



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

Lucas Ferraz dos Santos

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Eucalyptus ssp.* POR MEIO DE
MARCADORES MOLECULARES E MÉTODOS QUANTITATIVOS.**

**ILHÉUS – BAHIA
2012**

LUCAS FERRAZ DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Eucalyptus ssp.* POR MEIO DE
MARCADORES MOLECULARES E MÉTODOS QUANTITATIVOS.**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz, para
a obtenção do título de Mestre em
Produção Vegetal.

Área de concentração: Melhoramento
de Plantas e Biotecnologia.

Orientador: Ronan Xavier Corrêa

Co-orientadores: Júpiter I. M. Abad,
Norma Eliane Pereira e Fernanda A.
Gaiotto.

ILHÉUS – BAHIA

2012

LUCAS FERRAZ DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Eucalyptus ssp.* POR MEIO DE
MARCADORES MOLECULARES E MÉTODOS QUANTITATIVOS.**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz, para
a obtenção do título de Mestre em
Produção Vegetal. Área de concentração:
Melhoramento de Plantas e Biotecnologia.

Aprovada em: 23 março de 2012.

Júpiter Israel Muro Abad - DS

Prof. Dário Ahnert - DS

Prof. Márcio Gilberto Cardoso Costa – DS

Á Deus, que cuida dos mínimos detalhes da minha vida

Aos meus pais Chico e Duzinha.

Aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal.

Ao professor Dr. Ronan Xavier Corrêa, pela orientação, palavras sempre motivadoras e sabedoria com que sempre conduziu este projeto.

Ao Dr. Júpiter Israel Muro Abad, pelo grande empenho, carinho demonstrado para que este projeto fosse realizado.

Ao professor Dr. Dário Ahnet, pelas contribuições ao longo de toda pesquisa, discussões nos momentos de dúvida.

Ao professor Dr. Márcio Gilberto Costa, pela solidariedade com que me adotou em representação ao orientador.

A professora Dr^a. Fernanda Amato Gaiotto, pela grande contribuição para realização das análises moleculares.

Ao Dr. Eder Jorge de Oliveira, por me iniciar na pesquisa e pelo direcionamento na área do melhoramento.

A minha piauiense Eullaysa dos olhos verdes, que esteve comigo nestes momentos de tanta correria e teve que ouvir tanto agrupamento, diversidade e seleção, etc.

A FIBRIA em especial ao coordenador de Melhoramento Florestal, Dr. Júpiter Israel Muro Abad, pela colaboração oferecida ao projeto cedendo material.

Aos colegas de turma Cristina, Carol, Geórgia, Valéria, e em especial a Têssio, pela grande companhia e por suportar diariamente.

Agradeço as secretárias Carol e Viviane, pela eficiência e carinho demonstrado nestes dois anos de mestrado.

Agradeço aos meus pais, aos meus irmãos, por sempre acreditarem no meu sucesso, e pela motivação para um futuro gratificante.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pelas contribuições na minha vida acadêmica.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – CAPES, pela bolsa de estudo.

INDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O <i>Eucalyptus</i>	3
2.2 Melhoramento florestal do eucalipto	5
2.3 Diversidade e parâmetros genéticos	8
2.4 Variância genotípica, fenotípica e heterogeneidade das variâncias	9
2.5 Diversidade genética	10
2.6 Marcadores moleculares	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12

EVALUATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF A SET OF PARENTS OF *EUCALYPTUS SPP.* BY USING MICROSATELLITE MARKERS TO DIRECT MATINGS.

ABSTRACT	17
RESUMO.....	18
1. INTRODUCTION.....	19
2. MATERIALS AND METHODS.....	20
3. RESULTS AND DISCUSSION	21
4. CONCLUSIONS	25
5. REFERENCE	26

AVALIAÇÃO GENÉTICO MOLECULAR DE UM GRUPO DE GENITORES de *Eucalyptus ssp* UTILIZANDO MARCADORRES MICROSSATÉLITES EST-SSR E GENÔMICOS-SSR.

RESUMO.....	28
ABSTRACT	29
1. INTRODUÇÃO	30
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Material genético e extração do DNA genômico	31
3.2 Amplificação dos locos microsatélites	32

3.3 Análise dos dados	33
3.4 Heterozigosidade observada (H_O)	33
3.5 Heterozigosidade esperada (H_E)	33
3.6 Conteúdo de informação polimórfica (PIC).....	34
3.7 Índice de fixação de Wright (F_{IS})	34
3.8 Teste F	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5. CONCLUSÕES	41
6. REFERÊNCIAS	42

AValiação da Diversidade Genética por Meio de Características Morfológicas em Progenies de *Eucalyptus ssp.*

RESUMO.....	44
ABSTRACT	45
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1 Material genético	49
2.2 Distância genética e agrupamento dos genótipos	49
2.3 Estimativas das análise de variância e parâmetros genéticos	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
3.1 Estimativas das variâncias, coeficientes de variação e herdabilidade	52
3.2 Divergência genética das progenies.....	57
4. CONCLUSÕES	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

RESUMO

SANTOS, Lucas Ferraz dos. M. Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Fevereiro 2012.

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Eucalyptus ssp.* POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES E MÉTODOS QUANTITATIVOS.

Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientadores: Júpiter Israel Muro Abad, Norma Eliane Pereira e Fernanda Amato Gaiotto.

Os objetivos a serem alcançados em um programa de melhoramento requerem métodos de análise que possam ao longo do vários ciclos de melhoramento proporcionar a seleção de indivíduos superiores em populações com base genética ampla permitindo ganhos de forma contínua. O estabelecimento de estratégias e métodos de melhoramento eficientes depende do conhecimento prévio dos mecanismos genéticos responsáveis pela herança do caráter a melhorar e consequentemente da melhor indicação dos genitores a recombinar. O presente estudo teve como finalidade comparar o uso de marcadores EST-SSR e genômicos ou G-SSR na avaliação de genitores de *Eucalyptus ssp.*, e analisar a variabilidade genética por meio destes e por variáveis quantitativas em dois testes de progênies de irmãos completos de *Eucalyptus ssp.*, oriundos destes genitores em cruzamentos dialélicos. Uma grande diversidade genética foi observada entre os 20 genitores utilizados como pais, sendo agrupados em até sete grupos. Estes resultados permitiram selecionar os pais a serem utilizados para o próximo ciclo de seleção e mostrou que para todos os locos analisados havia polimorfismo. O número de alelos por loco variou de 4 a 15, com uma média de 8,2 no geral. Por outro lado foi verificado que alguns genótipos compartilham os mesmos alelos da população em estudo. Este resultado é importante e esperado quando se estuda populações melhoradas oriundas de cruzamentos entre genitores que vêm de um processo de melhoramento para manutenção da variabilidade genética. Entre os microssatélites genômicos verificou-se diferenças contrastantes entre alguns primers. O primer

Embra 665 destacou-se apresentando 15 alelos, enquanto Embra 646 apresentou cinco alelos. Por se tratar de regiões conservadas os EST-SSR podem apresentar valores para polimorfismo abaixo dos microssatélites oriundos de bibliotecas genômicas. Ambos os marcadores EST-SSR e G-SSR apresentaram elevados valores de PIC, variando em média de 0,7730 a 0,8522, para EST e genômicos, respectivamente. A análise conjunta dos marcadores G-SSR e EST-SSR, considerando o agrupamento hierárquico evidenciaram um maior poder de discriminação dos marcadores G-SSR, em função destes marcadores acessarem diferentes alelos nos genótipos da população. Este resultado foi confirmado no teste F a 5% probabilidade, em que os SSR-G foram significativos para valores de PIC ($F= 5,5$) com maior quantidade de polimorfismo. Para a correlação entre as matrizes de dados gerados a partir de locos SSR-G e SSR-EST, calculado por meio do teste de Mantel com 1000 simulações mostrou uma correlação significativa de 0,59** comprovando alguma ligação entre estes marcadores e o tipo de identidade compartilhada com estes dados moleculares. A análise de variância realizada para os dois experimentos mostrou-se significativa para os efeitos relacionados a famílias com 1% e 5% para as características de DAP, altura e volume. Isso evidencia a existência de variabilidade genética entre as famílias e que o programa de melhoramento está mantendo esta variabilidade, sendo essa condição favorável para proceder á seleção com ganhos genéticos na população. As estimativas de herdabilidade apresentam valores elevados, reforçando a possibilidade de ganhos com a seleção.

ABSTRACT

SANTOS, Lucas Ferraz dos. M. Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Fevereiro 2012.

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY IN *Eucalyptus* ssp. THROUGH MOLECULAR MARKERS AND QUANTITATIVE METHODS

Advisor: Ronan Xavier Corrêa. Co-advisor: Júpiter Israel Muro Abad, Norma Eliane Pereira e Fernanda Amato Gaiotto.

