

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**VARIAÇÃO GENÉTICA PARA CARACTERES
SILVICULTURAIS E MARCADOR MOLECULAR EM
UMA POPULAÇÃO BASE DE *Eucalyptus camaldulensis*
DEHNH.**

PATRÍCIA FERREIRA ALVES

Engenheira Agrônoma

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira - UNESP, para obtenção do título de Mestre em Agronomia: área de concentração em Sistemas de Produção.

ILHA SOLTEIRA - SP

FEVEREIRO DE 2009

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**VARIAÇÃO GENÉTICA PARA CARACTERES
SILVICULTURAIS E MARCADOR MOLECULAR EM
UMA POPULAÇÃO BASE DE *Eucalyptus camaldulensis*
DEHNH.**

PATRÍCIA FERREIRA ALVES

Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. Mario Luiz Teixeira de Moraes

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira - UNESP, para obtenção do título de Mestre em Agronomia: área de concentração em Sistemas de Produção.

ILHA SOLTEIRA - SP

FEVEREIRO DE 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação/Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da UNESP-Ilha Solteira

A474v Alves, Patrícia Ferreira.
Variação genética para caracteres silviculturais e marcador molecular em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh / Patrícia Ferreira Alves. -- Ilha Solteira : [s.n.], 2009
59 f. : il., fots. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2009

Orientador: Mario Luiz Teixeira de Moraes
Bibliografia: p. 51-59

1. Eucalipto rostrato – Melhoramento genético. 2. Melhoramento genético. 3. Estimativa de parâmetro. 4. Plantas – População. 5. Genética quantitativa. 6. Plantas – Genética molecular.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: VARIAÇÃO GENÉTICA PARA CARACTERES SILVICULTURAIS E MARCADOR MOLECULAR EM UMA POPULAÇÃO BASE DE *Eucalyptus camaldulensis* DEHNH.

AUTORA: PATRÍCIA FERREIRA ALVES

ORIENTADOR: Prof. Dr. MARIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES

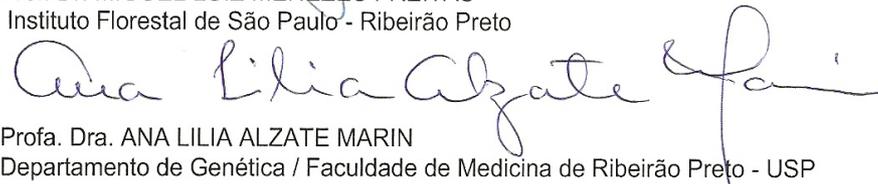
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em AGRONOMIA ,
Área: SISTEMAS DE PRODUÇÃO, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MARIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES

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


Prof. Dr. MIGUEL LUIZ MENEZES FREITAS

Instituto Florestal de São Paulo - Ribeirão Preto


Profa. Dra. ANA LILIA ALZATE MARIN

Departamento de Genética / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Data da realização: 27 de fevereiro de 2009.

A minha mãe querida Glória pelo incentivo,
pelo amor incondicional, confiança e carinho,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Mário Luiz Teixeira de Moraes, por ter acreditado em mim, pelos ensinamentos transmitidos, sua confiança, dedicação, paciência, oportunidade de crescimento e principalmente pela sua amizade;

À Selma, pelos ensinamentos transmitidos com paciência e carinho, por estar sempre disposta a estender uma mão para ajudar em tudo e pela grande amizade brindada;

À comadre Janete Motta da Silva pelo apoio, amizade pelo fornecimento dos dados utilizados neste trabalho e principalmente pelo apoio no momento inesquecível da minha vida;

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de treinamento Técnico concedida sob a orientação do pesquisador do Instituto Florestal Miguel Luiz Menezes de Freitas;

Ao Dr. Alexandre Magno Sebbenn pelo apoio nas análises estatísticas relacionada aos marcadores molecular SSR;

Ao Pr. Dr. Pedro César do Santos e a Prof^a. Ana Lilia Alzate Marin pelas suas valiosas sugestões;

Aos funcionários da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão – FEPE – Alonso, Ângelo, José Camboim, Manoel e Odorico pelo apoio na coleta dos dados de campo;

A Embrapa Floresta pela concessão das sementes da população base de *Eucalyptus camaldulensis* procedente da Austrália;

Aos colegas e amigos do laboratório Ana Paula, Laila, Juliana, Ana Cristina, Marcela, Flávio, Ricardo e Cecília pela amizade, companheirismo e boas conversas;

À Feis/Unesp, e especialmente ao programa de pós-graduação em Sistema de Produção, representados por todos os professores e funcionários, pela oportunidade de realização deste curso;

Aos meus irmãos William e Wederson pelo apoio, amor, carinho e paciência;

Aos meus pais, Glória e José, pelos seus ensinamentos, apoio incondicional, incentivo a continuar crescendo a cada dia como pessoa e profissional. Tudo o que eu sou devo a vocês. Os amos!!!

Principalmente a Deus por mais esta etapa vencida, pelas graças derramadas e por ter me presenteado com um lindo filho, Elísio Gabriel, que é a luz dos meus olhos, onde hoje não imagino minha vida sem ele.

Muito obrigada!!!

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1.** Foto do satélite mostrando a posição geográfica das árvores de *Eucalyptus camaldulensis* amostradas para o desenvolvimento do projeto. 23
- Figura 2.** Esquema do processo amostral na população base de *Eucalyptus camaldulensis*. 24
- Figura 3.** Foto das árvores antes dos desbaste (A), demarcação das árvores amostradas (B) e corte das árvores para a retirada dos discos (C). 26
- Figura 4.** Aparelho utilizado para a retirada da casca (A); perfuração da árvore (B); orifício para a mensuração da resistência à penetração (C), demonstração da medição com o aparelho *Pilodyn Wood Tester* (D) e demonstração da medição em milímetros (E). 27

LISTAS DE TABELAS

- Tabela 1** Seqüências dos Primers SSR descrito por Brondani et al (1998) para *E. grandis* e *E. urophylla* e Brondani et al (2002) para *Eucalyptus*. 32
- Tabela 2** Estimativas da variância genética aditiva ($\hat{\sigma}_A^2$), variância residual ($\hat{\sigma}_e^2$), variância fenotípica individual ($\hat{\sigma}_f^2$), média geral (\hat{m}), coeficiente de variação experimental (CV_{exp}), teste-F (F) para os caracteres silviculturais avaliados em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* em Selvíria-MS, aos 21 anos de idade. 37
- Tabela 3** Estimativas dos coeficientes de herdabilidade: individual, no sentido restrito (\hat{h}_a^2); da média de progênies (\hat{h}_m^2); aditiva dentro de parcela (\hat{h}_d^2); de variação genética aditiva individual (CV_{gi}); de variação genética entre progênies (CV_{gp}); de variação relativa (CV_r) e da acurácia (r_{aa}) para os caracteres silviculturais avaliados em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* em Selvíria-MS, aos 21 anos de idade 39
- Tabela 4** Comparação entre duas formas de seleção: I ($k_f = \forall K \neq 0$) e II ($k_f = 1$), para o caráter HC: altura comercial (m) em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* em Selvíria-MS, aos 21 anos de idade. 41
- Tabela 5** Características dos oito locos microssatélites analisados em *Eucalyptus camaldulensis*: número de alelos por loco (A); número efetivo de alelos por loco (A_e), heterozigosidade observada (H_o); heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e); índice de fixação (F); probabilidade de exclusão do segundo parental ($P_{Excl(2)}$). 43
- Tabela 6** Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução, endogamia, coancestria e tamanho efetivo em população base de *Eucalyptus camaldulensis* estabelecida em Selvíria-MS. 46

RESUMO

O *Eucalyptus camaldulensis* destaca-se pelo potencial de utilização de sua madeira, como também pela sua plasticidade de adaptação a diferentes condições ambientais brasileiras. Dessa forma, se utilizou duas metodologias, para avaliar uma população base de *E. camaldulensis*, originária da Austrália, e instalada em Selvíria-MS em abril de 1986. A primeira procurou avaliar a variação genética para os caracteres silviculturais: altura total, altura comercial, altura da primeira bifurcação, diâmetro a altura do peito e volume; como também da qualidade da madeira como a resistência à penetração e a densidade básica da madeira. Para tanto, utilizou-se um delineamento em blocos casualizados com 25 progênies, 4 repetições e 1 planta por parcela. As estimativas de componentes de variância e parâmetros genéticos foram obtidas pelo método da máxima verossimilhança restrita e melhor predição linear não viciada (REML/BLUP). Verificou-se que: *i*) não se detectou variação genética para os caracteres silviculturais e da qualidade da madeira; *ii*) o caráter mais indicado para a seleção foi à altura comercial (HC) em função dos maiores coeficientes de variação relativa ($CV_r = 0,32$), herdabilidade ($\hat{h}_m^2 = 0,28$) e da acurácia ($r_{\hat{a}a} = 0,54$) encontrados; *iii*) a população de *E. camaldulensis* apresenta bom desenvolvimento silvicultural (HT = 25,36m) na região do bolsão sul-matogrossense; *iv*) a alta densidade básica da madeira (DBM = 0,74) desta população de *E. camaldulensis* indica este material para uso em serraria e energia (carvão e lenha). A segunda metodologia procurou avaliar a diversidade genética e o sistema reprodutivo desta população, por meio de marcador microssatélite. Para tanto, foram amostrados tecidos foliares em 100 árvores de uma população de *E. camaldulensis* localizada na Fazenda de Ensino e Pesquisa da UNESP de Ilha Solteira, situada em Selvíria-MS. Observou-se que os oito locos avaliados foram todos polimórficos. A heterozigidade observada nas matrizes ($H_o = 0,631$) foi maior que a heterozigidade observada nas progênies ($H_o = 0,700$), indicando que algum processo está reduzindo a heterozigidade nas progênies. O índice de fixação observado nas matrizes em relação as progênie foi menor, sugerindo

seleção contra homozigotos. A estimativa da taxa de cruzamento multiloco ($t_m = 0,955$) foi alta, revelando que a espécie é de sistema misto de reprodução com predomínio de cruzamentos. De modo geral verifica-se alta variabilidade genética, que é a matéria prima para utilização em programas de conservação e melhoramento genético, com base nesta população.

Palavras chaves: *Eucalyptus camaldulensis*, população, parâmetros genéticos, diversidades genética, sistema reprodutivo

ABSTRACT

The *Eucalyptus camaldulensis* is distinguished for the potential of use of its wood, as well as for its plasticity of adaptation the different Brazilian ambient conditions. Of this form, if it used two methodologies, to evaluate a population base of *E. camaldulensis*, originary of Australia, and installed in Selvíria-MS in April of 1986. The first one looked for to evaluate the genetic variation for the silvicultural traits: total height, commercial height, height of the first bifurcation, breast height diameter and volume; as well as of the wood quality as the resistance to the penetration and the wood density. The experimental design utilized was a randomized block with 25 progenies, four replications and one plant for plot was used. The genetic estimates of variance components and parameters had been gotten by the method of the restricted maximum likelihood and best linear unbiased prediction (REML/BLUP). It was verified that: *i*) did not detect genetic variation for the silvicultural traits and of the quality of the wood; *ii*) the indicated trait more for the election was to the commercial height (HC) in function of the biggest coefficients of relative variation ($CV_r = 0,32$), heritability ($\hat{h}_m^2 = 0,28$) and of the accuracy ($r_{aa} = 0,54$) found; *iii*) the population of *E. camaldulensis* presents good silvicultural development (HT = 25,36m) in the region of the south-matogrossense; *iv*) the high wood density (DBM = 0,74) of this population of *E. camaldulensis* indicates this material for use in would saw and energy (coal and firewood). The second methodology looked for to evaluate the genetic diversity and the mating system of this population, by means of marking microsatellite. For in such a way, they had been showed leaves in 100 *E. camaldulensis* trees of a population located in the Farm of Education and Research of the UNESP in Selvíria-MS. It was observed that the nine evaluated locos had been all polymorphism. The observed heterozygosity in the mothers ($H_o = 0.631$) was greater that the observed heterozygosity in the progenies ($H_o = 0,700$), indicating that some process is reducing the heterozygosity in the progenies. The fixation index observed in the mothers in

relation the progenies was lesser, suggesting election against homozygosity. The estimate of the mating system ($t_m = 0,955$) was high, disclosing that the species is of mixing system of reproduction with predominance of crossings. In general way high genetic variability is verified on the basis of, that is the substance cousin for use in conservation programs and genetic improvement, this population.

