

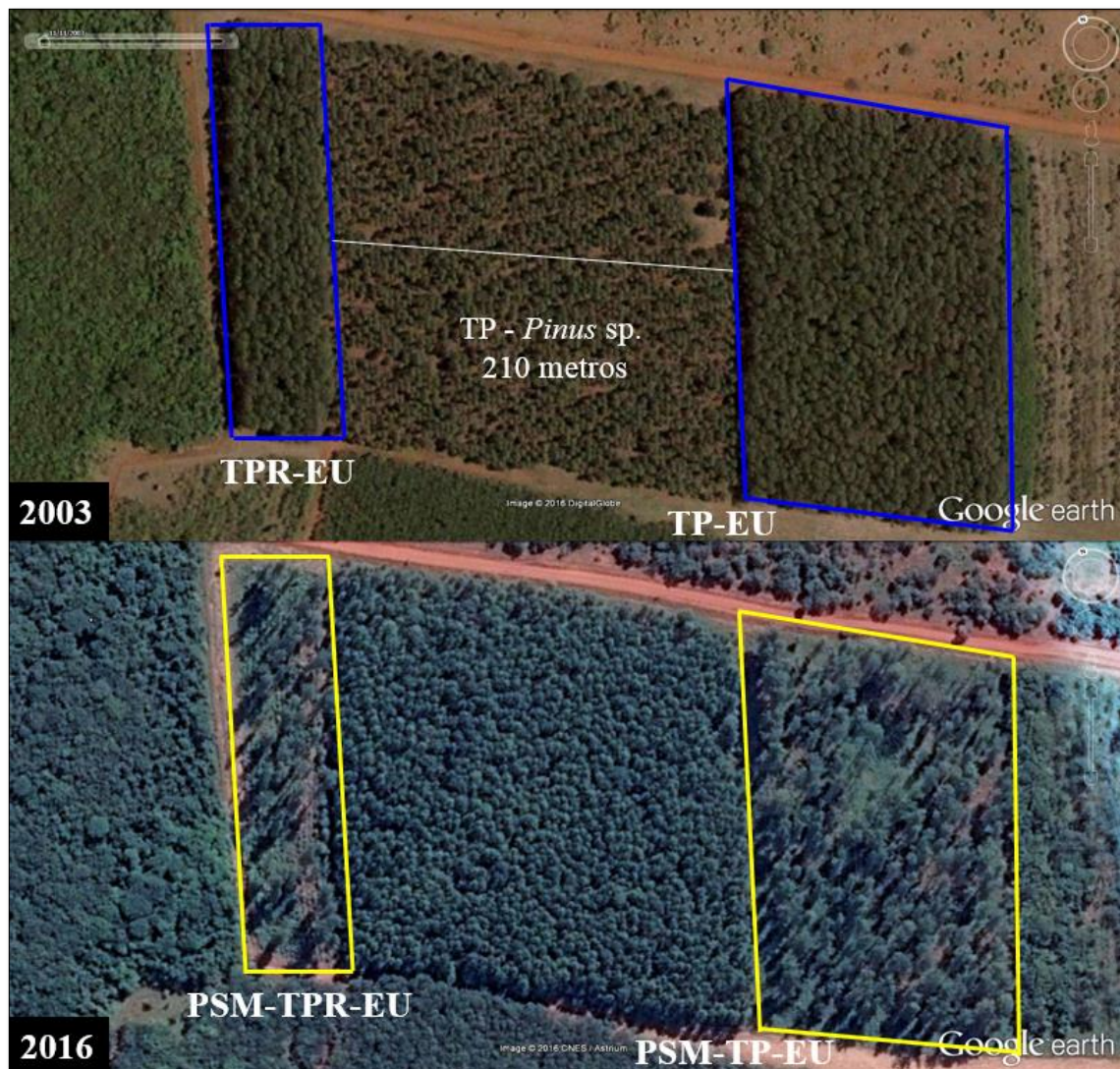
Antes do Desbaste	Teste de progênes e procedências	Teste de progênes
Identificação	TPR-EU	TP-EU
Instalação	Outubro de 1991	Março de 1992
Nº Progênes	33	64
Nº Procedências	2	1
Delineamento	Blocos casualizados	Látice 8 × 8 Quintuplo
Repetições	4	5
Plantas/Parcela	6	8
Espaçamento	3 m × 3 m	3 m × 3 m
Latitude	20°19'57"S	20°20'01"S
Longitude	51°24'22"O	51°24'13"O
Altitude	389 m	386 m
Após o desbaste (2011)	PSM-TPR-EU	PSM-TP-EU
Indivíduos	79	298
Nº Progênes	22	55
Média de Altura*	40,0 m	44,2 m
Média de DAP*	40,4 cm	39,4 cm
Média para DBM**	0,687 g cm ⁻³	0,612 g cm ⁻³
Apêndice	Tabela 1A	Tabela 2A
Croqui	Figura 1B	Figura 2B

DAP: Diâmetro a altura do peito (1,30 m do solo); DBM: densidade básica da madeira. *Dados mensurados aos 23 anos de idade; **Pupin et al. (2017). Fonte: Dados de Pesquisa da Autora.

A formação do teste de progênes e procedências (TPR-EU) foi realizada a partir da coleta em 26 árvores matrizes localizadas em Rio Claro-SP e 7 árvores matrizes em Três Lagoas-MS. Após o desbaste permaneceram apenas progênes de Rio Claro-SP. Para composição do teste de progênes (TP-EU) foram coletadas sementes de 64 árvores matrizes provenientes da Estação Experimental de Ciências Florestais, localizada em Anhembi-SP, que pertence ao Departamento de Ciências Florestais, da ESALQ/USP e que eram oriundas de uma população de florescimento precoce da Área de Coleta e Produção de Sementes da Ripasa S/A, como descreveu Zani Filho et al. (1990).

A transformação dos testes de progênes em PSM consistiu na realização de um desbaste seletivo realizado no segundo semestre de 2011 (ambos com 20 anos de idade), com base nos valores genéticos aditivos individuais para DAP (BLUP - *Best Linear Unbiased Prediction*). A forma do fuste das árvores foi obtida com base em escala de notas e considerada na seleção. O número de indivíduos selecionados, por família, foi variável. O termo “famílias” foi adotado para referir-se às progênes dos PSM’s (Tabela 3A). As áreas experimentais antes (2003) e depois do desbaste (2016) evidenciam a plantação de *Pinus*, espécies nativas, pasto e vegetação natural de cerrado, no entorno (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Localização dos testes de progênes e procedências (TPR-EU e TP-EU) e dos pomares de sementes por mudas (PSM-TPR-EU e PSM-TP-EU), de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.



Fonte: Google Earth (2017).

O solo foi classificado como LATOSSOLO VERMELHO Distrófico típico (EMBRAPA, 2013) e o tipo climático como Aw, conforme a classificação de Köppen, com verão quente e chuvoso e inverno ameno e seco. A temperatura média anual foi de 25,1°C e precipitação média anual de 1300 mm (SANTOS; HERNANDEZ, 2012).

A base genética dos PSM foi estabelecida sobre solo de cerrado, caracterizado pela elevada acidez, baixa disponibilidade nutricional (Tabela 5.2) e sujeita ao déficit hídrico, que pode durar até oito meses e atingir 490 mm ano⁻¹ (SANTOS; HERNANDEZ, 2012). Acrescido a isso, as árvores dos PSM não receberam adubação ou controle de pragas e doenças, desde a instalação dos testes de progênes/procedências até a seleção, sendo que foram providenciados cuidados eventuais com o controle de plantas daninhas e formigas cortadeiras. Em função disso, espera-se que essa base genética esteja adaptada às condições de estresses hídrico e nutricional, condizentes com características edafoclimáticas da região do Bolsão sul-mato-grossense.

Tabela 5.2 - Análise de solo realizada em julho de 2016 nos pomares de sementes por mudas de *Eucalyptus urophylla*, localizados em Selvíria-MS.

	PSM-TPR-EU	PSM-TP-EU
Fósforo – resina (mg dm ⁻³)	3	4
Matéria orgânica (g dm ⁻³)	17	17
pH CaCl ₂	4,4	4,5
Potássio (mmolc dm ⁻³)	0,5	0,4
Cálcio (mmolc dm ⁻³)	4	6
Magnésio (mmolc dm ⁻³)	8	7
Acidez Potencial (mmolc dm ⁻³)	42	38
Alumínio (mmolc dm ⁻³)	11	10
Soma de Bases (mmolc dm ⁻³)	12,5	13,4
CTC (mmolc dm ⁻³)	54,5	51,4
Saturação por bases (%)	23	26
Cálcio na CTC (%)	7	12
Magnésio na CTC (%)	15	14
Saturação por Alumínio (%)	47	43

CTC: Capacidade de troca catiônica. Legenda: Baixo; Médio; Alto. Fonte: Dados de Pesquisa da Autora.

B) Teste de Progênes do Programa Cooperativo de Populações Núcleo (PCPN-EU)

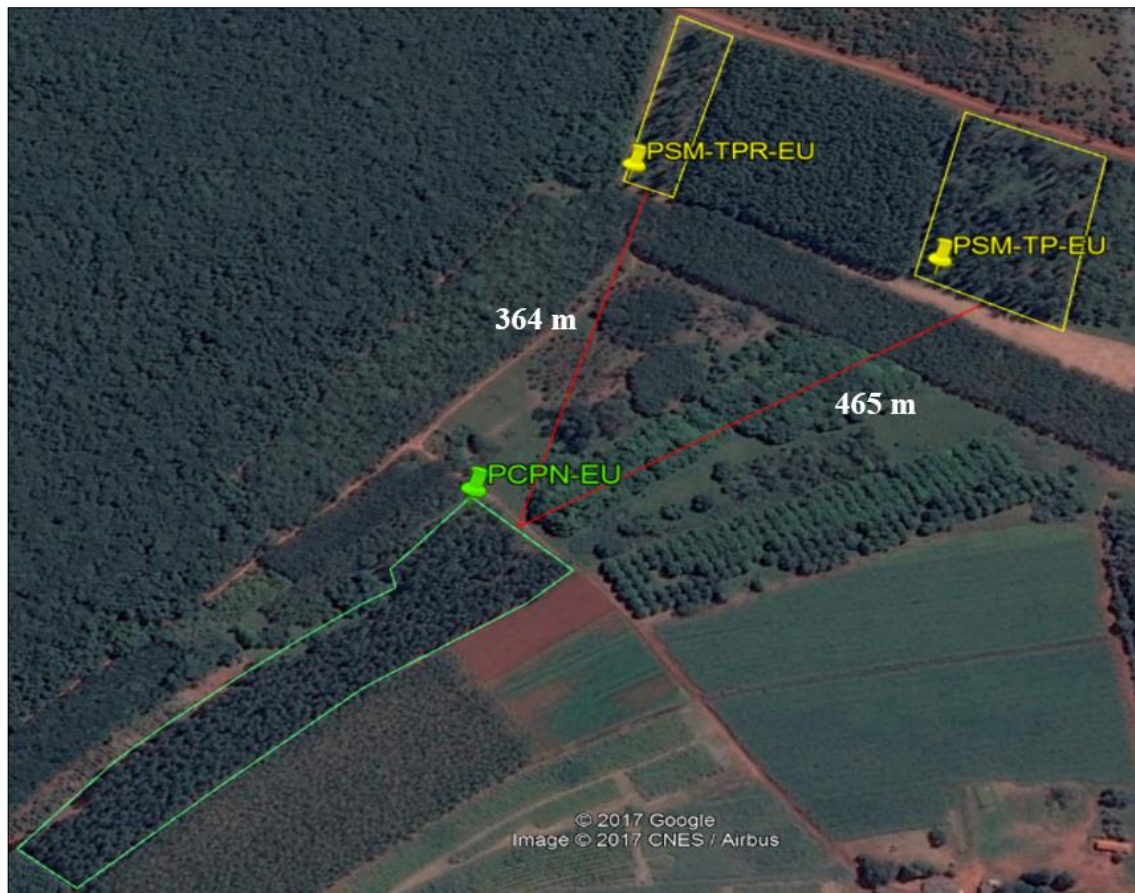
Foram selecionadas 90 árvores em um teste de progênes de polinização aberta de *E. urophylla*, que constitui parte da rede experimental do Programa Cooperativo de Melhoramento Florestal do IPEF, inicialmente identificado como Programa Cooperativo de Populações Núcleo (PCPN-EU). Esse teste de progênes foi instalado na FEPE/FEIS/UNESP,

em dezembro de 2009, com 166 famílias referente ao primeiro lote do Programa e três clones comerciais utilizados como testemunhas (H15, CO41H, P4295H). Foi adotado o termo “famílias” para referir as progênies do PCPN-EU (Tabela 3A). O delineamento empregado foi o de blocos casualizados, com cinco repetições e cinco plantas por parcela, no espaçamento de 3,0 m × 2,5 m. O local onde encontra-se instalado apresenta as seguintes coordenadas geográficas: 20°20'15,6"S; 51°24'26,4"O e altitude de 375 m.

Para compor uma amostra dessa população foram selecionados aos seis anos e quatro meses de idade, 87 indivíduos de 36 progênies (21,7%), em número variável de indivíduos, por progênie. Além desses, foram coletadas folhas de cada clone comercial (3) (Tabela 4A). As árvores foram selecionadas com base no DAP e nos maiores valores genéticos aditivos individuais (BLUP).

A média geral para altura das árvores do PCPN-EU aos seis anos e quatro meses de idade foi de aproximadamente 19,8 m e o intervalo de variação foi de 1,9 a 31,2 m. Para DAP a média foi de 15,9 cm e o intervalo de variação foi de 1,3 a 35,5 cm. A sobrevivência dos indivíduos foi baixa (< 48%), o que permite assemelhar esse teste de progênies como um pomar de sementes por mudas que passou por um desbaste natural. Como existe a possibilidade do PSM-TP-EU e PSM-TPR-EU não estarem isolados reprodutivamente, isso incentivou a formação e caracterização genética dessa amostra de indivíduos do PCPN-EU (Figura 5.3).

Figura 5.3 - Localização e distância entre as populações de polinização aberta de *Eucalyptus urophylla*: PSM-TPR-EU, PSM-TP-EU e PCPN-EU, em Selvíria-MS.



Fonte: Google Earth (2017).

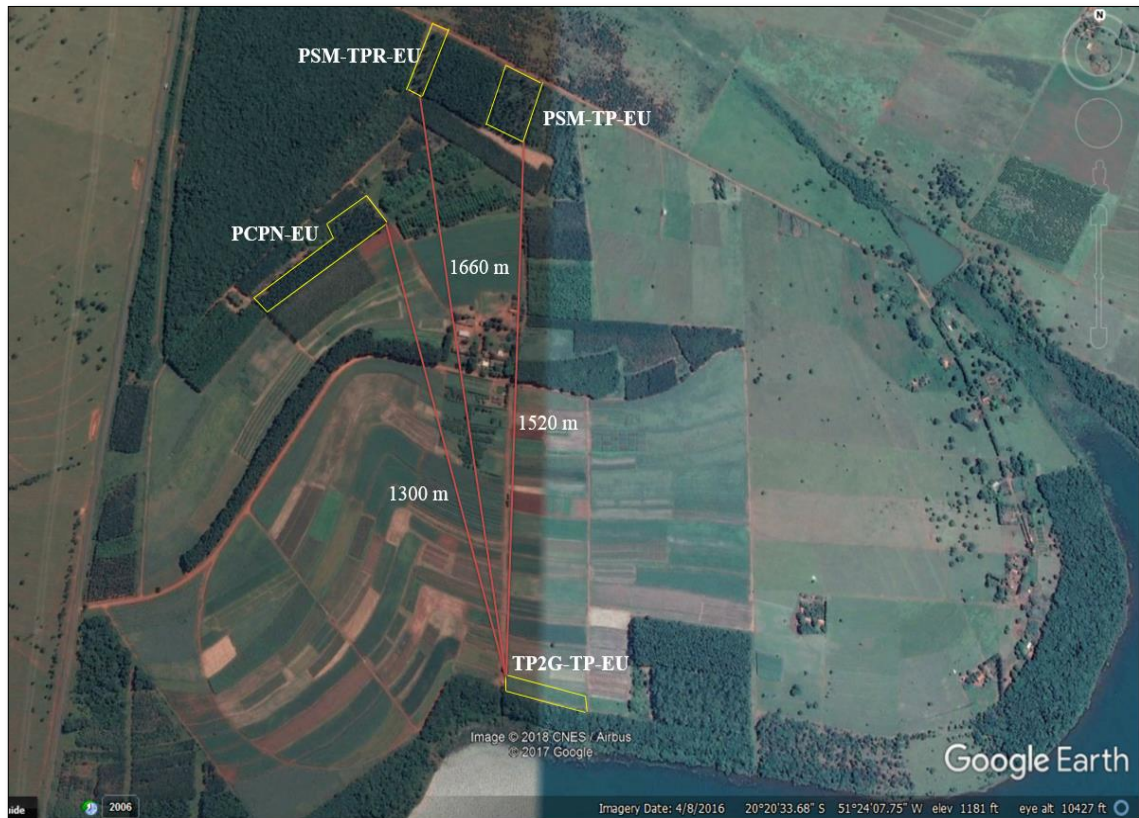
C) Teste de progênies de segunda geração (TP2G-TP-EU)

Para instalação do teste de progênies de segunda geração de *E. urophylla* (TP2G-TP-EU) foram coletados frutos em 23 árvores matrizes do PSM-TP-EU. Em razão da frutificação escassa para espécie na região no momento da coleta (fevereiro 2016), não foi possível coletar frutos nos melhores indivíduos dentro das melhores famílias. Dessa forma, priorizou-se a coleta em árvores matrizes de famílias diferentes, com a finalidade de minimizar o parentesco (Tabela 5A). A produção de mudas foi realizada no viveiro da Eldorado Brasil, localizado no município de Andradina-SP. Em 5 de outubro de 2016, foi instalado o TP2G-TP-EU na FEPE/FEIS/UNESP (Figura 5.4).

As características edafoclimáticas da área experimental são similares as descritas para os Pomares de Sementes. As coordenadas geográficas compreendem a latitude de 20°20'58" S e longitude de 51°24'04" O, com 339 m de altitude. Foram plantadas no campo 605 mudas

identificadas no viveiro, em delineamento de blocos casualizados, uma planta por parcela e 30 repetições, no espaçamento de 3,0 m × 1,5 m. Um mês após o plantio foi realizada a reposição de mudas que não sobreviveram no campo.

Figura 5.4 - Localização e distância entre o teste de progênies de segunda geração de *Eucalyptus urophylla* (TP2G-TP-EU) e os PSM's e o PCPN-EU, em Selvíria-MS.



Fonte: Google Earth (2017).

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Caracterização genética

A caracterização genética foi realizada em todos os indivíduos dos Pomares de Sementes (PSM-TP-EU = 298 e PSM-TPR-EU = 79), do teste de progênies de segunda geração (TP2G-TP-EU = 605), incluindo os indivíduos utilizados para replantio das mudas que morreram no campo (117), e da amostra do PCPN-EU (90), a totalizar 1189 indivíduos.

Para genotipagem foram empregados de 12 a 20 marcadores genéticos microssatélites. Doze locos comuns as populações e que não apresentaram desequilíbrio genotípico foram

utilizados para análises dos dados moleculares: EMBRA2, EMBRA28, EMBRA3, EMBRA11, EMBRA10, EMBRA63, EMBRA12, EMBRA157, EMBRA204, EMBRA128, EMBRA38 e EMBRA210. O EMBRA681 foi descartado devido a nova síntese do *primer* entre as etapas de genotipagem, resultando em deslocamentos do número de pares de bases acima do tolerável.

A caracterização genética e descrição dos marcadores SSR foram reportadas no item “Material e Métodos” do Capítulo I. A coleta de material biológico para caracterização genética dos indivíduos do PSM-TP-EU e PSM-TPR-EU, consistiu em lascas de casca viva (câmbio) e isso foi necessário devido à inibição da PCR, provavelmente causada pelo acúmulo de substância secundária nas folhas e/ou idade avançada das árvores (GRATTAPAGLIA, 2015, comunicação pessoal). Para o TP2G-TP-EU e PCPN-EU procedeu-se a coleta de quatro a seis folhas novas e saudáveis, que foram armazenadas em saco de papel tipo “pipoca” para transporte em caixa térmica (Figura 5.5). A genotipagem de todos os indivíduos foi realizada no Laboratório Heréditas/Genomax, localizado em Brasília-DF.

Figura 5.5 - Formação da cunha com a motosserra (A), retirada da lasca de casca viva (B), lasca de madeira contendo câmbio (C) e coleta e identificação de folhas novas para extração de DNA (D), de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.



Fonte: Elaboração da própria autora.

5.2.2.2 Análise dos marcadores microssatélites

I) Diversidade genética

A diversidade genética intrapopulacional foi investigada pelos índices: número de alelos por loco (k), riqueza alélica ($\hat{R}$), heterozigosidade observada ($\hat{H}_o$), heterozigosidade esperada ($\hat{H}_e$) nas proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e índice de fixação ($\hat{F}$). A significância de $\hat{F}$ foi obtida por permutação de alelos entre indivíduos. A partir das frequências alélicas (f) foram determinados por contagem os números de alelos raros ($f < 0,05$) e alelos privados. Para medir a divergência genética interpopulacional foi utilizado o índice padronizado $\hat{G}'_{ST}$, calculado de acordo com Hedrick (2005). Os parâmetros estimados e utilizados para o cálculo de $\hat{G}'_{ST}$ foram obtidos usando o programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995).

II) Sistema de reprodução

O sistema de reprodução foi caracterizado em nível populacional e de progênies, empregando os modelos do sistema misto de reprodução (RITLAND; JAIN, 1981) e de cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1989). As estimativas foram obtidas utilizando o programa MLTR 3.4 (RITLAND, 2002) e baseadas no método numérico “*Expectation Maximization*” (EM). O intervalo de confiança foi estimado a 95%, por meio de 1000 reamostragens *bootstrap*. As unidades de reamostragens foram as progênies em nível populacional e, indivíduos dentro de progênies, na análise em nível de progênies. As frequências do pólen e o índice de fixação da população parental foram obtidas na análise em nível populacional.

Os seguintes índices genéticos e demográficos foram obtidos pelo programa ou estimados de acordo com as expressões:

i) Taxa de cruzamento multiloco ($\hat{t}_m$);

ii) Taxa de cruzamento uniloco ($\hat{t}_s$);

iii) Taxa de cruzamento entre parentes ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$);

iv) Correlação de autofecundação ($\hat{r}_s$);

v) Correlação multiloco de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$);

vi) Número médio de árvores polinizadoras ($\hat{N}_{ep}$)

$$\hat{N}_{ep} = 1 / \hat{r}_{p(m)} \text{ (RITLAND, 1989);}$$

vii) Coancestria média dentro de progênies em nível populacional ($\hat{\Theta}$)

$$\hat{\Theta} = 0,125(1 + \hat{F}_p) \left[4\hat{s} + (\hat{t}_m^2 + \hat{s}\hat{r}_s\hat{t}_m)(1 + \hat{r}_p) \right] \text{ (SEBBENN, 2006);}$$

em que: $\hat{s}$ é a taxa de autofecundação ($\hat{s} = 1 - \hat{t}_m$) e $\hat{F}_p$ é o índice de fixação da população parental.

viii) Coancestria média em nível progênies ($\hat{\Theta}$)

$$\hat{\Theta} = 0,125(1 + \hat{F}_m) \left[4\hat{s} + \hat{t}_m^2(1 + \hat{r}_p) \right] \text{ (SEBBENN, 2006);}$$

em que: $\hat{F}_m$ é o índice de fixação da árvore matriz obtido pelo programa SPAGeDi 1.3 (HARDY; VEKEMANS, 2002), sendo que, valores negativos foram considerados como zero, visto que o estimador de coancestria foi derivado para o coeficiente de endogamia (varia de 0 a 1) e não para o índice de fixação (varia -1 a 1).

ix) Tamanho efetivo de variância ($\hat{N}_{e(v)}$) foi calculado com base em Cockerham (1969)

$$\hat{N}_{e(v)} = \frac{0,5}{\hat{\Theta} \left(\frac{n-1}{n} \right) + \left(\frac{1 + \hat{F}_o}{2n} \right)} \text{ (SEBBENN, 2006);}$$

em que: n é o tamanho amostral dentro das progênies e $\hat{F}_o$ é o índice de fixação de progênies, obtido com base na frequência de pólen para calcular a heterozigosidade esperada ($\hat{H}_e = 1 - \sum p_i^2$), a fim de evitar erros devido à superestimativas das frequências alélica para os alelos maternos. A heterozigosidade observada foi calculada por meio do índice de fixação obtido no FSTAT, para então, recalculer $\hat{F}_o$ ($1 - (\hat{H}_o / \hat{H}_e)$). Para estimar $\hat{N}_{e(v)}$ em nível populacional foi empregado a expressão de coancestria do item (vii) e em nível de progênies o item (viii).

x) Número de árvores matrizes para coleta de sementes ($\hat{m}$)

$$\hat{m} = \frac{\hat{N}_{e(referência)}}{\hat{N}_{e(v)}} \text{ (SEBBENN, 2002)}$$

assumindo reter na amostra total o tamanho efetivo de referência ($\hat{N}_{e(referência)}$) de 150.

xi) Proporção de progênes de irmãs de autofecundação ($\hat{P}_{IA}$)

$$\hat{P}_{IA} = \hat{s}^2 \text{ (SEBBENN, 2006);}$$

xii) Proporção de progênes de irmãs de autofecundação e cruzamento ($\hat{P}_{AC}$)

$$\hat{P}_{AC} = 2\hat{s}\hat{t}_m \text{ (SEBBENN, 2006);}$$

xiii) Proporção de progênes de meias-irmãs ($\hat{P}_{MI}$)

$$\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m^2(1 - \hat{r}_p) \text{ (SEBBENN, 2006);}$$

xiv) Proporção de progênes de irmãs completas ($\hat{P}_{IC}$)

$$\hat{P}_{IC} = \hat{t}_m^2\hat{r}_p \text{ (SEBBENN, 2006);}$$

xv) Coeficiente de endogamia devido autofecundação ($\hat{F}_s$)

$$\hat{F}_s = 0,5\hat{s}(1 + \hat{F}_m) \text{ (SEBBENN, 2006);}$$

sendo que: $\hat{F}_m$ é o coeficiente de endogamia da árvore matriz, em que valores negativos de $\hat{F}_m$ foram considerados como zero (varia 0 a 1).

xiii) Coeficiente de endogamia devido cruzamento entre parentes ($\hat{F}_{t_m-t_s}$)

$$\hat{F}_{t_m-t_s} = \hat{F}_o - \hat{F}_s \text{ (SEBBENN, 2006).}$$

III) Análise de paternidade e parentesco

Para conhecer o mais provável candidato a pai de um indivíduo do TP2G-TP-EU, conduziu-se a análise de paternidade, utilizando o método de máxima verossimilhança (MEAGUER, 1986; MEAGHER; THOMPSON, 1987), para comparar o genótipo das árvores adultas com o genótipo das mudas de 23 árvores matrizes conhecidas do PSM-TP-EU. Doze

locos SSR foram examinados para determinar a paternidade e foram considerados até três *mismatch* entre o trio: a muda, a árvore matriz e o putativo doador de pólen. O programa utilizado para análise foi o CERVUS 3.0 (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007). A paternidade de cada muda foi determinada pela estatística Δ , que é a diferença entre o LOD do candidato mais provável a pai, menos o segundo candidato mais provável a pai. O candidato a pai que apresentou um valor de Δ maior que o valor crítico de Δ , calculado por simulações (50000 repetições), foi considerado como o verdadeiro pai. Mudanças que apresentaram a mesma árvore materna como o provável parental paterno foram consideradas oriundas de autofecundação.