The objectives to be achieved in a improvement program require methods of analysis that can over several cycles of improvement to provide the selection of superior individuals in populations with wide genetic base allowing gains continuously. The establishment of strategies and efficient methods of improvement depend on prior knowledge of the genetic mechanisms responsible for the inheritable character and therefore the best indication of the parents to be recombined. We aimed to compare the use of EST-SSR markers and genomic SSR or in the evaluation of parents of *Eucalyptus* spp, and analyze the genetic variability by means of quantitative variables and two tests of full-sib progenies of *Eucalyptus* ssp., from these parents in diallel crosses. Large genetic diversity was observed among the 20 parents used as parents, and grouped into seven groups. These results allowed the selection of parents to be used for the next cycle of selection and showed that for all loci analyzed were polymorphic. The number of allele per locus varied 4-15, with an average of 8.2 general. Moreover it was found some genotypes sharing the same alleles of the study population. This result is expected in populations derived from crosses among parents that come from a process of improvement to maintain genetic variability. Among the microsatellite, genomic differences were observed among some contrasting primers. The primer Embra 665 stood out with 15 alleles, while 646 had five alleles Embra. Due the conserved regions of the EST-SSR, its polymorphism can have small values than microsatellites derived from genomic libraries. Both EST-SSR and G-SSR markers have higher PIC values, ranging on average from 0.7730 to 0.8522 for genomic and EST, respectively. The analysis of the G-SSR and EST-SSR markers, considering the hierarchical clustering showed a

greater discrimination power of the G-SSR markers, according to access different alleles of this marker genotypes in the population. This result was confirmed in the F test at 5% probability that the SSR-genomic were significant PIC values ($F= 5.5$) with a large amount of polymorphism. For the correlation between the arrays of data generated from genomic SSR-and EST-SSR locos, calculated using the Mantel test with 1000 simulations showed a significant correlation of 0.59 ** proving a link between these markers and the type of shared identity with these molecular data. The variance analysis performed for the two experiments was significant for the purposes related families with 1% and 5% for the characteristics of DAP, height and volume. This shows the existence of genetic variability between families and the breeding program is keeping this variability, and this favorable condition to proceed to selection with genetic gains in population. The heritability estimates show high values, reinforcing the possibility of selection gains.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo das cinco últimas décadas o Brasil se firmou líder em plantio de florestas de eucalipto em nível comercial, com mais de quatro milhões de hectares de florestas plantadas. Os grandes avanços foram conquistados através do melhoramento genético capaz de oferecer cultivares clonais superiores com ótimo desempenho silvicultural e qualidade da madeira para produção de celulose, energia e madeira sólida.

O programa de melhoramento genético do eucalipto detém hoje toda capacidade de desenvolvimento de genótipos superiores capazes de oferecer ganhos de forma contínua através de cruzamentos entre genótipos elite, o que têm possibilitado ganhos ao longo das gerações. Estes programas de melhoramento intensificaram seus esforços nos testes de progênies com aplicação do método da seleção recorrente recíproca, sendo possível fixação das características desejáveis ao longo de vários ciclos de seleção. Todos estes esforços são empregados com o desejo de manter nas populações o máximo possível uma base genética ampla, ou seja, que a variabilidade genética seja mantida através desses processos de seleção.

A escolha dos genitores com alta capacidade de geração de genótipos e famílias superiores é outro ponto fundamental nos programas de melhoramento. A seleção de indivíduos mais divergentes para constituir os cruzamentos em eucalipto tem produzido combinações geralmente superiores e sendo recurso importante para o alcance de ganhos com a seleção. Nesse sentido o auxílio de marcadores moleculares microssatélites capazes de oferecer dados de divergência genética entre os genitores constituiu uma ferramenta poderosa, além de oferecer ganhos em tempo de condução dos experimentos em campo.

O presente estudo teve como finalidade comparar o uso de marcadores EST-SSR e genômicos-SSR na avaliação de genitores de *Eucalyptus ssp*, e analisar a variabilidade genética por meio destes e por variáveis quantitativas de 44 progênies de irmãos completos de *Eucalyptus ssp*., oriundo do cruzamento entre 24 genitores de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* em diferentes combinações.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O *Eucalyptus*

As espécies de *Eucalyptus* são amplamente cultivadas em quase todas as partes do mundo, estando adaptadas às mais diferentes condições de clima e solo (ELDRIDGE et al., 1994). Sua origem é a Austrália e regiões próximas, como Timor, Indonésia, Papua Nova Guiné, Molucas, Irian Jaya e sul das Filipinas. A maioria dessas espécies está confinada predominantemente ao continente australiano, na faixa latitudinal entre 9° N e 45° S, onde se encontram amplamente distribuídas entre as altitudes de 30 m a 2.000 m (PRYOR, 1976).

O *Eucalyptus* (Myrtaceae) possui muitas espécies, subespécies e alguns híbridos naturais, sendo também notórias as variedades fenotípicas intraespecíficas decorrentes de condições ambientais ou da hibridação (BERTOLUCCI et al., 1995). É um dos gêneros predominantes da flora australiana, estendendo-se das áreas sub-alpinas às florestas úmidas costeiras, às florestas temperadas e à zona mais árida da Austrália. Taxonomicamente até recentemente compreendia as plantas dos gêneros *Angophora* (“apples”) e *Corymbia* (“bloodwoods”), esse último recentemente redescrito (NICOLLE, 2004).

Atualmente diversas espécies de *Eucalyptus* vêm sendo estudadas visando sua introdução em programas de melhoramento com objetivo de se obter materiais com características específicas com destaque para: *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, *Eucalyptus citriodora* Hook, *Eucalyptus cloeziana* F. Muell, *Eucalyptus deanei* Maiden, *Eucalyptus globulus* Labill, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, *Eucalyptus pellita* F. Muell, *Eucalyptus saligna* Smith, *Eucalyptus tereticornis* Smith e *Eucalyptus urophylla* (PERREIRA et al., 2000)

Adaptado as várias condições edafoclimáticas brasileiras, plantações de eucalipto foram estabelecidas desde a Região Norte até as áreas costeiras do Sul, passando pelos cerrados do Brasil Central, litoral da Bahia e Espírito Santo e interior de São Paulo (ABRAF, 2009). Segundo a ABRAF- Associação Brasileira de Produtores de Florestas

Plantadas, em 2009, a área total de plantio de eucalipto e pinus no Brasil atingiram 6.310.450 ha dos quais 4.515.730 ha são de Eucalipto, representando um crescimento de 2,5 % em relação ao total de 2008, considerado modesto tendo em vista o crescimento médio anual de 5,5 % no período de 2005 a 2008.

Entre os anos de 2005 a 2009 houve diversas modificações na tendência de crescimento das florestas de eucalipto nos estados brasileiros, influenciados principalmente pela crise financeira mundial. O maior crescimento ocorreu no estado da Bahia, seguido por São Paulo, Maranhão, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, os quais em conjunto, totalizaram 143 mil ha.

2.2 Melhoramento florestal do eucalipto

Desde a década de 1970, os programas de melhoramento genético do eucalipto utilizam metodologias de hibridação e de clonagem como principais ferramentas para a obtenção de ganhos genéticos, fundamentados na expressiva divergência genética entre e dentro de espécies e procedências associada à manifestação heterótica dos híbridos (RESENDE, 1990).

No melhoramento genético do *Eucalyptus*, os ganhos genéticos esperados nem sempre têm sido compatíveis com os observados. A este fato tem se atribuído como causa principal a interação genótipo x ambiente, isto é, o material selecionado num sítio (local, tipo de manejo) não tem correspondido às expectativas quando se planta em outro sítio (KAGEYAMA, 1980).

Os objetivos a serem alcançados em um programa de melhoramento que visa obtenção de cultivares geneticamente superiores requerem métodos de análise que possam ao longo do vários ciclos de seleção proporcionar indivíduos superiores em populações com base genética ampla, permitindo ganhos de forma continuada. O estabelecimento de estratégias eficientes de melhoramento depende do conhecimento prévio dos mecanismos genéticos responsáveis pela herança do caráter a melhorar, tais como, o número de genes que o governam, as ações e efeitos gênicos, herdabilidade, repetibilidade e associações genéticas com outros caracteres. O êxito do melhoramento genético está associado à capacidade de acerto na escolha dos melhores indivíduos que

serão os genitores das próximas gerações (CRUZ, 2003). Uma das maneiras de identificar os indivíduos portadores de genes desejáveis é a avaliação genética dos candidatos à seleção (RESENDE, 2002).

Em plantas perenes, recomenda-se que a seleção seja feita com base nos valores genéticos aditivos dos indivíduos que serão utilizados na recombinação e nos valores genotípicos dos indivíduos que serão clonados (RESENDE, 2002).

Vários métodos de seleção buscando alcançar o máximo de ganhos genéticos têm sido empregados como: seleção entre e dentro de progênies (KAGEYAMA; VENCovsky, 1983); o índice de seleção multivariado (RESENDE et al., 1990) seleção entre e dentro de progênies, com equivalência entre unidade de seleção e de recombinação (RESENDE, 1991); índice de seleção univariado, utilizando informações de parentes (BUENO FILHO, 1992; RESENDE; HIGA, 1994; PIRES et al., 1996); e o índice de seleção multivariado multi-efeitos (RESENDE, 1994).