Key words: *Eucalyptus camaldulensis*, population, genetic parameters, genetic diversity, mating system.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Considerações sobre <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh	13
2.2. Melhoramento e conservação genética	16
2.3. Sistema reprodutivo	19
2.4. Marcadores moleculares no melhoramento de <i>Eucalyptus</i>	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Material	23
3.2. Métodos	24
3.2.1. Caracteres quantitativos	24
3.2.1.1. Amostragem e caracteres avaliados	24
3.2.1.2. Estimativa de parâmetros genéticos e estatísticos	27
3.2.2. Análise molecular	31
3.2.2.1. Amostragem	31
3.2.2.2. Análise de microsatélite	31
3.2.2.3. Análise genética	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Caracteres quantitativos	35
4.1.1. Desenvolvimento da população base	35
4.1.2. Variação genética	37
4.1.3. Ganho de seleção, tamanho efetivo e diversidade genética	39
4.2. Análise utilizando Marcador Molecular SSR	42
4.2.1. Diversidade genética	42
4.2.2. Sistema de reprodução	45

4.2.3. Endogamia, coancestria e tamanho efetivo de variância	48
5. CONCLUSÃO	50
6. REFERÊNCIA	51

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no cenário mundial pela importância da biomassa florestal e suas potencialidades, com uma das mais altas taxas de produtividade na silvicultura, atingindo entre 40 e 50 m³ de madeira por hectare ao ano, mais de dez vezes superior à observada em países de clima temperado (STAPE, 2003).

Existe unanimidade entre os pesquisadores da área que a qualidade da madeira pode ser melhorada, modificada ou ter alguns fatores minimizados ou controlados, em considerável extensão, através de tratamentos silviculturais e, principalmente, do melhoramento genético (REMADE, 2003).

É reconhecida a grande importância do melhoramento genético para o desenvolvimento do setor florestal. Embora os resultados experimentais sobre técnicas e métodos de melhoramento para as propriedades físicas, químicas e anatômicas sejam muito raramente citados pela literatura, é de consenso geral que a solução ou, pelo menos, a minimização dos problemas relacionados com a produção de madeira adequada ao uso industrial depende do desenvolvimento de programas específicos de melhoramento genético (REMADE, 2003).

A madeira de eucalipto é utilizada para o abastecimento da maior parte da indústria de base florestal no Brasil. Em 2004, de acordo com relatório da Bracelpa (Associação Nacional dos Fabricantes de Celulose e Papel), foram consumidos pelo setor de celulose e papel 34.113.000 m³ de madeira, proveniente de reflorestamento com eucalipto, 2.475.000 m³ pelo setor de geração de energia e 340.000 m³ pelo setor de serraria (INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS- IPEF, 2005).

O crescimento dessa indústria brasileira de base florestal pode esbarrar na escassez de florestas plantadas. Produtora de itens como papel e celulose, móveis, chapas e carvão vegetal, a

cadeia prevê dobrar suas exportações até 2020, chegando a uma receita de US\$ 12 bilhões. Segundo a Abimci (Associação Brasileira da Indústria de Madeira Processada Mecanicamente), o resultado poderia ser ainda melhor, caso não houvesse a perspectiva de um apagão florestal (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA - SBS, 2004).

Apesar da participação das plantações florestais estarem aumentando em todos os segmentos em relação a das florestas nativas, o setor acredita que com base nas expectativas de crescimento de demanda, haverá uma necessidade de plantio em torno de 630 mil hectares ao ano. A Sociedade Brasileira de Silvicultura - SBS distribui essa necessidade de plantio como sendo: 170 mil ha/ano para celulose, 130 mil ha/ano para madeira sólida, 250 mil ha/ano para carvão vegetal e 80 mil ha/ano para energia (REMADE, 2003).

Dessa forma, o produto deste trabalho terá influência positiva não apenas na ampliação de áreas reflorestadas na região de estudo, como também contribuirá para a diminuição do déficit de madeira nacional.

Diante do exposto o objetivo deste estudo foi investigar a diversidade genética e o sistema de reprodução em uma população base de *E. camaldulensis*, por meio de caracteres quantitativos (silviculturais) e de marcadores moleculares do tipo microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações sobre *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, apresentando cerca de 600 espécies, muitas variedades e híbridos. Possui grande potencial para a indústria da madeira,

devido ao seu rápido crescimento, à boa adaptação às condições ambientais brasileiras e à produção de madeira de boas propriedades físicas e mecânicas. Podendo ser produzidas a baixos custos, as madeiras de cores agradáveis contribuem para destacar e valorizar algumas espécies desse gênero (ANDRADE, 1961, LIMA et al., 2006).

Atualmente, os plantios de florestas comerciais no Brasil cobrem uma área de 4,8 milhões de hectares. No Estado de São Paulo são 770.000 hectares de plantios (3,1% da área). Desse montante, o eucalipto responde por 79,4%, o pinus 20,6% e outras madeiras com 2,0% (KRONKA et al., 2003).

O *Eucalyptus camaldulensis* Dehn., seção *Exsertaria*, é conhecida na Austrália por “Murray red gum” e “River red gum”, ou seja, eucalipto do “Vale do Murray ou dos cursos d’água com tronco de casca lisa e madeira vermelha” (PRYOR, 1976, GOLFARI et al., 1978). É considerada a espécie de maior distribuição geográfica do gênero, encontra-se espalhada por quase todo o território australiano, com exceção da Tasmânia. Em áreas áridas e semi-áridas, ocorre ao longo ou próximo de cursos d’água sazonais. É essencialmente uma espécie ciliar, mas pode também ocorrer em encostas de colinas, independente das condições de precipitação (BARROS; BARROS, 1990).

Entre as espécies do gênero *Eucalyptus*, o *E. camaldulensis* se destaca como a de maior plasticidade em termos de adaptação às condições brasileiras. As causas de tal preferência são várias, destacando-se entre elas: adaptação a condições ecológicas muito variadas, no que diz respeito à pluviosidade, solos e outros fatores; grande número de procedências existentes, o que possibilita encontrar facilmente a mais conveniente ao solo que se pretende floresta; e rapidez de crescimento, que, juntamente com a vigorosa brotação de cepa, proporciona benefícios em curto prazo (MORAES et al., 1997).

Devido às grandes dimensões e boa durabilidade da madeira (500-600 kg m⁻³), o *E. camaldulensis* tem ampla aplicação principalmente para usos que requerem madeiras mais duras, como para serraria, dormentes, postes, mourões e carvão. Também é utilizado como cerca quebra-ventos, planta ornamental e produção de mel de excelente qualidade e há um potencial para a produção de óleo de grau medicinal em algumas procedências tropicais (DORAN; BROPHY, 1990, MARTÍNEZ, 1990, ELDRIDGE et al., 1993, SOERIANEGARA; LEMMENS, 1994).

Normalmente as sementes desta espécie apresentam alta porcentagem de germinação (maior que 90%), sem tratamento pré-germinativo. A germinação em laboratório ocorre em 5 a 16 dias e, em viveiros obtém-se aproximadamente 60.000 plântulas a partir de 1 kg de semente. O crescimento das plântulas é rápido, de forma que num período de 16 a 18 semanas alcançam 40 a 50cm, porém os talos devem ser podados para induzir mais lignificação (NIETO; RODRIGUEZ, 2003).

Quanto aos solos, o *E. camaldulensis* adapta-se em diversos tipos, resiste parcialmente ao salitre e inundações periódicas ou encharcamentos longos de quatro a cinco meses. Também cresce em solos compactados por pastejo excessivo, ou com baixa umidade anual. Porém, nestes o crescimento não é ótimo. Mudanças no tipo de solo dentro de curtas distâncias resultam em mudanças muito extremas em crescimento. O crescimento radicular é impedido em solos rasos ou compactados (NIETO; RODRIGUEZ, 2003).

As características de rápido crescimento, sistema radicular bastante desenvolvido e facilidade de aclimatação tornam o *E. camaldulensis* uma espécie de uso potencial para o emprego em programas de recuperação de áreas degradadas pela deposição de metais pesados. O *E. camaldulensis* apresentou desenvolvimento satisfatório em solos degradados, desestratificados e

com características muito discrepantes das originais, resultante da extração do xisto (VALLE, 1991).

Tradicionalmente, a madeira de *E. camaldulensis* é dura, utilizada em construções pesadas e em interior de edifícios, rolos de madeira, polpa de fibra curta, papel, celulose, madeira compensada e tábuas de aglomerado. É usada em trabalhos de marcenaria e carpintaria, postes de transmissão, lenha, carvão e dormentes. Também é plantada como sombreamento, quebra-ventos, e é importante para produção de flores na apicultura, produzindo mel de excelente qualidade (LIMA, 1984, RESENDE, 1999, NIETO; RODRIGUEZ, 2003).

O *E. camaldulensis*, vêm sendo melhorado por várias empresas florestais privadas, que via de regra, estão associadas a indústrias de papel e celulose, de móveis, siderúrgicas, dentre outras. Também várias universidades e instituições públicas e privadas do Brasil colaboram de alguma forma com o melhoramento desta espécie (RESENDE, 1999).

2.2. Melhoramento e conservação genética

A diversidade genética é a matéria-prima para adaptação, evolução e sobrevivência das espécies e indivíduos, especialmente sob condições de mudanças ambientais. Reduções na diversidade genética podem também predispor as espécies a doenças, reduzir a produtividade e limitar o melhoramento genético (RAJORA; PLUHAR, 2003).

São de fundamental importância o conhecimento da existência de variabilidade nas características de interesse e o nível de controle genético nas mesmas quando se considera o desenvolvimento de programas de melhoramento genético para determinada finalidade. A existência de variabilidade fenotípica entre espécies, procedências, famílias e indivíduos (clones) para as características de interesse e o forte controle genético envolvido na expressão da grande

maioria dessas características asseguram a possibilidade de obtenção de madeira de alta qualidade para suprir as necessidades industriais, a partir da implementação de programas dessa natureza (REMADE, 2003).

Pode-se concluir, então, que se existe variabilidade e se a participação dos componentes genéticos na manifestação das características for expressiva é possível promover alterações desejadas nas características sob seleção (REMADE, 2003).

A variabilidade genética vem sendo gradativamente perdida em várias espécies, mencionando-se até mesmo a perda de genes que, em maior ou menor grau, vem ocorrendo nos próprios bancos de germoplasma. Segundo Vencovsky (1987), é unânime entre autores a necessidade de se preservar a variabilidade disponível, através de coletas constantes de sementes e da adequada preservação de germoplasmas, tanto em espécies nativas como em exóticas. Desse modo, estará sendo feita a preservação não só de alelos, para uso imediato ou futuro, mas também a manutenção de complexos gênicos na sua integridade, a fim de servirem como fonte de estudos no melhoramento e conservação genética. Vencovsky (1987) ainda explica que, do ponto de vista da genética de populações, a erosão genética e as medidas de combate para minimizar seus efeitos, podem ser enfocados sob a ótica do tamanho efetivo populacional, que seria a representatividade genética de amostras de plantas e de sementes.

O conhecimento da variabilidade genética é indispensável para a conservação da biodiversidade, manutenção de amostras representativas e da diversidade de espécies, além de promover oportunidades para a pesquisa científica, educação ambiental, turismo e outras formas menos impactantes de geração de renda. Além disso, quando se conhece a variabilidade e a biodiversidade da espécie, evita-se que materiais sejam descartados precocemente de um determinado programa de melhoramento/pesquisa (SOUZA et al., 2003).

Com a finalidade de atender a demanda nacional, os programas de melhoramento de espécies florestais têm como principais objetivos: o aumento da produtividade, a obtenção da matéria-prima de maior qualidade, a melhoria nas condições adaptativas das espécies, a tolerância a pragas e doenças, assim como a manutenção da variabilidade genética, requisito fundamental para a obtenção de ganhos genéticos em longo prazo. No entanto, para a obtenção de ganhos genéticos ressalta-se a importância do monitoramento da base genética, a fim de evitar perdas excessivas de variabilidade, o que compromete os objetivos do programa de melhoramento (MORI, 1993).

Na seleção de árvores para programas de melhoramento genético, podem ser utilizadas características de: adaptação, crescimento, forma e qualidade da madeira (MORAES et al., 1997). Portanto, estudos que envolvam essas características, em populações de *E. camaldulensis*, são de fundamental importância para o conhecimento da estrutura genética da população, além de indicarem também qual o método de seleção mais adequado para se explorar a variabilidade genética existente para essas características na população.

Segundo Resende (1999), a partir de avaliação experimental, a seleção deve basear-se tanto em componentes de médias, quanto de variâncias e, idealmente, materiais genéticos com elevada média e ampla variabilidade genética devem ser selecionados, pois deverão propiciar ganhos contínuos com seleção ao longo de várias gerações. Neste contexto, Resende e Higa (1994a) sugerem o uso de todos os efeitos do modelo como forma de conseguir a maximização na precisão da seleção, embora, em muitos casos, as inclusões dos efeitos de parcela e blocos podem pouco alterar a seleção. Assim, por considerar todos estes efeitos, os autores propõem a utilização do Índice Multi-efeitos (IME), que se baseia na multiplicação dos valores fenotípicos referentes ao indivíduo, média de parcela, média de família e média geral do experimento pelos coeficientes de ponderação dos índices – herdabilidades, além de explorar frações da variância

genética aditiva que não são consideradas na seleção entre e dentro de progênes, levando à maximização da precisão da seleção, muito embora, em muitos casos, a inclusão dos efeitos de parcela e blocos pode pouco alterar a seleção (RESENDE; HIGA, 1994b, SAMPAIO et al, 2002).