A estimativa da taxa de autofecundação (S) foi calculada como o número de progênies autofecundadas (n_s), dividido pelo número total de progênies amostradas (n_{total}). Mudanças que não tiveram nenhuma árvore identificada dentro do PSM-TP-EU como provável parental paterno ou que tiveram o candidato a pai determinado no PSM-TPR-EU ou PCPN-EU, foram assumidas como descendente de pólen migrante. A taxa de imigração de pólen (m) foi calculada como a proporção de mudas que não tiveram um parente paterno determinado dentro do PSM-TP-EU ($n_{imigrantes}$) relativo ao número de mudas amostradas (n_{total}) (BURCZYK et al., 1996).

Antes da transformação do teste de progênies em pomar de sementes por mudas, as árvores estavam distribuídas em espaçamento 3 m $\times$ 3 m. Em razão disso, não foi necessário obter as coordenadas geográficas e a distância de dispersão de pólen foi calculada com base na distribuição de pontos cartesianos (x e y) da posição da árvore matriz e do provável candidato a pai dentro do PSM-TP-EU, por meio da distância Euclidiana entre dois pontos. A área de vizinhança efetiva de polinização foi calculada assumindo uma área circular ao redor da árvore matriz, com base em Levin (1988): $\hat{A}_{ep} = 2\pi\sigma^2$, em que σ^2 é a variância da dispersão de pólen, que corresponde a área em que 63% dos doadores de pólen que cruzaram com a árvore matriz estão localizados.

Para cada família foi obtido o número de doadores de pólen (N_p) a partir dos resultados da análise de paternidade, pela contagem simples do número de parentais paternos contribuindo para formação das progênies. Do parâmetro N_p foi calculado a correlação de paternidade, como: $r_p = 1/N_p$. De posse da taxa de autofecundação (S), da correlação de paternidade (r_p) e do coeficiente de endogamia da árvore matriz ($\hat{F}_m$), foi estimado o coeficiente de coancestria média dentro de progênies (RITLAND, 1989). Como $\hat{F}_m$ das árvores matrizes foi

estimado com uma correlação que varia de -1 a 1, os valores negativos foram assumidos como zero ($\hat{F}_m$ variando de 0 a 1). O tamanho efetivo de variância foi obtido como previamente descrito na análise do sistema de reprodução.

As análises de parentesco entre pares de indivíduos foram conduzidas empregando-se o estimador multiloco do coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$), calculado de acordo com o método de J. Nason, descrito em Loiselle et al. (1995) e implantado no programa SPAGeDi 1.3 (HARDY; VEKEMANS, 2002). Esse método considera as frequências p_x e p_y do alelo k nos indivíduos x e y , além da frequência média do alelo na população parental ($\bar{p}_k$) e o tamanho amostral (n), conforme a equação:

$$\hat{\theta}_{xy} = \frac{\sum_{k=1}^K (p_x - \bar{p}_k)(p_y - \bar{p}_k)}{\sum_{k=1}^K \bar{p}_k(1 - \bar{p}_k)} + \frac{1}{2n-1} \quad (\text{LOISELLE et al., 1995});$$

As análises das relações de parentesco foram realizadas para as famílias dentro de populações, sendo que, o número de pares de coancestria entre indivíduos foi:

$$NP = \left[\frac{n(n-1)}{2} \right].$$

Famílias representadas por um ou dois indivíduos não foram analisadas. O

nível de parentesco também foi analisado entre a árvore matriz (PSM-TP-EU) e seus filhos (TP2G-TP-EU), entre a árvore matriz (PSM-TP-EU) e o mais provável candidato a pai (PSM-TP-EU, PSM-TPR-EU ou PCPN-EU) e entre pai e filho.

Adicionalmente, estimou-se o coeficiente de endogamia das progênies originadas de autofecundação e por cruzamento entre parentes, conforme os resultados da análise de paternidade. A taxa de cruzamento entre parentes (t_r) foi obtida pelo número de mudas originadas pelo cruzamento entre parentes (n_r) dividido pelo número de mudas originadas por cruzamentos (n_o), em casos de $\hat{\theta}_{xy} < 0,124$. Os viés das estimativas foram calculados seguindo

proposto por Wang (2011): $\frac{1}{k} \sum_{i=1}^k (\hat{\Theta}_i - \hat{\Theta})^2$; em que k é o número de estimativas, $\hat{\Theta}_i$ é a coancestria observada e $\hat{\Theta}$ a coancestria esperada.

A endogamia esperada em um indivíduo originado por autofecundação é de pelo menos 50%, conforme: $\hat{F}_s = 0,5(1 + \hat{F}_m)$; em que, $\hat{F}_m$ é o coeficiente de endogamia da árvore matriz

(0 a 1); e a endogamia esperada devido ao cruzamento entre parentes ($\hat{F}_r$) é igual ao coeficiente de coancestria entre os pais cruzados ($\hat{F}_r = \hat{\theta}_{xy}$) (LINDGREN; GEA; JEFFERSON, 1997).

IV) Correlação de Spearman

Para averiguar se existem associações entre índices do sistema de reprodução (em nível progênie) e os de diversidade genética foram obtidos os coeficientes de correlação de Spearman, especialmente para verificar se:

- i) O tamanho da amostra dentro de progênie (n) afeta os índices $\hat{t}_m$, $\hat{t}_m - \hat{t}_s$, $\hat{s} + (\hat{t}_m - \hat{t}_s)$, $\hat{N}_{ep}$, $\hat{\Theta}$, $\hat{F}_o$, $\hat{N}_e$, $\hat{H}_o$, $\hat{R}$;
- ii) A taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$) afeta $\hat{N}_{ep}$, $\hat{\Theta}$, $\hat{F}_o$, $\hat{N}_e$, $\hat{H}_o$, $\hat{R}$;
- iii) O número efetivo de polinizadores ($\hat{N}_{ep}$) interfere na $\hat{\Theta}$, $\hat{F}_o$, $\hat{N}_e$, $\hat{H}_o$ e $\hat{R}$;
- iv) A riqueza alélica ($\hat{R}$) afeta a $\hat{\Theta}$, $\hat{F}_o$, $\hat{N}_e$ e $\hat{H}_o$;
- v) A heterozigosidade observada ($\hat{H}_o$) interfere na $\hat{\Theta}$, $\hat{F}_o$, e no $\hat{N}_e$;
- vi) A taxa de autofecundação e taxa de cruzamento entre parentes [$\hat{s} + (\hat{t}_m - \hat{t}_s)$] afeta $\hat{F}_o$, $\hat{H}_o$ e $\hat{R}$;
- vii) A endogamia das progênie ($\hat{F}_o$) afeta $\hat{t}_m - \hat{t}_s$ e $\hat{N}_e$.

5.3 Resultados

5.3.1 *Diversidade genética*

- **PSM-TP-EU:** foram observados 153 alelos (k) nos 12 locos SSR, variando de 8 (EMBRA2) a 19 alelos (EMBRA3) (Tabela 5.3). Em geral, a riqueza alélica ($\hat{R}$) apresentou valores próximos a k , de forma que, tanto a heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) como a heterozigosidade observada, foram altas e apresentaram médias próximas ($\hat{H}_e = 0,793 \pm 0,091$; $\hat{H}_o = 0,764 \pm 0,092$). Valores positivos e significativos para o índice de fixação ($\hat{F}$) foram detectados para média da população e para o EMBRA2, EMBRA10 e EMBRA128, como indicativo de endogamia.
- **TP2G-TP-EU:** foram encontrados 149 alelos (Tabela 5.3) e a média do número de alelos foi semelhante ao PSM-TP-EU. A heterozigosidade esperada foi similar entre as gerações, diferentemente da heterozigosidade observada que foi inferior ($0,686 < 0,764$), principalmente para os locos EMBRA128 e EMBRA157. O índice de fixação apresentou valores positivos e significativos para média da população e para 75% dos locos, a indicar a existência de endogamia na geração descendente e aumento da homozigose.
- **PSM-TPR-EU:** o número de alelos foi elevado (138), principalmente se considerar o menor tamanho populacional (Tabela 5.3). Os valores de riqueza alélica foram próximos às demais populações. A heterozigosidade esperada foi elevada ($0,803 \pm 0,089$), assim como a heterozigosidade observada ($0,715 \pm 0,141$). Apenas dois locos apresentaram valores de $\hat{F}$ positivos e significativos (EMBRA3 e EMBRA128). Apesar disso, detectou-se um indicativo de endogamia para média da população ($0,110 \pm 0,140$).
- **PCPN-EU:** foi detectado um alto número de alelos (143) e a média foi próxima ao PSM-TPR-EU, que também apresenta menor número de indivíduos na população (Tabela 5.3). A riqueza alélica foi semelhante ou até mesmo superior para alguns locos em relação às demais populações. Nesse mesmo sentido, seguiram a heterozigosidade esperada e observada ($0,846 \pm 0,045$; $0,798 \pm 0,106$), sugerindo alta diversidade genética. Apesar disso, o índice $\hat{F}$ foi positivo e significativo para média da população.

Tabela 5.3 - Diversidade genética e índice de fixação em populações de polinização aberta de *Eucalyptus urophylla*, localizadas em Selvíria-MS.

	Adultos PSM-TP-EU (N = 298)					Progenies TP2G-TP-EU (n = 722)				
	k	$\hat{R}$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{F}$	k	$\hat{R}$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{F}$
EMBRA2	8	7,8	0,628	0,708	0,113*	7	6,8	0,608	0,706	0,139*
EMBRA28	15	14,8	0,845	0,898	0,059	15	14,5	0,807	0,893	0,096*
EMBRA3	19	17,9	0,859	0,882	0,026	19	14,1	0,820	0,876	0,064*
EMBRA11	10	9,4	0,725	0,771	0,060	9	8,4	0,753	0,756	0,004
EMBRA10	14	13,3	0,789	0,848	0,070*	14	13,6	0,776	0,857	0,095*
EMBRA63	10	8,5	0,606	0,572	-0,059	10	9,1	0,521	0,529	0,016
EMBRA12	12	11,8	0,878	0,860	-0,021	12	11,3	0,804	0,843	0,046
EMBRA157	15	13,8	0,822	0,867	0,052	14	11,7	0,623	0,839	0,258*
EMBRA204	13	11,8	0,832	0,811	-0,026	13	11,4	0,719	0,804	0,106*
EMBRA128	12	11,3	0,665	0,788	0,156*	11	10,1	0,469	0,774	0,394*
EMBRA38	13	11,3	0,779	0,748	-0,041	13	10,8	0,671	0,746	0,100*
EMBRA210	12	11,2	0,745	0,768	0,030	12	10,6	0,659	0,753	0,125*
Média	12,7	11,9	0,764	0,793	0,037*	12,4	11,0	0,686	0,781	0,122*
DP	2,9	2,8	0,092	0,091	0,064	3,1	2,3	0,115	0,099	0,108
Total	153	-	-	-	-	149	-	-	-	-
	Adultos PSM-TPR-EU (N = 79)					Adultos PCPN-EU (n = 90)				
	k	$\hat{R}$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{F}$	k	$\hat{R}$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{F}$
EMBRA2	8	8,0	0,423	0,569	0,256	9	8,7	0,667	0,747	0,107
EMBRA28	14	14,0	0,792	0,902	0,122	13	13,0	0,877	0,910	0,036
EMBRA3	15	15,0	0,754	0,895	0,158*	19	18,5	0,922	0,870	-0,060
EMBRA11	10	10,0	0,798	0,840	0,050	10	10,0	0,800	0,848	0,057
EMBRA10	13	12,9	0,797	0,767	-0,039	13	12,8	0,866	0,863	-0,004
EMBRA63	9	9,0	0,784	0,811	0,033	9	9,0	0,733	0,805	0,090
EMBRA12	12	11,9	0,810	0,823	0,016	12	12,0	0,900	0,892	-0,009
EMBRA157	14	13,9	0,861	0,860	-0,001	13	13,0	0,722	0,895	0,193*
EMBRA204	10	10,0	0,757	0,811	0,067	12	11,8	0,855	0,837	-0,022
EMBRA128	10	10,0	0,449	0,856	0,476*	9	8,7	0,567	0,819	0,308*
EMBRA38	12	11,9	0,645	0,739	0,127	13	12,7	0,833	0,840	0,008
EMBRA210	11	11,0	0,714	0,767	0,069	11	11,0	0,833	0,828	-0,006
Média	11,5	11,5	0,715	0,803	0,110*	11,9	11,8	0,798	0,846	0,057*
DP	2,20	2,2	0,141	0,089	0,140	2,8	2,7	0,106	0,045	0,104
Total	138	-	-	-	-	143	-	-	-	-

Nota: DP: desvio-padrão; *Significativo em nível de 5% (p -valor = 0,00104, obtido por 960 permutações).

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

Em geral, o número de alelos total e por loco foi elevado (Tabela 5.3). O EMBRA3 foi o marcador SSR mais informativo (15 a 19 alelos). Valores positivos e significativos de $\hat{F}$ foram detectados para o EMBRA128 em todas as população. A heterozigosidade esperada foi alta e indicou diversidade genética em nível de locos e de populações, sendo a maior média verificada para o PCPN-EU. Entre o PSM-TP-EU e o TP2G-TP-EU, em nível de $\hat{H}_e$ foi semelhante, ao contrário de $\hat{H}_o$. Em função disso, o índice de fixação foi maior na geração descendente.

A média de riqueza alélica ($\hat{R}$) variou pouco entre as populações: de 11,0 (TP2G-TP-EU) a 11,9 alelos (PSM-TP-EU), a indicar que a diversidade alélica entre elas foi baixa, ou seja, apesar dos diferentes tamanhos populacionais, a maioria dos alelos é compartilhada por todas as populações, porém com frequências distintas. Reforçando isso, a média do índice padronizado $\hat{G}_{ST}$ apresentou média de $0,390 \pm 0,234$ para as três populações de árvores adultas, portanto, 39% da diversidade genética encontra-se distribuída entre populações e a maior porção, refere-se à diversidade genética dentro de populações. Os índices entre pares de populações foram significativamente maior do que zero (Tabela 5.4), indicando que as populações são geneticamente distintas. Entre o PSM-TP-EU e o TP2G-TP-EU, o índice padronizado $\hat{G}_{ST}$ não foi significativo.

No que se refere aos alelos de baixa frequência ($f \leq 0,05$) foram encontrados: 89 alelos no PSM-TP-EU (58,2%); 84 no TP2G-TP-EU (56,4%); 70 no PSM-TPR-EU (50,7%) e 62 no PCPN-EU (44,6%). Entre eles, foram considerados como alelos de muito baixa frequência ($f \leq 0,01$): 28,1% no PSM-TP-EU; 36,9% no TP2G-TP-EU; 27,1% no PSM-TPR-EU e 17,7% no PCPN-EU. Apenas um alelo privado foi encontrado (PSM-TPR-EU) e pouquíssimos casos de alelos com ocorrência em 50% das populações foram observados (24 alelos). Como a maioria dos alelos é amplamente dispersa e a constituição alélica das populações semelhantes, não foi encontrado um forte indicativo de fluxo do pólen, a sugerir que o maior número de cruzamentos, que originou as sementes do TP2G-TP-EU, ocorreu dentro do próprio PSM-TP-EU.

Tabela 5.4 - Índice padronizado $\hat{G}_{ST}'$ para divergência genética entre as populações de polinização aberta de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.

	TP2G-TP-EU	PSM-TPR-EU	PCPN-EU
PSM-TP-EU	0,017±0,021 ^{ns}	0,356±0,252*	0,324±0,229*
TP2G-TP-EU	-	0,345±0,246*	0,341±0,222*
PSM-TPR-EU	-	-	0,209±0,193*

Nota: ^{ns} Não significativo; * Significativo em nível de 5% (p -valor = 0,0083, obtido por 120 permutações).

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

5.3.2 Sistema de reprodução

- **Nível populacional:** a taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$) no PSM-TP-EU foi alta e significativa (0,964) (Tabela 5.5). A diferença entre a taxa de cruzamento multilocos e unilocos foi significativamente maior zero ($\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,194$), indicando a ocorrência de cruzamentos entre indivíduos que são parentes. A correlação de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$) foi significativamente maior que zero, sugerindo que algumas progênies são irmãs-completas. O número efetivo de árvores polinizadoras foi moderado ($\hat{N}_{ep}$) e o tamanho efetivo dentro de progênies ($\hat{N}_{e(v)}$) foi inferior ao esperado para progênies de meias-irmãs ($3,02 < 4,0$). Dessa forma, para reter um tamanho efetivo de referência de 150, seria necessário que a coleta de sementes fosse realizada em no mínimo 50 árvores matrizes, para atender aos padrões de uma população idealizada. O coeficiente médio de coancestria ($\hat{\Theta}$) foi de 0,152, superior ao esperado para progênies de meias-irmãs ($\hat{\Theta} = 0,125$), a sugerir a ocorrência de outros níveis de parentesco. A proporção de irmãs de autofecundação foi baixa e considerada como zero. A maior proporção referiu-se a meias-irmãs (80%), sendo o restante de irmãs-completas (13%) e irmãs de autofecundação e cruzamento (7%).

Tabela 5.5 - Parâmetros do sistema de reprodução em nível populacional para o PSM-TP-EU de *Eucalyptus urophylla* (95% IC é o intervalo de confiança em nível de 95%).

Índices	Média (95% IC)
Número árvores matrizes: n_m	23
Número descendentes: n_d	30 (9 - 53)
Índice de fixação da população parental: $\hat{F}_p$	0,009 (0,000 - 0,019)
Índice de fixação dentro de progênie: $\hat{F}_o$	0,127 (0,065 - 0,189)
Taxa de cruzamento multiloco: $\hat{t}_m$	0,964 (0,936 - 0,985)
Taxa de cruzamento uniloco: $\hat{t}_s$	0,770 (0,701 - 0,849)
Taxa de cruzamento entre parentes: $\hat{t}_m - \hat{t}_s$	0,194 (0,136 - 0,235)
Correlação de autofecundação: $\hat{r}_s$	0,098 (0,048 - 0,128)
Correlação multiloco de paternidade: $\hat{r}_{p(m)}$	0,137 (0,067 - 0,219)
Número médio de árvores polinizadoras: $\hat{N}_{ep}$	7,3 (4,6 - 14,9)
Coancestria média entre e dentro de progênie ($\hat{\Theta}$)	0,152 (0,137 - 0,170)
Proporção de irmãs de autofecundação: $\hat{P}_{IA}$	0,00 (0,00 - 0,00)
Proporção de irmãs de autofecundação e cruzamento: $\hat{P}_{AC}$	0,07 (0,03 - 0,12)
Proporção de meias-irmãs: $\hat{P}_{MI}$	0,80 (0,76 - 0,82)
Proporção de irmãs completas: $\hat{P}_{IC}$	0,13 (0,06 - 0,21)
Tamanho efetivo dentro de progênie: $\hat{N}_{e(v)}$	3,02 (2,72 - 3,33)
Número matrizes para coleta: $\hat{m}$ ($\hat{N}_e = 150$)	50 (45 - 55)

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

• **Nível de famílias:** houve variação na taxa individual de cruzamento das progênie ($\hat{t}_m$) que foram coletadas no PSM-TP-EU (Tabela 5.6) e em alguns casos foram observados valores para taxa de cruzamento ($\hat{t}_m$) de 100%, a indicar ausência de autofecundação (Matrizes 10, 214, 241 e 458), em contraste ao obtido para Matriz 45. Em geral, o índice de fixação das árvores matrizes foram baixos, com exceção da 1, 101 e 2473. A taxa de cruzamento entre parentes ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) foi diferentemente maior que zero em todas as progênie, reforçando a ocorrência desse tipo de cruzamento. Assim, o coeficiente de endogamia devido ao cruzamento entre indivíduos parentes ($\hat{F}_{t_m - t_s}$) foi superior a endogamia originada de autofecundação ($\hat{F}_s$), com exceção da Matriz 45. A correlação de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$) foi significativamente maior do que zero para todas as progênie e variou de 0,04 (Matriz 533) a 0,58 (Matriz 101), sendo esses valores

relacionados ao maior (25,6) e menor (1,7) número efetivo de árvores polinizadoras ($\hat{N}_{ep}$). A coancestria foi superior a considerada para progênies de meias-irmãs em 100% das famílias e os maiores valores foram observados para Matriz 1 e 101 ($\hat{\Theta} > 0,250$). Para algumas famílias foram detectados baixos tamanhos efetivos (< 2), indicando fortes relações de parentesco. Apesar disso, 87% das progênies apresentaram valores intermediários ao considerado para irmãs-completas e meias-irmãs ($2 < N_{e(v)} < 4$).

Tabela 5.6 - Índices do sistema de reprodução e estrutura genética para progênieis do PSM-TP-EU de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.