Segundo Resende et al. (1995) o índice multi-efeitos univariado ou multivariado é o mais eficiente quando se estuda caracteres de baixa herdabilidade. Os procedimentos Melhor Predição Linear-BLP (“Best Linear Prediction”) e Melhor Predição Linear Não-Viciada-BLUP (“Best Linear Unbiased Prediction”) também têm sido empregados (RESENDE et al., 1996).

O BLUP e o índice multi-efeitos são métodos equivalentes no caso de dados balanceados (RESENDE, 2002). Para as espécies perenes, os métodos de seleção podem ser classificados quanto às unidades de seleção, unidades de recombinação e quanto aos procedimentos de predição de valores genéticos, devendo ser incluído também o critério de seleção, definido em função do objetivo do melhoramento.

Avaliando progênies de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden (MARTINS et al., 2003) enfatizaram que a seleção através de análises de correlações proporciona a discriminação das alterações pela seleção de uma variável influenciando em outras. Assim, a resposta correlacionada pode ou não ser de interesse ao melhorista (MARTINS et al, 2003).

A seleção atua promovendo a alteração das frequências alélicas nos locos que controlam o caráter sob seleção, modificando a média genotípica da população. Atua-se em duas etapas básicas: a predição do valor genético dos indivíduos e a decisão de como utilizar os indivíduos que apresentam os maiores valores genéticos preditos (RESENDE, 2002).

A definição correta do objetivo da seleção é um requisito essencial para a obtenção de sucesso nos programas de melhoramento genético. O objetivo da seleção ou do melhoramento pode ser definido como o caráter econômico final, único ou um conjunto de caracteres agrupados, para os quais se deseja obter um dado ganho genético. O critério de seleção representa o caráter ou o conjunto de caracteres em que a seleção se baseia, com a finalidade de avaliar e ordenar os candidatos à seleção, para o caráter objetivo do melhoramento.

Para a definição do objetivo da seleção, deve-se proceder à correta avaliação do produto de interesse e de informações econômicas dos componentes deste produto. Já a definição do critério de seleção depende de informações sobre os parâmetros genéticos e fenotípicos (herdabilidades, repetibilidades e correlações genéticas e fenotípicas associadas aos caracteres) e também das informações econômicas, notadamente das importâncias econômicas relativas entre os caracteres (RESENDE, 2002).

Atualmente, nos estudos de melhoramento florestal, para a obtenção de árvores superiores de importância econômica, são necessários muitos cálculos estatísticos para discriminar materiais mais promissores, sob vários contextos, e verificar se os indivíduos selecionados apresentam os atributos de superioridade, genética (CRUZ, 1990).

2.3 Diversidade e parâmetros genéticos

Para as espécies perenes, os métodos de seleção podem ser classificados quanto às unidades de seleção, unidades de recombinação e quanto aos procedimentos de predição de valores genéticos, devendo ser incluído também o critério de seleção, definido em função do objetivo do melhoramento.

Resende e Bertolucci (1995) afirmaram que a seleção pelo índice multi-efeitos em espécies de *Eucalyptus* foi sempre superior à seleção combinada em maior ganho genético, maior acuidade, maior tamanho efetivo populacional e maior intensidade de seleção realizada, demonstrando também a capacidade de avaliar o efeito de parcelas.

O estabelecimento de estratégias eficientes de melhoramento depende essencialmente do conhecimento prévio dos mecanismos genéticos responsáveis pela herança do caráter a melhorar, tais como o número de genes que o governam, as ações e

efeitos gênicos, herdabilidade, repetibilidade e associações genéticas com outros caracteres (RESENDE, 2002).

Os parâmetros genéticos permitem inferir sobre a estrutura genética, os quais variam para diferentes caracteres, idades e populações (DUDA, 2003). As estimativas dos parâmetros genéticos possibilitam prever os ganhos oriundos das estratégias aplicadas ao melhoramento genético, fornecendo informações importantes à seleção e para a definição do programa de melhoramento da população. O tipo de ação dos genes, em caráter quantitativo, também pode ser deduzido destes parâmetros, assim como as estimativas do progresso genético esperado na seleção (COCKERHAM, 1963; VENCOVSKY, 1969). Dessa forma, as estimativas de parâmetros genéticos são necessárias para uma seleção eficiente de árvores, possibilitando o conhecimento da estrutura genética da população (MORAES, 1987).

Os parâmetros genéticos populacionais de maior importância para o melhoramento florestal são: a variância genotípica e seus componentes aditivo e não-aditivo; os componentes de herdabilidade para estimar os ganhos genéticos, no sentido amplo e restrito, indicando o grau de dificuldade ou facilidade para melhorar determinados caracteres; a interação genótipos x ambientes e as correlações genotípicas e fenotípicas entre as características.

A existência de variância genética aditiva, em magnitude satisfatória, possibilita um melhoramento efetivo, pela seleção em uma população (VENCOVSKY, 1978 FALCONER, 1987).

2.4 Variância genotípica, fenotípica e heterogeneidade das variâncias

A variância fenotípica pode ser composta de variações produzidas pelo ambiente, pelas variações dos efeitos genotípicos e devido à interação genótipos x ambientes. A variância genotípica pode ser dividida em variância genética aditiva, variância de dominância e variância epistática (VENCOVSKY, 1969). A variância genética aditiva é a fração mais importante a ser determinada, pois ela é a principal causa da semelhança entre parentes e determinante funcional das propriedades genéticas da população, conseqüentemente, da sua resposta à seleção (FALCONER, 1987).

A variação genética e principalmente sua parte aditiva mostra, para uma determinada característica, o potencial da população para fins de seleção e melhoramento. O efeito aditivo dos genes controla a maioria dos caracteres das árvores. O seu conhecimento possibilita a seleção por caracteres de importância econômica, que tem garantido grandes avanços no aumento da produtividade. Para uma estimativa ampla e sem restrições dos componentes de variância, é essencial que tanto os indivíduos que constituem o material experimental como os da população-base não sejam endocruzados (VENCOVSKY, 1969). Se a endogamia ocorrer, o teste de progênie de polinização livre proporcionará uma superestimativa da variância genética. A variância genética também pode ser superestimada, quando o experimento é instalado em um só local e ano (SILVA et al., 2011).

Nesse sentido para minimizar os erros das estimativas de variância genética, é preciso estimar a variância devida às interações dos efeitos aditivos com os ambientes, realizando experimentos em vários ambientes e avaliações em diferentes períodos.

Uma consequência direta da heterogeneidade das variâncias, em diferentes níveis de produção, é o risco de se selecionar maior proporção de indivíduos de maior variabilidade fenotípica e não de maior valor genético, podendo, com isso, ocorrer até uma redução no progresso genético esperado (RAMOS et al., 1996). Esta heterogeneidade nos componentes de variância reflete diretamente nas estimativas de coeficientes de herdabilidade, conforme ressaltam (MARION et al., 2001).

A precisão das avaliações genéticas depende da precisão das estimativas dos componentes de variância e da adequabilidade das pressuposições dos modelos à natureza das informações disponíveis. A presença de heterogeneidade de variância genotípica pode comprometer a exatidão daquelas estimativas, reduzindo o potencial de progresso genético dos programas de seleção (COSTA, 1998). Uma grande heterogeneidade de variância genotípica entre ambientes pode constituir-se num sério problema para a avaliação da estabilidade de rendimento das culturas, nos programas de melhoramento genético, pelo fato dela superestimar os componentes de variância da interação genótipos x ambientes, pelos efeitos não relacionados à mudança na resposta relativa dos genótipos entre ambientes (ANNICCHIARICO, 2002).

2.5 Diversidade genética

O estabelecimento de estratégias eficientes de melhoramento depende essencialmente do conhecimento prévio dos mecanismos genéticos responsáveis pela herança do caráter a melhorar, tais como o número de genes que o governam, as ações e efeitos gênicos, herdabilidade, repetibilidade e associações genéticas com outros caracteres (RESENDE, 2002).

As estimativas dos parâmetros genéticos possibilitam prever os ganhos oriundos das estratégias alternativas aplicadas ao melhoramento genético, fornecendo informações importantes à seleção. Dessa forma, as estimativas de parâmetros genéticos são necessárias para uma seleção eficiente de árvores, possibilitando o conhecimento da estrutura genética da população (MORAES, 1987).

Os parâmetros genéticos populacionais de maior importância para o melhoramento florestal são: a variância genotípica e seus componentes aditivo e não-aditivo; os componentes de herdabilidade para estimar os ganhos genéticos, no sentido amplo e restrito, indicando o grau de dificuldade ou facilidade para melhorar determinados caracteres; a interação genótipos por ambientes e as correlações genotípicas e fenotípicas entre as características.

Segundo Falconer (1987), a existência de variância genética aditiva, em magnitude satisfatória, possibilita um melhoramento efetivo, por meio de seleção em uma população.

Estudos sobre a diversidade genética vêm sendo utilizados com muita frequência no auxílio a programas de melhoramento genético do eucalipto proporcionando ao melhorista a seleção dos melhores indivíduos, em busca do aumento da frequência de alelos favoráveis (BISON et al., 2006; PAULA et al., 2002; PIGATO; LOPES, 2001).