Estudos que envolvem a importância da variabilidade genética de genótipos de *E. camaldulensis* foram desenvolvidos por diversos autores: Pinyopusarerk et al. (1996), estudaram variações no crescimento de procedências de *E. camaldulensis*; Pereira et al. (1997) estudaram a seleção precoce com base em caracteres quantitativos de genótipos de *E. camaldulensis*; Bila e Issufo (1994) avaliaram as melhores procedências da espécie indicadas para reflorestamentos na região de Moçambique; Vital et al. (1994) estudaram a variabilidade genética das características de crescimento, das características da madeira e do carvão vegetal de progênes de *E. camaldulensis* em Paraopeba-MG.

2.3. Sistema reprodutivo

O conhecimento do sistema reprodutivo, se misto ou aleatório, depende do número adequado de amostras, de populações necessárias à conservação *in situ*, com base nas frequências alélicas, do tamanho efetivo populacional, ou ainda, de procedimentos que conduzam ao uso e à conservação *ex situ* de germoplasma vegetal, contanto que possuam variabilidade genética suficiente para uso em longo prazo. Essas estimativas são fundamentais para a conservação genética, a implantação de programas de melhoramento e o manejo sustentável de espécies florestais. (VENCOVSKY; CROSSA, 1999, VALOIS et al., 2001, SEBBENN, 2002, ZUCCHI, 2002, SEBBENN, 2003).

O sistema de reprodução pode apresentar grande variação entre espécies e entre e dentro de populações devido ao fato de seu controle estar sobre influência genética e ambiental, o

que explica a variação observada da taxa de cruzamento entre plantas de uma mesma espécie, quando comparados diferentes locais ou anos, podendo as sementes incluir diferentes graus de parentescos, como meios-irmãos, irmãos completos e irmãos de autofecundação (SEBBENN, 2003). Tal variação na taxa de cruzamento tem sido relatada para diferentes espécies de plantas, como por exemplo, em *Malpighia emarginata*, uma espécie predominantemente alógama, onde a taxa de cruzamento varia entre famílias (LOPES et al., 2002).

O *Eucalyptus* possui um sistema de reprodução misto, com taxas de cruzamento relativamente altas que são mantidas por protandria e por diferentes níveis de auto-incompatibilidade (PHILLIPS; BROWN, 1977, POTTS et al., 1987). Quando essas espécies são experimentalmente autofecundadas, apresentam forte depressão por endogamia (ELDRIDGE; GRIFFIN, 1983), o que foi verificado em *E. grandis*, onde o crescimento de uma progênie proveniente de autofecundação foi 30% inferior ao da progênie híbrida (CAMPINHOS et al., 1998). *E. urophylla* apresenta um sistema de cruzamento intermediário, podendo ocorrer no mesmo fruto sementes oriundas de autofertilização e/ou de fertilização cruzada.

O conhecimento do sistema reprodutivo permite entender como os genes se combinarão para formar as gerações descendentes, possibilitando traçar estratégias para a seleção de genótipos superiores e para a manutenção da variabilidade genética visando usos futuros (ALVES et al., 2003). Populações com alta variabilidade são menos vulneráveis as condições adversas devido a seu alto potencial adaptativo (MARTINS-CORDER et al., 1996). Paula et al. (2002) concluíram que o conhecimento da variabilidade genética entre e dentro de famílias de meios-irmãos de uma população de *E. camaldulensis* Dehn, permitiu a predição dos progressos genéticos advindos da seleção direta e indireta em relação a características de crescimento, assim como a adoção de índices de seleção.

2.4. Marcadores moleculares no melhoramento de *Eucalyptus*.

O conhecimento a respeito da genética das espécies florestais é ainda incipiente. Dessa forma, o emprego de pesquisas com os marcadores de DNA permite entre outras coisas, quantificar os níveis de variabilidade genética intrapopulacional, estimar a divergência genética interpulacional, resolver questões de identificação de genótipos, visando, por exemplo, proteção varietal ou investigação de paternidade em sistemas de polinização aberta (KIRST et al., 2005).

Os marcadores microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats*) são considerados ideais para a estimação de parâmetros genéticos de populações e para a compreensão de padrões de fluxo gênico e parentescos. Estes marcadores são abundantes e uniformemente distribuídos pelo genoma das plantas, além de serem codominantes, multialélicos e com alta heterozigosidade (ZUCCHI, 2002). Embora seja inquestionável a eficiência da aplicação dos microssatélites nos estudos genéticos e nos programas de melhoramento de espécies florestais, o custo de desenvolvimento destes marcadores é muito alto. Como alternativa de barateamento e de ampliação do emprego dos marcadores gerados, alguns autores têm testado a transferibilidade dos mesmos, entre espécies relacionadas. Sob essa ótica, é importante verificar a ocorrência de sintenia, ou seja, de conservação na ordem de genes entre espécies relacionadas (CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA-CIB, 2005).

A transferibilidade de microssatélites entre espécies relacionadas é uma consequência da homologia da seqüência de DNA das regiões que flanqueiam os microssatélites (ZUCCHI, 2003). Brondani et al. (1998) desenvolveram vários marcadores SSR para *Eucalyptus* spp (*Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*) que vêm sendo utilizados em pesquisas genéticas de outras espécies dentro do mesmo gênero, como em *E. camaldulensis* (AGRAMA et al., 2002)

e *E. tereticornis* e *E. globulus* (MARQUES et al., 2002), como também em espécies pertencentes a outros gêneros como é o caso da *Eugenia dysenterica*, uma frutífera nativa da região do Cerrado (ZUCCHI, 2002). No trabalho de Marques et al. (2002) ao testarem a transferabilidade de 180 *primers* SSR, obtiveram um sucesso de 78%, indicando alto nível de conservação das seqüências nas espécies testadas.

A utilização dos marcadores moleculares fornece informações diretas a respeito da variabilidade genética, permitindo o entendimento genético da espécie. Isso possibilita, por exemplo, indicar genitores para a produção de híbridos específicos, visando o aumento da divergência genética nas próximas gerações a serem utilizados em futuros programas de melhoramento genético florestal (CAIXETA et al., 2003). Os microssatélites têm sido intensamente empregados em *Eucalyptus*, envolvendo objetivos como: teste de paternidade e seleção de indivíduos de *Eucalyptus grandis* (KIRST et al., 2005); teste de paternidade e sistema reprodutivo em *E. grandis* e *E. urophylla* (GRATTAPAGLIA et al., 2004); mapa de ligação em *E. grandis* e *E. urophylla* (BRONDANI et al., 2002) entre outros.

Segundo Marques et al. (2002), poucos estudos têm abordado informações sobre ligações dos locos SSR e a transferabilidade de marcadores entre as espécies. Desse modo, o emprego da tecnologia de marcadores moleculares, associada às técnicas clássicas de melhoramento, trará contribuições significativas para o conhecimento básico da espécie e dos caracteres estudados, assim como promoverá a geração e desenvolvimento de produtos melhorados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

O trabalho foi realizado a partir de uma população base de *E. camaldulensis*, originária da Austrália, instalada em abril de 1986 na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE), da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/UNESP), localizada no município de Selvíria – MS (Figura 1). A localização geográfica aproximada da área do experimento está na latitude de 20°20'S, longitude de 51°23'W, e altitude de 370 m. Essa população base possui 25 progênies de polinização aberta, sendo cada uma representada por 1 planta, repetida 60 vezes de forma casualizada, totalizando 1500 indivíduos, sendo que cada parcela foi representada por uma árvore, no espaçamento de 4 x 4 m.



Figura 1: Foto do satélite mostrando a posição geográfica das árvores de *Eucalyptus camaldulensis* amostradas para o desenvolvimento do projeto.

Após 21 anos, para o estudo da diversidade genética foram avaliadas, ao acaso, quatro progênies de cada uma das 25 matrizes da população base de *E. camaldulensis*, totalizando um tamanho amostral de 100 indivíduos, constituindo-se, dessa forma, em uma amostra desta população base de *E. camaldulensis* (Figura 2).

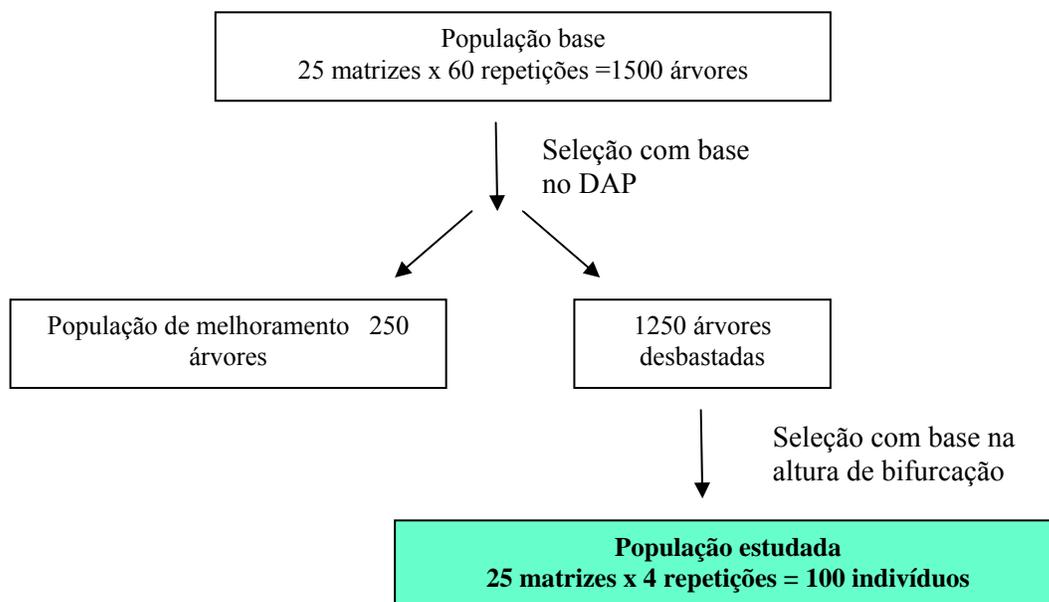


Figura 2. Esquema do processo amostral na população base de *Eucalyptus camaldulensis*.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Caracteres quantitativos

3.2.1.1. Amostragem e caracteres avaliados

Em abril de 2007, quando o experimento de *E. camaldulensis* completava 21 anos, foram avaliados em 100 árvores (quatro plantas, distribuídas de forma aleatória na população base, de cada uma das 25 progênies) os seguintes caracteres quantitativos (silviculturais):

- 1) altura total das plantas (HT, m);
- 2) altura comercial (HC, m);

3) altura de primeira bifurcação (HB, m). Essas alturas foram mensuradas com auxílio de um medidor de altura do tipo Vertex II;

4) diâmetro à altura do peito (DAP, cm), utilizando-se de uma suta de alumínio;

5) volume (Vol, m³). Para tanto, aplicou-se a seguinte expressão:

$$V = \frac{\pi}{4} \cdot (DAP)^2 \cdot H \cdot \bar{q};$$

em que: V= volume de madeira (m³); DAP = diâmetro à altura do peito; H = altura total da árvore; \bar{q} = quociente de forma, obtido para cada uma das árvores, tomando como base os discos retirados

nas árvores desbastadas, dado por: $q = \frac{D(1/2)HC}{DAP}$;

em que: D(1/2)HC = medida feita no disco obtido no diâmetro na metade da altura comercial da árvore, com casca; e DAP = medida feita no disco obtido no diâmetro à altura do peito, com casca.

6) densidade básica da madeira, em nível do DAP (DBM, g/cm³). Para tanto, foi retirado um disco nas árvores desbastadas na altura do DAP (Figura 3), com espessura média de 6 cm. Esse procedimento teve por base a norma da ABCP M 14/70. Dessa forma, na determinação da DBM utilizou o método da balança hidrostática, conforme Foelkel et al. (1971), obtida com base na seguinte expressão:

$$DBM = \frac{P_s}{P_u - P_i};$$

em que: DBM: densidade básica da madeira (g/cm³); P_s: massa da madeira (g) a 0% de umidade; P_u: massa de madeira (g) úmida (saturada); P_i: massa da madeira (g) imersa.



Figura 3: Foto das árvores antes dos desbaste (A), demarcação das árvores amostradas (B) e corte das árvores para a retirada dos discos (C).