Matriz	$\hat{F}_m$	n	$\hat{R}$	$\hat{H}_o$	$\hat{F}_o$	$\hat{F}_s$	$\hat{F}_{t_m-t_s}$	$\hat{t}_m \pm \text{DP}$	$\hat{t}_m - \hat{t}_s \pm \text{DP}$	$\hat{r}_{p(m)} \pm \text{DP}$	$\hat{N}_{ep}$	$\hat{\Theta}$	$\hat{N}_{e(v)}$
1	0,33	25	3,20	0,477	0,39	0,03	0,36	0,95±0,03	0,31±0,04	0,44±0,08	2,3	0,251	1,86
10	-0,15	50	5,26	0,733	0,07	0,00	0,07	1,00±0,00	0,11±0,02	0,08±0,01	11,9	0,136	3,49
20	-0,05	40	4,77	0,631	0,20	0,01	0,18	0,97±0,02	0,08±0,02	0,09±0,01	11,8	0,142	3,25
21	-0,19	26	4,46	0,734	0,07	0,01	0,06	0,98±0,00	0,08±0,02	0,18±0,05	5,7	0,150	3,03
35	-0,27	9	4,08	0,639	0,19	0,03	0,16	0,95±0,00	0,05±0,01	0,11±0,01	9,4	0,150	2,50
45	-0,11	31	3,91	0,696	0,11	0,11	0,01	0,79±0,07	0,08±0,05	0,15±0,05	6,7	0,195	2,42
55	-0,29	27	4,52	0,747	0,05	0,01	0,04	0,99±0,00	0,10±0,01	0,10±0,00	9,8	0,141	3,22
65	0,11	19	4,87	0,689	0,12	0,04	0,09	0,94±0,04	0,15±0,04	0,11±0,03	8,8	0,171	2,61
86	-0,13	20	3,91	0,646	0,18	0,03	0,15	0,94±0,04	0,07±0,03	0,15±0,04	6,8	0,157	2,80
95	0,09	37	4,50	0,720	0,08	0,00	0,08	0,99±0,01	0,11±0,02	0,12±0,04	8,4	0,155	3,03
101	0,38	32	2,99	0,509	0,35	0,08	0,27	0,88±0,05	0,35±0,05	0,58±0,08	1,7	0,295	1,63
104	0,21	25	4,24	0,670	0,15	0,01	0,14	0,98±0,00	0,13±0,02	0,19±0,06	5,3	0,184	2,51
116	-0,22	31	4,30	0,686	0,13	0,02	0,11	0,96±0,03	0,15±0,03	0,13±0,04	7,7	0,150	3,06
118	0,22	30	4,03	0,762	0,03	0,01	0,02	0,99±0,01	0,12±0,02	0,18±0,04	5,6	0,183	2,58
155	-0,23	36	4,68	0,713	0,09	0,00	0,09	0,99±0,00	0,13±0,03	0,10±0,04	10,5	0,139	3,33
212	-0,06	37	5,25	0,729	0,07	0,00	0,07	0,99±0,01	0,13±0,02	0,08±0,00	12,2	0,137	3,39
214	-0,18	53	4,92	0,707	0,10	0,00	0,10	1,00±0,00	0,07±0,01	0,09±0,01	11,6	0,136	3,47
236	-0,13	30	4,82	0,711	0,10	0,02	0,07	0,96±0,03	0,08±0,02	0,09±0,00	10,8	0,146	3,13
241	-0,16	34	4,97	0,783	0,00	0,00	0,00	1,00±0,00	0,07±0,01	0,10±0,01	10,5	0,137	3,39
458	0,07	45	5,13	0,765	0,03	0,00	0,03	1,00±0,01	0,08±0,01	0,09±0,01	11,8	0,145	3,27
533	0,09	44	4,34	0,594	0,24	0,06	0,18	0,89±0,05	0,09±0,04	0,04±0,02	25,6	0,173	2,74
2473	0,33	13	3,93	0,605	0,23	0,09	0,14	0,87±0,06	0,06±0,04	0,11±0,02	8,8	0,227	1,95
2612	-0,01	28	4,73	0,660	0,16	0,04	0,12	0,93±0,04	0,09±0,03	0,09±0,00	10,9	0,154	2,95

Nota: $\hat{F}_m$ e $\hat{F}_o$: índice de fixação das árvores matrizes e dentro de progênieis, respectivamente; n : tamanho amostral dentro de progênieis; $\hat{R}$: riqueza alélica; $\hat{H}_o$: heterozigosidade observada; $\hat{F}_s$: coeficiente de endogamia devido autofecundação; $\hat{F}_{t_m-t_s}$: coeficiente de endogamia devido ao cruzamento entre parentes; $\hat{t}_m$: taxa de cruzamento multilocus; $\hat{t}_m - \hat{t}_s$: taxa de cruzamento entre parentes; $\hat{r}_{p(m)}$: correlação de paternidade; $\hat{N}_{ep}$: número efetivo de doadores de pólen; $\hat{\Theta}$: coeficiente de coancestria e; $\hat{N}_{e(v)}$: tamanho efetivo de variância. DP é o desvio-padrão das estimativas. Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

Associações positivas e significativas foram encontradas entre vários índices de diversidade genética e sistema de reprodução (Tabela 5.7). A coancestria ($\hat{\Theta}$), o tamanho efetivo ($\hat{N}_{e(v)}$) e a riqueza alélica ($\hat{R}$) influenciaram 100% dos índices com que foram correlacionados. Outros índices que apresentaram a maioria das associações significativas foram a taxa de cruzamento ($\hat{t}_m$) e a taxa de autofecundação e cruzamento entre parentes ($\hat{s} + (\hat{t}_m - \hat{t}_s)$).

Tabela 5.7 - Correlação de Spearman entre índices de diversidade genética e do sistema de reprodução em nível de progênies para *Eucalyptus urophylla* do PSM-TP-EU.

	$\hat{t}_m$	$\hat{t}_m - \hat{t}_s$	$\hat{s} + (\hat{t}_m - \hat{t}_s)$	$\hat{N}_{ep}$	$\hat{\Theta}$	$\hat{F}_o$	$\hat{N}_{e(v)}$	$\hat{H}_o$	$\hat{R}$
n	0,553*	0,099	-0,325	0,601*	-0,538*	-0,327	0,666*	0,325	0,557*
$\hat{t}_m$	-	-	-	0,352	-0,755*	-0,769*	0,799*	0,761*	0,684*
$\hat{s} + (\hat{t}_m - \hat{t}_s)$	-	-	-	-	-	0,619*	-	-0,604*	-0,578*
$\hat{N}_{ep}$	-	-	-	-	-0,709*	-0,233	0,715*	0,226	0,788*
$\hat{F}_o$	-	-0,051	-	-	-	-	0,644*	0,995*	0,601*
$\hat{\Theta}$	-	-	-	-	-	-	-	0,584*	0,840*
$\hat{N}_{e(v)}$	-	-	-	-	-	-	-	0,633*	0,872*
$\hat{H}_o$	-	-	-	-	-	-	-	-	0,589*

Nota: n : tamanho da amostra; $\hat{t}_m$: taxa de cruzamento multiloco; $\hat{t}_m - \hat{t}_s$: taxa de cruzamento entre parentes; $\hat{N}_{ep}$: número de árvores polinizadoras; $\hat{N}_{e(v)}$: tamanho efetivo de variância dentro de progênies; $\hat{R}$: riqueza alélica; $\hat{H}_o$: heterozigosidade observada; $\hat{s} + (\hat{t}_m - \hat{t}_s)$: taxa de autofecundação e cruzamento entre parentes; $\hat{F}_o$: índice de fixação dentro de famílias; $\hat{\Theta}$: coancestria média de progênies. Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

5.3.3 Análise de parentesco dentro das populações

- **PSM-TP-EU:** coancestria entre todos os pares de indivíduos indicou que a maior proporção se refere a relações entre meios-irmãos (94,6%). Das 55 famílias que constituem o Pomar, 38 foram analisadas (Tabela 5.8). A média de $\hat{\theta}_{xy}$ foi de $0,119 \pm 0,075$ e o valor máximo superou o nível mínimo considerado para meias-irmãs (0,125) em quase todas as famílias, sendo que 47,4% delas apresentou níveis acima do estipulado para irmãs-completas (0,250). No entanto, não foi detectado parentesco entre indivíduos no grau de irmãos de autofecundação (0,500).

Tabela 5.8 - Média e desvio-padrão do coeficiente multiloco de coancestria entre pares de indivíduos ($\hat{\theta}_{xy}$) dentro de famílias do PSM-TP-EU, de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.

Famílias (38)	Pares de Indivíduos	$\hat{\theta}_{xy} \pm DP$	Máximo*
1	28	0,076±0,062	0,206
2	3	0,075±0,033	0,112
3	3	0,168±0,094	0,276
5	10	0,174±0,100	0,419
9	36	0,187±0,079	0,331
10	36	0,099±0,076	0,254
11	36	0,050±0,073	0,212
13	6	0,139±0,063	0,202
14	91	0,109±0,088	0,419
15	55	0,080±0,070	0,262
18	45	0,100±0,098	0,331
19	15	0,070±0,046	0,151
20	28	0,061±0,084	0,244
21	3	0,131±0,049	0,187
22	10	0,072±0,081	0,171
23	45	0,098±0,075	0,242
27	10	0,046±0,100	0,255
28	45	0,096±0,070	0,301
29	21	0,059±0,064	0,174
30	3	0,106±0,021	0,130
31	3	0,175±0,072	0,252
34	3	0,101±0,123	0,235
37	15	0,137±0,093	0,322
39	91	0,133±0,121	0,408
40	15	0,081±0,054	0,181
41	153	0,100±0,075	0,307
42	66	0,115±0,080	0,282
44	120	0,157±0,098	0,410
45	6	0,315±0,085	0,429
46	3	0,129±0,117	0,247
48	36	0,167±0,071	0,314
49	15	0,178±0,068	0,306
51	3	0,197±0,047	0,233
53	3	0,204±0,027	0,224
55	66	0,073±0,075	0,247
56	6	0,112±0,078	0,197
62	10	0,044±0,094	0,229
64	3	0,122±0,037	0,152
Média	-	0,119±0,075	0,259

Nota: * Máximo valor de coancestria obtido entre dois indivíduos dentro da família.

Fonte: Dados de Pesquisa da Autora.

- **TP2G-TP-EU:** o coeficiente de coancestria se sobressaiu para as progênies 1, 101 e 2473 (Tabela 5.9). Todas as médias foram superiores a 0,125, inclusive para as progênies em que a taxa de cruzamento foi de 100%. A média populacional foi alta e próximo ao considerado para irmãs-completas. Cerca de 60,9% das famílias ultrapassaram o valor de 0,500, indicando a existência de indivíduos de autofecundação e de cruzamentos endogâmicos.

Tabela 5.9 - Média e desvio-padrão do coeficiente multiloco de coancestria entre pares de indivíduos ($\hat{\theta}_{xy}$) dentro de famílias do TP2G-TP-EU, de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.

Progênies (23)	Pares de Indivíduos	$\hat{\theta}_{xy} \pm DP$	Máximo *
1	300	0,516±0,162	0,836
10	1225	0,178±0,095	0,473
20	780	0,189±0,087	0,568
21	325	0,152±0,096	0,445
35	36	0,193±0,090	0,481
45	465	0,253±0,100	0,548
55	351	0,170±0,068	0,423
65	171	0,320±0,108	0,561
86	190	0,190±0,098	0,475
95	666	0,235±0,089	0,499
101	496	0,579±0,158	0,901
104	300	0,256±0,091	0,497
116	465	0,199±0,095	0,518
118	435	0,248±0,090	0,688
155	630	0,186±0,088	0,457
212	666	0,197±0,089	0,576
214	1378	0,144±0,088	0,535
236	435	0,162±0,102	0,572
241	561	0,222±0,078	0,485
458	990	0,210±0,092	0,633
533	946	0,218±0,109	0,653
2473	78	0,403±0,134	0,734
2612	378	0,221±0,106	0,564
Média	-	0,245±0,100	0,570

Nota: * Máximo valor de coancestria obtido entre dois indivíduos dentro da progênie.

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

- **PSM-TPR-EU:** o número total entre pares de indivíduos indicou que 82,4% das relações entre indivíduos são de meios-irmãos e 17,6% de irmãos-completos. Das 22 famílias, 12 apresentaram mais de dois indivíduos para conduzir a análise de parentesco (Tabela 5.10). Nenhuma relação entre progênies de irmãs de autofecundação foi encontrada. Um terço das

famílias analisadas apresentou médias acima de 0,125 e valor máximo acima de 0,250, a indicar que existem relações entre irmãs-completas.

Tabela 5.10 - Média e desvio-padrão do coeficiente multiloco de coancestria entre pares de indivíduos ($\hat{\theta}_{xy}$) dentro de famílias do PSM-TPR-EU, de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.

Famílias (12)	Pares de Indivíduos	$\hat{\theta}_{xy} \pm DP$	Máximo*
6	36	0,164±0,102	0,379
8	6	0,113±0,069	0,201
11	28	0,121±0,083	0,372
12	3	0,025±0,063	0,079
13	15	0,103±0,105	0,285
15	3	0,041±0,021	0,064
17	3	0,123±0,138	0,278
18	6	0,122±0,053	0,172
20	15	0,126±0,087	0,312
22	15	0,130±0,115	0,307
23	21	0,163±0,081	0,339
25	3	0,095±0,118	0,231
Média	-	0,110±0,086	0,251

Nota: * Máximo valor de coancestria obtido entre dois indivíduos dentro da família.

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

- **PCPN-EU:** entre todos os pares de indivíduos dessa população, 85,4% das relações foram entre meias-irmãs e 14,6% entre irmãs-completas. Desconsiderando clones, entre as 36 famílias, 15 tiveram o parentesco dentro de progênie analisado (Tabela 5.11). Aproximadamente metade das famílias apresentaram médias abaixo da coancestria entre meias-irmãs, mas foram observados valores máximos acima desse nível para todas as progênies. Apesar de não ter sido encontrado o parentesco no grau de irmãs de autofecundação, por se tratar de uma amostra de indivíduos, essa relação não pode ser descartada dentro da população original, assim como a existência de maior proporção de irmãs-completas

Tabela 5.11 - Média e desvio-padrão do coeficiente multiloco de coancestria entre pares de indivíduos ($\hat{\theta}_{xy}$) dentro de famílias do PCPN-EU, de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.

Famílias (15)	Pares de Indivíduos	$\hat{\theta}_{xy} \pm DP$	Máximo *
17	3	0,072±0,088	0,165
52	3	0,109±0,050	0,161
59	6	0,080±0,105	0,234
66	6	0,095±0,075	0,229
74	6	0,151±0,073	0,245
75	10	0,171±0,051	0,266
82	21	0,127±0,102	0,410
89	3	0,124±0,073	0,198
92	6	0,132±0,103	0,308
98	10	0,107±0,075	0,234
108	6	0,252±0,105	0,407
114	3	0,200±0,101	0,307
139	6	0,131±0,081	0,209
163	6	0,098±0,030	0,132
166	10	0,193±0,065	0,310
Média	-	0,136±0,078	0,254

Nota: * Máximo valor de coancestria obtido entre dois indivíduos dentro da família.

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

5.3.4 Análise de paternidade, fluxo gênico e parentesco

Com a análise de paternidade foi possível determinar o mais provável candidato a pai de aproximadamente 99% dos indivíduos genotipados do TP2G-TP-EU. Foram detectados 519 cruzamentos, que geraram 660 descendentes de cruzamentos (n_o), dos quais 69 representaram o cruzamento entre parentes (n_r) e, 53 indivíduos, originados de autofecundação (n_s) (Tabela 5.12). A nomenclatura para identificação das matrizes inclui a família (Tabela 6A). A taxa de imigração foi de 11,9% e a maior proporção de pólen imigrante foi oriundo do PSM-TPR-EU (56,4%). Assim, o maior número de cruzamentos foi realizado dentro do próprio PSM-TP-EU (89,1%), sendo que a distância de dispersão de pólen variou de 3 a 206 m, com média de 74,9 metros. Contudo, devido à imigração de pólen que foi detectada, pode-se dizer que a distância de dispersão foi superior a menor distância verificada entre o PCPN-EU e o PSM-TP-EU (> 430 m). Dessa forma, para isolar reprodutivamente os PSM seria necessário manter uma distância superior a essa.

Tabela 5.12 - Estimativa do fluxo de pólen e estrutura genética dentro do PSM-TP-EU de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.

Matriz	$\hat{F}_m$	n_o	Fluxo Gênico		$S (n_s)$	t	N_p	r_p	$\hat{\Theta}$	$\hat{N}_{e(v)}$	$\hat{\delta} \text{ (m)} \pm \text{DP}$	$\hat{A}_{ep} \text{ (ha)}$
			Dentro	Fora								
TP_M_1_44	0,326	25	25	0	0,160 (4)	0,840	15	0,067	0,231	2,02	73,3±46,0	1,33
TP_M_10_41	0,000	50	42	8	0,000 (0)	1,000	41	0,024	0,128	3,69	112,9±61,7	2,39
TP_M_20_28	0,000	40	32	8	0,025 (1)	0,975	31	0,032	0,135	3,47	65,1±36,5	0,84
TP_M_21_48	0,000	26	25	1	0,000 (0)	1,000	14	0,071	0,134	3,38	45,4±53,9	1,83
TP_M_35_55	0,000	9	8	1	0,000 (0)	1,000	8	0,125	0,141	2,77	56,1±51,0	1,63
TP_M_45_42	0,000	31	30	1	0,290 (9)	0,710	16	0,063	0,212	2,26	47,2±47,3	1,41
TP_M_55_11	0,000	27	27	0	0,000 (0)	1,000	23	0,043	0,130	3,47	83,5±57,4	2,07
TP_M_65_27	0,121	19	14	5	0,053 (1)	0,947	17	0,059	0,163	2,72	114,0±67,4	2,85
TP_M_86_1	0,000	20	20	0	0,100 (2)	0,900	14	0,071	0,158	2,85	50,3±35,6	0,80
TP_M_95_21	0,077	37	31	6	0,000 (0)	1,000	28	0,036	0,139	3,33	86,7±53,5	1,80
TP_M_101_49	0,395	32	32	0	0,625 (20)	0,375	10	0,100	0,463	1,06	79,5±51,6	1,67
TP_M_104_9	0,214	25	24	1	0,000 (0)	1,000	15	0,067	0,162	2,78	51,6±44,4	1,24
TP_M_116_19	0,000	31	24	7	0,032 (1)	0,968	22	0,045	0,139	3,33	79,6±63,3	2,52
TP_M_118_20	0,216	30	30	0	0,000 (0)	1,000	15	0,067	0,162	2,82	59,7±54,4	1,86
TP_M_155_39	0,000	35	31	4	0,057 (2)	0,943	28	0,036	0,144	3,25	99,7±62,3	2,44
TP_M_212_1	0,000	35	29	6	0,000 (0)	1,000	33	0,030	0,129	3,59	95,4±52,3	1,72
TP_M_214_64	0,000	53	43	10	0,000 (0)	1,000	42	0,024	0,128	3,70	111,3±50,6	1,61
TP_M_236_23	0,000	29	24	5	0,034 (1)	0,966	25	0,040	0,138	3,31	94,0±45,1	1,28
TP_M_241_32	0,000	34	29	5	0,000 (0)	1,000	25	0,040	0,130	3,55	46,4±27,9	0,49
TP_M_458_25	0,060	42	38	4	0,000 (0)	1,000	33	0,030	0,137	3,42	76,0±56,0	1,97
TP_M_533_3	0,146	43	40	3	0,140 (6)	0,860	32	0,031	0,189	2,52	75,7±47,1	1,39
TP_M_2473_47	0,307	13	12	1	0,231 (3)	0,769	9	0,111	0,258	1,73	62,6±40,4	1,03
TP_M_2612_61	0,000	27	25	2	0,111 (3)	0,889	23	0,043	0,159	2,92	57,0±30,0	0,57
Total	-	713	635	78	(53)	-	519	-	-	-	-	-
Média	0,081	-	27,6	3,4	0,081	0,919	22,6	0,055	0,170	2,95	74,9	1,6
Desvio-padrão	0,125	-	8,8	3,1	0,144	0,144	9,8	0,028	0,073	0,68	22,1	0,6

Nota: $\hat{F}_m$: coeficiente de endogamia da árvore matriz; n_o : tamanho amostral dentro de progênie; S : taxa de autofecundação; n_s : número de indivíduos de autofecundação; t : taxa de cruzamento; N_p : número de árvores doadoras de pólen; r_p : coeficiente de correlação de paternidade; $\hat{\Theta}$: coancestria dentro de progênies; $\hat{N}_{e(v)}$: tamanho efetivo de variância; $\hat{\delta} \text{ (m)} \pm \text{DP}$: distância de dispersão de pólen e desvio-padrão; $\hat{A}_{ep}$: área de vizinhança de polinização. Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

A contagem do número total de pais envolvidos no processo de reprodução realizado foi alta (23 matrizes + 249 adultos). A amplitude de variação do número de doadores de pólen foi alta ($N_p = 8$ a 42), com média de $22,6 \pm 9,8$ (Tabela 5.12). Árvores matrizes localizadas próximas às periferias do PSM-TP-EU foram mais fecundadas por pólen imigrante do que outras (Matrizes: $214 > 20 > 10$). Em função do N_p , a correlação de paternidade foi baixa e inferior ao estimado pelo modelo de cruzamentos correlacionados de Ritland.

Em geral, o pólen dentro do PSM-TP-EU foi disperso a curtas distâncias (< 200 m) e as distâncias médias dentro de progênes variaram de 45 a 114 m, desconsiderando os cruzamentos que ocorreram com o pólen imigrante. A área efetiva de polinização foi ampla e atingiu 2,85 ha (Matriz 65), com média de $1,6 \pm 0,6$ ha.

A taxa de autofecundação foi estimada em 8,1% (Tabela 5.12). Para os casos com maior número de autofecundação, as estimativas de coancestria dentro de progênes foram maiores que as obtidas por meio de parâmetros do sistema de reprodução. Para as demais árvores matrizes, as estimativas acessadas diretamente via análise de paternidade, foram inferiores.

Com o conhecimento de *pedigree* foi possível estimar diretamente o nível de endogamia em indivíduos que foram originados por cruzamento entre parentes ou por autofecundação. A média do coeficiente de coancestria entre pares de indivíduos relacionando a árvore matriz e seus descendentes foi alta e acima do esperado (0,250) (Tabela 5.13). Estimativas acima de 0,500 foram obtidas para as progênes 1, 101 e 2473. Para relação entre as árvores paternas e seus descendentes, a média do coeficiente de coancestria foi inferior em relação ao verificado para as árvores maternas, mas ainda assim, em geral, superior ao esperado (0,250). Para algumas famílias, os valores máximos foram iguais para relação entre as árvores maternas e paternas com seus descendentes, indicando a ocorrência de autofecundação. O coeficiente de coancestria médio entre árvores maternas e paternas foi baixo ($0,056 \pm 0,087$) e variou de -0,225 (mínimo) a 0,516 (máximo). Os maiores intervalos de variação foram obtidos para relações de parentesco entre pai e mãe para as progênes 1, 45 e 2612. Dessa forma, apesar de ter ocorrido cruzamentos entre parentes, esses não foram majoritários, e isso pode ter favorecido a recombinação da diversidade genética.

Tabela 5.13 - Coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) entre árvores maternas, paternas e progênes do TP2G-TP-EU de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.

Progênie	Árvore Materna e Descendentes				Árvore Paterna e Descendentes				Árvores Maternas e Paternas			
	NP	$\hat{\theta}_{xy}$	Mínimo	Máximo	NP	$\hat{\theta}_{xy}$	Mínimo	Máximo	NP	$\hat{\theta}_{xy}$	Mínimo	Máximo
1	25	0,560±0,109	0,290	0,697	25	0,445±0,138	0,202	0,697	15	0,214±0,150	-0,091	0,468
10	50	0,253±0,053	0,149	0,349	50	0,264±0,102	0,053	0,590	41	0,054±0,083	-0,063	0,287
20	40	0,232±0,054	0,118	0,414	40	0,245±0,072	0,132	0,425	31	0,021±0,062	-0,081	0,157
21	26	0,221±0,067	0,103	0,360	26	0,214±0,085	0,108	0,437	14	0,059±0,062	-0,038	0,166
35	9	0,190±0,048	0,123	0,277	9	0,238±0,058	0,154	0,326	8	0,032±0,071	-0,053	0,170
45	31	0,325±0,084	0,181	0,435	31	0,311±0,088	0,125	0,435	16	0,053±0,104	-0,138	0,247
55	27	0,182±0,037	0,095	0,238	27	0,214±0,084	0,058	0,407	23	0,008±0,054	-0,104	0,107
65	19	0,417±0,098	0,281	0,596	19	0,337±0,116	0,133	0,596	17	0,115±0,110	-0,059	0,322
86	20	0,230±0,067	0,104	0,370	20	0,241±0,103	0,024	0,419	14	0,004±0,080	-0,145	0,150
95	37	0,318±0,059	0,193	0,503	37	0,252±0,076	0,088	0,410	28	0,041±0,071	-0,099	0,187
101	32	0,631±0,108	0,323	0,757	32	0,548±0,208	0,108	0,757	10	0,184±0,157	-0,105	0,395
104	25	0,358±0,061	0,222	0,452	25	0,310±0,085	0,135	0,443	15	0,105±0,129	-0,058	0,321
116	31	0,252±0,060	0,146	0,358	31	0,254±0,062	0,117	0,420	22	0,017±0,079	-0,210	0,148
118	30	0,357±0,062	0,281	0,535	30	0,239±0,078	0,106	0,408	15	0,069±0,083	-0,097	0,262
155	36	0,216±0,071	0,089	0,349	35	0,245±0,095	0,079	0,518	28	0,014±0,083	-0,225	0,151
212	36	0,283±0,043	0,155	0,382	35	0,257±0,081	0,118	0,430	33	0,021±0,051	-0,096	0,106
214	53	0,188±0,045	0,089	0,276	53	0,224±0,082	0,075	0,412	42	-0,002±0,068	-0,141	0,128
236	30	0,220±0,058	0,105	0,387	29	0,230±0,087	0,102	0,402	25	0,012±0,065	-0,185	0,113
241	34	0,229±0,049	0,142	0,306	34	0,224±0,071	0,133	0,415	25	0,023±0,055	-0,070	0,138
458	45	0,301±0,055	0,191	0,419	42	0,253±0,102	0,031	0,444	33	0,024±0,073	-0,096	0,194
533	44	0,326±0,094	0,154	0,523	43	0,279±0,105	0,100	0,523	32	0,048±0,085	-0,108	0,258
2473	13	0,532±0,127	0,350	0,713	13	0,383±0,181	0,176	0,713	9	0,123±0,107	-0,024	0,307
2612	28	0,315±0,098	0,125	0,521	27	0,270±0,100	0,124	0,521	23	0,053±0,115	-0,063	0,516
Média	-	0,310±0,070	0,174	0,444	-	0,282±0,098	0,108	0,485	-	0,056±0,087	-0,102	0,230
Total	721	-	-	-	713	-	-	-	519	-	-	-

Nota: NP: Número de pares de coancestria entre indivíduos. Valor máximo e mínimo obtido por um par de indivíduos dentro da progênie.