2.6 Marcadores moleculares

Os primeiros estudos referentes ao uso de marcadores moleculares em estudos com a cultura do eucalipto foram voltados para a avaliação genética em populações base de melhoramento, caracterização em clones e identificação em viveiros clonais e na construção de mapas moleculares (MARINO, 2008).

A forma clássica do melhoramento genético requer tempo até que seus objetivos sejam alcançados, pois necessita de vários ciclos de recombinação, avaliação e seleção (SOUZA, 2001). Apesar dos grandes avanços conquistados no processamento de dados através da genética quantitativa nas últimas décadas, pouco é conhecido sobre a biologia e arquitetura genética das características quantitativas, segregação alélica e frequência alélica, efeitos causados pela substituição de alelos, interações epistáticas, regulação gênica (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Segundo Grattapaglia (2004) apesar dos progressos significativos, o conhecimento do genoma de árvores abrange um grupo relativamente pequeno de genes o que mostra que desafios ainda precisam de superados, especialmente para o eucalipto.

Vários tipos de marcadores moleculares de DNA estão disponíveis, diferenciando quanto a habilidade de detectar polimorfismo, custo de aplicação, facilidade de uso e confiabilidade dos resultados. Esses marcadores vêm sendo utilizados em estudos de diversidade genética, *fingerprinting*, análise de pureza, genética de sementes, melhoramento assistido, mapeamento genético, isolamento de genes etc (BORÉM, 2009).

Segundo Souza (2001) os marcadores moleculares contribuíram para o desenvolvimento de técnicas moleculares permitindo avaliação do genoma. Devido a estas características foi possível avaliar cada genótipo de interesse, com informações de variabilidade genética, identificação de genes específicos e, principalmente, possibilitou a associação de marcadores moleculares a características fenotípicas (KIRST et al., 2005).

Marcadores moleculares estão sendo amplamente utilizados para diversos estudos. Dentre os marcadores mais conhecidos destacam-se: RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição de DNA), RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado) e os marcadores microssatélites ou SSR (repetições de sequências simples).

O RFLP foi o primeiro marcador molecular capaz de apresentar as diferenças entre indivíduos diretamente no DNA, isto é, homocigotos e heterocigotos. (GRODZICKER et al., 1974). O polimorfismo detectado através deste marcador advém da eliminação ou criação de sítios de restrição, com modificação ou substituição de bases (WYMAN; WHITE, 1980). Seu potencial pode ser visto em estudos de diversidade genética, predição de híbridos (IEMMA, 2003), diferenciação geográfica (BATATA-FILHO et al., 2009), variabilidade genética (MEHTA et al., 2010). Segundo Bernardo (1994) o uso destes marcadores é viável em estudos para predizer desempenho entre cruzamentos de híbridos de milho.

Outra técnica que também foi empregada com muita eficiência em estudos com espécies florestais e árvores em geral é o RAPD (GRATTAPAGLIA et al., 1996). Por não necessitar do conhecimento prévio dos segmentos a serem amplificados foi considerada rápida, precisa, sensível e relativamente barata para análise genômica de árvores, permitindo a avaliação de numerosos locos no genoma (BORÉM; CAIXETA, 2009).

O RAPD tem seu emprego visto nos mais diversos estudos como: análise de estrutura e diversidade genética em populações naturais, construção de mapa genético de alta cobertura genômica, obtenção de *fingerprint* molecular, localização de genes de interesse econômico (GRATTAPAGLIA et al., 1994). A eficiência destes marcadores também foi comprovada quando empregados para avaliar variações genéticas em populações de *Eucalyptus ssp.*, permitindo discriminar os genótipos avaliados (CAIXETA, et al., 2003).

Entretanto uma classe de marcadores bastante empregada e que vêm se tornando o mais popular dos marcadores genéticos no melhoramento vegetal são os SSR ou marcadores microssatélites (*Simple sequence repeats*) (SCHLOTTERER, 2004). Dentre as suas vantagens está a possibilidade de proporcionar ao pesquisador maior conteúdo informativo, distinguindo dos demais por serem abundantes, estarem distribuídos por todo o genoma, apresentarem polimorfismo do tipo co-dominante, serem de natureza multialélica, necessitarem de pequenas quantidades de DNA e poderem ser transferíveis entre espécies de um mesmo gênero (GRATTAPAGLIA, 2001).

A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR a torna muito importante nos estudos de genética molecular, que envolve grande número de genótipos e organismos. Isso proporcionou grande desenvolvimento de métodos tradicionais de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Segundo Steane et al. (2001) dados de marcadores moleculares são necessárias para propor modelos genéticos quantitativos e predição de valores.

Estudando populações núcleo de *Eucalyptus* Souza et al. (2010) confirmou resultados consistentes sendo de grande importância para auxiliar na condução programa de melhoramento.

Vários trabalhos sobre análise de diversidade genética assim como de desempenho e seleção de híbridos vêm sendo realizados com o auxílio desses

marcadores (ROCHA et al., 2002; KIRST et al., 2004; BRONDANI et al., 2006; FURLAN et al., 2007; CUPERTINO et al., 2010; AGUIAR et al., 2007).

3. REFERÊNCIAS

ABRAF. A849 a. Anuário estatístico da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas, 2010, ano base 2009. ABRAF. Brasília, 2010.

Alves, P. F. et al. Variação genética para caracteres silviculturais e marcador molecular em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* DEHNH. (Dissertação de Mestrado em Sistemas de Produção) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Universidade Estadual Paulista. Ilha Solteira, 2009.

Annicchiarico, P. Genotype x environment interactions: challenges and opportunities for plants breeding and cultivar recommendations. Rome: FAO. 115p. 2002.

Ayres, M. et al. BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém. Sociedade Civil Mamirauá, MCT.

Batata-filho, H. et al. Geographic distribution and spatial differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae). Zoologia. Curitiba. v.26. p. 213-219. 2009.

Bernardo, R. Prediction of maize single-cross performance using RFLPs and information from related hybrids. Crop science. v.34. p.20-25. 1994.

Bertolucci, F.; Rezende, G.; Penchel, R. Produção e utilização de híbridos de eucalipto. Silvicultura. v.51. p. 12-16, 1995.

Bison, O. et al. Combining ability of elite clones of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* with *Eucalyptus globulus*. Genetics and Molecular Biology. v.30. p.417-422. 2007.

Brondani, R.P.V., Grattapaglia, D. Cost-Effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. *BioTechniques*. v.31. 793-800. 2001.

Bueno Filho, J. S. S. Seleção combinada versus seleção seqüencial no melhoramento de populações florestais. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz". Piracicaba. 1992.

Coelho, A.S.G.: Multiplexer v. 4.0: A software for the design of multiplex SSR reactions. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2005.

Cruz, C. D. Programa Genes - Aplicativo computacional em genética e estatística. versão 2009.

Cupertino, F. B. et al. Comparative study between genomic and EST microsatellite markers to estimate genetic diversity of *Eucalyptus* hybrids. *Biologia Plantarum*, 2010.

Duda, L. L. Seleção genética de árvores de *Pinus taeda* L. na região de Arapoti, Paraná. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Falconer, D. S. Introdução a genética quantitativa. Viçosa: Imprensa Universitária, 279 p.1987.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília. EMBRAPA, 220p. 1996.

Furlan, R. A. et al. Estrutura genética de populações de melhoramento de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* por meio de marcadores microssatélites. *Bragantia*, Campinas, v.66, n.4, p.553-563, 2007.

Grattapaglia, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-ILGLIS, M.C. Recursos genéticos e melhoramento plantas. Rondonópolis. Fundação MT. p. 967-1010. 2001.

Grattapaglia, D.; Bradshaw, H.J. Nuclear DNA content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. Canadian Journal of Forest Research. Ottawa. v.24. p.1074-1078. 1994.

Griffing, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. Australian Journal of Biological Science, v.9. p.463-493. 1956.

lemma, M. Uso do melhor preditor linear não viesado (Blup) em análises dialélicas e predição de híbridos. Piracicaba. Dissertação Mestrado. 2003.

Kageyama, P. Y.; Vencovsky, R. Variação genética em progênes de uma população de *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden. IPEF, Piracicaba, v. 24. p. 9-26. 1983.

Kageyama, P.Y. Variação genética em progênes de uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. (Tese de Mestrado - ESALQ). Piracicaba. 1980.

Kirst, M. et al. Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. Journal of Heredity. 96,2, p.161–166. 2005.

Marino, C.L. Incorporação de marcadores moleculares no melhoramento de eucalipto. Universidade Estadual Paulista. Botucatu. Tese. 50p. 2008.

Martins, I. S. et al. Eficiência da seleção univariada direta e indireta e de índices de seleção em *Eucalyptus grandis*. Revista Árvore. v. 27. n. 3. p.327-333. 2003.

Mehta, Y. R.; Mehta, A. Variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum gossypii* do algodoeiro. Summa Phytopathologica. v. 36. p. 40-44. 2010.

Molecular Research. Ribeirão Preto. v.3. p. 369-379. 2004.