7) resistência à penetração (mm). Foi obtida com um aparelho chamado *Pilodyn Wood Tester* (fabricado por *Proceq S/A*), emprestado junto ao Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP. As avaliações feitas com o *Pilodyn* consistem na penetração de um pino de aço de 2,5 mm de diâmetro, na superfície do tronco, no qual é retirada a casca, impulsionada por uma mola com força constante de 6 joules. Essas avaliações foram feitas em três pontos (repetições), por árvore, em ângulo de 120°, na altura do DAP (Figura 4). Depois de encostado ao tronco, dispara-se o aparelho e mede-se a penetração do pino no visor do mesmo, em milímetros, possibilitando verificar a existência da madeira à penetração.



Figura 4. Aparelho utilizado para a retirada da casca (A); perfuração da árvore (B); orifício para a mensuração da resistência à penetração (C), demonstração da medição com o aparelho *Pilodyn Wood Tester* (D) e demonstração da medição em milímetros (E).

3.2.1.2. Estimativa de parâmetros genéticos e estatísticos

As estimativas de componentes de variância e parâmetros genéticos foram obtidas pelo método da máxima verossimilhança restrita e melhor predição linear não viciada (REML/BLUP), a partir de dados desbalanceados, empregando-se o *software* genético-estatístico SELEGEN-REML/BLUP, desenvolvido por Resende (2002b). Para utilizar o modelo proposto pelo programa, foi preciso assumir que as matrizes de polinização livre de *E. camaldulensis* são de meios-irmãos.

O modelo aplica-se aos testes de progênies de meios-irmãos, com delineamento de blocos ao acaso, uma planta por parcela, um só local e uma única população. Este modelo faz a análise de variância e genética, além de classificar os indivíduos pelos seus respectivos valores genéticos

preditos. As variáveis foram analisadas pela metodologia do modelo linear misto (aditivo univariado) REML/BLUP, seguindo o procedimento proposto por Resende (2002a):

$$y = Xb + Za + e;$$

em que: y = vetores de dados; b = vetores dos efeitos de blocos (fixos); a = vetores dos efeitos genéticos aditivos (aleatórios); e = vetores dos efeitos de erros aleatórios; X , Z = matrizes de incidência para b e a , respectivamente.

As distribuições e estruturas da média e variâncias são:

$$y|b, V \sim N(Xb, V)$$

$$a|A, \sigma_a^2 \sim N(0, A \sigma_a^2)$$

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

$\text{COV}(a, e) = 0$; ou seja, as covariâncias entre todos os efeitos aleatórios do modelo são consideradas nulas. Assim:

$$E \begin{bmatrix} y \\ a \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} Xb \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \text{Var} \begin{bmatrix} y \\ a \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} V & ZG & R \\ GZ' & G & 0 \\ R & 0 & R \end{bmatrix}; \text{ em que:}$$

$$G = A \sigma_a^2; R = I \sigma_e^2; V = ZA \sigma_a^2 Z' + I \sigma_e^2 = ZGZ' + R.$$

As equações de modelo misto são:

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z \\ Z'X & Z'Z + A^{-1}\lambda_1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{b} \\ \hat{a} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \end{bmatrix}, \text{ em que:}$$

$\lambda_1 = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_a^2} = \frac{1-h^2}{h^2}$; $h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_e^2}$: herdabilidade individual no sentido restrito, no bloco; σ_a^2 :

variância genética aditiva; σ_e^2 : variância residual (ambiental + não aditiva); A: matriz de correlação genética aditiva entre os indivíduos em avaliação.

Os estimadores iterativos dos componentes de variância por REML, via algoritmo EM (Expectation-Maximization), são:

$$\hat{\sigma}_e^2 = [y'y - \hat{b}' X'y - \hat{a}' Z'y] / [N - r(x)]; \quad \hat{\sigma}_a^2 = [\hat{a}' A^{-1} \hat{a} + \hat{\sigma}_e^2 \text{tr}(A^{-1} C^{22})] / q \text{ e } C^{22} \text{ advêm}$$

de:

$$C^{-1} = \begin{bmatrix} C_{11} & C_{12} \\ C_{21} & C_{22} \end{bmatrix}^{-1} = \begin{bmatrix} C^{11} & C^{12} \\ C^{21} & C^{22} \end{bmatrix};$$

em que: C= matriz dos coeficientes das equações de modelo misto; tr = operador traço matricial;

r(x) = posto da matriz X; n = número total de dados; q = número de indivíduos.

Demais estimativas de variâncias e parâmetros genéticos processados pelo programa:

$$r_{\hat{a}\hat{a}} = \left[\frac{n}{n + \left(\frac{4 - h_a^2}{h_a^2} \right)} \right]^{1/2} : \text{acurácia de seleção de progênes};$$

$$\hat{\sigma}_f^2 = \hat{\sigma}_a^2 + \hat{\sigma}_e^2 : \text{variância fenotípica individual}; \quad \hat{h}_{mp}^2 = \frac{[1 + (n-1)\rho_a]h^2}{1 + (n-1)(\rho_a h^2)} : \text{herdabilidade da}$$

média de progênes, em que: ρ_a = correlação genética entre os indivíduos do tipo de progênie

considerada ($\rho_a = 1/4$ para meios-irmãos); n = número total de indivíduos por progênie = b.

$$\hat{h}_{ad}^2 = \frac{[(3+b)/(4b)]\hat{\sigma}_a^2}{\hat{\sigma}_p^2 + \frac{\hat{\sigma}_e^2}{b}} : \text{herdabilidade aditiva dentro de parcelas, em que: } b = \text{número de blocos.}$$

Os coeficientes de variação estimados foram: $CV_{gi} = \frac{100 \cdot \sqrt{\hat{\sigma}_a^2}}{\hat{m}}$: coeficiente de variação genética entre indivíduos; $CV_{gp} = \frac{100 \cdot \sqrt{(1/4)\hat{\sigma}_a^2}}{\hat{m}}$: coeficiente de variação genética entre progênies; $CV_{exp} = \frac{100 \cdot \sqrt{QM_{res}}}{\hat{m}}$: coeficiente de variação experimental e $CV_r = \frac{CV_{gp}}{CV_{exp}}$

coeficiente de variação relativa.

A estimativa do ganho na seleção foi obtida empregando-se o Índice Multi-efeitos (IME), segundo metodologia proposta por Resende (2002a), para o caráter altura comercial (HC). Para tanto, utilizou-se de duas estratégias: a primeira refere-se à seleção dos 10 melhores indivíduos (k_f), com base no IME, independente de qual progênie pertençam, ou seja, $k_f = \forall K \neq 0$ e na segunda a seleção foi feita com base nas 10 primeiras progênies, sendo que cada uma delas foi representada por um único indivíduo ($k_f = 1$).

O tamanho efetivo populacional (N_e) foi obtido com base em Resende (2002a):

$$N_e = (4 \cdot N_f \cdot \bar{k}_f) / [\bar{k}_f + 3 + (\sigma_{kf}^2 / \bar{k}_f)];$$

em que: \bar{k}_f = número médio de indivíduos selecionados por matriz; σ_{kf}^2 = variância do número de indivíduos selecionados por matriz; N_f = nº de matrizes selecionadas.

A diversidade genética (D), após a seleção, foi quantificada conforme Wei e Lindgren (1996), citados por Resende (2002a):

$$D = N_{ef} / N_{fo} ;$$

em que: $0 < D \leq 1$; N_{fo} = número original de matrizes, que no presente trabalho corresponde a 25; N_{ef} = número efetivo de matrizes selecionadas, sendo dado por:

$$N_{ef} = \left(\sum k_f \right)^2 / \sum k_f^2 .$$

3.2.2. Análise molecular.

3.2.2.1. Amostragem

Foram coletadas folhas adultas de progênies nos 100 indivíduos com auxílio de um podador telescópico, as quais foram identificadas e acondicionadas em caixas de térmica com gelo e transportadas até o Laboratório de Genética de Populações e Silvicultura (LGPS), do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio-Economia, da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, onde foram armazenadas em freezer (-20°C). A coleta de folhas foi bastante criteriosa, e buscou-se dentro do possível, utilizar as que não apresentassem estágio de maturidade demasiadamente avançado e nem sinais de herbivoria.

3.2.2.2. Análise de microssatélite

A extração de DNA de folhas dos 100 indivíduos de *E. camaldulensis* foi efetuada com base na metodologia de Ferreira e Grattapaglia (1998). Durante o processo de extração do DNA das amostras foram realizadas alterações no protocolo de extração, sem a adição de proteinase K (100 µg/mL) e sem adição de PVP 360 (1%), sugerida pelo LGPS (Laboratório de Genética de Populações e Silvicultura). Após a extração, o DNA foi quantificado utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose 0,8%, em TEB 1X (Tris 28 mM, ácido bórico 88 mM, EDTA 7 mM, pH 8,3) contendo brometo de etídio (5 µg/ mL).

Para as análises dos locos procedeu-se amplificação de regiões de microssatélites (SSR) utilizando 8 pares de *primers* (Tabela 1), sendo eles: Embra 06, Embra 11, Embra 13, Embra 16, Embra 22, Embra 27, Embra 30 (BRONDANI et al., 1998, BRONDANI et al., 2002) Euca 63 (CERESINI et al., 2005) que esta apresentada na tabela seguinte. A reação de amplificação de volume de 15 uL foi constituída de tampão PCR (1X), 0,1mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1uM de cada integrante do par de *primer* (F e R), 2 unidades de Taq DNA polimerase, 18 ng de DNA genômico.

Tabela 1: Sequências dos *Primers* SSR descrito por Brondani *et al* (1998) para *E. grandis* e *E. urophylla* e Brondani *et al* (2002) para *Eucalyptus*.

Loco SSR	Elementos repetidos	Seqüências do primer 5' - 3'	Temperatura Anelamento (°C)
EMBRA 06	(AG) ₁₉	AGAGAATTGCTCTTCATGGA GAAAAGTCTGCAAAGTCTGC	56
EMBRA 11	(AG) ₄ GG(AG) ₂₅	GCTTAGAATTTGCCTAAACC GTAAAATCCATGGGCAAG	56
EMBRA 13	(AG) ₂₇	ATTTCCCTAGGTTTGACATG TCCAACATCTTACTCAACCA	56
EMBRA 16	(AG) ₂₁	CAACGTTCCCCTTTCTTC ATGTTAGGCCAAACCCAG	56
EMBRA 22	(AG) ₁₇ (AC) ₁₄	GCACATGCACACACGGTTG AAGGCCAGTGGTCGTGAGTC	56
EMBRA 27	(AG) ₂₄	ATAACCACACCAATCTGCA TATAGCTCGAACGCTCAAC	56
EMBRA 30	(AG) ₂₂	TTAGTTGAATCCAACCATTG TATATAAGGTGCAAATAATAAA CG	58

As reações de amplificação foram realizadas em *touchdown* universal, programado nas seguintes condições: um ciclo de 95°C por 5 minutos; cinco ciclos de 95°C por 45 segundos, 68°C (diminuindo de 2°C a cada ciclo) por 5 minutos e 72°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto; 25 ciclos de 95° por 45 segundos, 50°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto e finalmente 72°C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram separados em géis de agarose 3%, em corrida com TBE (1X) com tensão constante de 110 V. Para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados

(alelos) foi utilizado um padrão de tamanho molecular 100 pb ladder (GE) na mesma corrida eletroforética. Para estimar o tamanho de cada alelo amplificado em termos de pares de base, empregou-se o *software* **FragSize** (CARVALHO, 2007), o qual utiliza uma estimativa de tamanho de bandas através de uma equação exponencial derivada da interpolação logarítmica para cálculos de tamanho de bandas de ácidos nucleicos em géis de agarose ou poliacrilamida.

3.2.2.3. Análise genética

A diversidade genética da geração adulta e das progênes foi caracterizada pelos índices número médio de alelos por loco (A), número efetivo de alelos por loco (A_e), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e). Também foi estimado o índice de fixação (F), conforme expressão:

$$\hat{F} = 1 - \frac{\hat{H}_o}{\hat{H}_e}.$$

Os índices de diversidade e o índice de fixação foram calculados utilizando o programa CERVUS 3.0 (MARSHALL et al., 1998).

A análise do sistema de reprodução foi baseada no modelo misto de reprodução (RITLAND; JAIN 1981) e no modelo de cruzamentos correlacionados (RITLAND 1989) e realizados utilizando o programa “Multilocus MLTR” (RITLAND, 2004). Os parâmetros estimados foram: taxa populacional de cruzamento multiloco (t_m); taxa populacional de cruzamento uniloco (t_s); taxa de cruzamento entre aparentados ($t_m - t_s$) e; correlação multiloco de paternidade ($r_{p(m)}$). O desvio padrão (DP) das estimativas dos parâmetros foi obtido por meio de 1000 reamostragens *bootstraps*. O desvio padrão foi usado para calcular o erro padrão das

estimativas médias a 95% de probabilidade, $IC_{95\%} = 1,96(DP/\sqrt{m})$, em que, m representa o número de bootstraps.