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

Dos 69 cruzamentos realizados entre indivíduos aparentados, 48 apresentaram $\hat{\theta}_{xy} > 0,124$ (Tabela 5.14). A taxa de cruzamento entre parentes foi estimada em 9,7% e cerca de 44% dos cruzamentos ocorreram a uma distância de até 24 m, enquanto 37,5% ocorreu a mais de 100 m, sugerindo o favorecimento para ocorrência entre árvores dentro da mesma parcela. Foram encontrados cruzamentos a distâncias maiores (± 200 m) entre indivíduos localizados em pontos opostos no PSM-TP-EU (M10_41×A145_41; M10_41×A200_41; M10_41×A139_41).

A média de coancestria entre indivíduos parentes que se cruzaram foi alta (0,219) (Tabela 5.14). No entanto, a endogamia observada ($\hat{F}_r$) foi superior a endogamia que era esperada pelo cruzamento de dois indivíduos parentes ($\hat{F}_r = \hat{\theta}_{xy}$). O intervalo de variação de $\hat{F}_r$ foi amplo (-0,110 a 0,671) e o viés médio foi de 0,036 e elevado para indivíduos das famílias 1, 21 e 45.

A endogamia esperada em um filho gerado por autofecundação ($\hat{F}_s$) quando o índice de fixação da árvore matriz ($\hat{F}_m$) for zero, deveria ser de 0,5. Apesar disso, os valores para o coeficiente de endogamia observado devido a autofecundação ($\hat{F}_i$) variaram de 0,057 a 0,803, com média de 0,446, e portanto, abaixo de 0,5. Os valores para endogamia esperada foram superiores e variaram de 0,387 a 0,698, com média de 0,581 (Tabela 5.15).

Dessa forma, as médias para endogamia observada devido ao cruzamento entre parentes foi inferior a endogamia observada devido a autofecundação ($\hat{F}_r < \hat{F}_i$) e como a ocorrência do primeiro tipo de cruzamento foi maior, espera-se que os efeitos deletérios nas progênies do TP2G-TP-EU não sejam tão negativos para população em geral.

Tabela 5.14 - Coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) entre árvores parentes do PSM-TP-EU que se cruzaram, coeficiente de endogamia observada ($\hat{F}_r$) devido ao cruzamento entre parentes e distância entre a árvore matriz e o mais provável candidato a pai (Dist.). (Continua)

Progênie	Árvore Matriz	Candidato Pai	$\hat{\theta}_{xy}$	$\hat{F}_r$	Viés	Dist. (m)
TP_S_1_44_6	TP_M_1_44	TP_A_8_44	0,407	0,427	0,000	53,7
TP_S_1_44_15	TP_M_1_44	TP_A_15_44	0,230	0,647	0,174	50,3
TP_S_1_44_18	TP_M_1_44	TP_A_72_44	0,233	0,671	0,192	119,5
TP_S_1_44_19	TP_M_1_44	TP_A_72_44	0,233	0,577	0,118	119,5
TP_S_1_44_5	TP_M_1_44	TP_A_120_44	0,226	0,338	0,013	137,6
TP_S_10_41_3	TP_M_10_41	TP_A_48_41	0,287	0,337	0,003	76,7
TP_S_10_41_11	TP_M_10_41	TP_A_87_41	0,174	0,363	0,036	63,3
TP_S_10_41_6	TP_M_10_41	TP_A_89_41	0,180	0,096	0,007	6,0
TP_S_10_41_17	TP_M_10_41	TP_A_89_41	0,180	0,486	0,094	6,0
TP_S_10_41_44	TP_M_10_41	TP_A_139_41	0,194	0,126	0,005	188,4
TP_S_10_41_12	TP_M_10_41	TP_A_139_41	0,194	0,242	0,002	188,4
TP_S_10_41_13	TP_M_10_41	TP_A_139_41	0,194	0,146	0,002	188,4
TP_S_10_41_40	TP_M_10_41	TP_A_145_41	0,208	0,208	0,000	198,1
TP_S_10_41_49	TP_M_10_41	TP_A_145_41	0,208	0,157	0,003	198,1
TP_S_10_41_5	TP_M_10_41	TP_A_200_41	0,152	0,152	0,000	190,8
TP_S_10_41_43	TP_M_10_41	TP_A_322_41	0,239	0,239	0,000	74,1
TP_S_20_28_12	TP_M_20_28	TP_A_88_28	0,157	0,332	0,031	105,3
TP_S_21_48_16	TP_M_21_48	TP_A_2_48	0,157	0,257	0,010	3,0
TP_S_21_48_17	TP_M_21_48	TP_A_13_48	0,166	0,525	0,129	6,0
TP_S_35_55_2	TP_M_35_55	TP_A_7_55	0,170	0,338	0,028	12,0
TP_S_35_55_6	TP_M_35_55	TP_A_7_55	0,170	0,403	0,054	12,0
TP_S_45_42_4	TP_M_45_42	TP_A_22_42	0,241	-0,076	0,101	6,0
TP_S_45_42_13	TP_M_45_42	TP_A_22_42	0,241	-0,110	0,123	6,0
TP_S_45_42_14	TP_M_45_42	TP_A_22_42	0,241	0,566	0,106	6,0
TP_S_45_42_18	TP_M_45_42	TP_A_22_42	0,241	0,107	0,010	6,0
TP_S_45_42_29	TP_M_45_42	TP_A_22_42	0,241	-0,063	0,092	6,0
TP_S_45_42_23	TP_M_45_42	TP_A_24_42	0,201	0,067	0,018	15,0
TP_S_45_42_7	TP_M_45_42	TP_A_216_42	0,247	0,216	0,001	18,0
TP_S_45_42_16	TP_M_45_42	TP_A_216_42	0,247	-0,030	0,077	18,0
TP_S_65_22_2	TP_M_65_27	TP_A_182_27	0,270	0,244	0,001	135,0
TP_S_65_22_14	TP_M_65_27	TP_A_182_27	0,270	0,143	0,016	135,0
TP_S_95_21_24	TP_M_95_21	TP_A_132_21	0,145	0,254	0,012	39,0
TP_S_104_9_21	TP_M_104_9	TP_A_39_9	0,282	0,103	0,032	108,0
TP_S_104_9_18	TP_M_104_9	TP_A_237_9	0,321	0,195	0,016	42,0
TP_S_104_9_18	TP_M_104_9	TP_A_258_9	0,203	0,274	0,005	51,0
TP_S_116_19_31	TP_M_116_19	TP_A_74_19	0,126	0,078	0,002	141,0
TP_S_116_19_20	TP_M_116_19	TP_A_74_19	0,126	-0,035	0,026	141,0

Tabela 5.14 - Coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) entre árvores parentes do PSM-TP-EU que se cruzaram, coeficiente de endogamia observada ($\hat{F}_r$) devido ao cruzamento entre parentes e distância entre a árvore matriz e o mais provável candidato a pai (Dist.). (Conclusão)

Progênie	Matriz	Candidato Pai	$\hat{\theta}_{xy}$	F_r	Viés	Dist, (m)
TP_S_118_20_14	TP_M_118_20	TP_A_231_20	0,262	0,130	0,017	153,0
TP_S_118_20_18	TP_M_118_20	TP_A_231_20	0,262	0,383	0,015	153,0
TP_S_118_20_29	TP_M_118_20	TP_A_231_20	0,262	0,272	0,000	153,0
TP_S_155_39_2	TP_M_155_39	TP_A_61_39	0,127	0,002	0,016	3,0
TP_S_155_39_3	TP_M_155_39	TP_A_61_39	0,127	0,133	0,000	3,0
TP_S_458_25_25	TP_M_458_25	TP_A_292_25	0,194	0,194	0,000	75,0
TP_S_533_3_36	TP_M_533_3	TP_A_535_3	0,258	0,524	0,071	24,0
TP_S_533_3_36	TP_M_533_3	TP_A_535_3	0,258	0,141	0,014	24,0
TP_S_533_3_8	TP_M_533_3	TP_A_535_3	0,258	0,459	0,040	24,0
TP_S_533_3_17	TP_M_533_3	TP_A_535_3	0,258	0,106	0,023	24,0
TP_S_533_3_22	TP_M_533_3	TP_A_535_3	0,258	0,331	0,005	24,0
Média	-	-	0,219	0,243	0,036	73,6

Nota: Nomenclatura: Tabela 6A.

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

Tabela 5.15 - Coeficiente de endogamia esperado devido a autofecundação (F_s) e observado (F_i) em progênie de *Eucalyptus urophylla*.

Progênie	Matriz	$\hat{F}_i$	$\hat{F}_s$	Viés	Progênie	Matriz	$\hat{F}_i$	$\hat{F}_s$	Viés
TP_S_1_44_3	TP_M_1_44	0,539	0,663	0,015	TP_S_101_49_2	TP_M_101_49	0,632	0,698	0,004
TP_S_1_44_9	TP_M_1_44	0,539	0,663	0,015	TP_S_101_49_3	TP_M_101_49	0,704	0,698	0,000
TP_S_1_44_11	TP_M_1_44	0,442	0,663	0,049	TP_S_101_49_4	TP_M_101_49	0,749	0,698	0,003
TP_S_1_44_22	TP_M_1_44	0,401	0,663	0,069	TP_S_101_49_5	TP_M_101_49	0,472	0,698	0,051
TP_S_20_28_22	TP_M_20_28	0,803	0,460	0,118	TP_S_101_49_6	TP_M_101_49	0,632	0,698	0,004
TP_S_45_42_2	TP_M_45_42	0,282	0,431	0,022	TP_S_101_49_8	TP_M_101_49	0,747	0,698	0,002
TP_S_45_42_3	TP_M_45_42	0,144	0,431	0,082	TP_S_101_49_9	TP_M_101_49	0,417	0,698	0,079
TP_S_45_42_5	TP_M_45_42	0,150	0,431	0,079	TP_S_101_49_10	TP_M_101_49	0,695	0,698	0,000
TP_S_45_42_24	TP_M_45_42	0,244	0,431	0,035	TP_S_101_49_11	TP_M_101_49	0,627	0,698	0,005
TP_S_45_42_25	TP_M_45_42	0,385	0,431	0,002	TP_S_101_49_12	TP_M_101_49	0,535	0,698	0,026
TP_S_45_42_26	TP_M_45_42	0,303	0,431	0,016	TP_S_101_49_16	TP_M_101_49	0,484	0,698	0,046
TP_S_45_42_27	TP_M_45_42	0,372	0,431	0,003	TP_S_101_49_18	TP_M_101_49	0,484	0,698	0,046
TP_S_45_42_28	TP_M_45_42	0,340	0,431	0,008	TP_S_101_49_19	TP_M_101_49	0,494	0,698	0,041
TP_S_45_42_30	TP_M_45_42	0,057	0,431	0,140	TP_S_101_49_20	TP_M_101_49	0,523	0,698	0,030
TP_S_65_27_9	TP_M_65_27	0,436	0,561	0,016	TP_S_101_49_21	TP_M_101_49	0,494	0,698	0,041
TP_S_86_1_3	TP_M_86_1	0,100	0,428	0,107	TP_S_101_49_23	TP_M_101_49	0,746	0,698	0,002
TP_S_86_1_11	TP_M_86_1	0,461	0,428	0,001	TP_S_101_49_24	TP_M_101_49	0,602	0,698	0,009
TP_S_116_19_23	TP_M_116_19	0,503	0,395	0,012	TP_S_101_49_26	TP_M_101_49	0,362	0,698	0,113
TP_S_155_39_19	TP_M_155_39	0,142	0,387	0,060	TP_S_101_49_27	TP_M_101_49	0,514	0,698	0,034
TP_S_155_39_28	TP_M_155_39	0,306	0,387	0,007	TP_S_101_49_28	TP_M_101_49	0,417	0,698	0,079
TP_S_236_23_3	TP_M_236_23	0,641	0,407	0,055	TP_S_533_3_37	TP_M_533_3	0,392	0,573	0,033
TP_S_2473_47_2	TP_M_2473_47	0,305	0,654	0,122	TP_S_533_3_40	TP_M_533_3	0,742	0,573	0,029
TP_S_2473_47_4	TP_M_2473_47	0,484	0,654	0,029	TP_S_533_3_12	TP_M_533_3	0,236	0,573	0,113
TP_S_2473_47_11	TP_M_2473_47	0,675	0,654	0,000	TP_S_533_3_13	TP_M_533_3	0,330	0,573	0,059
TP_S_2612_61_4	TP_M_2612_61	0,178	0,494	0,100	TP_S_533_3_15	TP_M_533_3	0,146	0,573	0,182
TP_S_2612_61_6	TP_M_2612_61	0,382	0,494	0,012	TP_S_533_3_23	TP_M_533_3	0,336	0,573	0,056
TP_S_2612_61_14	TP_M_2612_61	0,526	0,494	0,001	Média	-	0,446	0,581	0,043

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

5.4 Discussão

Os níveis de diversidade genética em nível de locos e para as médias das populações de polinização aberta de *Eucalyptus urophylla* foram elevados (Tabela 5.3), concordando com resultados reportados em populações naturais da espécie (TRIPIANA et al, 2007; PAYN et al., 2008). Destaca-se que o PSM-TPR-EU e o PCPN-EU apresentaram elevado número de alelos e médias de heterozigosidade, com reduzido tamanho populacional. Miranda (2016) verificou índices semelhantes para uma amostra da população de *E. grandis* ($\hat{H}_e = 0,877$; $\hat{H}_o = 0,753$), que assim como o PCPN-EU, constituiu parte do Programa Cooperativo de Populações Núcleo do IPEF, a justificar ampla base genética que foi constituída.

O índice de fixação ($\hat{F}$) foi significativo para todas as populações, sugerindo excesso de homozigotos em relação ao esperado em EHW. Os valores de $\hat{F}$ não apresentaram tendência e foram divergentes para alguns locos entre as populações. No entanto, pareceu existir alelos fixados no EMBRA128, uma vez que todas as populações apresentaram $\hat{F}$ positivo e significativo, concordando com resultados obtidos por Henriques (2016) em *E. urophylla* e Mora et al. (2017) em *E. cladocalyx*. Para o EMBRA11, marcador associado à densidade da madeira (FREEMAN et al., 2009), foram detectados até 10 alelos e alta heterozigosidade observada ($> 0,725$). Para o EMBRA12, marcador associado com a propagação vegetativa (MARQUES et al., 2002), os níveis de $\hat{H}_o$ foram elevados e todas as populações apresentaram os mesmos 12 alelos. O índice de fixação indicou ausência de endogamia em ambos os locos.

A redução da diversidade genética entre as gerações não foi intensa e as estimativas de heterozigosidade esperada foram similares, sendo que, o TP2G-TP-EU manteve 97% da média de $\hat{H}_e$ das populações e praticamente todos os alelos presentes no PSM-TP-EU, independentemente da frequência, foram transmitidos aos descendentes (TP2G-TP-EU). Portanto, o evento reprodutivo realizado pôde representar a diversidade genética da população parental. Por outro lado, a heterozigosidade observada foi inferior nas progênies ($0,686 < 0,764$), e com isso, houve aumento do índice de fixação, a indicar presença de endogamia (Tabela 5.3).

Foram detectados alelos de frequência muito baixa ($f \leq 0,01$) em maior proporção no TP2G-TP-EU, devido à redução das frequências alélicas da geração parental para os descendentes. Apesar disso, a riqueza alélica manteve-se semelhante (Tabela 5.3), mas sugeriu

a vulnerabilidade desses alelos, que podem ser perdidos ou ter menor probabilidade de serem amostrados ou transmitidos (SEBBENN, 2002; MARCUCCI-POLTRI et al., 2003), o que alerta para o afunilamento da base genética.

Em geral, o índice de fixação das árvores matrizes ($\hat{F}_m$) foi inferior ao de progênes ($\hat{F}_o$) (Tabela 5.6) e isso está relacionado à seleção contra indivíduos endogâmicos entre as fases de plântula e adulta. A associação positiva e significativa foi detectada entre o índice de fixação das progênes ($\hat{F}_o$) e a taxa de autofecundação somada a taxa de cruzamento entre indivíduos parentes ($\hat{s} + (\hat{t}_m - \hat{t}_s)$) (Tabela 5.7), indicando que a origem da endogamia nas progênes advém da autofecundação e, principalmente, devido ao cruzamentos entre parentes ($\hat{F}_{t_m - t_s} > \hat{F}_s$) (Tabela 5.6).

A taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$) foi elevada (Tabela 5.5) e apesar de combinar cruzamento e autofecundação, indicou a predominância do sistema de reprodução por cruzamento ($\hat{t}_m > 80\%$) do PSM-TP-EU de *E. urophylla* (GOODWILLE et al., 2005), concordando com o obtido por House e Bell (1994) por meio de isoenzimas ($\hat{t}_m = 0,90$) em populações naturais de *E. urophylla*. Valores semelhantes foram acessados com marcadores SSR para outras espécies de *Eucalyptus* (BREED et al., 2015; GONZAGA et al., 2016; MIRANDA, 2016).

A taxa de cruzamento entre parentes ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) e a correlação multiloco de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$) foram significativas e confirmaram que a estrutura de progênes do PSM-TP-EU viabilizou a ocorrência de cruzamentos entre parentes e cruzamentos correlacionados, o que contribui para aumentar a proporção de alelos paternos idênticos por descendência. O número de árvores polinizadoras foi moderado considerando os modelos do sistema de reprodução de Ritland e menor que o verificado diretamente pela análise de paternidade (Tabelas 5.5, 5.6 e 5.12). As médias de coancestria foram superiores ao mínimo estipulado para progênes de meias-irmãs em nível populacional e dentro de progênes, tanto pela análise do sistema de reprodução como de paternidade. Isso contribuiu para que o tamanho efetivo de variância fosse menor do que o esperado em populações panmíticas. Desse modo, as progênes que constituem o TP2G-TP-EU foram formadas por diferentes graus de parentescos e para estimar a variância genética aditiva com prudência, sugeriu-se aplicar a coancestria média obtida em nível populacional (0,152), a resultar no coeficiente de parentesco de 0,304 ($\hat{r}_{xy} = 2\hat{\theta}$). Com isso,

pretende-se evitar superestimativas do coeficiente de herdabilidade aditiva que conduziria a ganhos irreais com a seleção no teste de progênies de segunda geração.

Houve variação na taxa de cruzamento individual das árvores matrizes e apenas quatro progênies (17%) foram 100% geradas por cruzamentos (Tabela 5.6). No entanto, a análise de paternidade evidenciou uma proporção maior (48%) (Tabela 5.12) em relação ao obtido pela análise do sistema de reprodução. Os fatores que podem influenciar a variação de $\hat{t}_m$ entre plantas de uma população reprodutiva consistem na variação genética para autoincompatibilidade, assincronismo de florescimento e comportamento dos polinizadores (SEBBENN, 2017).

A $\hat{t}_m$ interferiu significativamente no índice de fixação das progênies ($\hat{F}_o$) e na coancestria ($\hat{\Theta}$) (Tabela 5.7), ou seja, quanto maior a taxa de cruzamento, menor a endogamia e o parentesco dentro das progênies. Árvores matrizes localizadas na borda do PSM-TP-EU tiveram maior número de doadores de pólen e isso deve estar relacionado com o comportamento dos polinizadores nas extremidades da área, com destaque para o observado para as matrizes 10, 236, 533 e 458, que estão próximas ao Teste de Progênies de Sistemas de Plantio de Aroeira, o que deve ser favorecido em razão do maior número de insetos polinizadores.

Broadhurst et al. (2015) enfatizaram a importância de evitar a criação de gargalos genéticos para prevenir o cruzamento dentro de subamostras do *pool* gênico e garantir a representatividade genética da população. Durante a coleta de sementes foi observado a formação de conjuntos, sendo que, enquanto árvores da mesma família encontravam-se em estágio de frutificação, outras de diferentes famílias, não possuíam nenhum fruto. Como as famílias que constituíram o TP-EU foram oriundas de uma população de florescimento precoce e como foi observado a assincronia dos estágios fenológicos, é possível que isso possa ter favorecido o cruzamento entre árvores parentes dentro do PSM-TP-EU. Apesar disso, não houve descaracterização da diversidade genética entre as gerações e, provavelmente, isso se sustenta no elevado número de doadores de pólen conforme a análise de paternidade, na preferência por cruzamentos e no fluxo gênico entre as populações (Tabelas 5.6, 5.7 e 5.12).

As médias de coancestria entre pares de indivíduos ($\hat{\theta}_{xy}$) dentro das famílias em cada população adulta foram próximas ao considerado para progênies de meias-irmãs (0,125) (Tabelas 5.8, 5.10 e 5.11). Apesar disso, o valor máximo ultrapassou ao esperado para irmãs-completas (0,250), sem atingir o nível de irmãs de autofecundação. Portanto, os PSM e a amostra do PCPN-EU são possivelmente constituídos por esses dois graus parentesco, sendo que a maior proporção de meias-irmãs ocorreu na seguinte ordem:

PSM-TP-EU > PCPN-EU > PSM-TPR-EU. Isso pode ter favorecido a obtenção de níveis adequados de diversidade genética nas populações, por minimizar a redundância genética entre os indivíduos. Em média, o parentesco obtido entre árvores maternas e paternas foi baixo (Tabela 5.13). No entanto, para algumas famílias, o parentesco conduziu a médias elevadas de $\hat{\theta}_{xy}$ na descendência (Tabela 5.9). Desse modo, a amplitude para o coeficiente de coancestria entre as gerações foi alta ($0,245 > 0,119$), o que conduziu ao aumento do coeficiente de endogamia na geração descendente ($\hat{F}_o$).

As maiores taxas de autofecundação foram verificadas para as famílias 45, 101 e 2473 (Tabela 5.6 e 5.12), colaborando também para elevadas estimativas de coancestria entre pares de indivíduos ($\hat{\theta}_{xy}$) (Tabela 5.9). A taxa de autofecundação ($\hat{s}$), cruzamento entre parentes ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) e correlação de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$) foram significativamente associados a $\hat{\theta}_{xy}$ ($\hat{r}_{s(s)} = 0,68, P < 0,05$; $\hat{r}_{s(tm-ts)} = 0,87, P < 0,05$; $\hat{r}_{s(rp)} = 0,89, P < 0,05$). Desse modo, os valores elevados para o TP2G-TP-EU ($\hat{\theta}_{xy} > 0,500$) (Tabela 5.9), estão associados à presença de meias-irmãs endogâmicas, irmãs-completas endogâmicas, meias-irmãs paternas e irmãs de autofecundação. Por sua vez, o índice de fixação ($\hat{F}_o$) alto, devido às fortes relações de parentesco ($\hat{\theta}_{xy}$) e menor tamanho efetivo ($\hat{N}_{e(v)} < 2$) (Tabela 5.7), pode ser um indicativo da ocorrência de depressão endogâmica nas progênies 1 e 101, explicando a baixa sobrevivência com um ano de idade (52% e 47%, respectivamente).

Por meio da análise de paternidade foi possível determinar o provável parental paterno de quase todas as mudas (99%). Os cruzamentos que ocorreram no PSM-TP-EU contaram com a participação de 272 doadores de pólen e, a ampla população reprodutiva, foi positiva para manter a diversidade genética. De acordo com os resultados, foram gerados 53 indivíduos de autofecundação (8%) e 69 de cruzamento entre parentes (9,7%) (Tabela 5.12). Houve fluxo gênico, porém a taxa de imigração de pólen foi baixa (11,9%), sendo a maior proporção oriunda do PSM-TPR-EU, provavelmente devido à proximidade entre os pomares (210 m). Isso pode ser considerado altamente favorável por promover a variabilidade genética (SEBBENN, 2002) e recombinação de alelos envolvendo indivíduos selecionados nos Pomares de Sementes.

Em geral, a distância de dispersão de pólen dentro do PSM-TP-EU foi curta (média = 75 m) e ocorreram cruzamentos entre árvores parentes que constituíam a mesma parcela do TP-EU (3 - 24 m) e a distâncias mais longas, como foi verificado para M_10_41 e A_200_41 (190 m) (Tabela 5.14), reforçando a possibilidade de que o florescimento no mesmo

período tenha favorecido o cruzamento entre parentes. Silva et al. (2015) detectaram que a dispersão de pólen se concentra a curtas distâncias (< 200 m) e o sucesso da polinização esperado a longas distâncias foi baixo (1-3%), embora tenha atingido mais de 550 m, sendo essa distância mínima recomendada para isolamento de plantios transgênicos de *Eucalyptus*. Em árvores matrizes localizadas próximos as bordas do PSM-TP-EU (10, 95, 116, 212 e 214) detectou-se maior imigração de pólen (Figura 2B).