Moraes, M. L. T. Variação genética da densidade básica da madeira em progênes de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden e suas relações com as características de crescimento. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba. 1987.

Nicolle, D. Temperate area *eucalypts*. Paper presented at the ASGAP 19 Biennial Seminar which was held at Annesley College. Adelaide. 1997.

Oda, S.; Menck, A.L.M. Problemas no melhoramento genético clássico do eucalipto em função da alta intensidade de seleção. IPEF. n.41/42. p.8-17.1989.

Pereira, J. C. D. et al. Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil. Colombo: Embrapa Florestas. 113p. 2000.

Pigato, S. M. C.; Lopes, C. R. Avaliação da variabilidade genética em quatro gerações de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake por meio do marcador molecular RAPD. Scientia Forestalis. n. 60. p. 119-133. 2001.

Pires, I. E.; Cruz, C. D.; Borges, R. C. G.; Regazzi, A. J. Índice de seleção combinada aplicado ao melhoramento genético de *Eucalyptus* spp. Revista Árvore, v. 20, n. 2, p. 191-97. 1996.

Ramalho, M. A. P. Emprego da seleção recorrente no melhoramento de essências florestais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA FLORESTAL, Belo Horizonte, 1993. Anais. Belo Horizonte: SIF. p. 21-37. 1993.

Resende, M. D. V. de. Correções nas expressões do progresso genético em função da amostragem finita dentro de famílias e populações e implicações no melhoramento florestal. Boletim de Pesquisa Florestal. Colombo. n. 22. p. 61- 77, 1991.

Resende, M. D. V. et al. Melhor predição linear não viciada (BLUP) de valores genéticos no melhoramento de *Pinus*. Boletim de Pesquisa Florestal. Colombo, v. 32/33. p. 3-22, 1996.

Resende, M. D. V. SELEGEN-REML/BLUP - Seleção genética computadorizada: manual do usuário. Colombo: Embrapa – CNPF. 67p. 2002.

Resende, M. D. V.; Bertolucci, F. L. G. Maximization of genetic gain with restriction on effective population size and inbreeding in *Eucalyptus grandis*. In: IUFRO CONFERENCE “EUCALYPT PLANTATIONS: Improving Fibre and Quality”, Hobart. Proceedings. Hobart: IUFRO-CRCTHF. p.167-170. 1995.

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

Resende, M. D. V.; Higa, A. R. Estratégias de melhoramento para eucaliptos visando à seleção de híbridos. Boletim de Pesquisa Florestal, n. 21, p. 49-60,1990.

Rocha, R. B. et al. “*Fingerprint*” e análise da diversidade genética em genótipos de *Eucalyptus* utilizando marcadores RAPD e microssatélites. Scientia Forestalis. n. 62, p.24-31. 2002.

Schlotterer, C. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion. Nature Reviews Genetics. London. v.5. p. 63-69. 2004

Silva, J. M. et al. Implicações da interação genótipos – ambientes sobre ganhos com a seleção em meloeiro. Ciência Rural. v. 41. p. 51-56. Santa Maria. 2011.

Souza, H. G. et al. Diversidade genética em populações-núcleo de *Eucalyptus grandis*. Acta Scientiarum Agronomy. v. 32. n. 4. p. 621-625. 2010.

Steane, D. A. et al. Development and Characterisation of Microsatellite Loci in *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). Silvae Genetica. v.50. n. 2. 2001.

Stefenon, V.M.; NODARI, R.O. Marcadores moleculares no melhoramento genético da araucária. Biotecnologia. Ciência e Desenvolvimento. n.31. p. 95-99. 2003.

Xavier, A. Aplicação da análise multivariada da divergência genética no melhoramento de *Eucalyptus spp.* Dissertação (Doutorado em Ciência Florestal) Universidade Federal de Viçosa. 1996.

GENETIC DIVERSITY OF A SET OF PARENTS OF *Eucalyptus spp.* BASED ON MICROSATELLITE MARKERS TO DIRECT MATINGS

Santos, L.F.; Sabóia, E.N.; Abad, J.I.M.; Missiaglia, A; Pereira, N.E.; Ahnert, D.; Gaiotto, F.A. and Corrêa, R.X.

ABSTRACT

The choice of the parents for the recombination is carried out as the specific designs diallels. However, the use of this strategy is used a considerable time, mainly in improvement the *eucalyptus*. Methodologies for discrimination "a priori" parent is very important in order to save time of field tests and thereby increase the gain per unit time. In this study we evaluated the genetic diversity of *Eucalyptus spp* genitors to indicate the parents for the recombination process for the next cycle of improvement. Wide genetic diversity was observed among the 20 genotypes selected as parents. The number of alleles per locus ranged from 5 to 15, with averaging 8.33. The polymorphism (statistical PIC) was high and ranged from 0.59 to 0.89. Likewise the gene diversity (H_E) was considerer high ranged from 0.66 to 0.89, averaging 0.80. The greatest genetic distance was observed between genotypes Matrix-002 (GIV) and Matrix-013 (GVI), and the lowest between genotypes Matrix-020 (GI) and Matrix-004. Genotypes (Matrix-003, Matrix-004, Matrix-001, Matrix-012, Matrix-005, Matrix-006, Matrix-009, Matrix-007 and Matrix-011) were clustered together probably due to the fact that they belong to the same heterotic group. The classification by Tocher method allowed to define two groups diversity high for establishing matings to the next selection cycle.

RESUMO

DIVERSIDADE GENÉTICA DE UM CONJUNTO DE GENITORES DE *Eucalyptus spp.* COM BASE EM MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA DIRECIONAMENTO DE CRUZAMENTOS

A escolha de genitores para a recombinação é feita com delineamentos específicos como os dialelos. Entretanto o uso dessa estratégia utiliza-se de um tempo considerável, principalmente no melhoramento do eucalipto. Metodologias para discriminação “a priori” de genitores é muito importante, no sentido de economizar tempo dos testes de campo e conseqüentemente, aumentando o ganho por unidade de tempo. Neste estudo, foi avaliado a diversidade genética de genitores de *Eucalyptus spp* para o processo de recombinação para o próximo ciclo de melhoramento. Elevada diversidade genética foi observada entre os 20 genótipos analisados. O número de alelos por loco variou de 5 a 15, com uma média de 8.33. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi elevado, variando de 0,59-0,89. Da mesma forma o índice de diversidade gênica (H_E) foi considerado alto, variando de 0,66-0,89, com uma média de 0,80. A maior distância genética foi observada entre os genótipos Matriz-002 (GIV) e Matriz-013, e a menor entre os genótipos Matriz-020 (GI) e Matriz-004 (GII). Os genótipos (Matriz-003, Matriz-004, Matriz-001, Matriz-012, Matriz-005, Matriz-006, Matriz-009, Matriz-007, Matriz-011) foram agrupados provavelmente devido ao fato de pertencerem à um mesmo grupo heterótico. A classificação por Tocher permitiu definir dois grupos de elevada diversidade para o estabelecimento de cruzamentos para o próximo ciclo de seleção.

INTRODUCTION

Eucalyptus species are commonly employed in the Brazilian reforestation programs (ABRAF, 2011) as well as in the majority of the world's planted hardwood forests (ELDRIDGE et al., 1994).

To supply the growing demand for wood, Brazil has planted forests, reaching a cultivated area of more than 6.6 millions/ha between 2005 and 2010. The planted forests are concentrated mainly in the states of Minas Gerais, Parana, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Sao Paulo and Bahia (ABRAF, 2011).

Currently, the demand for wood is principally served by the breeding programs of large companies of the forestry sector. Clonal cultivars are recorded each year, result of the development and selection of superior genotypes. For the development of genetically superior cultivars are performed several cycles of recombination and selection. Nevertheless, the maintenance of a broad genetic base of the breeding populations is crucial to guarantee the continuous genetic gains along the program.

Genetic divergence studies have been of great importance in breeding programs, because they provide an indicative of the divergence among progenitors allowing the breeder to choose divergent parents for the development of segregating populations (CRUZ, 1990; MURO_ABAD, 2005). The establishment of efficient breeding strategies depends on methods and analytical tools used on the different stages of the breeding program (ELDRIDGE et al., 1994). Therefore, an efficient and fast access to the variability among parents used frequently in *Eucalyptus* breeding programs can be one through molecular markers (ROCHA et al., 2002, CAIXETA et al., 2003; LEITE et al., 2008). Microsatellites markers are the most used mainly by their co-dominant and multiallelic characteristic. Those makes reference as an excellent marker for eucalyptus and their hybrids (ROCHA et al., 2002, AGUIAR et al. 2007; LEITE et al. 2008; GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008).

In this study we analyze hybrid *Eucalyptus* parents of a breeding program using microsatellites markers. The aim was to identify the most divergent combinations for crosses recommendation "*a priori*".

MATERIALS AND METHODS

Total of 20 genotypes of *Eucalyptus grandis*, *E.urophylla* and hybrid *E. grandis* x *E. urophylla* were selected for use as parents (Table 1).

These matrixes are established in the orchard of hybridization in the field or in a greenhouse.