Os parâmetros do sistema de reprodução foram utilizados para estimar outros parâmetros demográficos e genéticos. O número efetivo de pais polinizadores ou tamanho da vizinhança reprodutiva foi calculado da correlação de paternidade por $\hat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_p$. Nos parâmetros do sistema de reprodução foram ainda estimados a proporção média de pares de irmãos de autofecundação ($\hat{P}_{IA} = \hat{s}$), irmãos-completos ($\hat{P}_{IC} = \hat{t}_m \hat{r}_p$) e meios-irmãos ($\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m (1 - \hat{r}_p)$) contidos nas progênes e o coeficiente médio de coancestria ($\hat{\Theta}_{xy}$) entre plantas dentro de progênes por,

$$\hat{\Theta}_{xy} = 0,125(1 + \hat{F}_p)[4\hat{s} + (\hat{t} + \hat{t}\hat{s}\hat{r}_s)(1 + \hat{r}_p)] \text{ (RITLAND, 1989).}$$

Para conhecer a representatividade genética das progênes foi estimado o tamanho efetivo de variância ($N_{e(v)}$) médio das progênes, calculado da variância amostral das freqüências alélicas e utilizando uma população idealizada (infinitamente grande, panmítica, sem parentes, endogamia, seleção, mutação e migração) como referência, conforme propôs Cockerham (1969),

$$\hat{N}_{e(v)} = \frac{0,5}{\hat{\Theta}_{xy}}.$$

O número de árvores matrizes para a coleta de sementes foi calculado assumindo que infinitas sementes serão coletadas de cada árvore ($n = \infty$) e que o objetivo é reter na amostra total o tamanho efetivo de referência de 100,

$$\hat{m} = N_{e(\text{referênciav})} \left[\hat{\Theta}_{xy} \left(\frac{n-1}{n} \right) + \frac{1 + \hat{F}_o}{2n} \right] \text{ (SEBBENN, 2003).}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracteres quantitativos

4.1.1. Desenvolvimento da população base

As estimativas dos componentes de variância e parâmetros genéticos foram obtidas pelo procedimento REML/BLUP (estimativa de parâmetros genéticos por máxima verossimilhança restrita - REML, e predição de valores genéticos pelo procedimento da melhor predição linear não viciada - BLUP), conforme proposto por Resende (2002a). Essa metodologia tem sido empregada para espécies perenes como café e eucalipto, e um exemplo disso é o trabalho de Garcia e Nogueira (2005), que utilizaram essa metodologia para selecionar os melhores clones de várias espécies de eucalipto, na região de Eunápolis-BA.

Os resultados referentes às estimativas de parâmetros estatísticos, como a média geral (\hat{m}), o coeficiente de variação experimental (CV_{exp}) e o teste-F (F) estão na Tabela 3, para os caracteres avaliados aos 21 anos após a instalação da população base de *E. camaldulensis*.

Não houve diferenças significativas entre as progênies, para todos os caracteres quantitativos, indicando teoricamente de que não existe variabilidade genética na população avaliada. Possivelmente esse resultado foi devido ao tamanho amostral que não foi suficiente para que as progênies expressassem a variação genética existente para estes caracteres utilizado no trabalho. Wergles (2008), estudando todas as árvores desbastadas, observou variabilidade genética entre as progênies em função do maior tamanho amostral utilizado.

O crescimento médio anual em 2007 das progênies foi bom, com Incremento Médio Anual (IMA) de 1,21 m para altura total de plantas; 0,81 m para altura comercial; 0,82 m para altura de bifurcação; 1,22 cm para DAP e 0,05 m³/árvore para volume de madeira.

O crescimento médio das progênes aos 21 anos após o plantio para altura total: 25,36 m; altura comercial: 17,10m; altura de bifurcação: 17,26m; DAP: 25,57cm; e volume: 1,04 m³/árvore, evidencia o potencial do material genético estudado às condições edafo-climáticas da região de Selvíria-MS, indicando o potencial para estudos de seleção de indivíduos que sejam melhor adaptados, o que proporcionará melhores ganhos com a seleção.

Quanto à resistência à penetração da casca, o valor médio foi de 26,25 cm. A avaliação com o aparelho Pilodyn infere que a profundidade de penetração do pino na casca da árvore é, em princípio, inversamente proporcional à densidade da madeira. Além de ser um método não destrutivo, apresenta ainda as vantagens de rapidez, isenção de erros sistemáticos por parte do operador, a não necessidade de extração de amostras de madeira com sondas e custos inferiores a outros métodos. Outros autores utilizaram também essa metodologia para determinar a resistência à penetração da casca, como Silva Júnior et al. (1993) em híbridos de *E. grandis* x *E. camaldulensis*; Vale et al. (1995) em *E. grandis* e Wei Borralho (1997) em *E. urophylla*.

Os coeficientes de variação experimental (CV_{exp}) foram de médios a altos, para todos os caracteres analisados. O volume teve os maiores CV_{exp} , com média de 59,51%, o que era esperado, pois o caráter é composto basicamente pelo produto das variáveis altura total de plantas e DAP, e também em função das condições de variabilidade existente entre as progênes. Segundo Houle (1992), caracteres compostos apresentam maior coeficiente de variação.

A densidade básica da madeira foi considerada alta (0,74 g.cm⁻³), o que indica a utilização deste material genético para programas de fomento com objetivo de energia (carvão e lenha) e de estrutura no caso de material serrado. Outra possibilidade de utilização deste material é no fornecimento de pólen das progênes para programas de hibridação com *E. grandis* e *E. urophylla* na região do bolsão sul-matogrossense, que vem apresentando um considerável avanço em plantio com espécies florestais de rápido crescimento como é o caso do eucalipto.

Tabela 2. Estimativas da variância genética aditiva ($\hat{\sigma}_A^2$), variância residual ($\hat{\sigma}_e^2$), variância fenotípica individual ($\hat{\sigma}_f^2$), média geral (\hat{m}), coeficiente de variação experimental (CV_{exp}), teste-F (F) para os caracteres silviculturais avaliados em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* em Selvíria-MS, aos 21 anos de idade.

Caráter	$\hat{\sigma}_A^2$	$\hat{\sigma}_e^2$	$\hat{\sigma}_f^2$	\hat{m}	CV_{exp} (%)	F
HT (m)	2,6004	9,4864	12,0867	25,36	13,33	1,227 ^{ns}
HC (m)	6,2134	10,6374	16,8508	17,10	22,86	1,406 ^{ns}
HB (m)	0,1564	16,2223	16,3788	17,26	23,42	1,009 ^{ns}
DAP (cm)	0,2524	42,1651	42,4175	25,57	25,45	1,006 ^{ns}
VOL (m ³)	0,0032	0,3774	0,3806	1,04	59,51	1,008 ^{ns}
RESP (mm)	4,2813	11,2835	15,5648	26,25	14,50	1,295 ^{ns}
DBM (g.cm ⁻³)	0,0001	0,0042	0,0043	0,74	8,87	1,038 ^{ns}

HT: Altura Total; HC: Altura Comercial; HB: Altura da 1ª Bifurcação; DAP: Diâmetro a altura do peito; VOL: Volume; RESP: Resistência à penetração; DBM: Densidade Básica da Madeira, em nível do DAP.

4.1.2. Variação genética

As estimativas dos parâmetros relacionados com a variação genética, como os coeficientes de herdabilidade: no sentido restrito (\hat{h}_a^2), de média de progênie (\hat{h}_m^2), aditiva dentro de parcela (\hat{h}_d^2); coeficiente de variação genética individual, genética de progênes e variação relativa (CV_{gi} , CV_{gp} , CV_r), e da acurácia de seleção (\hat{r}_{aa}) estão na Tabela 4, para os caracteres avaliados em 2007, aos 21 anos após a instalação da população base de *E. camaldulensis*.

De modo geral, as estimativas do coeficiente de variação genética individual (CV_{gi}) foram maiores que coeficiente genética de progênes (CV_{gp}), para todos os caracteres. O caráter altura comercial apresentou maior coeficiente de variação genética, o que expressa uma maior variação genética, tanto entre os indivíduos quanto entre as progênes, em relação aos demais

caracteres analisados. Esse resultado é um indicativo da existência de variação genética na população e do potencial para o melhoramento genético.

As estimativas de herdabilidade individual, no sentido restrito (\hat{h}_a^2), foram de baixa magnitude, para os caracteres altura de bifurcação (0,01), DAP (0,01), volume (0,01), densidade básica da madeira (0,04), exceto para altura total (0,22), altura comercial (0,37) e resistência à penetração (0,28) que apresenta estimativa mediana. A herdabilidade média de progênie (\hat{h}_m^2) também apresenta baixa estimativa para os caracteres altura de bifurcação (0,01), DAP (0,01), volume (0,01), densidade básica da madeira (0,04), exceto para altura total (0,18), altura comercial (0,28) e resistência à penetração (0,23) com estimativa mediana, segundo interpretação proposta por Resende (1995) (herdabilidades de 0,01 a 0,15 como baixas; de 0,15 a 0,50 são medianas; e acima de 0,50 são altas). As estimativas de herdabilidade para todos os caracteres estudados indicam que a variância de dominância tem uma participação maior que a aditiva na variância genética. Desse modo, processos mais acurados que a seleção massal devem ser empregados nos programas de melhoramento que utilizarem estes caracteres.

Em relação ao coeficiente de variação relativa, que ficou entre de 0,04 (DAP) a 0,32 (HC), foram de baixa magnitude, segundo Vencovsky e Barriga (1992), evidenciando que o controle genético dos caracteres é baixo e influenciado por fatores ambientais, considerando-se que a espécie é exótica em condições de adaptação.

A acurácia na seleção de progênies, em todos os caracteres, foi de baixa a média magnitude, variando de 0,0769 (DAP) a 0,5374 (HC) segundo interpretação proposta por Resende (1995). Recomenda-se que o caráter altura comercial (HC) seja utilizado na seleção dos melhores indivíduos, considerando as estimativas obtidas.

Tabela 3. Estimativas dos coeficientes de herdabilidade: individual, no sentido restrito (\hat{h}_a^2); da média de progênies (\hat{h}_m^2); aditiva dentro de parcela (\hat{h}_d^2); de variação genética aditiva individual (CV_{gi}); de variação genética entre progênies (CV_{gp}); de variação relativa (CV_r) e da acurácia (r_{aa}) para os caracteres silviculturais avaliados em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* em Selvíria-MS, aos 21 anos de idade.

Caráter	\hat{h}_a^2	\hat{h}_m^2	\hat{h}_d^2	CV_{gi} (%)	CV_{gp} (%)	CV_r	r_{aa}
HT (m)	0,22	0,18	0,17	6,36	3,18	0,24	0,4304
HC (m)	0,37	0,28	0,30	14,57	7,28	0,32	0,5374
HB (m)	0,01	0,01	0,01	2,29	1,14	0,05	0,0974
DAP (cm)	0,01	0,01	0,01	1,96	0,98	0,04	0,0769
VOL (m ³)	0,01	0,01	0,01	5,46	2,73	0,05	0,0913
RESP	0,28	0,23	0,22	7,88	3,94	0,27	0,4775
DBM (g.cm ⁻³)	0,04	0,04	0,03	1,73	0,86	0,10	0,1912

HT: Altura Total; HC: Altura Comercial; HB: Altura da 1ª Bifurcação; DAP: Diâmetro a altura do peito; VOL: Volume; RESP: Resistência à penetração; DBM: Densidade Básica da Madeira, em nível do DAP.

4.1.3. Ganho de seleção, tamanho efetivo e diversidade genética

A utilização do Índice Multi-efeitos ($\hat{\alpha}$ = IME) permite, segundo Resende e Higa (1994a), explorar frações da variância genética aditiva que não são consideradas na seleção entre e dentro de progênies, levando à maximização da precisão na seleção, muito embora, nos casos em que o experimento está bem conduzido e balanceado, a inclusão dos efeitos de parcela e blocos pode pouco alterar na seleção.

Para estimar ganhos genéticos na seleção, foram propostas 2 estratégias, utilizando o Índice de Multi-efeito (IME): a primeira corresponde à seleção dos melhores indivíduos (10%, ou seja, os 10 primeiros na classificação do IME, independente de qual progênie possam pertencer) e a segunda é a seleção com base nas 10 melhores progênies, selecionando-se o melhor indivíduo

de cada uma (Tabela 5). O caráter escolhido para a seleção foi à altura comercial (HC), pois este foi o que apresentou o maior coeficiente de variação relativa e a melhor acurácia e herdabilidade.