A área efetiva de polinização, que corresponde a área em que 63% dos doadores de pólen que cruzaram com a árvore matriz estão localizados, foi ampla (0,49 a 2,85 ha). Isso indicou a atuação dos polinizadores favorecendo a recombinação da diversidade genética. De acordo com Pacheco et al. (1986), as abelhas, principais polinizadores do *Eucalyptus*, podem coletar pólen de diferentes plantas em uma visita e promover polinização efetiva até 100 m, diminuindo gradativamente sua atividade até a distância de 300 m. Dessa forma, é possível que o pólen oriundo do PCPN-EU tenha sido disperso pelo vento (> 430 m).

A endogamia observada em progênes originadas do cruzamento entre parentes ($\hat{F}_r$) foi menor que a endogamia em progênes oriundas de autofecundação ($\hat{F}_i$) ($0,243 < 0,446$) (Tabelas 5.14 e 5.15), concordando com Tambarussi et al. (2017). Os valores obtidos para $\hat{F}_i$ deveriam ser de pelo menos 0,500, o que não foi completamente satisfeito. De acordo com Silva (2010), as diferenças entre os valores observados e esperados são consequências da dificuldade em estimar parâmetros de parentesco e endogamia de dados moleculares, sendo que para obtenção de estimativas próximas, o ideal seria a utilização de um grande número de marcadores moleculares (> 20), o que nem sempre é possível, devido a limitações dos projetos de pesquisa.

5.5 Conclusão

Os níveis de diversidade genética são elevados nas populações de polinização aberta de *Eucalyptus urophylla* e a redução entre as gerações foi pequena. O índice de fixação indica a presença de endogamia, que é maior na geração descendente. Na espécie a reprodução ocorre predominantemente por cruzamentos. Existe cruzamentos entre indivíduos que são parentes, cruzamentos correlacionados e autofecundações no pomar de sementes. A endogamia nas progênes é originada principalmente do cruzamento entre parentes. Existe variação na taxa individual de cruzamento e imigração de pólen. O número de árvores polinizadoras é alto. A coancestria entre pares de indivíduos indica que as populações adultas são formadas por

famílias de meias irmãs e irmãs completas e na geração descendente ocorre também o parentesco de meias irmãs endogâmicas, irmãs completas endogâmicas, meias irmãs paternas e irmãs de autofecundação. A coancestria do teste de progênies de segunda geração é maior que do pomar de sementes e com isso o tamanho efetivo é menor no teste de progênies. Para estimar a variância genética aditiva deve-se aplicar o coeficiente de parentesco de 0,304.

REFERÊNCIAS

- BREED, M.F.; OTTEWELL, K.M.; GARDNER, M.G.; MARKLUND, M.H.K.; STEAD, M.G.; HARRIS, J.B.C.; LOWE, A.J. Mating system and early viability resistance to habitat fragmentation in a bird-pollinated eucalypt. **Heredity**, Londres, v. 115, n. 2, p. 100-107, 2015. Disponível em: <DOI: 10.1038/hdy.2012.72>. Acesso em: 17 dez. 2017.
- BROADHURST, L.M.; FIFIELD, G.; VANZELLA, B.; PICKUP, M. An evaluation of the genetic structure of seed sources and the maintenance of genetic diversity during establishment of two yellow box (*Eucalyptus melliodora*) seed-production areas. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 63, n. 5, p. 455-466, 2015.
- BURCZYK, J.; ADAMS, W.T.; SHIMIZU, J.Y. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon) stand. **Heredity**, Londres, v. 77, n. 3, p. 251-260, 1996.
- COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Lancaster, v. 23, n. 1, p.72-84, 1969.
- EL-KASSABY, Y.A.; FUNDA, T.; LIEWLAKSANEEYANAWIN, C. Increasing breeding without breeding (BwB) efficiency: Full – vs. partial-pedigree reconstruction in logepole pine. **Symbiosis Online Journal**, v. 2, n. 1, p. 1-16, 2015. Disponível em: <<http://www.symbiosisonlinepublishing.com/genetic-science/genetic-science07.pdf>>. Acesso em: 08 out. 2016.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CNPQ, 2013. 353 p.
- EWÉDJÈ, E.B.K.; AHANCHÉDÉ, A.; HARDY, O.J. Breeding system, gene dispersal and small-scale spatial genetic structure of threatened food tree species, *Pentadesma butyraceae* (Clusiaceae) in Benin. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 18, n. 4, p. 799-811, 2017.
- FREEMAN, J.S. **The application of molecular markers to *Eucalyptus globulus* tree improvement**. 2006. 137 f. Tese (Doutorado) - Universidade da Tasmânia, Tasmânia, 2006.
- FUNDA, T.; EL-KASSABY, Y. A. Seed orchard genetics. **CAB Reviews**, Wallingford, v. 7, n. 13, p. 1-15, 2012.
- GAULI, A.; STEANE, D.; VAILLANCOURT, R.E.; POTTS, B.M. Molecular genetic diversity and population structure in *Eucalyptus pauciflora* subsp. *pauciflora* (Myrtaceae) on the island of Tasmania. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 62, n. 3, p. 175-188, 2014.
- GOODWILLIE, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C.G. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. **Annuals Review of Ecology Evolution and Systematics**, Palo Alto, v.36, p.47-79, 2005.
- GOUDET, J. FSTAT. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate *F*-statistics. **Heredity**, Londres, v.86, n. 6, p. 485-486, 1995.
- GOVINDARAJ, M.; VETRIVENTHAN, M.; SRINIVASAN, M. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. **Genetics Research International**, Londres, p. 1-14, 2015. Disponível em: <DOI: 10.1155/2015/431487>. Acesso em: 17 dez. 2017.

- GONZAGA, J. M. S.; MANOEL, R. O.; SOUZA, A. C. B.; SOUZA, A. P.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A.M. Pollen contamination and nonrandom mating in a *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh seedling seed orchard. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 65, n. 1, p. 1-11, 2016. Disponível em:<DOI: 10.1515/sg-2016-0001>. Acesso em: 17 dez. 2017.
- HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; SHERMAN-BROYLES, S.L. Factors influecing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forests**, Heidelberg, v. 6, n. 1-4, p. 95-124, 1992.
- HARDY, O., X. VEKEMANS. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 618-620, 2002.
- HEDRICK F. A standardized genetic differentiation measured. **Evolution**, Nova York, v. 59, n. 8, p. 1633-1638, 2005.
- HEDRICK, P.W.; HELLSTEN, U.; GRATTAPAGLIA, D. Examining the cause of high inbreeding depression: analysis of whole-genome sequence data in 28 selfed progeny of *Eucalyptus grandis*. **New Phytologist**, Lancaster, v.209, n.2, p.600-611, 2016. Disponível em: <DOI: 10.1111/nph.13639>. Acesso em: 17 dez. 2017.
- HENRIQUES, E.P. **Seleção genética de progênes de irmãos completos obtidos entre espécies de *Eucalyptus* sp., visando a produção de carvão vegetal**. 2016. 79 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016.
- HOLLIDAY, J.A.; AITKEN, S.N.; COOKE, J.E.K.; FADY, B.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C.; HEUERTZ, M.; JARAMILLO-CORREA, J.P.; LEXER, C.; STATON, M.; WHETTEN, R.W.; PLOMION, C. Advances in ecological genomics in forest trees and applications to genetic resources conservation and breeding. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 706-717, 2017. Disponível em:<DOI: 10.1111/mec.13963>. Acesso em: 17 dez. 2017.
- HOUSE, A.P.N.; BELL, J.C. Isozyme variation and mating system in *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, n. 2/3, p. 167-176, 1994.
- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how computer program Cervus accommodates genotyping error increase success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 1099-1106, 2007.
- KREMER, A.; RONCE, O.; ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J.; GUILLAUME, F.; BOHRER, G.; NATHAN, R.; BRIDLE, J.R.; GOMULKIEWICZ, R.; KLEIN, E.K.; RITLAND, K.; KUPARINEN, A.; GERBER, S.; SCHUELER, S. Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. **Ecology Letters**, v. 15, n. 4, p. 378-392, 2012. Disponível em: <DOI: 10.1111/j.1461-0248.2012.01746.x>. Acesso em: 17 dez. 2017.
- LAMBETH, C.; LEE, B.-C.; O'MALLEY, D.; WHEELER, N. Polymix breeding with parental analysis of progeny: an alternative to full-sib breeding and testing. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 103, n. 6-7, p. 930-943, 2001.
- LEVIN D.A. The paternity pool plants. **The American Naturalist**, Chicago, v. 132, n. 3,p. 309-317, 1988.
- LINDGREN, D.; GEA, L.D.; JEFFERSON, P.A. Status number for measuring genetic diversity. **Forest Genetics**, Rome, v. 4, n. 2, p. 69-76, 1997.

- LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 82, n. 11, p. 1420–1425, 1995.
- LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Canadá: Sinauer Associates, 1998. 971 p.
- MARCUCCI-POLTRI, S.N.; ZELENER, N.; RODRIGUEZ TRAVERSO, J.; GELID, P.; HOPP, H.E. Selection of a seed orchard of *Eucalyptus dunni* based on genetic diversity criteria calculated using molecular markers. **Tree Physiology**, Oxford, v. 23, n. 9, p. 625-632, 2003.
- MARQUES, C.M.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Conservation and synteny of SSR loci and QTLs for vegetative propagation in four *Eucalyptus* species. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 105, n. 2-3, p. 474-478, 2002. Disponível em: <DOI: 10.1007/s00122-002-0899-z>. Acesso em: 17 dez. 2017.
- MARSHALL T.C.; SLATE, J.; KRUUK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 639-655, 1998.
- MEAGHER, T.R. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of most-likely male parents. **The American Naturalist**, Chicago, v. 128, n. 2, p. 199–215, 1986.
- MEAGHER, T.R.; THOMPSON, E. Analysis of parentage for naturally established seedlings of *Chamaelirium luteum* (Liliaceae). **Ecology**, Tempe, v. 68, n. 4, p. 803-812, 1987.
- MIRANDA, A.C. **Caracterização e comparação da diversidade genética de populações de *Eucalyptus grandis* por meio de marcadores moleculares e características quantitativas**. 2016. 70 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016.
- MORA, F.; ARRIAGADA, O.; BALLESTA, P.; RUIZ, E. Genetic diversity and population structure of a drought-tolerant species of *Eucalyptus*, using microsatellite markers. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, Nova Dehli, v. 26, n. 2, p. 274-281, 2017. Disponível em: <DOI: 10.1007/s13562-016-0389-z>. Acesso em: 17 dez. 2017.
- PACHECO, I.A.; KAGEYAMA, P.Y.; WIENDL, E.M.; BERTI FILHO, E. Estudo da dispersão de pólen de *Eucalyptus saligna* Smith por abelhas *Apis mellifera* L. utilizando-se o rádio fósforo. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 34, p. 47-52, 1986.
- PAYN, K.G.; DVORAK, W.S.; JANSE, B.J.H.; MYBURG, A.A. Microsatellite diversity and genetic structure of commercially important tropical tree species *Eucalyptus urophylla*, endemic to seven islands in eastern Indonesia. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 4, n. 3, p. 519-530, 2008.
- PUPIN, S.; ZARUMA, D.U.G.; SOUZA, C.S.; CAMBUIM, J.; ALVES, P.F.; COLETO, A.L.; PAVAN, B.E.; MORAES, M.L.T. Parâmetros genéticos para caracteres de crescimento, espessura de casca e densidade básica da madeira em progênies de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 45, n. 115, 2017. Disponível em: <DOI: 10.18671/scifor.v45n115.04>. Acesso em: 17 dez. 2017.
- RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, Lancaster, v. 43, n. 4, p. 848-859, 1989.

RITLAND K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**, Londres, v. 88, n. 4, p. 221-228, 2002.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, Londres, v. 47, n. 1, p. 35-52, 1981.

SANTOS, G.O.; HERNANDEZ, F.B.T. Uso do solo e monitoramento dos recursos hídricos no córrego do Ipê, Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 1, p. 60-68, 2012.

SEBBENN, A.M. Sistema de Reprodução. In: **Curso de Genética de populações de espécies arbóreas**. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2017.

SEBBENN, A.M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 115-132, 2002.

SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. **Pomares de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUPEF, 2006. p. 93-138.

SILVA, P.H.M.; SEBBENN, A.M.; GRATTAPAGLIA, D. Pollen-mediated gene flow across fragmented clonal stands of hybrid eucalypts in an exotic environment. **Forest Ecology and Management**, Amsterdã, v. 356, p. 293-298, 2015. Disponível em: <DOI:10.1016/j.foreco.2014.12.005>. Acesso em: 17 dez. 2017.

TAMBARUSSI, E.V.; BOSHIER, D.; VENCOSKY, R.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A.M. Inbreeding depression from selfing and mating between relatives in the Neotropical tree *Cariniana legalis* Mart. Kuntze. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 18, n.1., p. 225-234, 2017.

TRIPIANA, V.; BOURGEOIS, M.; VERHAEGEN, D.; VIGNERON, P.; BOUVET, J.M. Combining microsatellites, growth, and adaptive traits for managing in situ genetic resources of *Eucalyptus urophylla*. **Canadian Journal of Forest Research**, Toronto, v. 37, n. 4, p. 773-785, 2007.

ZANI FILHO, J.; STAPE, J. L.; RIBEIRO, F. A.; BALLONI, E.A. Programa de melhoramento genético de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, através de seleção precoce. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão, **Anais...** São Paulo: SBS, 1990. v. 3, p.464-471.

WANG, J. Unbiased relatedness estimation in structured populations. **Genetics**, v.187, n.3, p.887-901, 2011. Disponível em: <DOI: 10.1534/genetics.110.124438>. Acesso em: 17 dez. 2017.

6 SELEÇÃO A PARTIR DE UM TESTE DE PROGÊNIES DE POLINIZAÇÃO ABERTA DE *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE AVALIADO COMO POLINIZAÇÃO CONTROLADA

6.1 Introdução

Em meados da década de 80, os marcadores moleculares promoveram uma forte mudança de paradigma e contribuíram com transição da “genética mendeliana” para “genética genômica” (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Recentemente, o sequenciamento de alta densidade com base em marcadores SNP's têm permitido associar a seleção genômica ampla (GWS) ao mapeamento de locos de características quantitativas (QTL), além da modificação direcionada de genes específicos, por meio de técnicas de edição do genoma (sistema CRISPR/Cas9) ou identificação de mutações adequadas de alelos variantes para serem introduzidas em variedades cultivadas (MEUWISSEN; HAYES; GODDARD, 2001; AINLEY et al., 2013; BELHAJ et al., 2013).

No final da década de 80, Tansley et al. (1989) afirmaram que novas ferramentas moleculares estavam sendo desenvolvidas para serem empregadas por uma ciência antiga. De fato, mais de 30 anos após a descoberta da PCR e da tecnologia de DNA recombinante, é incontestável o avanço da genética molecular. No entanto, o melhoramento genético ainda depende da contribuição da genética clássica, devido a constatação de que a variação fenotípica não é completamente explicada pela variação genômica e a recombinação é fundamental para gerar novas combinações de alelos, especialmente, para locos estritamente ligados (BARABASCHI et al., 2016).

Os pomares de sementes de polinização aberta ou controlada foram os métodos preferidos para recombinação de genitores superiores no melhoramento florestal (FUNDA; EL-KASSABY, 2012) e os testes de progênies têm sido predominantemente utilizados para avaliação e seleção de árvores *plus* de segunda geração (WHITE; ADAMS; NEALE, 2007). No entanto, apesar de geralmente abranger uma base genética mais ampla, devido ao maior número indivíduos envolvidos no cruzamento, espera-se que os pomares de polinização aberta promovam um ganho genético menor, devido à falta de conhecimento do parental masculino (FUNDA; EL KASSABY, 2012; HALLINGBÄCK; JANSSON, 2013; YUAN et al., 2016).

Em razão disso, El-Kassaby (2006) propôs a metodologia “*Breeding without Breeding*” (BwB) em contraposição ao uso de dialelos, que geravam grande número de cruzamentos e dificuldades de avaliação das progênies. Para tanto, o BwB se sustenta na associação do

emprego de marcadores de DNA (SSR) com métodos para reconstrução do *pedigree*, que permitem estimar parâmetros genéticos e predizer os valores genéticos sem haver cruzamento. A avaliação é realizada por meio do procedimento REML/BLUP (*Restricted Maximum Likelihood/Best Linear Unbiased Prediction*) utilizando as informações de *pedigree* e as mensurações fenotípicas para a seleção de indivíduos *plus* (LSTIBŮREK; HODGE; LACHOUT, 2015).

Os marcadores microssatélites (SSR) continuam sendo efetivamente empregados em estudos genéticos com *Eucalyptus* (SILVA et al., 2015; GONZAGA et al., 2016; MORA et al., 2017). Isso porque trata-se de uma ferramenta informativa, robusta e com alto poder de exclusão na atribuição de paternidade (SUMATHI; YASODHA, 2014; TELFER et al., 2015). Por essa razão, os SSR permitem a reconstrução do *pedigree* de progênies oriundas de polinização aberta com adequado grau de confiabilidade. Além disso, os parâmetros do sistema de reprodução permitem acessar com maior precisão a variância genética aditiva e os coeficientes de herdabilidade, em contraposição àqueles baseados em pressuposições irreais, como a panmixia perfeita durante um evento reprodutivo.

Assim, o objetivo geral desse capítulo foi verificar a distribuição da variação genética dentro e entre progênies de segunda geração oriundas de um pomar de sementes de polinização aberta de *Eucalyptus urophylla*. Os objetivos específicos foram:

- i) Propor a análise de um teste de progênies de polinização aberta como um teste de progênies de irmãs completas;
- ii) Ajustar as estimativas de variância genética aditiva com base no coeficiente parentesco;
- iii) Selecionar genótipos superiores, indicar cruzamentos promissores e conhecer a capacidade geral e específica de combinação.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Material

Os genótipos constituem um teste de progênies de segunda geração (Figura 6.1) e um Pomar de Sementes por Mudas de *Eucalyptus urophylla* (PSM-TP-EU), ambos instalados na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE), que pertence a Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEPE/FEIS/UNESP), localizada no município de Selvíria-MS.

O teste de progênies foi instalado em 05 de outubro de 2016 e denominado de TP2G-TP-EU. A coleta de sementes para constituição do experimento foi realizada em 23

árvores matrizes do PSM-TP-EU. O delineamento experimental seguiu o de blocos casualizados, com 23 tratamentos (progênes), uma planta por parcela, com 30 repetições (desbalanceadas), no espaçamento 3,0 m × 1,5 m. A área experimental é de 0,96 ha e as coordenadas geográficas compreendem a latitude de 20°20'58"S e longitude de 51°24'04"O, com 339 metros de altitude.

Figura 6.1 - Teste de progênes de segunda geração de *Eucalyptus urophylla* com dez meses de idade (TP2G-TP-EU), instalado na FEPE/FEIS/UNESP, em Selvíria-MS.

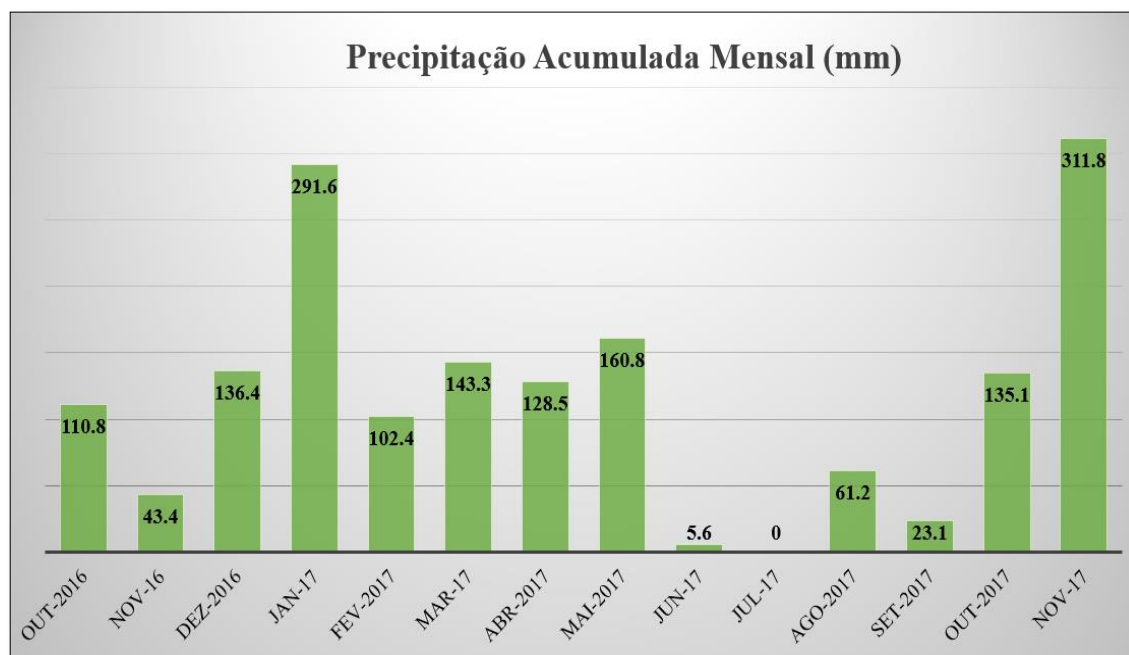


Fonte: Elaboração da própria autora.

A seleção no teste de progênes para formação do PSM-TP-EU ocorreu em 2011 e após o desbaste permaneceram 298 indivíduos, que pertencem a 55 progênes. A coleta de sementes no PSM-TP-EU para constituição do TP2G-TP-EU foi realizada em 23 árvores matrizes de 22 progênes diferentes (Tabela 2A). Outros detalhes da formação do Pomar de Sementes por Mudas estão disponíveis no item “Material e Métodos”, do Capítulo II.

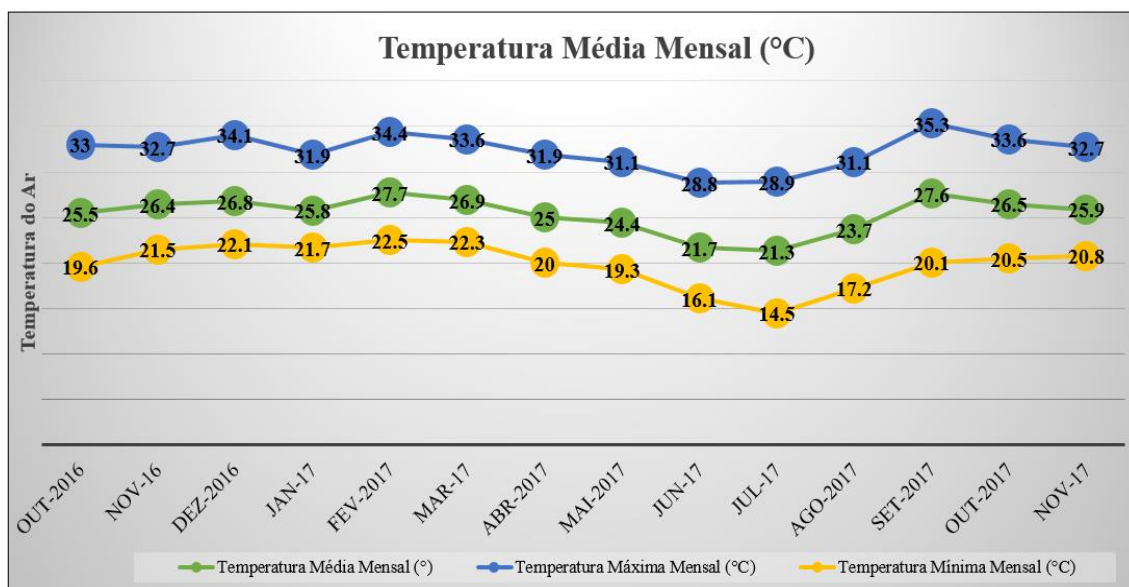
O solo da FEPE/FEIS/UNESP foi classificado como LATOSSOLO VERMELHO Distrófico típico (EMBRAPA, 2013) e o tipo climático como Aw, conforme a classificação de Köppen, com verão quente e chuvoso e inverno ameno e seco. A temperatura média anual no período desde a instalação do TP2G-TP-EU até completar um ano (outubro/2016 a novembro/2017) na estação em Ilha Solteira-SP, que fica cerca de 12 km em linha reta da FEPE/FEIS/UNESP em Selvíria-MS, foi de 25,4°C e precipitação média anual de 1654 mm (CLIMA FEIS, 2017). As médias referentes a temperatura e precipitação indicaram condições adequadas para desenvolvimento do *E. urophylla* (Figuras 6.2 e 6.3).