Genomic DNA was extracted from leaves, according to (FERREIRA and GRATTAPAGLIA, 1998). DNA was amplified with primers previously developed for *Eucalyptus spp*, (Embra 604, Embra 645 Embra 646, Embra 648, Embra 655, Embra 665, Embra 679, Embra 844 and Embra 915) as described by (CUPERTINO et al., 2010).

Table 1: Description of 20 genotypes of *Eucalyptus ssp.*, selected for matings.

Matrix code	Specie	Local of Selection / Provenance
Matrix-001	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Luiz Antônio, SP
Matrix-002	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Luiz Antônio, SP
Matrix-003	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Luiz Antônio, SP
Matrix-004	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Luiz Antônio, SP
Matrix-005	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Mogi Guaçu , SP
Matrix-006	<i>E. grandis</i>	Taubaté, SP /Coff's Harbour
Matrix-007	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Fazenda Boa Esperança do Sul, SP
Matrix-008	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Fazenda Sta. Branca, SP
Matrix-009	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Fazenda Boa Esperança do Sul, SP
Matrix-010	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Luiz Antônio, SP
Matrix-011	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Jacareí, SP
Matrix-012	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Luiz Antônio, SP
Matrix-013	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Desconhecido
Matrix-014	<i>E. grandis</i>	Taubaté, SP /Coff's Harbour
Matrix-015	<i>E. urophylla</i>	Taubaté, SP /Flores
Matrix-016	<i>E. grandis</i>	Taubaté, SP /Coff's Harbour
Matrix-017	<i>E. grandis</i>	Taubaté, SP /Coff's Harbour
Matrix-018	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Luiz Antônio, SP
Matrix-019	<i>E. grandis</i>	Taubaté, SP /Coff's Harbour
Matrix-020	<i>E. grandis</i>	Taubaté, SP /Coff's Harbour

The DNA amplifications were performed using the GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems) thermal cycler using the following amplification cycle: 96 ° C for 2 min, 30 cycles at 94 ° C for 1 min, specific primer annealing temperature for 1 min, 72 ° C for 1 min and a final extension step at 72 ° C for 7 min. Loci were amplified in single and duplex system, according to the Multiplexer Program (COELHO, 2005). Scoring of SSR bands was performed considering 1 for the presence and 0 for the absence of a DNA

fragment. The presence or absence of a determined band (similar size) in all genotypes compared indicated similarity, whereas presence in one and absence in the other indicated dissimilarity. The distances between individuals were estimated by the arithmetic complement of the weighted index. Statistical analyzes were performed in the software Genes (Cruz, 2009). The dissimilarity matrix obtained was used to obtain the clustering structure by the methods of Tocher, and UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages).

With the software POWERMARKER version 3.25 (LIU and MUSE, 2005) we calculated the PIC (Polymorphism Information Content) using the estimation of the allele frequency and the expected and observed heterozygosities.

For each locus we calculated the number of alleles (A), allele frequencies, expected heterozygosity (H_E), observed heterozygosity (H_O) and the inbreeding coefficient ($F_{IS} = (H_E - H_O)/H_E$).

RESULTS AND DISCUSSION

The data showed the existence of a wide genetic diversity among the 20 genotypes under evaluation. All nine SSR locus analyzed were polymorphic, with a total of 77 alleles. The number of alleles per locus ranged from five primer (EMBRA 646) to 10 primer (Embrea 645) (Figure1). Evaluating a population of *Eucalyptus camaldulensis*, Silva et al. (2009) obtained values between 4 and 13 alleles by locus with an average of 8.

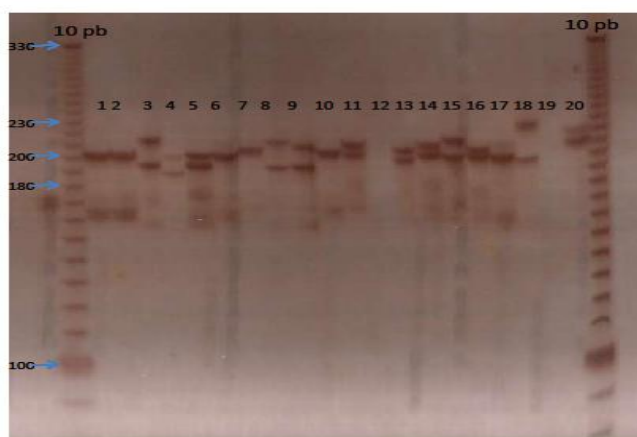


Figure 1 - Results of amplification of 20 genotypes using primer 645; marker 10 bp DNA Ladder (Invitrogen).

The lowest value of polymorphism was obtained for the primer EMBRA 915 (PIC = 0.59) and the highest for the primer EMBRA 645 (PIC = 0.89). The expected heterozygosity ranged from 0.66 to 0.89, averaging 0.80. These values for PIC are considered high when observed in other studies realized with SSR for *Eucalyptus*. (SILVA et al., 2009; SANSALONI, 2008; CUPERTINO et al., 2009). These values for H_E and H_o are above the values found by Silva et al (2009) characterizing 14 microsatellite loci for *Eucalyptus camaldulensis* once again suggesting the efficiency these primers selected for the study.

The fixation index ranging from 0.05 to 0.34 with average of 0.19. Higher values were found in the loci EMBRA 679 and EMBRA 915 (Table 2). A similar study conducted by Alves et al. (2009) found values ranging between 0.017 and -0.49 with average of -0.118 suggesting that selection was occurring in favor of heterozygotes.

As already reported in other studies microsatellite markers were efficiency reliable for access the genetic diversity information (FURLAN et al. 2007; Abad, et al., 2005; Leite, et al., 2002, NAGHAVI et al. 2009; PAYN et al., 2008). In addition to the high polymorphism found, that parent population is characterized by a high heterozygosity. High values of heterozygosity seem to be common in populations of parents to eucalyptus. This population consists of parents of hybrids which explain the high diversity, as well as the high number of allelic forms. SOUZA et al. (2010) and Abad, et al. (2005) found a great number of heterozygous individuals in their studding with breeding population of *Eucalyptus*. In both cases the heterozygosity was a good measure to quantify variation and genetic diversity.

By using the genetic distances and the Tocher grouping analysis the 20 genotypes were clustered into six distinct groups (Table 3). The greatest genetic distance was observed between genotypes Matrix-002 (GIV) and Matrix-013 (GVI), and the smallest among genotypes Matrix-020 (GI) and Matrix-004 (GII) among groups.

The group II clustered together the largest number of genotypes (Matrix-003, Matrix-004, Matrix-001, Matrix-012, Matrix-005, Matrix-006, Matrix-009, Matrix-007, Matrix-011), which is probably due to the fact that these genotypes belong to the same heterotic group. These results allowed us to select the parents to be crossed for the next cycle of

selection and showed that some genotypes share the same alleles of the population under study.

By comparing the UPGMA and Tocher's method, the same results were observed (Figura 2). Six main groups were formed with individuals: Matrix-003, Matrix-004, Matrix-001, Matrix-005, Matrix-006, Matrix-009, Matrix-007, Matrix-012, Matrix-011, Matrix-008, Matrix-010. The genotypes Matrix-002 and Matrix-001 presented the greatest genetic distance.

Table 2: Genetic diversity parameters for nine microsatellite loci: A - number of alleles observed; N – size of the sample analyzed; H_o and H_e - observed and expected heterozygosity, respectively; F_{IS} (Coefficient of fixation) = $1 - (H_o/H_e)$; PIC –content of polymorphic information.

<i>Locus</i>	A	N	H_o	H_e	F_{IS}	PIC
Embra 604	6	20	0.65	0.86	0.24	0.84
Embra 679	7	20	0.55	0.83	0.33	0.81
Embra 648	15	20	0.85	0.89	0.05	0.90
Embra 655	8	20	0.75	0.88	0.14	0.86
Embra 665	11	20	0.90	0.85	0.11	0.83
Embra 646	5	20	0.70	0.83	0.15	0.81
Embra 645	10	20	0.75	0.89	0.16	0.89
Embra 844	7	20	0.90	0.75	0.20	0.70
Embra 915	6	20	0.90	0.66	0.34	0.59

Table 3 - Grouping of 20 genotypes of *Eucalyptus* by Tocher grouping method, using genetic distance.