Dos 100 indivíduos estudados foram selecionados 10, tanto na primeira como na segunda estratégia de seleção. Verifica-se que na primeira estratégia o número de progênies selecionadas é menor (7), enquanto que na segunda é de 10 progênies das 25 que foram estudadas. Dessa forma, observou-se a presença de uma variância diferente de zero na primeira estratégia. A presença desta variância e o número menor de progênies selecionadas leva a uma menor estimativa do N_e na primeira estratégia (8,2) em relação à segunda (10), ou seja, esta última fica com uma maior base genética.

O ganho na seleção é maior na primeira estratégia (2,4686 ou 14,43%) em relação a segunda (2,2000 ou 12,86%). Dessa forma, verifica-se que a utilização da primeira estratégia proporciona uma eficiência na seleção de 12,21% em relação a segunda.

A diversidade genética inicial é tomada como sendo igual a 1,0 ou 100%. Em função das duas estratégias de seleção, observa-se que na primeira em que a base genética foi menor e o ganho maior, que a diversidade passou de 100% para 22,22%, ou seja, perdeu-se 77,78% da diversidade genética inicial. Já na segunda estratégia, que possui maior base genética e menor ganho na seleção, que a diversidade passou de 100% para 40%, ou seja, perdeu-se 60% da diversidade com a utilização desta estratégia de seleção.

Em função do que foi discutido uma recomendação geral seria a de que em programas de melhoramento que visam à maximização de ganhos em seleção, a seleção com base nos indivíduos é a mais recomendada, pois sua eficiência foi maior ($Ef = 12,21\%$) e maior ganho genético ($\hat{G}_S = 14,43\%$) mesmo tendo uma redução em sua diversidade genética de 77,78%, mas se o objetivo for o melhoramento sem uma preocupação com a maximização de ganho na

seleção, a segunda estratégia é mais recomendada, pois se tem maior diversidade genética ($\hat{D}=40\%$), embora se obtenha um menor ganho genético ($\hat{G}_s = 12,86\%$).

Tabela 4. Comparação entre duas formas de seleção: I ($k_f = \forall K \neq 0$) e II ($k_f = 1$), para o caráter HC: altura comercial (m) em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* em Selvíria-MS, aos 21 anos de idade.

Formas de Seleção			
I		II	
Progênes	$k_f = \forall K \neq 0$	Progênes	$k_f = 1$
3	3	3	1
8	1	12	1
10	1	8	1
12	2	23	1
16	1	13	1
23	1	9	1
25	1	16	1
-	-	10	1
-	-	6	1
-	-	24	1
$\sum k_f$	10	$\sum k_f$	10
N_{fo}	25	N_{fo}	25
N_f	7	N_f	10
\bar{k}_f	1,4286	\bar{k}_f	1
$\hat{\sigma}_{kf}^2$	0,6190	$\hat{\sigma}_{kf}^2$	0
N_e	8,2	N_e	10
$\mu(m)$	17,1084	$\mu(m)$	17,1084
$\hat{a}(m)$	2,4686	$\hat{a}(m)$	2,2000
$\hat{G}_s(\%)$	14,43	$\hat{G}_s(\%)$	12,86
$Ef.(%)$	12,21	$Ef.(%)$	-
\hat{D}	0,2222	\hat{D}	0,4000

$\sum k_f$: nº de indivíduos selecionados; N_{fo} = nº de progênes do teste; N_f : nº de progênes selecionadas; k_f : nº de indivíduos selecionados por progênie; \bar{k}_f : nº médio de indivíduos selecionados por progênie; $\hat{\sigma}_{kf}^2$: variância do nº de indivíduos selecionados por progênie; N_e : tamanho efetivo; μ : média geral; \hat{a} : efeito genético aditivo = **IME**: Índice Multi-efeito; \hat{G}_s : Ganho na seleção; **Ef.**: eficiência do IME em relação à Seleção entre e dentro de progênes; \hat{D} : Diversidade genética.

4.2 Análise genética utilizando Marcador Molecular SSR

4.2.1 Diversidade genética

Todos os oito locos microssatélites avaliados foram polimórficos, totalizando 37 alelos nas matrizes e 45 nas progênies (Tabela 5). O número de alelos detectados por loco (A) nas árvores matrizes variou de 3 a 6, com média de 4,63 alelos, e nas progênies de 4 a 8, com média de 5,63 alelos. Devido a grande quantidade de alelos encontrados pode-se supor de que a população de *E. camaldulensis* possui alta diversidade genética. O número efetivo de alelos por loco (A_e), por sua vez, foi menor do que o número de alelos por loco, variando de 1,29 a 4,52 nas matrizes (média de 3,18 alelos) e de 1,65 a 4,33 nas progênies (média de 3,49 alelos). O número efetivo de alelos por loco mede a uniformidade do alelo mais freqüente, sendo que os alelos raros contribuem pouco nessa somatória da freqüência alélica ao quadrado. Assim, o menor número efetivo de alelos em relação ao número de alelos por loco indica que muitos dos alelos são raros (freqüência $\leq 0,05$). A presença de vários alelos raros nos locos pode ocorrer devido a mutações que eventualmente tenham ocorrido na população, ou, à introdução desses no conjunto gênico da população através de hibridações com populações vizinhas de *Eucalyptus* por migração (MARTINS-CORDER et al.,1996).

Tabela 5 - Características dos oito locos microssatélites analisados em *Eucalyptus camaldulensis*: número de alelos por loco (A); número efetivo de alelos por loco (A_e), heterozigosidade observada (H_o); heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e); índice de fixação (F); probabilidade de exclusão do segundo parental ($P_{Excl(2)}$).

Loco	A	\hat{A}_e	\hat{H}_o	\hat{H}_e	\hat{F}	$P_{Excl(2)}$
Matrizes						
Euca63	3	2,16	0,536	0,800	-0,493 **	0,731
Embra13	6	4,41	0,773	0,760	0,017	0,446
Embra06	4	3,38	0,704	0,719	-0,022	0,575
Embra11	5	2,89	0,654	0,640	0,022	0,603
Embra16	4	1,29	0,224	0,240	-0,071	0,845
Embra22	5	2,58	0,613	0,721	-0,176	0,651
Embra27	5	4,52	0,779	0,920	-0,181	0,467
Embra30	5	4,20	0,762	0,840	-0,103	0,494
Média	4,63	3,18	0,631	0,705	-0,118	-
Erro padrão [£]	±0,09	±0,11	±0,018	±0,020	±0,017	-
Total	37	-	-	-	-	0,993
Progênies						
Euca63	4	2,65	0,622	0,287	0,538 **	-
Embra13	8	4,33	0,769	0,316	0,589 **	-
Embra06	4	3,37	0,703	0,520	0,260 **	-
Embra11	7	3,56	0,719	0,457	0,365 **	-
Embra16	5	2,65	0,622	0,741	-0,191	-
Embra22	6	2,82	0,645	0,143	0,779 **	-
Embra27	6	4,33	0,769	0,342	0,555 **	-
Embra30	5	4,26	0,765	0,329	0,570 **	-
Média	5,63	3,49	0,700	0,392	0,442 **	-
Erro padrão	±0,14	±0,07	±0,006	±0,018	±0,029	-
Total	45	-	-	-	-	-

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; £ O erro padrão da média a 95% de probabilidade foi determinado por reamostragem *jakknife* sobre locos. Com base nesta estimativa, todos os parâmetros diferem significativamente entre matrizes e progênies.

As heterozigosidades foram altas nas amostras, embora nas progênies estes valores tenham sido significativamente menores, de acordo com o erro padrão calculado por reamostragem *jakknife* (Tabela 5). A heterozigosidade observada nas matrizes variou de 0,536 a

0,779, com média de 0,631 e a heterozigosidade esperada variou de 0,240 a 0,920, com média de 0,705. Nas progênies, a heterozigosidade observada variou de 0,622 a 0,769, com média de 0,700 e a heterozigosidade esperada variou de 0,143 a 0,520, com média de 0,392. Esta menor heterozigosidades nas progênies é um indicativo que algum processo no sistema de reprodução, como autofecundações ou cruzamentos entre parentes, esteja atuando e reduzindo seus níveis.

A heterozigosidade observada foi maior que a esperada nas matrizes e menor nas progênies, o que sugere excesso de heterozigotos nas matrizes e de homozigotos nas progênies (Tabela 5). O índice de fixação nas matrizes variou de -0,493 a 0,022, com média de -0,118 e nas progênies variou de -0,191 a 0,779, com média de 0,442. Estes resultados sugerem que está ocorrendo seleção a favor de heterozigotos entre a fase de plântulas e a fase adulta das árvores. Seleção contra homozigotos entre a fase de plântulas e a fase adulta também foi observado em *Eucalyptus berthamii*. Butcher et al. (2005) avaliando quatro desta espécie encontraram que o coeficiente de endogamia foi significativamente maior nas progênies (0,136) do que nas matrizes (0,06), o que sugere a existência de seleção natural entre plântulas e fase adultas. Uma possível explicação para este padrão é a combinação de depressão endogâmica com a seleção para heterozigotos. A depressão pode estar eliminando plântulas originas de autofecundação ou cruzamento entre parentes, reduzindo o valor de F para próximo a zero e a seleção a favor de heterozigotos, pode aumentar a freqüências de genótipos heterozigotos na população, pela maior sobrevivência destes genótipos. Outra explicação para os altos e positivos valores do índice de fixação nas progênies é a presença de alelos nulos segregando nesses locos. Contudo, para determinar com precisão se realmente esta é a causa da alta endogamia observada nas progênies, seria necessário uma amostra maior de descendentes de cada progênie, idealmente 50 descendentes para um estudo detalhado de segregação Mendeliana 1:1.

4.2.2 Sistema de reprodução

Idealmente para estudos do sistema de reprodução, é recomendado trabalhar-se com amostras de pelo menos 200 genótipos e quatro a cinco locos polimórficos (RITLAND, 2002). A presente amostra é 50% menor do que a ideal, mas apresenta a vantagem de ter sido analisada para oito locos microssatélites altamente polimórficos. A probabilidade de exclusão do segundo parente (Tabela 5) quando o primeiro é conhecido foi alta nas matrizes (0,993), indicando que este conjunto de locos tem alto poder para resolver análises de paternidade e determinar o sistema de reprodução da população, visto que os genótipos são únicos (não idênticos). Assim, o poder de exclusão do segundo parente indica que o pequeno tamanho amostral foi compensado pelo alto polimorfismo presente nos locos analisados.

A análise do sistema de reprodução indicou que a espécie apresenta um sistema misto de reprodução, combinando autofecundações e cruzamentos, embora predominem cruzamentos (Tabela 6). A estimativa da taxa de cruzamento multiloco foi alta ($\hat{t}_m=0,955$), mas significativamente ($P < 0,05$) diferente da unidade (1,0). Esse resultado está dentro do padrão observado para a taxa de cruzamento em outras populações das espécies \hat{t}_m variando de 0,912 a 0,995 (BUTCHER e WILLIAMS, 2002), o que reforça que a espécie apresenta um sistema misto de reprodução. De fato, o sistema misto de reprodução parece ser um padrão em espécies do gênero *Eucalyptus* e a estimativa da taxa de cruzamento está também dentro do padrão observado para outras espécies do gênero *Eucalyptus* as quais tem variado de 0,45 a 1,0. Por exemplo, em *Eucalyptus grandis* a taxa t_m tem sido estimada variar entre populações de 0,69 a 0,967 (MORAN; BELL, 1983, BURGESS et al., 1995, JUNGHANS et al., 1998, JONES et al., 2008), em *Eucalyptus citriodora* foi estimada em 0,85 (YEH et al., 1983), em *Eucalyptus globulos* tem

variado entre populações de 0,48 a 1,0 (HARDNER et al., 1996, PATTERSON et al., 2004) e em *Eucalyptus pellita* tem variando de 0,45 a 0,73 (HOUSE; BELL, 1996).

Tabela 6 - Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução, endogamia, coancestria e tamanho efetivo em população base de *Eucalyptus camaldulensis* estabelecida em Selvíria-MS.