Figura 6.2 - Dados de temperatura média, máxima e mínima (°C) mensuradas no período de outubro de 2016 a novembro 2017, na estação climática de Ilha Solteira-SP.



Fonte: Adaptado de clima.feis.unesp.br. Acesso em: 19 dez. 2017.

Figura 6.3 - Dados de precipitação acumulada mensal (mm) mensuradas no período de outubro de 2016 a novembro 2017, na estação climática de Ilha Solteira-SP.



Fonte: Adaptado de clima.feis.unesp.br. Acesso em: 19 dez. 2017.

6.2.2 Métodos

6.2.2.1 Caracterização fenotípica

A caracterização fenotípica foi realizada no TP2G-TP-EU quando as plantas completaram um ano de idade. Os caracteres avaliados foram a altura total de plantas (ALT, m), diâmetro a altura do peito (DAP, cm) e sobrevivência (SOB, %). Para mensuração da ALT utilizou-se uma régua telescópica para árvores com até 8,0 m e o hipsômetro *Forestor Vertex* para plantas acima dessa medida. Para aferição do DAP empregou-se um paquímetro posicionado perpendicularmente ao fuste da árvore, na altura de 1,30 m do solo. A SOB foi avaliada considerando “0” para ausência da planta e “1” para presença.

A caracterização fenotípica também foi realizada nas árvores do PSM-TP-EU. Os caracteres silviculturais (ALT e DAP) foram mensurados aos 23 anos de idade e a densidade média aparente da madeira (DMA, g cm^{-3}) foi determinada aos 25 anos de idade, por meio de amostragem não destrutiva nas 23 árvores matrizes, empregando o método de densitometria de Raios - X.

Para determinação da densidade média aparente da madeira de cada árvore matriz foi retirada uma amostra da casca até a região da medula (bagueta), com auxílio de um trado de incremento (Figura 6.4). Após a coleta, as amostras foram secas em temperatura ambiente para evitar rachaduras e acondicionadas em canudos de plástico. O preparo das amostras consistiu na fixação em um suporte de madeira e secção transversal com aproximadamente 2,00 mm de espessura, obtida pelo corte em serra circular dupla paralela. As amostras não foram lixadas e as rebarbas do suporte foram retiradas com estilete. Posteriormente, foram limpas com pincel e mensurados o comprimento e espessura média. Por fim, foram acondicionadas em uma câmara de climatização, com 65% de umidade e temperatura controlada de 20°C até o momento da leitura no aparelho de Raios - X (AMARAL; TOMAZELLO FILHO, 1998).

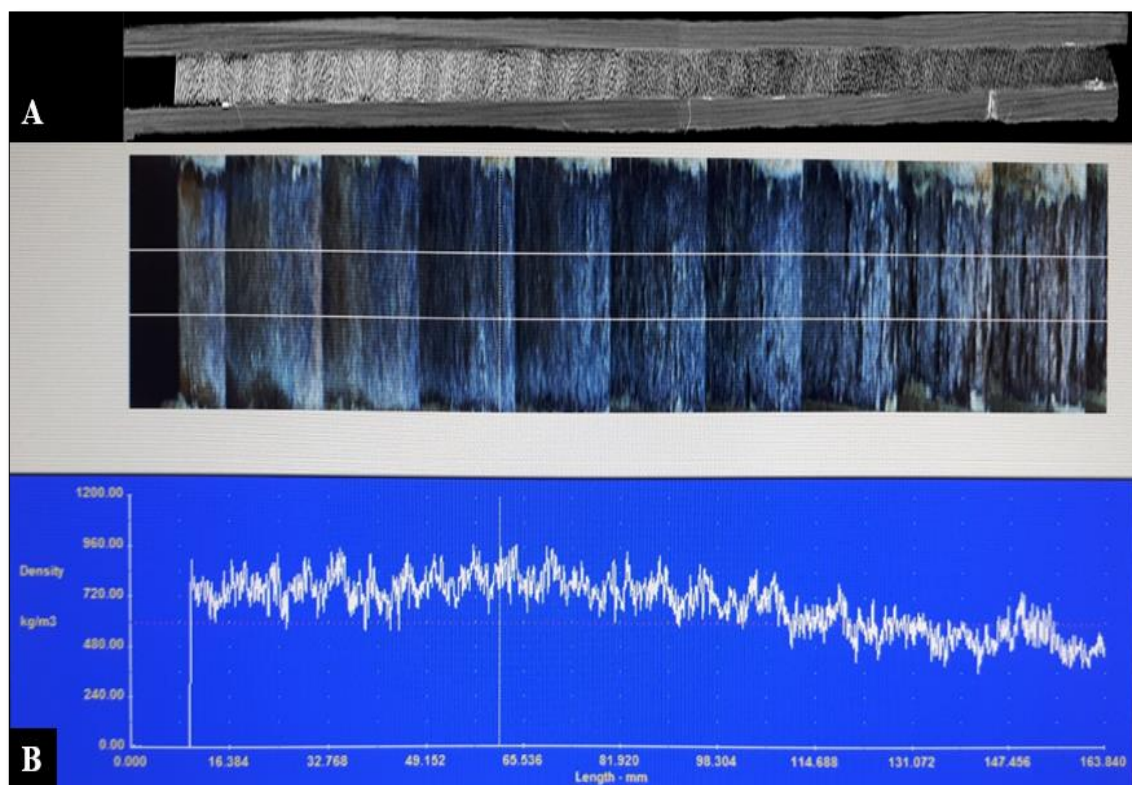
Figura 6.4 - Introdução do trado de incremento (A), bagueta de madeira (B), corte em serra circular (C) e amostra da madeira de *Eucalyptus urophylla* no suporte (D).



Fonte: Elaboração da própria autora.

Após serem acondicionadas na câmara para climatização, as amostras (baguetas fixadas ao suporte de madeira) foram colocadas no equipamento QTRS-01X (Fabricante: Quintek Measurement Systems), para obtenção do perfil densitométrico (Figura 6.5). Cada amostra foi colocada em suporte metálico e encaixada no compartimento blindado do equipamento. Após a calibração, foi iniciado a leitura das amostras com varredura contínua por um feixe de raios X colimado. A densidade aparente da madeira foi determinada ponto a ponto ($8\ \mu\text{m}$) e os valores de Raios - X que passaram pela amostra foram transformados em valores de densidade aparente, com o suporte do *software* QMS. Todas as etapas de preparo e leitura das amostras nos equipamentos foram realizadas no Laboratório de Anatomia, Identificação e Densitometria de Raios X, no Departamento de Ciências Florestais, da ESALQ/USP, em Piracicaba-SP, com a colaboração da equipe e contribuição do Prof. Dr. Mario Tomazello Filho.

Figura 6.5 - Imagem escaneada na posição casca-medula (A) e perfil densitométrico de uma árvore matriz de *Eucalyptus urophylla*.



Fonte: Elaboração da própria autora.

6.2.2.2 Caracterização genética

Para determinar a paternidade de cada planta do TP2G-TP-EU foram genotipadas todas as mudas que constituíram o teste de progênes de segunda geração (605), inclusive as utilizadas para reposição das que não sobreviveram no campo (117), totalizando 722 indivíduos. Delas, não foi possível conhecer o provável candidato a pai de nove plantas: uma devido a falha de locos na genotipagem e oito que não tiveram o pai encontrado dentro das populações estudadas.

As árvores maternas e todos os possíveis candidatos a pai foram genotipados para que fosse possível acessar o *pedigree* da maior quantidade possível de árvores do teste de progênes de segunda geração. Dessa forma, foram genotipados todos os indivíduos adultos dos pomares de sementes [PSM-TP-EU (298) e PSM-TPR-EU (79)] e da amostra do teste de progênes que constitui o PCPN-EU (90). Os detalhes e as etapas da caracterização genética encontram-se descritos no item “Material e Métodos” dos Capítulos I e II. Todas as etapas de genotipagem dos 1189 indivíduos foram realizadas no Laboratório Heréditas/Genomax. Para acessar a paternidade dos indivíduos do TP2G-TP-EU foram empregados 12 locos microssatélites

EMBRA.

6.2.2.3 Análises quantitativas

I) Análise descritiva do PSM-TP-EU

Os componentes de média, desvio-padrão e coeficiente de variação foram obtidos com a utilização do *Microsoft Excel*.

II) Análise do teste de progênes de segunda geração

As estimativas de componentes de variância e parâmetros genéticos foram obtidas pela metodologia do modelo linear misto (aditivo univariado) - REML/BLUP (máxima verossimilhança restrita/melhor predição linear não viciada), empregando-se o programa genético-estatístico Selegen-REML/BLUP (RESENDE, 2016).

A análise dos caracteres quantitativos, para acomodar a estimativa de variância genética aditiva, empregou o modelo 95 do Selegen, utilizado para avaliação de progênes de polinização aberta (considerando como meias-irmãs), um local, no delineamento de blocos casualizados, com 23 tratamentos e uma planta por parcela, conforme o modelo matemático:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xr} + \mathbf{Za} + \mathbf{e};$$

em que: $\mathbf{y}$ é o vetor de dados, $\mathbf{r}$ é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral, $\mathbf{a}$ é o vetor dos efeitos genéticos aditivos individuais (assumidos como aleatórios), e $\mathbf{e}$ é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

Para estimar a variância genética aditiva ($\hat{\sigma}_a^2$) foram empregados os coeficientes de parentesco ($\hat{r}_{xy}$) obtidos no Capítulo II, por meio do coeficiente médio de coancestria dentro de progênes em nível populacional ($\hat{r}_{xy} = 0,304$) e pela máxima coancestria média em nível de progênie ($\hat{r}_{xy} = 0,590$), obtidos pela análise do sistema de reprodução. O primeiro aplica um nível de ajuste da variância genética aditiva moderado, enquanto o segundo é mais rigoroso. Os coeficientes de herdabilidade individual no sentido restrito ($\hat{h}_a^2$) e ganho de seleção ($\hat{G}_s = d_s \times \hat{h}_a^2$) foram utilizados com a finalidade comparativa. O diferencial de seleção (d_s) foi baseado na seleção fenotípica dos 100 melhores indivíduos para cada caráter ($\mu_s - \mu_o$), com

20,6% de intensidade de seleção.

Para seleção de genitores com base na capacidade geral e específica de combinação, foi utilizado o Modelo 87 do Selegen, aplicado a avaliação de indivíduos em progênes de irmãs completas, obtidas sob cruzamentos fatoriais (população materna e paterna), em delineamento de blocos completos e uma planta por parcela, conforme Resende (2007):

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xr} + \mathbf{Zm} + \mathbf{Wf} + \mathbf{Tc} + \mathbf{e};$$

em que: $\mathbf{y}$ é o vetor de dados; $\mathbf{r}$ é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral; $\mathbf{m}$ é o vetor dos efeitos de genitores da população de machos (assumidos como aleatórios); $\mathbf{f}$ é o vetor dos efeitos genéticos de genitores da população de fêmeas (assumidos como aleatórios); $\mathbf{c}$ é o vetor dos efeitos aleatórios da capacidade específica de combinação dos genitores da população de machos com os genitores da população de fêmeas (assumidos como aleatórios); e $\mathbf{e}$ é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

As distribuições e estruturas de variância associadas aos termos do modelo são (RESENDE, 2007):

$$y|r, V \sim N(Xr, V)$$

$$gm|I\sigma_{gm}^2 \sim N(0, I\sigma_{gm}^2).$$

$$gf|I\sigma_{gf}^2 \sim N(0, I\sigma_{gf}^2)$$

$$c|\sigma_{cec}^2 \sim N(0, I\sigma_{cec}^2)$$

$$e|\sigma_e^2 \sim N(0, I\sigma_e^2)$$

$$V = Z_m \sigma_{gm}^2 Z_m' + Z_f \sigma_{gf}^2 Z_f' + W I \sigma_{cec}^2 W' + I \sigma_e^2$$

III) Teste de progênes de polinização livre para controlada

A caracterização genética das progênes, das árvores matrizes e dos prováveis candidatos a pai, permitiu determinar o mais provável parental masculino das progênes de polinização aberta. As análises de exclusão de paternidade foram obtidas usando o programa CERVUS 3.0 (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007). Dessa forma, foi possível utilizar o teste de progênes de polinização aberta em um teste fatorial, onde todos os parentais masculinos e femininos das progênes foram determinados. Conhecendo o *pedigree* dos indivíduos e de posse dos caracteres quantitativos (ALT e DAP)

foi possível desmembrar os efeitos de dominância dos efeitos aditivos e, com isso, estimar a capacidade geral e a capacidade específica de combinação. A variância epistática foi assumida como nula. As estimativas dos coeficientes de variância e parâmetros genéticos foram analisadas conforme as equações:

i) Variância genética aditiva ($\hat{\sigma}_a^2$):

$$\hat{\sigma}_a^2 = 2(\hat{\sigma}_{gm}^2 + \hat{\sigma}_{gf}^2);$$

em que: $\hat{\sigma}_{gm}^2$ refere-se a variância genética entre machos e $\hat{\sigma}_{gf}^2$ é a variância genética entre fêmeas.

ii) Variância de dominância ($\hat{\sigma}_d^2$):

$$\hat{\sigma}_d^2 = 4\hat{\sigma}_{cec}^2;$$

em que: $\hat{\sigma}_{cec}^2$ refere-se a variância da capacidade específica de combinação entre dois genitores, a qual estima 1/4 da variação genética de dominância.

iii) Variância fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$):

$$\hat{\sigma}_f^2 = \hat{\sigma}_{gm}^2 + \hat{\sigma}_{gf}^2 + \hat{\sigma}_{cec}^2 + \hat{\sigma}_e^2;$$

em que: $\hat{\sigma}_e^2$ refere-se variância residual.

iv) Herdabilidade individual no sentido restrito ($\hat{h}_a^2$):

$$\hat{h}_a^2 = \frac{\hat{\sigma}_a^2}{\hat{\sigma}_f^2} \text{ (RESENDE, 2007);}$$

v) Coeficiente de determinação dos efeitos da capacidade específica de combinação ($\hat{c}_{cec}^2$):

$$\hat{c}_{cec}^2 = \frac{\hat{\sigma}_{cec}^2}{\hat{\sigma}_f^2} \text{ (RESENDE, 2007);}$$

vi) Herdabilidade individual para o efeito de árvores paternas ($\hat{h}_m^2$):

$$\hat{h}_m^2 = \frac{4\hat{\sigma}_{gm}^2}{\hat{\sigma}_{gm}^2 + \hat{\sigma}_{gf}^2 + \hat{\sigma}_{cec}^2 + \hat{\sigma}_e^2} \text{ (RESENDE, 2007);}$$

vii) Herdabilidade individual para o efeito de árvores maternas ($\hat{h}_f^2$):

$$\hat{h}_f^2 = \frac{4\hat{\sigma}_{gf}^2}{\hat{\sigma}_{gm}^2 + \hat{\sigma}_{gf}^2 + \hat{\sigma}_{cec}^2 + \hat{\sigma}_e^2} \text{ (RESENDE, 2007);}$$

viii) Grau médio de dominância ($\hat{d}$), que foi estimado conforme recomendação¹:

$$\hat{d} = \frac{\hat{\sigma}_d^2}{\hat{\sigma}_a^2 + \hat{\sigma}_d^2};$$

em contraposição à utilização da fórmula clássica $\hat{d} = \frac{\hat{\sigma}_d^2}{\hat{\sigma}_a^2}$.

¹ Sugestão do Prof. Dr. M.D.V. de Resende, citado em Henriques (2016), devido ao grau de melhoramento genético que os genótipos de *E. urophylla* possuem.

6.3 Resultados

6.3.1 Caracteres quantitativos e qualidade da madeira

• **PSM-TP-EU:** a média geral para altura de plantas (ALT) de *Eucalyptus urophylla* foi de 44,2 m e 39,3 cm para o diâmetro a altura do peito (DAP) e o coeficiente de variação experimental intermediário: 17,1% (ALT) e 21,3% (DAP). Em relação as árvores matrizes, a média foi de 47,5 m para ALT e 44,4 cm para DAP (Tabela 6.1). A densidade média aparente (DMA) foi de 0,725 g cm⁻³ e o intervalo foi de 0,611 a 0,828 g cm⁻³. As médias para ALT e DAP das árvores matrizes foram maiores que a média geral do PSM-TP-EU, assim como o incremento médio anual para volume (0,16 > 0,12 m³ ano⁻¹).

Tabela 6.1 - Altura de plantas (ALT*, m), diâmetro a altura do peito (DAP*, cm) e densidade aparente da madeira (DMA**, g cm⁻³) de árvores matrizes do PSM-TP-EU, de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.

Árvore Matriz	ALT* (m)	DAP* (cm)	DMA** (g.cm ⁻³)
TP_M_1_44	54,2	61,1	0,611
TP_M_10_41	51,1	56,7	0,818
TP_M_20_28	46,3	47,5	0,704
TP_M_21_48	52,0	43,3	0,765
TP_M_35_55	48,4	50,0	0,705
TP_M_45_42	47,4	46,5	0,800
TP_M_55_11	43,4	43,6	0,783
TP_M_65_27	52,9	57,9	0,828
TP_M_86_1	44,6	40,7	0,788
TP_M_95_21	45,0	49,9	0,776
TP_M_101_49	53,9	42,9	0,729
TP_M_104_9	48,9	34,6	0,725
TP_M_116_19	49,0	45,2	0,807
TP_M_118_20	44,1	42,6	0,713
TP_M_155_39	42,3	37,8	0,701
TP_M_212_1	34,6	30,1	0,639
TP_M_214_64	49,1	42,6	0,638
TP_M_236_23	45,4	36,1	0,673
TP_M_241_32	54,4	46,7	0,717
TP_M_458_25	43,8	43,8	0,747
TP_M_533_3	38,0	39,3	0,684
TP_M_2473_47	48,2	39,2	0,659
TP_M_2612_61	54,6	42,3	0,668
Média	47,5	44,4	0,725
Desvio-padrão	5,2	7,4	0,062

Nota: ALT* e DAP*: Mensurado aos 23 anos de idade; DMA**: Determinada aos 25 anos de idade.

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

• **TP2G-TP-EU:** a média para sobrevivência foi de 80,6% e as médias de crescimento foram de 6,63 m para ALT e 5,66 cm para DAP, com um ano de idade (Tabela 6.2). Embora a sobrevivência tenha sido moderada, o desenvolvimento dos indivíduos foi adequado. O intervalo de variação para ALT foi de 1,3 m a 13,4 m e para DAP de 1,8 cm a 10,2 cm. Das árvores que foram mensuradas 60% apresentaram ALT maior que a média geral e para DAP foram 58%. A análise desses dados indicou boas possibilidades para seleção de indivíduos produtivos. Cerca de 8,5% das árvores do TP2G-TP-EU apresentaram botões florais na avaliação com um ano de idade. O coeficiente de variação experimental (CV_e) foi intermediário para experimentos em que ocorrem competição (20% a 30%).

Tabela 6.2 - Altura de plantas (ALT, m), diâmetro a altura do peito (DAP, cm) e sobrevivência (SOB, %) para árvores com um ano de idade do TP2G-TP-EU, de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.

Parâmetros Estatísticos	ALT (m)	DAP (cm)	SOB (%)
Média geral	6,63	5,66	80,60
Mínimo	1,3	1,8	-
Máximo	13,4	10,2	-
Amplitude de variação	12,1	8,4	-
CV_e (%)	27,43	27,83	-

Nota: CV_e : coeficiente de variação experimental.

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

6.3.2 Parâmetros genéticos

Os ganhos de seleção obtidos a partir da aplicação do coeficiente de parentesco que aplicou um nível de ajuste rigoroso, representaram menos da metade do ganho para estimativa obtida na análise de progênies de polinização aberta. Os dois ajustes indicaram superestimativas na variância genética aditiva ($\hat{\sigma}_a^2$) e herdabilidade individual no sentido restrito ($\hat{h}_a^2$) (Tabelas 6.3 e 6A).

Assim, a aplicação do modelo com base na pressuposição de que progênies de polinização aberta são meias-irmãs é errôneo para o TP2G-TP-EU, devido as diferentes relações de parentesco que existem dentro de progênies, como resultado de cruzamentos correlacionados, cruzamentos entre parentes e autofecundação.

Tabela 6.3 - Estimativas de variância genética aditiva ($\hat{\sigma}_a^2$), herdabilidade individual ($\hat{h}_a^2$) e ganhos de seleção ($\hat{G}_s$) aplicando 20,6% de intensidade de seleção, em progênie de *Eucalyptus urophylla* do TP2G-TP-EU, em Selvíria-MS.

	ALT	ALT ¹	ALT ²	DAP	DAP ¹	DAP ²
$\hat{\sigma}_a^2$	2,0114	1,6543	0,8524	1,2720	1,0460	0,5390
$\hat{\sigma}_p^2$	0,5029	0,5029	0,5029	0,3180	0,3180	0,3180
$\hat{\sigma}_f^2$	3,8144	3,8144	3,8144	2,3775	2,3775	2,3775
$\hat{h}_a^2$	0,53	0,43	0,22	0,54	0,44	0,23
d_s	2,73 m	2,73 m	2,73	2,33 cm	2,33 cm	2,33 cm
$\hat{G}_s$ (%)	21,9%	17,6%	9,1%	22,3%	18,1%	9,5%

Nota: $\hat{\sigma}_a^2$: variância genética aditiva; $\hat{\sigma}_p^2$: variância entre progênie; $\hat{\sigma}_f^2$: variância fenotípica; $\hat{h}_a^2$: herdabilidade aditiva; d_s : diferencial de seleção; $\hat{G}_s$: ganho com seleção em porcentagem; estimativas para ALT¹ e DAP¹ corrigidas com base no coeficiente de parentesco (0,304) e para ALT² e DAP² corrigidas com base no coeficiente de parentesco (0,590).

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

A variância de dominância foi superior a variância genética aditiva para os caracteres ALT e DAP (Tabela 7A). O coeficiente de variação genotípico entre as progênie foi alto ($CV_{gp} > 18\%$) e similar entre os caracteres (ALT e DAP) (Tabela 6.4), a indicar que existe variação genética entre as progênie.

O coeficiente de herdabilidade individual no sentido restrito na população de machos ($\hat{h}_m^2$) indicou que existem diferenças genéticas para ALT, mas não para DAP. A colaborar com isso, o teste de LRT não detectou diferenças entre os tratamentos da população de machos. A herdabilidade na população de fêmeas foi maior ($\hat{h}_f^2 > \hat{h}_m^2$) e variou de 0,29 (DAP) a 0,37 (ALT), indicando que a seleção voltada para fêmeas pode ser mais efetiva na obtenção de ganhos genéticos. O teste de LRT detectou diferenças significativas para a população de fêmeas para os dois caracteres.

O coeficiente de herdabilidade individual ($\hat{h}_a^2$) foi maior para ALT (Tabela 6.4), a indicar que os efeitos aditivos para esse caráter são maiores. O coeficiente de determinação dos efeitos da capacidade específica de combinação ($\hat{c}_{cec}^2$) foi moderado para ALT e a estimativa para DAP foi quase o dobro ($0,2576 > 0,1368$), a mostrar que os efeitos de não aditivos são predominantes para esse caráter. Desse modo, o teste de LRT indicou diferenças para DAP e não para ALT. O grau médio de dominância indicou dominância parcial ($0 < \hat{d} < 1$) e foi muito mais alto para DAP.

Tabela 6.4 - Parâmetros genéticos em um teste de progênes de segunda geração de *Eucalyptus urophylla* com um ano de idade, oriundo do PSM-TP-EU de polinização aberta, em Selvíria-MS.

Parâmetros Genéticos	ALT (m)	DAP (cm)
$\hat{h}_m^2$	0,16±0,10	0,03±0,05
$\hat{h}_f^2$	0,37	0,29
$\hat{c}_{cec}^2$	0,1368	0,2576
$\hat{h}_a^2$	0,27	0,16
$\hat{d}$	0,67	0,87
CV_{gp} (%)	18,30	19,84
LRT (♂)	0,45 ^{ns}	0,03 ^{ns}
LRT (♀)	18,11 ^{**}	10,37 ^{**}
LRT (CEC)	1,32 ^{ns}	6,54 [*]

Nota: $\hat{h}_m^2$: herdabilidade individual no sentido restrito na população de machos; $\hat{h}_f^2$: herdabilidade individual no sentido restrito na população de fêmeas; $\hat{c}_{cec}^2$: coeficiente de determinação dos efeitos da capacidade específica de combinação; $\hat{h}_a^2$: herdabilidade individual no sentido restrito; $\hat{d}$: grau médio de dominância; CV_{gp} : coeficiente de variação genotípica entre as progênes; LRT: teste da razão de verossimilhança; (^{ns}): não significativo; (*): significativo a 5% = 3,84; (**): significativo a 1% = 6,63.

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

6.3.3 Seleção de genitores

O *ranking* de cruzamento, com base no desempenho das progênes do TP2G-TP-EU para os caracteres quantitativos, permitiu identificar os melhores genitores e cruzamentos. As médias para os caracteres foi de 6,17 m para ALT e 5,00 cm para DAP.