GROUPS	GENOTYPES
I	Matrix-019 Matrix-020 Matrix-018 Matrix-017
II	Matrix-003 Matrix-004 Matrix-001 Matrix-005 Matrix-006 Matrix-009 Matrix-007 Matrix-012 Matrix-011 Matrix-008 Matrix-010
III	Matrix-014 Matrix-015

- IV Matrix-002
 - V Matrix-016
 - VI Matrix-013
-

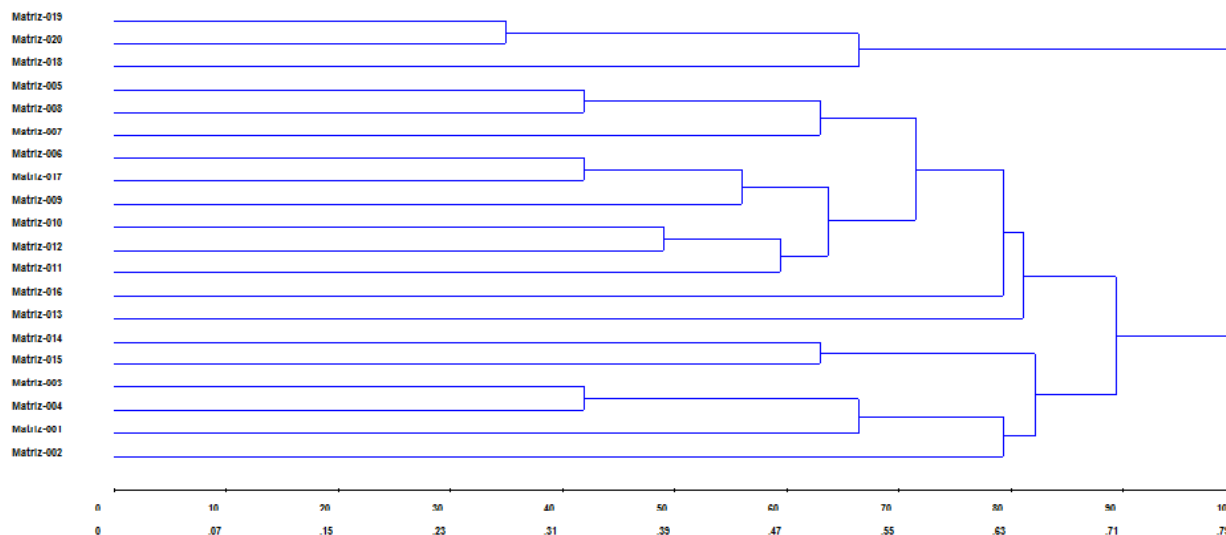


Figure 2: Dendrogram of genetic dissimilarities among 20 genotypes obtained by the UPGMA, based on microsatellite markers.

These results on the genotypes grouping indicate that, for the different loci observed, we found the individuals sharing the same alleles in the population. Nevertheless, the number of total allelic forms indicates a great variation between genotypes. The number of allelic forms is a function of the population analyzed. The high value of heterozygosis corroborates the diversity of allelic form found in that parent population.

The Tocher method allows discrimination of the most divergent groups of individuals. Thus, taking into account the divergence, two major groups can be established: **GROUP A** (Group I and Group II with genotypes Matrix-003, Matrix-004, Matrix-001, Matrix-005, Matrix-009 and Matrix-006) and **GROUP B** (Group II genotypes with Matrix-007, Matrix-012, Matrix-011, Matrix-008 and Matrix-010, and Groups III, IV and V). A cross design type “circulant partial diallel” is recommended for this type of analysis (MURO_ABAD et al., 2005) or even partial diallels.

Conclusions

The microsatellite markers used in this study are highly informative and feasible to assist in evaluation the genetic diversity of this population of genitors of eucalyptus.

That parental population has a wide genetic dissimilarity and the analysis of the hybrid parents of *Eucalyptus* with SSR was satisfactory allowing the discrimination the most divergent group of genitors and genotypes.

REFERENCES

- ABRAF - Associação Brasileira de produtores de Florestas Plantadas. Anuário Estatístico da ABRAF 2011: Ano base 2010. Brasília. ISSN: 1980-8550.130p.2011.
- Alves, P. F.; Silva, J.M.; Paula, D.R.; Mendes, H. S. J.; Silva, C. L. S. P.; Freitas, M. L. M.; Sebbenn, A. M.; Moraes, M. L. T. Diversidade genética e sistema de reprodução em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. procedente de Katherine River, Revista Instituto Florestal. São Paulo. v. 21. p. 169-179. 2009.
- Brondani, R.P.V.; Williams, E.; Brondani, C.; Grattapaglia, D. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. BMC Plant Biology. v.6. p.1-16. 2006.
- 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. Rev. Árvore. v. 27. n.3. p. 357-363. 2003
- Coelho, A. Multiplexer v. 4.0: A software for the design of multiplex SSR reactions. Universidade Federal de Goiás, 2005.
- Cruz, C. D. Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba. 1990.
- Cruz, C. D. Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV. 442p. 1997.
- Cupertino F, Leal J, Corrêa R, Gaiotto F: Comparative study between genomic and EST microsatellite markers to estimate genetic diversity of *Eucalyptus* hybrids. Biologia Plantarum. v. 55. p. 379-382. 2010.
- Ferreira, M.; Grattapaglia, D. Introduction to the usage of molecular markers in genetic analysis. Embrapa-Cenargen. 1998.
- Furlan, R. A; Mori, E. S.; Tambarussi, E. V.; Moraes, C. B.; Jesus, F. A.; Zimback, L. Estrutura genética de populações de melhoramento de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*

por meio de marcadores microssatélites. *Bragantia*. Campinas. v.66. n.4. p. 553-563. 2007.

Grattapaglia, D; Kirst, M. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. *New Phytologist*. n. 179. v. 4. p. 911–929. 2008

Leite, S. M. M.; Bonine, C. A. V.; Lopes, C. R.; Mori, E. S.; Valle, C. F.; Marino, C. L. Genetic variability in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. *Silvae Genetica*. v. 51, n. 5-6, p. 253-256. 2002.

Leite, S. M. M.; Mori, E. S.; Valle, C. F.; Bonine, C. A. V.; Marino, C. L. RAPD analysis of genetic variability in a multiprovenance base population of *Eucalyptus grandis* hill ex maiden. *Revista Árvore*. v.32. p.961-967. 2008.

Liu, K.; Muse, S.V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*. v 21. p. 2128–2129. 2005.

Muro_Abad, J. I. M.; Rocha, R. B.; Cruz, C. D.; Araújo, E. F. Obtainment of *Eucalyptus* spp. hybrids aided by molecular markers – SSR analysis. *Scientia Forestalis*. n. 67. p.53-63. 2005.

Naghavi, M. R.; Malaki, M.; Alizadeh, H.; Pirseiedi, M.; Mardi, M. J.. An Assessment of genetic diversity in wild diploid wheat *Triticum boeoticum* from west of Iran using RAPD, AFLP and SSR markers. *Agr. Sci. Tech*. v. 11. p. 585-598. 2009.

Payn, K. G.; Dvorak, W. S.; Janse, B. J. H. ; Myburg, A. A. Microsatellite diversity and genetic structure of the commercially important tropical tree species *Eucalyptus urophylla*, endemic to seven islands in eastern Indonesia. *Tree Genetics e Genomes*. v.4. p. 519–530.2008.

Rocha, M. G. B.; Muro_Abad, J. I. M.; Pires, I. E.; Araújo, E. F. *Fingerprint* and genetic diversity analyses of *Eucalyptus* spp. genotypes using RAPD and SSR markers. *Scientia Forestalis*. n.62. p. 24-31. 2002.

Sansaloni, C. P. Desenvolvimento, caracterização e mapeamento de microssatélites tetra e pentanucleotídeos em *Eucalyptus* spp. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. 2008.

Silva, J. M.; Sousa, A. C. B.; Souza, A. P.; Mori, E. S.; Freitas, M. L.; Sebbenn, A. M.; Moraes, M. L. T. Development and characterization of 14 microsatellite loci from an enriched genomic library of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. *Conservation Genet. Resour.* v.1. p.465–469. 2009.

Souza, H. G.; Doria, K. M. A. B. V. S; Rosa, M. A. B.; Dias, D.; Furtado, E. L.; Marino, C. L. Diversidade genética em populações núcleo de *Eucalyptus grandis*. *Acta Scientiarum Agronomy.* Maringá. v. 32. p. 621-625. 2010.

CAPÍTULO 2

COMPARAÇÃO DE MARCADORES EST-SSR E GENÔMICOS NO ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENITORES de *Eucalyptus*.

RESUMO

O estabelecimento de estratégias eficientes de melhoramento depende de métodos e ferramentas de análise nas diferentes etapas de um programa de melhoramento genético. Desta forma, estudos sobre a diversidade genética com o emprego de marcadores moleculares vêm sendo utilizados com muita frequência no auxílio a programas de melhoramento genético do eucalipto. Este estudo foi realizado com o objetivo de comparar o uso de marcadores EST-SSR e G-SSR na avaliação de genitores de *Eucalyptus ssp*, e analisar a variabilidade genética existente. Os primers utilizados neste estudo mostraram 148 alelos encontrados na análise dos 18 locos analisados. O número de alelos por loco variou de 4 a 15, com uma média de 8,2. Entre os EST-SSR o primer Embra 954 apresentou o maior número de alelos (12), enquanto Embra 950 e 941 o menor número de alelos (4). Entre os microssatélites genômicos Embra 665 destacou-se apresentando (15) alelos, enquanto Embra 646 apresentou (5) alelos. Os valores de PIC para os 18 primers variaram de 0,5926 a 0,8993 com média de 0.8142. Na maior distância genética para os 20 genitores avaliados por G-SSR foi de 0,9250 e a menor de 0,4286. Já para SSR-EST a maior distância foi de 0,8925 e a menor 0. A análise conjunta dos marcadores G-SSR e EST-SSR, o dendrograma geral utilizando dados do conjunto de 18 primers evidenciou uma tendência aos marcadores G-SSR, indicando desta forma que para este estudo houve realmente superioridade destes em acessar diferentes alelos nos genótipos da população. A análise dos 20 genitores por microssatélites genômicos permitiu detectar uma maior quantidade de polimorfismo na população em estudo do que os EST-SSR, permitindo maior cobertura na investigação de variabilidade genética existente.