Parâmetro	Estimativas
Sistema de reprodução	
Taxa de cruzamento multiloco: t_m	0,955 (0,941 – 0,969)
Taxa de cruzamento uniloco: t_s	0,669 (0,665 – 0,683)
Taxa de cruzamento entre parentes: $t_m - t_s$	0,285 (0,272 – 0,298)
Correlação multiloco de paternidade: $r_{p(m)}$	0,038 (0,035 – 0,041)
Número médio de árvores polinizadoras: $N_{ep} = 1/r_{p(m)}$	26,3 (24,5 – 28,4)
Endogamia e estrutura genética	
Índice de fixação nas matrizes: F_m ($n = 25$)	-0,118 (-0,090 – 0,190)
Índice de fixação nas progênies: F_o	0,442 (0,311 – 0,525)
Endogamia nas progênies por autofecundação: $F_s = 0,5s(1 + F_m)$	0,022 (0,015 – 0,029)
Endogamia por cruzamento entre parentes: $F_{t_m-t_s} = F_o - F_s$	0,419 (0,315 – 0,495)
Proporção de irmãos de autofecundação: $P_{IA} = 1 - t_m$	0,045 (0,031 – 0,059)
Proporção de meios-irmãos: $P_{MI} = t_m(1 - r_{p(m)})$	0,919 (0,908 – 0,929)
Proporção de irmãos-completos: $P_{IC} = r_{p(m)}t_m$	0,036 (0,033 – 0,039)
Coancestria média dentro de progênies: Θ	0,141 (0,137 – 0,145)
Tamanho efetivo de variância: $N_{e(v)}$	1,75 (1,73 – 1,77)
Número de árvores para reter o tamanho efetivo de 100: m	57,2 (56,6 – 57,8)

() = erro padrão da média a 95% de probabilidade.

A taxa de cruzamento uniloco ($\hat{t}_s=0,581$) foi significativamente menor do que a taxa de cruzamento multiloco (Tabela 6). Em concordância, a diferença entre a taxa de cruzamento multiloco e uniloco ($t_m - t_s$) foi alta e estatisticamente diferente de zero ($\hat{t}_m - \hat{t}_s=0,285$; $P < 0,05$). Diferenças positivas entre as taxas de cruzamento multiloco e uniloco têm sido interpretadas como indicativas de cruzamento entre parentes (RITLAND; JAIN, 1981, RITLAND, 2002). Portanto, a presente estimativa indica que 28,5% dos cruzamentos ocorrem entre árvores parentes na população. Por sua vez, isso sugere que a população natural australiana,

de origem destas progênies, apresentava estrutura genética espacial intrapopulacional, o que permitiu a ocorrência de cruzamentos entre indivíduos parentes. Estrutura genética espacial intrapopulacional tem sido reportada em uma população de *Eucalyptus globulos* na Tasmânia (JONES et al., 2007) e cruzamentos entre parentes em outras populações de *E. camaldulensis* (BUTCHER; WILLIANS, 2002), bem como em muitas outras espécies de *Eucalyptus*, como por exemplo: *Eucalyptus argutifolia* (KENNINGHTON; JAMES, 1997), *Eucalyptus cladocalys* (MCDONALD et al., 2003), *Eucalyptus delegatensis* (MORAN; BROWN, 1980), *Eucalyptus glóbulos* (PATTERSON et al., 2004), *Eucalyptus marginata* (MILLAR et al., 2000), *Eucalyptus morrisbyi* (JONES et al., 2005), *Eucalyptus rameliana* (SAMPSON et al., 1995) e *Eucalyptus rhodantha* (SAMPSON et al., 1989). Tais resultados levam a crer que muitas populações naturais de *Eucalyptus* apresentam estrutura genética espacial, provavelmente devido a dispersão de sementes e o estabelecimento de filhos nas vizinhanças das árvores matrizes.

A correlação multilocos de paternidade (Tabela 6) foi baixa, embora significativamente diferentes de zero ($r_{p(m)} = 0,038$; $P < 0,01$), o que demonstra que uma pequena parte das progênies geradas por cruzamentos são parentes no grau de irmãos-completos (3,6%). Da correlação de paternidade estimou-se um número médio de árvores efetivamente doadoras de pólen em 41,7 árvores. Contudo, tendo em vista que apenas quatro plantas foram avaliadas por progênie, estas estimativas da correlação de paternidade e número efetivo de doadores de pólen estão provavelmente subestimadas e tais parâmetros devem ser interpretados com cautela. Como a correção de paternidade é uma medida associada ao parentesco dentro das progênies e quanto maior o número de plantas avaliadas por progênie, maior é a precisão que este parâmetro é estimado. Assim, estimativas mais robustas podem ser obtidas com a amostragem de aproximadamente 20 plantas por progênie.

A causa dos cruzamentos biparentais pode ser atribuída a diversos fatores, sendo os mais relevantes no caso de espécies de *Eucalyptus* o comportamento dos polinizadores, visitando de forma sistemática árvores próximas, depósito de múltiplos grãos de pólen de um simples polinizador ou devido ao pequeno número de vizinhos reprodutivos próximos.

4.2.3 Endogamia, coancestria e tamanho efetivo de variância

O índice de fixação estimado nas progênes foi alto e significativamente diferente de zero ($\hat{F}_o = 0,442; P < 0,01$), indicando a presença forte de endogamia. O desdobramento da endogamia nas progênes nos seus componentes devido a autofecundação e cruzamento entre parentes (Tabela 6), indica que esta endogamia ocorreu principalmente devido ao cruzamento entre parentes. Isso decorre possivelmente do fato de que a endogamia em espécies de *Eucalyptus* gera depressão endogâmica, a qual mata muitos indivíduos endogâmicos (GRIFFIN; COTTERILL, 1988, HARDNER; POTTS, 1995, HARDNER; POTTS, 1997). A autofecundação gera no mínimo 50% de endogamia a cada geração e o cruzamento entre parentes gera endogamia igual ao coeficiente de coancestria entre os parentes cruzados. Assim, como a autofecundação gera uma maior taxa de endogamia, é provável que ela cause maior mortalidade do que a endogamia originada pelo cruzamento entre parentes. Logo, possivelmente apenas pequena parte de indivíduos endogâmicos originados de autofecundação tenham sido utilizados no plantio da população base, pois a maioria deve ter morrido e como a endogamia por cruzamento entre parentes é mais branda, estes últimos foram incluídos em maior frequência, inflando sua contribuição para a endogamia total da população.

O coeficiente médio de coancestria entre plantas dentro de progênes ($\Theta = 0,141$) foi maior do que o esperado em progênes coletadas de populações panmíticas ($\theta_{xy} = 0,125$). Isso mostra que estimativas da variância genética aditiva e parâmetros genéticos como herdabilidades e ganhos esperados na seleção na presente população devem ponderar os desvios de cruzamentos aleatórios, causados por autofecundações, cruzamentos entre parentes e cruzamentos correlacionados. Estimativas da variância genética aditiva (σ_A^2) no banco devem ser calculadas dividindo-se a variância genética entre progênes (σ_p^2) pelo coeficiente de parentesco médio dentro de progênes (r_{xy}) de 0,282 ($r_{xy} = 2\Theta = 2 \times 0,141$) e não por 0,25 (parentesco entre meios-irmãos) como é muitas vezes feito.

Em função da coancestria dentro de progênes ser maior do que a esperada em progênes de meios-irmãos e a alta taxa de endogamia detectada, o tamanho efetivo de variância estimado foi também menor ($N_{e(v)} = 1,75$) do que o esperado em progênes de meios-irmãos ($N_{e(v)} = 4$). Estes resultados também se devem ao sistema misto de reprodução, combinado autofecundações, cruzamentos entre parentes e cruzamentos correlacionados. Estes fatores aumentam o parentesco e a endogamia dentro das progênes e, portanto, a frequências de alelos idênticos por descendência, o que reduz o tamanho efetivo. Isso tem impacto direto em programas de melhoramento e conservação genética, visto a necessidade de coletar-se amostras maiores de polinização aberta para a implantação dos bancos de germoplasma ou testes de progênes, do que seriam necessárias caso a população de origem das sementes fosse perfeitamente panmítica. Se o processo de reprodução fosse perfeitamente aleatório, para fundar a população base no Brasil, a coleta de sementes nas 25 árvores ($m = 100/4$) como foi feito seria suficiente. Contudo, no presente caso, o número de árvores matrizes necessárias para a coleta de sementes na população

de origem (Austrália) visando reter o tamanho efetivo de 100 foi estimado em 58 árvores, ou seja, precisar-se-ia de uma amostra 57% maior para reter este tamanho efetivo alvo.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos e discutidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

A) Em relação ao estudo dos caracteres quantitativos (silviculturais):

- A variação genética para os caracteres silviculturais estudados (altura total, altura comercial, altura da primeira bifurcação, diâmetro a altura do peito, volume, resistência à penetração e a densidade básica da madeira) não foi detectada;
- O caráter mais indicado para a seleção foi à altura comercial (HC) em função dos maiores coeficientes de variação relativa, herdabilidade e da acurácia encontrados;
- A alta densidade básica da madeira desta população de *E. camaldulensis* indica este material para uso em serraria e energia (carvão e lenha);
- A população de *E. camaldulensis* apresenta bom desenvolvimento silvicultural na região do bolsão sul-matogrossense.

B) Com base no marcador molecular do tipo microssatélite:

- A população de *E. camaldulensis* apresenta alta variabilidade genética;
- O sistema de reprodução é misto, com alta taxa de cruzamento;
- A endogamia está ausente nas árvores matrizes, porém presente nas progênies em função de cruzamento entre parentes;
- A população de *E. camaldulensis* pode ser utilizada em programas de conservação e melhoramento genético em função de sua estrutura genética

6. REFERENCIAS

AGRAMA, H.A.; GEORGE, T.L.; SALAH, S.F. Construction of genome map for *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.51, n 5/6, p.201-206, 2002.

ALVES, R. M.; ARTERO, A. S.; SEBBENN, A. M.; FIGUEIRA, A. Mating system in a natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 3, p. 373-379, 2003.

ANDRADE, E. N. **O eucalipto**. 2.ed. Jundiaí: Companhia Paulista de Estradas de Ferrop, 1961. p.667.

BARROS, N. F.; BARROS, R. F. **Relação solo-eucalipto**. Viçosa: UFV, 1990. p 268-269

BILA, A.; ISSUFO, A.A.K. Teste de procedências de *Eucalyptus camaldulensis* na região Norte e Sul de Moçambique. **IPEF**, Piracicaba, n.47, p.50-55, 1994.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n 5/6, p. 816-827, 1998.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. **Molecular General and Genomics**, Germany, v.267, n.3, p.338-347, 2002.

BUTCHER, P. A.; WILLIAMS, E. R. Variation in outcrossing rates and growth in *Eucalyptus camaldulensis* from the Petford Region, Queensland; Evidence of Outbreeding Depression. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.51, n 1, p.6-12, 2002.

BUTCHER, P.A.; SKINNER, A.K.; GARDINER, C.A. Increased inbreeding and inter-species gene flow in remnant populations of the rare *Eucalyptus benthamii*. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v.6, n.2, p.213–226, 2005.

BYRNE, M.; ELLIOTT, C.P.; YATES, C.J.; COATES, D.J. Maintenance of high pollen dispersal in *Eucalyptus wandoo*, a dominant tree of the fragmented agricultural region in Western Australia. **Conservation Genetics**, , Dordrecht, v.9, n.1, p.97–105, 2008.

CAIXETA, R. P.; CARVALHO, D.; ROSADO, S. C. S.; TRUGILHO, P. F. Variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. detectadas por meio de marcadores moleculares. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 357-363, 2003.

CAMPINHOS, E. N.; PETERS-ROBINSON, I.; BERTOLUCCI, F.L.; ALFENAS, A.C. Interspecific hybridization and inbreeding effect in seed from a *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clonal orchard in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.21, n.3, p.1-6, 1998.

CARVALHO, M. O. FragSize software – bioinformatics open lab. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.3, p.179-179, 2000. Disponível em: <www.bioinformatics.org/fragsize>. Acesso em: 10 abr. 2007.

CERESINI, P.C.; SILVA, C.L.S.P.; MISSIO, R.F.; SOUZA, E.C.; FISCHER, C.N.; GUILHERME, I.R.; GREGÓRIO, I.D.; SILVA, E.H.T.; CICARELLI, R.M.B.; SILVA, M.T.A.; GARCIA, J.F.; AVELAR, G.A.; PORTO NETO, L.R.; MARÇON, A.R.; BACCI JÚNIOR, M.; MARINI, D.C. Satellyptus: analysis and databases of microsatellites from ESTs of *Eucalyptus*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.3, p.589-600, 2005.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA- CIB. **Glossário**. [S.l.]: CIB, [2005] Disponível em: <<http://www.cib.org.br/glossario.php?letra=S>>. Acesso em: 02 jul 2007 (artigo não publicado).

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Lawrence, v.23, n.1, p.72-84, 1969.

DORAN, J. C.; BROPHY, J. J. Tropical red gums: a source of 1,8-cineole-rich *Eucalyptus* oil. **New Forests**, Dordrecht., n. 4, p. 157-178, 1990.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; WYK, G. van. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1993. 312p.

ELDRIDGE, K.G.; GRIFFIN, A.R. Selfing effects in *Eucalyptus regnans*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.32, n 5/6, p.216-221. 1983.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p.1998.

FOELKEL, B; SHIELD, E. **Eucalyptus progress in higher value utilization**: a global review. Tacoma: Robert Flynn & Associates, 1999. 212p.