- **Fêmeas e machos:** o ganho de seleção das dez primeiras fêmeas foi de 0,47 m para ALT (7,6%) e 0,31 cm para DAP (6,2%), enquanto que para população de machos, os valores foram de 0,25 m para ALT (4,0%) e 0,04 cm para DAP (0,7%) (Tabela 6.5). Para machos, a concordância entre ALT e DAP foi de 50% e o melhor genitor paterno foi o indivíduo do PSM-TP-EU identificado como A_170 que pertence à família 13. Outro genitor masculino da mesma família foi indicado entre os dez primeiros (A_99). Entre eles, não houve presença de imigrantes, sendo que o melhor genitor masculino classificado para ALT foi o indivíduo TPR_A_85_25 (16º posição). A considerar os 30 melhores genitores masculinos para ALT houve ainda a presença do TPR_A_13_11 (19º), TPR_A_81_23 (22º) e TPR_A_21_25 (24º). Para DAP, o melhor genitor paterno imigrante foi o PC_A_94_98 (12º) sendo todos os demais

oriundos do PSM-TP-EU. Para fêmeas, a concordância das dez melhores para ALT e DAP foi de 90% (Tabela 6.5). A árvore matriz TP_M_55_11 destacou-se entre as demais. Entre elas, três foram também incluídas entre os melhores machos. As fêmeas com os menores valores genotípicos foram: TP_M_1_44, TP_M_2473_47, TP_M_458_25, TP_M_533_3 e TP_M_214_64.

Tabela 6.5 - Dez maiores valores genotípicos (g) para capacidade geral de combinação (CGC) para fêmeas e machos em um pomar de polinização aberta de *Eucalyptus urophylla* (PSM-TP-EU), em Selvíria-MS.

ALT (m)				
Posição	Fêmea	g	Macho	g
1	TP_M_55_11	1,0775	TP_A_170_13	0,4093
2	TP_M_21_48	0,9441	TP_A_102_1	0,3070
3	TP_M_95_21	0,7844	TP_A_360_56	0,2742
4	TP_M_65_27	0,6255	TP_A_99_13	0,2363
5	TP_M_101_49	0,3699	TP_A_409_30	0,2331
6	TP_M_212_1	0,2681	TP_M_21_48	0,2195
7	TP_M_2612_61	0,2499	TP_M_86_1	0,2158
8	TP_M_104_9	0,1795	TP_M_65_27	0,2132
9	TP_M_86_1	0,0950	TP_A_289_18	0,1888
10	TP_M_35_55	0,0690	TP_A_157_28	0,1734
DAP (cm)				
Posição	Fêmea	g	Macho	g
1	TP_M_95_21	0,6610	TP_A_170_13	0,0510
2	TP_M_55_11	0,6600	TP_M_65_27	0,0466
3	TP_M_21_48	0,4877	TP_A_31_28	0,0344
4	TP_M_35_55	0,3695	TP_A_70_14	0,0339
5	TP_M_2612_61	0,2032	TP_M_21_48	0,0326
6	TP_M_104_9	0,1957	TP_A_299_38	0,0311
7	TP_M_212_1	0,1755	TP_M_2612_61	0,0305
8	TP_M_118_20	0,1528	TP_A_409_30	0,0303
9	TP_M_65_27	0,1322	TP_A_262_45	0,0301
10	TP_M_101_49	0,0693	TP_A_99_13	0,0297

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

- **Capacidade específica de combinação:** o ganho de seleção dos dez melhores cruzamentos para DAP foi de 1,01 cm (20,3%), enquanto para ALT foi de 0,69 m (11,2%) (Tabela 6.6). Entre os dez cruzamentos de maior CEC foram observados três endogâmicos, sendo um para ALT e dois para DAP. Em relação os 30 primeiros cruzamentos, dois ocorreram com pólen imigrante para ALT: TP_M_20_28 × TPR_A_85_25 e TP_M_241_32 × TPR_A_81_23. Para o DAP não foram encontrados cruzamentos com pólen

imigrante até essa colocação. Ainda para os 30 melhores cruzamentos, a superioridade seria de 8,7% para ALT e 15,7% para DAP.

Tabela 6.6 - Maiores valores genotípicos (ge) para capacidade específica de combinação (CEC) entre árvores matrizes de um pomar de sementes por mudas de *Eucalyptus urophylla* (PSM-TP-EU) e populações de polinização aberta, em Selvíria-MS.

ALT (m)			
Cruzamento	Fêmea	Macho	ge
1	TP_M_95_21	TP_A_360_56	0,9217
2	TP_M_65_27	TP_A_170_13	0,8618
3	TP_M_101_49	TP_M_65_27	0,8331
4	TP_M_55_11	TP_A_99_13	0,7156
5	TP_M_10_41	TP_A_139_41	0,6575
6	TP_M_95_21	TP_A_289_18	0,6345
7	TP_M_214_64	TP_M_21_48	0,6299
8	TP_M_533_3	TP_A_79_28	0,6002
9	TP_M_65_27	TP_M_101_49	0,5482
10	TP_M_214_64	TP_A_332_41	0,5328
DAP (cm)			
Cruzamento	Fêmea	Macho	ge
1	TP_M_533_3	TP_A_79_28	1,4584
2	TP_M_65_27	TP_A_170_13	1,1289
3	TP_M_104_9	TP_A_70_14	1,1096
4	TP_M_21_48	TP_A_299_38	1,0186
5	TP_M_214_64	TP_M_21_48	0,9656
6	TP_M_65_27	TP_M_101_49	0,9357
7	TP_M_20_28	TP_A_145_41	0,9003
8	TP_M_118_20	TP_A_286_20	0,8781
9	TP_M_35_55	PC_A_94_98	0,8735
10	TP_M_236_23	TP_A_311_23	0,8661

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

• **Valor genotípico de cruzamentos:** com base no valor genotípico de cruzamentos (Vgc) foram selecionados os dez melhores (Tabela 6.7). A Vgc engloba os efeitos aditivos de fêmeas, de machos e a capacidade específica de combinação. Para ALT e DAP, verificou-se a superioridade da árvore matriz TP_M_55_11, que foi envolvida em 50% dos cruzamentos. Para ALT, a superioridade dos dez melhores cruzamentos em relação à média geral foi de 25,5% (média = 7,74 m) e para DAP foi de 26,0% (média = 6,30 cm). A concordância dos cruzamentos baseados na Vgc e CEC foi de 50% para ALT e 40% para DAP. Para ALT, os cruzamentos envolveram as cinco melhores fêmeas e seis dos dez melhores machos, enquanto para DAP, foram seis fêmeas e cinco machos. Outros cruzamentos interessantes podem ser obtidos

ampliando a quantidade de cruzamentos realizada no programa. Para os 30 primeiros cruzamentos do *ranking* a superioridade seria de 21,2% para ALT (7,48 m) e 22,0% para DAP (6,10 cm).

Tabela 6.7 - Maiores valores genotípicos de cruzamento (Vgc) entre árvores matrizes de um pomar de sementes por mudas de *Eucalyptus urophylla* (PSM-TP-EU) e populações de polinização aberta, em Selvíria-MS.

ALT (m)			
Cruzamento	Fêmea	Macho	Vgc
1	TP_M_55_11	TP_A_99_13	8,1966
2	TP_M_95_21	TP_A_360_56	8,1475
3	TP_M_65_27	TP_A_170_13	8,0638
4	TP_M_95_21	TP_A_289_18	7,7749
5	TP_M_101_49	TP_M_65_27	7,5835
6	TP_M_21_48	TP_A_129_55	7,5704
7	TP_M_55_11	TP_A_409_30	7,5661
8	TP_M_55_11	TP_A_168_56	7,5114
9	TP_M_55_11	TP_A_31_28	7,5103
10	TP_M_55_11	TP_A_356_62	7,4837
DAP (cm)			
Cruzamento	Fêmea	Macho	Vgc
1	TP_M_21_48	TP_A_299_38	6,5354
2	TP_M_55_11	TP_A_99_13	6,3398
3	TP_M_55_11	TP_A_356_62	6,3374
4	TP_M_104_9	TP_A_70_14	6,3371
5	TP_M_55_11	TP_A_31_28	6,3144
6	TP_M_65_27	TP_A_170_13	6,3101
7	TP_M_35_55	PC_A_94_98	6,2676
8	TP_M_55_11	TP_A_261_1	6,1962
9	TP_M_55_11	TP_A_332_41	6,1923
10	TP_M_95_21	TP_A_187_64	6,1638

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

- **Clonagem:** com base no valor genético dos indivíduos ($g = a + d$) foram indicadas as dez árvores mais promissoras do TP2G-TP-EU para estabelecer um teste clonal (Tabela 6.8). Para ALT, o ganho predito de seleção seria de 3,66 m ou 59,3%, enquanto para DAP, o ganho seria de 4,09 cm ou 81,9%. Para os 30 melhores indivíduos, o ganho para ALT seria de 46,3% e 67,9% para DAP. Desse modo, a seleção para DAP pode promover ganhos genéticos consideráveis, tanto para seleção das dez primeiras árvores quanto para as 30 melhores.

Tabela 6.8 - Posição das árvores com base no valor genético aditivo (a) e estimativas de valores genotípicos preditos (g) para progênie oriundas de um pomar de polinização aberta de *Eucalyptus urophylla*, em Selvíria-MS.

ALT (m)						
Ordem	Posição (a)	Progênie	Rep.	Cruzamento		g
				Fêmea	Macho	
1	1	9	11	TP_M_95_21	TP_A_360_56	5,3507
2	2	7	6	TP_M_65_27	TP_A_170_13	5,3296
3	5	9	10	TP_M_95_21	TP_A_289_18	4,1353
4	3	6	27	TP_M_55_11	TP_A_99_13	3,7143
5	36	10	7	TP_M_101_49	TP_M_65_27	3,3394
6	4	6	12	TP_M_55_11	TP_A_99_13	3,1951
7	55	21	9	TP_M_2612_61	TP_A_388_9	2,9832
8	13	22	25	TP_M_21_48	TP_A_231_20	2,9373
9	61	11	10	TP_M_104_9	TP_A_23_14	2,8170
10	7	22	10	TP_M_21_48	TP_A_129_55	2,8128
DAP (cm)						
Ordem	Posição (a)	Progênie	Rep.	Cruzamento		g
				Fêmea	Macho	
1	57	7	6	TP_M_65_27	TP_A_170_13	5,0463
2	1	6	5	TP_M_55_11	TP_A_261_1	4,6932
3	29	4	4	TP_M_35_55	PC_A_94_98	4,1588
4	2	6	1	TP_M_55_11	TP_A_356_62	4,1389
5	62	11	4	TP_M_104_9	TP_A_70_14	4,0453
6	69	13	11	TP_M_118_20	TP_A_286_20	3,9622
7	265	19	7	TP_M_533_3	TP_A_79_28	3,8489
8	241	15	10	TP_M_214_64	TP_M_21_48	3,7264
9	162	3	1	TP_M_20_28	TP_A_145_41	3,6785
10	107	5	6	TP_M_45_42	TP_A_141_42	3,6446

Fonte: Dados da Pesquisa da Autora.

6.4 Discussão

As médias para os caracteres silviculturais das árvores matrizes foram de 7,5% (ALT) e 13,0% (DAP) superior à média geral dos 298 indivíduos de *Eucalyptus urophylla* do PSM-TP-EU (Tabela 6.1). Isso indica que a seleção das árvores para coleta de sementes foi adequada e, em geral, foram amostradas matrizes com bom desenvolvimento. A densidade média aparente (DMA) é cerca de 10% a 12% superior a densidade básica da madeira (DBM). Os valores de DMA forneceram um indicativo de que as árvores matrizes apresentam qualidade adequada para fornecer madeira para produção de polpa celulósica ($DBM = 0,48 \text{ g cm}^{-3}$ a $0,57 \text{ g cm}^{-3}$) e para produção de carvão vegetal ($DBM > 0,54 \text{ g cm}^{-3}$)

(IKEMORI et al., 1986). No entanto, como se trata de madeira adulta, que apresenta espessamento maior da parede das fibras e menor proporção de espaços vazios (parênquima), espera-se que a DBM seja maior em função da idade. No entanto, isso é um bom indicativo para qualidade da madeira das progênies, visto que se trata de um caráter de alta herdabilidade (PUPIN et al., 2017). As melhores árvores matrizes para os caracteres de crescimento e qualidade da madeira foram: TP_M_10_41, TP_M_21_48, TP_M_65_27, TP_M_116_19 e TP_M_241_32.

A média de SOB das árvores do TP2G-TP-EU foi razoável (80%) e a mortalidade até a idade de um ano ocorreu em função do ataque de formigas cortadeiras que possuem colônias na Mata Ciliar da FEPE/FEIS/UNESP e que está localizada a menos de 10 m da margem inferior do TP2G-TP-EU, onde verificou-se ataque mais intenso (Tabela 6.2). As condições de temperatura e precipitação no período desde a instalação até um ano de idade foram adequadas e as médias para os caracteres de crescimento indicam ótimo desenvolvimento das progênies. O Incremento Médio Anual (IMA) para ALT e DAP foram superiores aos relatados por Pinto et al. (2014), Henriques (2016) e Nunes et al. (2016), em genótipos de *Eucalyptus* sp. com avançados processos de seleção e melhoramento genético avaliados até a idade de três anos. O uso do IMA para fins comparativos foi necessário em função da dificuldade de encontrar estudos com avaliações para um ano de idade. A precocidade de florescimento pode ser explicada pela origem dos genótipos das árvores matrizes (ZANI FILHO et al., 1990) e, provavelmente, o espaçamento e a competição entre as árvores possam também ter favorecido. Embora o florescimento tenha sido atingido por poucos indivíduos (8,5%), a maioria das progênies iniciou o florescimento precocemente (78%) e isso pode viabilizar, por exemplo, a formação de famílias de autofecundação, com redução de tempo.

O coeficiente de variação experimental (CV_e) indicou que o efeito ambiental sobre as progênies foi alto (Tabela 6.2). Isso pode ter ocorrido por conta do espaçamento e da competição entre os indivíduos, que se encontram em pleno estágio de crescimento e a necessidade por água, nutrientes, área de ocupação do sistema radicular e da copa, é intensa. Além disso, os genótipos encontram-se mais sensíveis às variações ambientais, uma vez que as mudas deixaram as condições controladas de viveiro para se adequar as condições de campo que são mais adversas.

A variância genética aditiva ($\hat{\sigma}_a^2$) ajustada pelo coeficiente de parentesco obtido no capítulo II, minimizou os erros associados a herdabilidade individual no sentido restrito ($\hat{h}_a^2$),

a contribuir para estimar ganhos genéticos acurados (Tabela 6.3). O uso do coeficiente de parentesco ($\hat{r}_{xy}$) de 0,304 foi indicado para o ajuste por ser mais parcimonioso que o coeficiente de 0,590, visto que o segundo penaliza o coeficiente de variância genética aditiva e consequentemente, os ganhos de seleção. A variância de dominância foi superior a variância genética aditiva para ALT e DAP (Tabela 7A), implicando na possibilidade de exploração da seleção recorrente recíproca. Os níveis consideráveis de variação genética entre progênies (> 18%) indicam que existe variabilidade genética na população do TP2G-TP-EU, passível de ser empregado no melhoramento, sugerindo boas perspectivas para seleção (Tabela 6.4).

O coeficiente de herdabilidade no sentido restrito ($\hat{h}_a^2$) foi mediano e superior para ALT, a indicar a possibilidade de seleção para condução do programa de melhoramento, via seleção recorrente (Tabela 6.4).

A herdabilidade individual na população de fêmeas foi superior a de machos ($\hat{h}_f^2 > \hat{h}_m^2$), a sugerir a possibilidade de maiores ganhos com base na seleção de indivíduos na população de fêmeas, principalmente para ALT. Dessa forma, o *ranking* baseado na capacidade geral de combinação (CGC) para seleção de machos e fêmeas, que concentra informações do efeito aditivo dos genes, indicou que os maiores valores genotípicos foram para seleção de fêmeas, visando melhorar o caráter ALT (Tabela 6.5). A seleção de machos para incrementar o DAP não se mostrou viável, devido a herdabilidade baixa e não significância ($0,03 \pm 0,05$), associada ao baixo ganho genético ($\hat{G}_s = 0,7\%$). Portanto, os genitores mais promissores para melhorar a ALT e DAP pertencem a população de fêmeas e as progênies do TP2G-TP-EU que possuam as melhores árvores matrizes em sua genealogia são as mais indicadas para seleção, desde que estejam associados a elevada capacidade específica de combinação (CEC). Adicional a isso, observou-se que as cinco melhores fêmeas agregaram também desempenho superior para ALT, DAP e densidade aparente da madeira: 11,85% para ALT e 20,92% para DAP; indicando que seleção envolve bom potencial para crescimento associado a qualidade da madeira (média = $0,786 \text{ g cm}^{-3}$).

As estimativas do coeficiente de determinação dos efeitos da capacidade específica de combinação ($\hat{c}_{cec}^2$) e grau médio de dominância ($\hat{d}$), que indicou dominância parcial, foram maiores para DAP, contrapondo-se ao coeficiente de herdabilidade ($\hat{h}_a^2$), maior para ALT (Tabela 6.4). Esses parâmetros indicam o tipo de ação gênica associado aos caracteres quantitativos e fornecem subsídios aos melhoristas quanto ao método de seleção mais adequado para ser adotado (VENCOVSKY, 1969). De acordo com Cruz e Carneiro (2003) a heterose

manifestada em híbridos está intimamente relacionada ao valor genotípico do heterozigoto, expresso pelo grau médio de dominância, e da diferença gênica entre os genitores. Assim, o DAP exhibe maior grau de dominância, o que justifica sua seleção para definir genitores com base na capacidade específica de combinação, que devem apresentar maior divergência genética para maximizar a heterose.

Altas estimativas para CEC são importantes para obtenção de cruzamentos superiores, que por sua vez permite obter maior variabilidade nas gerações segregantes e indicam os desvios de um híbrido, em relação ao esperado com base na capacidade geral de combinação de seus genitores (RODRIGUES et al., 2016). Portanto, combinações que envolvam elevada estimativa de CEC e pelo menos um genitor com CGC são favoráveis. Para os dez cruzamentos selecionados com base na CEC, sete envolveram pelo menos um genitor com alta CGC para ALT e DAP (Tabelas 6.5 e 6.6). Para ALT, as exceções foram os cruzamentos 5, 8 e 10; e para DAP foram 1, 7 e 10. Portanto, as demais combinações são altamente recomendadas para exploração da heterose, visando qualquer um dos dois caracteres, uma vez que eles apresentam alta correlação genética (> 80%), ou seja, a seleção de um deles indiretamente influenciará de modo favorável o outro.

Diferentes métodos de seleção consideram os conceitos de CGC e CEC e o tipo de ação gênica. De acordo com Hallauer, Carena e Miranda Filho (2010), a maioria da variação dentro de cada conjunto de cruzamento foi atribuída ao desempenho médio dos genitores envolvidos e se existem efeitos aditivos associados a dominância parcial ou completa, os métodos de seleção devem enfatizar a CGC. Assim, a seleção como base na CEC deve priorizar o DAP, enquanto a seleção para CGC, a ALT.

A identificação dos melhores cruzamentos com base no valor genotípico de cruzamento (V_{gc}), que engloba os efeitos aditivos de fêmeas (af), machos (am) e da capacidade específica de combinação (CEC): $V_{gc} = [0,5 (af + am) + CEC]$ (RESENDE, 2007), apresentou 50% dos cruzamentos coincidentes com os baseados apenas na CEC para ALT e 40% para DAP (Tabelas 6.6 e 6.7). Todas as fêmeas apresentaram elevada CGC e entre os machos foram seis para ALT e cinco para DAP. Os ganhos genéticos obtidos com a seleção dos dez melhores cruzamentos foram de 25,5% para ALT e 26,0% para DAP, enquanto os ganhos baseados na CEC foram inferiores: 11,2% para ALT e 20,3% para DAP. Essa diferença ocorre porque a CEC está associada aos efeitos de dominância, enquanto o V_{gc} relaciona os efeitos aditivos e de dominância, para explorar a seleção de cruzamentos específicos. Assim, recomenda-se o estabelecimento de um pomar de polinização controlada para recombinação desses cruzamentos com alta performance, como meio para avançar o Programa de Melhoramento

Genético de *E. urophylla* da FEPE/FEIS/UNESP.

No melhoramento de espécies perenes em que a propagação vegetativa é viável, faz-se necessário predizer os valores genéticos totais dos melhores indivíduos ($g = a + d$). A escolha do número de indivíduos é inerente a cada projeto e dependente dos objetivos, disponibilidade de área para experimentação e das condições operacionais e financeiras. Foram propostos dez indivíduos para clonagem com base em cada caráter (Tabela 6.8). Os ganhos genéticos obtidos foram elevados, em relação ao DAP, tanto para os dez primeiros ($81,9\% > 59,3\%$) quanto para os 30 primeiros ($67,9\% > 46,3\%$). A associação entre os indivíduos com base na ALT ou DAP não foi significativa pela correlação de Spearman ($r_s = -0,02$). Portanto, recomenda-se fazer a seleção para clonagem dos melhores genótipos com base no DAP, que resulta em ganhos genéticos consideráveis e, acrescenta-se que, os trinta primeiros clones garantem ganho de seleção elevado e a manutenção de uma base genética mais ampla. Além disso, recomenda-se que para o teste inicial sejam utilizados o maior número possível de clones, a fim de eliminar posteriormente, os clones menos produtivos.

6.5 Conclusão

A variância genética dos caracteres de crescimento de *Eucalyptus urophylla* com um ano de idade é explicada principalmente pelos efeitos de dominância. A seleção com base nos genitores femininos é mais indicada e as melhores árvores matrizes também apresentam boas características de crescimento e densidade média aparente da madeira. A seleção de cruzamentos com base na capacidade específica de combinação é mais favorável para DAP e apresenta boas perspectivas. Recomenda-se que os genitores envolvidos nos melhores cruzamentos, com base no valor genotípico de cruzamento para DAP, sejam empregados para formação de um pomar de polinização controlada. A seleção de trinta indivíduos para formação de um teste clonal é adequada e indica ganhos genéticos para DAP, consideráveis.

REFERÊNCIAS

- AINLEY, W.M.; SASTRY-DENT, L.; WELTER, M.E.; MURRAY, M.G.; ZEITLER, B.; AMORA, R.; CORBIN, D.R.; MILES, R.R.; ARNOLD, N.L.; STRANGE, T.L.; SIMPSON, M.A.; CAO, Z.; CARROLL, C.; PAWELCZAK, K.S.; BLUE, R.; WEST, K.; ROWLAND, L.M.; PERKINS, D.; SAMUEL, P.; DEWES, C.M.; SHEN, L.; SRIRAM, S.; EVANS, S.L.; REBAR, E.J.; GREGORY, P.D.; UMOV, F.D.; WEBB, S.R.; PETOLINO, J.F. Trait stacking via targeted genome editing. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 11, n. 9, p. 1126-1134, 2013.
- AMARAL, A.C.B.; TOMAZELLO FILHO, M. Avaliação das características dos anéis de crescimento de *Pinus taeda* pela técnica de microdensidade de raios X. **Revista de Ciência e Tecnologia**, Piracicaba, v. 6, n. 11/12, p. 17-23, 1998.
- BARABASCHI, D.; TONDELLI, A.; DESIDERIO, F.; VOLANTE, A.; VACCINO, P.; VALÈ, G.; CATTIVELLI, L. Next generation breeding. **Plant Science**, Shannon, v. 242, n. 1, p. 3-13, 2016.
- BELHAJ, K.; CHAPARRO-GARCIA, A.; KAMOUN, S.; NEKRASOV, V. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISP/Cas system. **Plant Methods**, Londres, v. 9, n. 39, p.1-10, 2013.
- CLIMA FEIS, CANAL CLIMA DA UNESP ILHA SOLTEIRA. **Dados Climáticos** - Outubro 2016 a Novembro 2017. Disponível em: <<http://clima.feis.unesp.br/login.php>>. Acesso em: 19 dez. 2017.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, 2003. 585 p.
- EL-KASSABY, Y.A.; LSTIBUREK, M.; LIEWLAKSANEYANAWIN, C.; SLAVOV, G.T.; HOWE, G.T. Breeding without breeding: Approach, example, and proof of concept. **PLoS One**, San Francisco, v., 6, n. 10, p.43-56, 2006.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CNPQSO, 2013. 353 p.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF, 1998. 220 p.
- FUNDA, T.; EL-KASSABY, Y.A. Seed orchard genetics. In: HEMMING, D. **Plant sciences reviews**. 2012. 280 p.
- GONZAGA, J.M.S.; MANOEL, R.O.; SOUZA, A.C.B.; SOUZA, A.P.; MORAES, M.L.T.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A.M. Pollen contamination and nonrandom mating in a *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh seedling seed orchard. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 65, n. 1, 2016. Disponível em:<DOI: 10.1515/sg-2016-0001>. Acesso em: 17 dez. 2017.
- HALLAUER, A.R.; CARENA, M.J.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 3. ed. In: HANDBOOK OF PLANT BREEDING. SPRINGER-VERLAG. Nova York. 2010. 664 p.
- HALLINGBÄCK, H.R.; JANSSEN, G. Genetic information from progeny trials: a comparison between progenies generated by open pollination and by controlled crosses. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 9, n. 3, p.731-740, 2013.

HENRIQUES, E.P. **Seleção genética de progênies de irmãos completos obtidos entre espécies de *Eucalyptus* sp., visando a produção de carvão vegetal**. 2016. 79 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016.

IKEMORI, Y.K.; MARTINS, F.C.G.; ZOBEL, B.J.: The impact of accelerated breeding on wood properties. IN: IUFRO WORLD CONFERENCE DIVISION 5: FOREST PRODUCTS, 18., Ljubljana. **Proceedings...** [S. l.: s. n.], 1986. p.358–368.

LSTIBŮREK, M.; HODGE, G.R.; LACHOUT, P. Uncovering genetic information from commercial forest plantations - making up for lost time using “Breeding without breeding”. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v.11, n.55, 2015. Disponível em: < DOI 10.1007/s11295-015-0881-y>. Acesso em: 25 dez. 2017.

MARSHALL T.C.; SLATE, J.; KRUUK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p. 639-655, 1998.

MEUWISSEN, T.H.E.; HAYES, B.J.; GODDARD, M.E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, Bethesda, v. 157, n. 4, p. 1819-1829, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1461589/>>. Acesso em: 25 dez. 2017.

MORA, F.; ARRIAGADA, O.; BALLESTA, P.; RUIZ, E. Genetic diversity and population structure of a drought-tolerant species of *Eucalyptus*, using microsatellite markers. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, Nova Dehli, v. 26, n. 2, p. 274-281, 2017. Disponível em:<DOI: 10.1007/s13562-016-0389-z>. Acesso em: 17 dez. 2017.

NUNES, A.C.P.; SANTOS, G.A.; RESENDE, M.D.V.; SILVA, L.D.; HIGA, A.; ASSIS, T.F. Estabelecimento de zonas de melhoramento para clones de eucalipto no Rio Grande do Sul. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 44, n. 111, p. 563-574, 2016.

PINTO, D.S.; RESENDE, R.T.; MESQUITA, A.G.G.; ROSADO, A.M.; CRUZ, C.D. Seleção precoce para características de crescimento em testes clonais de *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 42, n. 102, p. 251-257, 2014.

RESENDE, M.D.V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: Embrapa - Informação Tecnológica, 2002. 975 p.

RESENDE, M.D.V. **Matemática e estatística na análise de experimento e no melhoramento genético**. Embrapa Florestas, Colombo, 2007. 362 p.

RESENDE, M.D.V. *Software* Selegen-REML/BLUP: a useful tool for plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Ribeirão Preto, v. 16, p. 330-339, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332016v16n4a49>>. Acesso em: 25 dez. 2017.

RESENDE, M.D.V. **Software SELEGEN – REML/BLUP**: sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 359 p.

RODRIGUES, E.V.; LAVIOLA, B.G.; FALCÃO, R.; TEODORO, P.; MARANA, J.C.; ALVES, A.A. **Seleção de famílias e genitores de *Jatropha curcas* L. para produção de grãos via modelos mistos**. In: Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2016.

SILVA, P. H. M.; SHEPHERD, M.; GRATTAPAGLIA, D.; SEBBENN, A. M. Use of genetic markers to build a new generation of *Eucalyptus pilularis* breeding population. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 64, n. 4, p. 170-181, 2015.

SUMATHI, M.; YASODHA, R. Microsatellite resources of *Eucalyptus*: current status and future perspectives. **Botanical Studies**, Heidelberg, v. 55, n. 73, p.1-18, 2014.

TELFER, E.J.; STOVOLD, G.T.; LI, Y.; SILVA-JUNIOR, O.B.; GRATTAPAGLIA, D.; DUNGEY, H.S. Parentage reconstruction in *Eucalyptus nitens* using SNPs and microsatellite markers: a comparative analysis of marker data power and robustness. **PLoS ONE**, São Francisco, v.10, n.7, p.1-18, 2015.

VENCOVSKY, R. Genética quantitativa. In. KERR, W. E. (Org.) - **Melhoramento e Genética**. São Paulo: Melhoramentos, 1969. 301 p.

YUAN, H.; NIU, S.; EL-KASSABY, Y.A.; LI, Y.; LI, W. Simple genetic distance-optimized field deployments for clonal seed orchards based on microsatellite markers: as a case of Chinese pine seed orchard. **PLoS ONE**, São Francisco, 2016. Disponível em: <DOI: 10.1371/journal.pone.0157646>. Acesso em: 25 dez. 2017.

ZANI FILHO, J.; STAPE, J. L.; RIBEIRO, F. A.; BALLONI, E.A. Programa de melhoramento genético de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, através de seleção precose. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão, **Anais...** São Paulo: SBS, 1990. v.3, p.464-471.

WHITE, T.L.; ADAMS, W.T.; NEALE, D.B. **Forest Genetics**. Cambridge: CABI, 2007. 682 p.

APÊNDICE A – Tabelas de famílias remanescentes, número de indivíduos e identificação das progênes e populações de *Eucalyptus urophylla* utilizadas na pesquisa.

Tabela 1A - Famílias remanescentes PSM-TPR-EU após o desbaste realizado aos 20 anos de idade, quantidade de árvores selecionadas e genotipadas por progênie (k_f), identificação das árvores matrizes, e caracteres silviculturais (Altura e DAP) e de qualidade da madeira, em Selvíria-MS.

Ordem	Famílias	k_f	Árvore Matriz	Altura* (m)	DAP* (cm)	DMA* (g.cm ⁻³)
1	2	2	71	33,3	41,3	0,763
2	4	1	42	44,1	43,9	0,597
3	5	1	82	41,2	41,9	0,877
4	6	9	108	45,0	39,6	0,844
5	7	2	139	38,2	32,8	0,657
6	8	4	138	46,7	32,8	0,696
7	9	1	146	40,6	39,1	-
8	10	2	33	39,7	44,7	0,777
9	11	8	55	40,4	39,5	0,708
10	12	3	16	47,0	52,5	0,774
11	13	6	29	49,7	45,4	0,754
12	14	2	24	37,2	50,3	0,636
13	15	3	17	37,4	45,4	0,756
14	16	1	94	32,6	44,8	0,724
15	17	3	95	43,4	39,5	0,822
16	18	3	61	42,4	42,2	0,750
17	19	6	67	34,6	37,4	0,826
18	20	5	3	42,8	55,1	0,767
19	21	1	97	35,8	41,6	0,749
20	22	6	99	40,9	33,1	0,599
21	23	7	87	36,7	31,4	0,725
22	25	3	21	43,8	44,7	0,743
Total	22	79	22	-	-	-
Média	-	-	-	40,6	41,8	0,740
Desvio-padrão	-	-	-	4,6	6,2	0,074

Nota: Valores referente às mensurações da árvore matriz (*); Diâmetro a altura do peito (DAP); Densidade Média Aparente da madeira (DMA).

Fonte: Elaboração da própria autora.

Tabela 2A - Famílias remanescentes no PSM-TP-EU após o desbaste realizado aos 20 anos de idade, quantidade de árvores selecionadas e genotipadas por progênie (k_f) e identificação das árvores matrizes em que foram coletadas sementes, em Selvíria-MS.

Ordem	Família	k_f	Árvore Matriz	Ordem	Família	k_f	Árvore Matriz
1	1	8	86/212	29	32	2	241
2	2	3	-	30	34	3	-
3	3	3	533	31	35	2	-
4	4	1	-	32	36	1	-
5	5	5	-	33	37	6	-
6	7	1	-	34	38	2	-
7	8	2	-	35	39	13	155
8	9	10	104	36	40	6	-
9	10	9	-	37	41	18	10
10	11	9	55	38	42	12	45
11	12	1	-	39	44	15	1
12	13	4	-	40	45	4	-
13	14	14	-	41	46	3	-
14	15	11	-	42	47	1	2473
15	17	2	-	43	48	9	21
16	18	10	-	44	49	6	101
17	19	6	116	45	51	3	-
18	20	9	118	46	52	2	-
19	21	3	95	47	53	3	-
20	22	5	-	48	54	1	-
21	23	10	236	49	55	12	35
22	25	3	458	50	56	4	-
23	26	1	-	51	58	2	-
24	27	5	65	52	61	1	2612
25	28	9	20	53	62	5	-
26	29	7	-	54	63	2	-
27	30	3	-	55	64	3	214
28	31	3	-				
Total	-	157	12	Total	-	141	11

Fonte: Elaboração da própria autora.

Tabela 3A - Siglas para nomenclatura e identificação dos indivíduos dos pomares de sementes por mudas de *Eucalyptus urophylla* (PSM), teste de progênes (PCPN-EU) e teste de progênes de segunda geração (TP2G-TP-EU), instalados em Selvíria-MS.

Características	PSM-TPR-EU	PSM-TP-EU	PCPN-EU	TP2G-TP-EU
Termo adotado	Famílias	Famílias	Famílias	Progênes
Árvore Matriz	-	M	-	-
Árvore Adulta	A	A	A	-
Árvore jovem (muda)	-	-	-	S ou Sr
Identificação	TPR_A_2_11	TP_M_1_44	PC_A_1_139	S_1_44_2
Correspondência	Indivíduo adulto do PSM-TPR-EU, identificado no croqui com o número 2 e que pertence à família 11.	Árvore Matriz do PSM-TP-EU, identificada no croqui com o número 1 e que pertence à família 44.	Indivíduo adulto do PCPN-EU, identificado com o número 1 e que pertence à família 139.	Indivíduo jovem (2) do TP2G-TP-EU originado da árvore matriz (progênie) 1, que pertence à família 44.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Tabela 4A - Relação da família e número de indivíduos amostrados e genotipados do PCPN-EU, localizado em Selvíria-MS.

Ordem	Família	k_f	Ordem	Progênie	k_f
1	11	1	21	97	1
2	14	1	22	98	5
3	17	3	23	108	4
4	51	1	24	114	3
5	52	3	25	119	1
6	56	2	26	127	1
7	57	2	27	137	1
8	59	4	28	138	1
9	60	1	29	139	4
10	62	1	30	143	2
11	66	4	31	146	1
12	69	1	32	148	2
13	74	4	33	154	1
14	75	5	34	156	1
15	81	1	35	163	4
16	82	7	36	166	5
17	89	3	37	C041H	1
18	92	4	38	H15	1
19	94	1	39	P4295H	1
20	95	1			
Total	-	50	Total	-	40

Fonte: Elaboração da própria autora.

Tabela 5A - Relação da progênie e número de indivíduos genotipados do TP2G-TP-EU, com as árvores matrizes e família correspondente do PSM-TP-EU.

Ordem	Identificação Progênie no Campo TP2G-TP-EU	Árvore Matriz de Origem	Nº Indivíduos/Progênie TP2G-TP-EU
1	1	TP_M_1_44	25
2	2	TP_M_10_41	50
3	3	TP_M_20_28	40
4	22	TP_M_21_48	26
5	4	TP_M_35_55	9
6	5	TP_M_45_42	31
7	6	TP_M_55_11	27
8	7	TP_M_65_27	19
9	8	TP_M_86_1	20
10	9	TP_M_95_21	37
11	10	TP_M_101_49	32
12	11	TP_M_104_9	25
13	12	TP_M_116_19	31
14	13	TP_M_118_20	30
15	14	TP_M_155_39	36
16	23	TP_M_212_1	37
17	15	TP_M_214_64	53
18	16	TP_M_236_23	30
19	17	TP_M_241_32	34
20	18	TP_M_458_25	45
21	19	TP_M_533_3	44
22	20	TP_M_2473_47	13
23	21	TP_M_2612_61	28
Total	-	-	722

Fonte: Elaboração da própria autora.

Tabela 6A - Estimativas dos parâmetros genéticos para os caracteres de crescimento, altura de plantas (ALT, m) e diâmetro a altura do peito (DAP, cm), com base no modelo 95 do Selegen, em um teste de progênies de segunda geração de polinização aberta de *Eucalyptus urophylla*, com um ano de idade, localizado em Selvíria-MS.

	ALT (m)	DAP (cm)
$\hat{\sigma}_a^2$	2,0114	1,2720
$\hat{\sigma}_e^2$	1,8030	1,1055
$\hat{\sigma}_f^2$	3,8144	2,3775
$\hat{h}_a^2$	0,53±0,19	0,54±0,20
$\hat{h}_{mp}^2$	0,82	0,82
$\hat{r}_{aa}$	90,55%	90,69%
$\hat{h}_{ad}^2$	0,46	0,46
CV_{gi}	21,38%	19,93%
CV_{gp}	10,69%	9,96%
CV_e	27,43%	25,36%
CV_r	0,39	0,39
Média	6,63 m	5,66 cm

Nota: $\hat{\sigma}_a^2$: variância genética aditiva; $\hat{\sigma}_e^2$: variância residual; $\hat{\sigma}_f^2$: variância fenotípica; $\hat{h}_a^2$: herdabilidade individual no sentido restrito; $\hat{h}_{mp}^2$: herdabilidade da média de progênies; $\hat{r}_{aa}$: acurácia; $\hat{h}_{ad}^2$: herdabilidade aditiva dentro de progênies; CV_{gi} : coeficiente de variação genética aditiva individual; CV_{gp} : coeficiente de variação genotípica entre progênies; CV_e : coeficiente de variação experimental; CV_r : coeficiente de variação relativa; média geral do caráter.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Tabela 7A - Estimativas dos componentes de variância para os caracteres de crescimento, altura de plantas (ALT, m) e diâmetro a altura do peito (DAP, cm), com base no modelo 87 do Selegen, em um teste de progênie de segunda geração de *Eucalyptus urophylla*, com um ano de idade, localizado em Selvíria-MS.

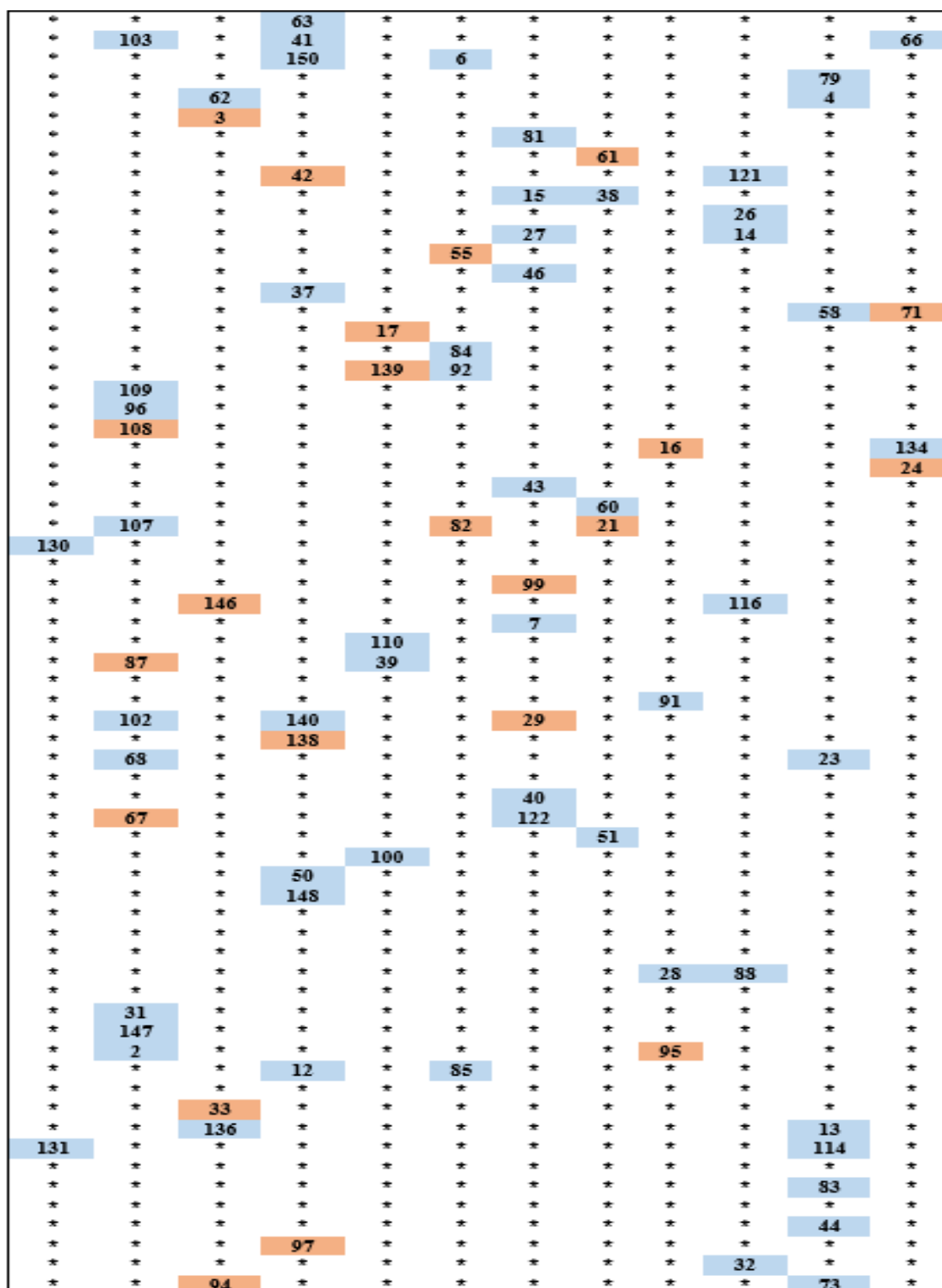
	ALT (m)	DAP (cm)
$\hat{\sigma}_{gm}^2$	0,1911	0,0230
$\hat{\sigma}_{gf}^2$	0,4407	0,2083
$\hat{\sigma}_a^2$	1,2636	0,4626
$\hat{\sigma}_d^2$	0,5470	1,0305
$\hat{\sigma}_{cec}^2$	0,6424	0,7516
$\hat{\sigma}_e^2$	3,4230	1,9345
$\hat{\sigma}_f^2$	4,6972	2,9174

Nota: $\hat{\sigma}_{gm}^2$: variância genética entre machos; $\hat{\sigma}_{gf}^2$: variância genética entre fêmeas; $\hat{\sigma}_a^2$: variância genética aditiva média; $\hat{\sigma}_d^2$: variância de dominância, a qual estima quatro vezes a variância da capacidade específica de combinação; $\hat{\sigma}_{cec}^2$: variância da capacidade específica de combinação; $\hat{\sigma}_e^2$: variância residual e $\hat{\sigma}_f^2$: variância fenotípica.

Fonte: Elaboração da própria autora.

APÊNDICE B – Croqui dos Pomares de Sementes por Mudas de *Eucalyptus urophylla*.

Figura 1B - Croqui e distribuição das árvores matrizes do PSM-TPR-EU de *Eucalyptus urophylla*, localizado em Selvíria-MS. Coloração laranja indicando as matrizes em que foram coletadas sementes.



Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 2B - Croqui e identificação das árvores matrizes do PSM-TP-EU em que foram coletadas sementes (verde), em Selvíria-MS.

270	*	*	*	*	*	*	*	*	327	*	*	*	221	*	*	*	*	*	82	*	1101	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	334	*	301	99
269	53	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	60	2172	*	8	*	342	44	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
*	250	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	57	*	*	*	211	*	*	*	*	247	*	96	*	*	*	*	*	*	*		
145	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	142	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	101	*	325	*	*	*	*	*	55	*	389	*	
124	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	95	*	*	*	15	*	*	*	140	*	*	*	*	286	110	*	*	261	*	*	*	*	*		
*	289	*	*	*	*	*	*	*	256	*	*	*	202	*	*	*	*	*	43	319	*	*	*	*	*	*	80	*	*	317	*	*	261	*	*	
200	*	214	*	*	*	*	*	206	*	*	260	*	*	*	*	*	*	*	417	*	*	*	224	*	*	*	*	80	*	*	*	*	262	*	*	
139	134	*	*	*	*	*	*	*	*	*	127	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	65	*	*	*	*	*	*	212	*	*	*	165	*	
219	*	*	63	*	*	*	*	216	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
*	1	*	*	*	*	*	*	276	46	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	168	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
*	6	*	64	*	*	*	24	*	164	*	*	305	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	285	*	*	*	*	*		
*	*	*	*	*	*	*	*	*	209	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	282	*	*	*	*	*	*	
*	109	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	107	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	336	*	395	*	*	*	*	194	*	
*	*	*	184	*	*	*	*	*	*	45	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	378	*	*	278	
173	37	*	*	137	*	132	*	*	*	22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	398	*	*	118	*
213	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	74	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
*	321	*	*	*	*	100	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	176	*	148	83	*	*	*	*	*	*	
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	171	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
183	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	146	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	129	*	*	*	*	*	13	
62	*	*	*	*	*	*	*	*	*	186	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	169	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
*	*	*	*	*	*	*	*	106	*	86	*	*	*	*	*	*	*	1527	*	388-M	*	39	*	*	*	*	102	3	*	*	*	*	*	*	*	
*	*	*	*	*	*	90	*	*	*	245	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	349	*	*	*	*	*	*	299	2	
149	*	*	*	133	*	217	188	*	*	187	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	93	*	*	*	18	*	*	151	*	*	*	*	*	360	*	
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	246	*	2473	*	121	*	20	*	*	198	*	*	*	*	*	42	*	*	103	*	130	*	*	*	
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	311	352	94	*	*	*	*	*	*	*	76	*	*	*	*	*	*	*	*	*	114		
75	*	*	*	*	*	*	*	*	238	*	*	*	*	108	*	*	*	*	16	*	*	*	*	*	*	210	*	*	*	*	*	*	*	368	*	
*	*	*	*	298	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	191	*	*	*	69	*	*	*	*	85	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
*	411	*	*	*	*	*	*	*	*	*	131	*	*	*	141	*	*	*	*	*	*	135	*	*	*	*	*	*	*	*	5301	*	*	*	*	
*	*	341	143	*	*	*	*	2612	113	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	199	*	205	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
*	98	*	4263	*	239	*	*	*	*	*	*	*	*	5	*	*	*	*	*	77	*	*	*	*	*	*	72	*	*	*	*	*	*	*	*	
*	123	*	*	*	*	150	*	*	*	*	*	*	*	251	*	*	*	*	*	160	48	*	387	*	*	*	*	36	*	*	*	*	*	*		
*	*	*	*	175	*	*	337	*	*	*	*	*	*	277	32	*	*	*	*	25	322	*	*	*	81	*	162	41	*	*	5306	*	*	56	*	
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	190	*	*	*	*	*	*	*	*	159	*	*	*	*	*	*	*	
*	*	*	*	*	*	*	*	185	*	*	*	*	*	*	*	*	241	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	409	*	*	*	*	
*	222	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	47	*	*	*	*	192	*	*	*	*	*	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
*	*	51	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	92	
344	*	*	*	316	*	*	*	*	329	*	*	*	292	*	*	*	*	*	178	1123	*	*	*	*	23	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
*	*	*	*	376	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	111	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
*	182	*	*	*	*	*	*	203	*	*	*	177	*	*	*	*	226	*	*	326	356	351	*	71	14	*	*	*	*	320	*	*	5366	*	23	
*	*	112	*	*	*	*	*	*	*	17	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	3407	*	40	*	*	*	*	*	375	*	*	*	*	*
*	*	70	*	*	*	*	*	*	50	*	*	*	*	*	*	189	*	*	*	*	*	*	300	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
*	365	*	197	*	*	*	*	2322	*	58	*	*	*	*	*	*	*	*	439	*	*	*	*	*	*	431	*	35	*	*	*	*	*	*	31	
*	*	*	104	*	*	30	*	*	*	*	*	*	28	*	*	*	*	*	242	*	*	393	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	533	*	31	
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*	*	*	9	*	2536	*	11	366	122	*	*	*	*	*	*	*	1225	*	*	*	*	*	7	*	*	*	*	535	79	*	
*	*	*	*	*	*	9	*	*	*	120	*	105	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	536	*	*	
*	*	*	78	*	*	38	*	*	52	*	*	*	*	*	281	*	263	154	*	*	*	154	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	255	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	391	*	435	*	*	*	
*	*	*	*	382	*	*	420	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	157	*	*	458	265	*	10	*	*	
*	*	*	*	*	*	312	*	*	294	307	237	87	*	*	*	*	*	*	302	*	*	33	*	309	*	88	*	*	*	*	*	*	*	172	*	
*	49	61	*	*	*	*	*	231	*	*	*	*	176NS	*	*	*	*	*	67	*	*	163	*	*	*	*	*	*	*	*	*	89	332	4	*	
*	155	*	*	*	*	116	*	170	*	229	258	152	*	*	*	*	*	*	161	*	*	125	340	54	*	*	*	144	*	*	314	*	*	414	*	

Nota: 388 M = Árvore morta. Fonte: Elaboração da própria