FOELKEL, C.E.B.;BRASIL, M.A.M.; BARRICHELTA, L.G.E. Métodos para determinação da densidade básica de cavacos para coníferas e folhosas. **IPEF**, Piracicaba, n.2/3, p.65-74, 1971.

GARCIA, C.H.; NOGUEIRA, M.C.S. Utilização da metodologia REML/BLUP na seleção de clones de eucalipto. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.68, p.107-112, 2005. (esta revista não possui volume, o volume começou a ser adotado em 2008)

GAIOTTO, F. A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.95, n.5/6, p.842-849, 1997.

GOLFARI, L.; CASER, R. L.; MOURA, V. P. G. **Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil**. 2.ed. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa Florestal da Região do Cerrado, 1978. 66p. (Projeto de Desenvolvimento e Pesquisa Florestal, 11).

GRATTAGLIA, D. Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. **Genetic and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.3, n.3, p.369-379. 2004.

GRIFFIN, A. R.; COTTERILL, P. P. Genetic variation in growth of outcrossed, selfed and open-pollinated progenies of *Eucalyptus regnans* and some implications for breeding strategy. **Silvae Genetica**. Frankfurt, v. 37, n.3/4, p. 124-131, 1988.

HARDNER, C. M.; POTTS, B. M. Inbreeding depression and changes in variation after selfing in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus*. **Silvae Genetica**. Frankfurt, v. 44, n.1, p. 46-54, 1995.

HARDNER, C. M.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M. *Stand density influences outcrossing rate and growth of open-pollinated families of Eucalyptus globulus*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 45, n.4, p. 226 -228, 1996.

HARDNER, C. M.; POTTS, B. M. Post-dispersal selection following mixed mating in *Eucalyptus regnans*. **Evolution**, Lawrence, v. 51, n.1, p. 103-111, 1997.

HOULE, D. Comparing evolvability and variability of quantitative traits. **Genetics**, Austin, v.130, n.1, p.195-204, 1992.

INSTITUTO DE PESQUISA E ESTUDOS FLORESTAIS- IPEF. **Indicações para escolha de espécies de *Eucalyptus* identificação de espécies florestais**. Piracicaba: IPEF, 2005. Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/eucalyptus/indicacoes.asp>>. Acesso em: 04 nov. 2008.

JONES, E.M.; SHEPHERD, M.; HENRY, R.; DELVES, A. Pollen flow in *Eucalyptus grandis* determined by paternity analysis using microsatellite markers. **Tree Genetics & Genomes**, Australia, v.1, n.4, p.37-47, 2008.

JUNGHANS, T.G.; PETERS-ROBINSON, I.; BERTOLUCCI, F.L.; ALFENAS, A.C. The use of self-incompatibility in the production of hybrid eucalyptus seed by 'Aracruz Celulose' in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.21, n.3, p.375-379, 1998.

KIRST, M.; CORDEIRO, C.M.; REZENDE, G.D.S.P.; GRATTAPAGLIA, D. Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. **Heredity**, Lund, v.96, n.2, p.161-166, 2005.

KRONKA, F. J. N.; NALON, M. A.; MATSUKUMA, C. K.; PAVÃO, M.; YWANE, M. S. S. I.; KANASHIRO, M. M.; LIMA, L. M. P. R.; PIRES, A. S.; SHIDA, C. N.; FUKUDA, J. C.; COUTO, H. T. Z. Mapeamento e quantificação de reflorestamento no Estado de São Paulo. **Florestar Estatístico**, São Paulo, v. 6, n. 14, p. 19-27, jan. 2003.

LIMA, I. L.; GARCIA, J. N. STAPE, J. L.; PIEDADE, S. N. S. Efeito do desbaste e da fertilização nas tensões de crescimento em *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 70, p. 171-183, 2006.

LIMA, P.C.F. Espécies potenciais para reflorestamento em regiões semiáridas. **Silvicultura**, São Paulo, v.10, n.37, p.28-32, 1984.

LOPES, R.; BRUCKNER, C. H.; LOPES, M.T.G. Estimation of outcrossing rates in acerola (*Malpighia emarginata*) based on isoenzymic data. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.3, p.321-327. 2002.

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**, Berlin, v.105, n.2/3, p.474-478, 2002.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUUK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Queensland, v.7, n.5, p.639-655, 1998.

MARTÍNEZ, H. **Camaldulensis (*Eucalyptus camaldulensis*):** especie de arbol de uso múltiple en America Central. Turrialba: GUIAS SILVICULTURALES, 1990. 58p. (CATIE. Informe Técnico, 158).

MARTINS-CORDER, M.P.; MORI, E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; LOPES, C.R. Estudo da variabilidade enzimática em *Eucalyptus urophylla* das ilhas das flores. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n.50, p.43-49. 1996.

MORAES, M.L.T.; HIGA, A.R.; CAVENAGE, A.; KANO, N.K. Avaliação da densidade básica da madeira e de sua relação com os caracteres de crescimento, em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. In: CONFERÊNCIA IUFRO SOBRE SILVICULTURA E MELHORAMENTO DE EUCALIPTOS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA/CNPF, 1997. v.3, p.43-47.

MORAN, G.F.; BELL, J.C. Eucalyptus. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Ed.) **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.423-441.

MORI, E.S. **Variabilidade genética isoenzimática em uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção.** 1993. 119f. Tese (Doutorado em Genética) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

NIETO, V.M.; RODRIGUEZ, J. *Eucalyptus camaldulensis* dehnh. In: VOZZO, J.A. **Tropical tree seed manual**. Santafé de Bogotá: Corporacion Nacional de Investigacion of Forestal, 2003. p.466-467.

PATTERSON, B.; VAILLANCOURT, R. E.; PILBEAM, D. J.; POTTS, B. M. Factors affecting variation in outcrossing rate in *Eucalyptus globules*. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.52, n.6, p.773–780, 2004.

PAULA, R.C.; PIRES, I.E.; BORGES, R.C.G.; CRUZ, C.D. Predição de ganhos genéticos em melhoramento florestal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.2, p.159-165. 2002.

PEREIRA, A.B.; MARQUES JÚNIOR, O.G.; RAMALHO, M.A.P.; ALTHOFF, P. Eficiência da seleção precoce em famílias de meios irmãos de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, avaliadas na região noroeste do estado de Minas Gerais. **Revista Cerne**, Lavras, v.3, n.1, p.1-14, 1997.

PHILLIPS, M.A., BROWN, A.H.D. Mating system and hybridity in *Eucalyptus pauciflora*. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.30, n.4, p.337-344. 1977.

PINYOPUSARERK, K.; DORAN, J.C.; WILLIAMS, E.R.; WASUWANICH, P. Variation in growth of *Eucalyptus camaldulensis* provenances in Thailand. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.87, n.1/3, p.63-73, 1996.

POTTS, B.M.; POTTS, W.C.; CAUVIN, B. Inbreeding and interspecific hybridization in *Eucalyptus gunnii*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.36, n 5/6., p.194-199. 1987

PRYOR, L. D. **The biology of eucalypts**. London: Edward Arnold. 1976. 83p.

RAJORA, O.P., PLUHAR, S.A. Genetic diversity impacts of forest fire, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.106, n. 2, p.1203–1212, 2003.

MELHORAMENTO genético para a qualidade da madeira. **Remade-Revista da Madeira**, São Paulo, n.75, ago. 2003. Disponível em: <[http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=403&subject=Melhoramento Genético&title=Melhoramento genético para a qualidade da madeira#](http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=403&subject=Melhoramento_Genético&title=Melhoramento_genético_para_a_qualidade_da_madeira#)>. Acesso em: 2 dez 2008.

RESENDE, M.D.V.; HIGA, A.R. Estimação de valores genéticos no melhoramento de *Eucalyptus*: seleção em um caráter com base em informações do indivíduo e seus parentes. Embrapa Floresta-**Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.28-29, p.11-36, 1994a.

RESENDE, M.D.V.; HIGA, A.R. Maximização da eficiência da seleção em testes de progênies de *Eucalyptus* através da utilização de todos os efeitos do modelo matemático. Embrapa Floresta. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.28/29, p.37-55, 1994b.(não possui volume)

RESENDE, M.D.V. Delineamento de experimentos de seleção para maximização da acurácia seletiva e do progresso genético. **Revista Árvore**, Viçosa, v.19, n.4, p.479-500, 1995.

RESENDE, M.D.V. Melhoramento de essências florestais. In: BOREM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p.589-647.

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

RESENDE, M.D.V. **Software SELEGEN - REML/BLUP**. Colombo: EMBRAPA – CNPF, 2002b. 67p. (Série Documentos, 77).

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

RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR**. Vancouver: University of British Columbia. Free program distributed by the authors from. [S.l.:s.n.], 1994. Disponível em: <<http://kritland@interchange.ubc.ca>>. 2004. Acesso em: 5 out 2008.

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

SAMPAIO, P.T.B.; RESENDE, M.D.V.; ARAÚJO, A.J. Estimativas de parâmetros genéticos e métodos de seleção para o melhoramento genético de *Pinus oocarpa* Schiede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.5, p.625-636, 2002.

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

SANTOS, F.W. **Varição genética para caracteres silviculturais e relacionados à qualidade da madeira em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* DEHNH.** 2008.45f. Trabalho de Formatura (Graduação em Agronomia) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Soletira, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA- SBS. **Apagão florestal vem aí, alerta o diretor do PNF**. São Paulo: SBS, 2002.(SBS dia a dia, 31/07/2002). Disponível em: <http://www.sbs.org.br/detalhes_dia.php?ok=3&id=344&PHPSESSID=5584322c5c0629567c87920b6f6504ed>. Acesso em: 03 out. 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA- SBS. **Madeira:** à sombra do apagão. São Paulo: SBS, 2004 (SBS dia a dia, 28/12/2004). Disponível em: <http://www.sbs.org.br/detalhes_dia.php?ok=3&id=940>. Acesso em: 02 dez. 2008.

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. Número de populações para conservação genética *in situ* de espécies arbóreas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.15, n.1, p.45-51, 2003.

SILVA JUNIOR, F.G.; GOMES, I.M.B.; BARRICHELO, L.E.G.; ODA, S. Avaliação da qualidade da madeira de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus camaldulensis* visando a produção de celulose. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7., 1993, Curitiba. **Anais...** São Paulo: SBS/SBEF, 1994. v.2, p.581-585.

SOERIANEGARA, I.; LEMMENS, R. H. M. J. Timber trees: mayor commercial timbers. **PROSEA**, Bogor, v.5, n.1, 160p, 1994.

SOUZA, C.S.; AGUIAR, A.V.; SILVA, A.M.; MORAES, M.L.T. Variação genética em progênies de Gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium*) em dois sistemas de plantio. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.15, n.2, p.137-145, 2003.

STAPE, J. L. **Pesquisa busca maior retorno das áreas de reflorestamento.** [S.l.: s.n., 2003]. Disponível em: <<http://www.ipef.br/servicos/clipping/007-2003.html>>. Acesso em: 26 fev. 2008.

SUN, M.; RITLAND K. Mating system of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*), a successful colonizer in North America. **Heredity**, Lund, v. 80, n.6, p. 225-232, 1998.

VALE, A.T.; MOURA, V.P.G.; MARTINS, I.S.; RESENDE, D.C.A. Densidade básica média em função da profundidade de penetração do pino do "pilodyn" e da classe diamétrica e variação axial da densidade básica em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v.19, n.1, p.80-91, 1995

VALLE, C. F. do. **Análise silvicultural de lotes de sementes de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. visando a implantação de populações-base.** 1991. 11f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1991.

VALOIS, A.C.C.; NASS, L.L.; GOES, M. Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.124-147.

VENCOVSKY, R. **Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasmas de espécies alógamas**. Piracicaba: IPEF, 1987. n.35, p.79-84.

VENCOSVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496p.

VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Variance effective population size under mixed self and random mating with applications to genetic conservation of species. **Crop Science**. Madison, v.39, n.5, 1999. p.1282-1294.

VITAL; B.R.; ALMEIDA, J.; VALENTE, O.F.; PIRES, I.E. **Características de crescimento das árvores e de qualidade da madeira de *Eucalyptus camaldulensis* para a produção de carvão**. Piracicaba: IPEF, 1994. n.47, p.22-28.

WEI, X.; BORRALHO, N.M.G. Genetic control of wood basic density and bark thickness and their relationships with growth traits of *Eucalyptus urophylla* in South East China. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.46, n.4, p.245-250, 1997.

YEH, F. C.; BRUNE, A.; CHELIAK, W. M.; CHIPMAN, D.C. Mating system of *Eucalyptus citriodora* in a seed-production area. **Canadian Journal of Forest Research**, Edmonton, v. 13, n.6, p. 1051-1055, 1983.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* D. utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ZUCCHI, M. I; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOVSKY, R. Genetic structures and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n.4, p. 449-457, 2003.