MOLECULAR GENETIC ASSESSEMENT OF PARENTS OF *Eucalyptus ssp.* USING EST-SSR AND GENÔMICOS MARKERS.

ABSTRACT

The establishment of efficient strategies of improvement depends of methods and analysis tools in different stages of a breeding program. Thus, studies of the genetic diversity with the use of molecular markers have been used frequently in assisting breeding programs of eucalyptus. This study it was carried through with the objective to compare the use of markers EST-SSR and genomic-SSR in the evaluation of genitors of *Eucalyptus ssp.*, and to analyze the existing genetic variability. Primers used in this study had shown 148 alelos found in the analysis of the 18 analyzed locos. The number of alelos for I lease varied of 4 the 15, with a average of 8, 2 in the general. Between the EST-SSR locus Embra 954 with the largest number of alleles (12) while Embra 950 and 941 the smallest number of alleles (4). Between the microsatellite genomic Embra 665 showed (15) alleles, while 646 Embra (5) alleles. The PIC values for the 18 primers ranged from 0.5926 to 0.8993 with an average of 0.8142. The greatest genetic distance for the 20 genitors assessed by SSR-G was 0, 9250 and the lowest 0, 4286. For the SSR-EST greater distances was 0.8925 and the lower 0. The joint analysis of markers G-SSR and EST-SSR, the generated dendrograma showed a tendency to G-SSR markers, thus indicating that for this study was actually superior in accessing these alleles in different genotypes of the population. Analysis of the 20 genitors for genomic microsatellite allowed detecting greater quantity of polymorphism in the population in study of what the EST-SSR, permitting better coverage in the investigation of genetic variability.

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético do eucalipto alcançou posição de destaque no Brasil, possuindo populações e métodos de avaliação de genótipos superiores eficientes (GONÇALVES et al., 2001). Para obter materiais geneticamente superiores em um programa de melhoramento, são requeridos métodos que possam ao longo do vários ciclos de seleção identificar estes indivíduos e manter a base genética ampla da população de melhoramento. Isto é crucial para garantir a obtenção de ganhos de forma continuada.

Estudos sobre a diversidade genética com o emprego de marcadores moleculares vêm sendo utilizados com muita frequência no auxílio a programas de melhoramento genético do eucalipto. Seu uso em larga escala na avaliação na análise de diversidade de genitores na etapa de recombinação oferece significativos ganhos na escolha de matérias superiores (MISSIO et al., 2009; FURLAN et al., 2007; SILVA et al., 2009).

Dos diferentes marcadores moleculares os microssatélites sobressaem devido ao grande conteúdo informativo, distinguindo dos demais por serem abundantes, estarem distribuídos por todo o genoma, apresentarem polimorfismo do tipo co-dominante, serem de natureza multialélica, necessitarem de pequenas quantidades de DNA e poderem ser transferíveis entre espécies de um mesmo gênero ou família (GRATTAPAGLIA, 2001). Estas características fazem dos microssatélites ou SSR marcadores genéticos bastante utilizados (SCHLOTTERERER, 2004).

O desenvolvimento constante de locos SSR também possibilita cada vez mais avanços em estudos de diversidade genética, mapeamento e seleção assistida. Grande parte destes microssatélites foi desenvolvida de regiões expressas do genoma (GAO et al., 2004; SORRELLS, 2005).

O uso de marcadores moleculares funcionais desenvolvidos a partir de seqüências expressas (EST-SSR) oferecem capacidade de acesso direto para a diversidade da população em genes de interesse agrônômico, podendo facilitar desta forma associação entre o genótipo e o fenótipo. Podem oferecer benefícios incluindo a ampla abrangência em diversos estudos além da tranferibilidade facilitada nos mais altos níveis táxon, solucionando análises onde recursos disponíveis são limitados (ELLIS; BURKE, 2007). Os EST-SSR são valiosos por se tratar de marcadores derivados de genes

transcritos localizarem em regiões conservadas podendo ser mais transmissíveis e estar presente em várias espécies (YU et al., 2004).

Estes marcadores vêm auxiliando com frequência estudos de divergência genética em *Eucalyptus* ssp. (CUPERTINO et al., 2009; WEN et al., 2010; SILVA et al., 2010; SOUZA et al., 2010; SANTOS et al, 2011), além de outros estudos com esta espécie como: mapeamento genético (SANSALONI, 2008), *fingerprint* (ROCHA et al., 2002), fluxo gênico (CHAIX et al., 2003).

2. OBJETIVO

Comparar os marcadores EST-SSR e genômicos-SSR na avaliação de genitores de *Eucalyptus* ssp, e analisar a variabilidade genética existente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético e extração do DNA genômico

As amostras foliares dos 20 genitores de *Eucalyptus grandis*, *E.urophylla* e híbrido *E. grandis* e *E. urophylla* selecionados em campo foram coletadas de forma individualizada e mantida em sílica gel até a chegada ao laboratório. O DNA genômico foi extraído das folhas de acordo com o protocolo descrito por (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998) e quantificado em espectrofotômetro do tipo GeneQuantPro e sua concentração, ajustada para 5 ng/μl, para o uso na reação (PCR).

3.2 Amplificação dos locos microssatélites

O DNA genômico foi amplificado com primers previamente desenvolvido para *Eucalyptus* ssp., conforme descrito por Cupertino et al. (2010).

Para as amplificações utilizou-se o total de 18 primers sendo 9 primers EST-SSR e 9 primers de locos SSR genômicos (G-SSR) (Tabela 1) em termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems), com ciclo de amplificação seguintes: 96 ° C por 2 min, 30 ciclos a 94 ° C por 1 min, temperatura específica de anelamento de cada primer por 1 min, 72 ° C por 1 min e uma etapa de extensão final a 72 ° C por 7 min. O volume total da mistura de PCR foi de (13 uL de solução) contendo 7,5 ng de DNA genômico, 250 µmol.L⁻¹ dNTPs, 1 X tampão PCR (10 mmol.L⁻¹ Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ de KCl, 2,25 mmol.L⁻¹ MgCl₂ pH 8,3), 2,5 mg / mL de BSA, 0,2 µmol.L⁻¹ de cada primer e 1U de Taq DNA polimerase (*Fermentas*). Os Loci foram amplificados em sistema único, de acordo com (COELHO, 2005).

Tabela 1 - Locos, sequência e temperatura dos nove microssatélites SSR-EST E SSR-genômicos utilizado na avaliação.

EST-SSR	SEQUÊNCIA	T °C	GENÔMICOS	SEQUÊNCIA	T °C
Locos			Locos		
Embra 844	(GAAA) ₁₆	60	Embra 645	(AG) ₁₁	56
Embra 915	(GAG) ₉	58	Embra 646	(GA) ₁₇	58
Embra 1445	(AG) ₆	58	Embra 648	(TC) ₁₃	56
Embra 949	(CT) ₁₆	56	Embra 655	(GA) ₁₂	56
Embra 954	(CTGC) ₄	58	Embra 665	(GA) ₁₃	56
Embra950	(CTCG) ₄	58	Embra 679	(AG) ₁₁	56
Embra 941	(CT) ₁₆	58	Embra604	(GAAA) ₁₆	62
Embra 979	(CT) ₁₇	56	embra 661	(AG) ₁₇	56
Embra 1213	(CT) ₉	58	embra 668	(GAG) ₁₀	56

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 4%; a coloração realizada com nitrato de prata. A interpretação das bandas nos géis foi feita visualmente e a definição da variação do tamanho dos fragmentos realizada estimando distância percorrida pelas bandas no gel e comparadas com marcador padrão 10 pb invitrogen.

3.3 Análise dos dados

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado com auxílio do programa POWERMARKER versão 3.25 (LIU E MUSE, 2005).

Aos alelos, foram atribuídos números relativos à sua frequência. Desta forma, o alelo mais frequente de cada loco foi denominado de alelo 1, o segundo mais frequente foi chamado de alelo 2 e assim sucessivamente. Os parâmetros genéticos foram calculados pelo programa computacional Genes versão 7.0 (CRUZ, 2009), através dos procedimentos descritos a seguir:

3.4 Heterozigosidade observada (H_o)

A quantidade de heterozigose de um determinado loco seguiu os procedimentos de WEIR (1983):

$$H_o = 1 - \sum P_{ii};$$

sendo: P_{ii} - a frequência observada de genótipos homocigotos do alelo i .

A heterozigosidade média observada foi obtida pela soma dos valores de cada loco dividindo-se pelo número total de locos estudados.

3.5 Heterozigosidade esperada (H_E)

A quantidade de heterozigose estimada teve como base NEI (1978):

sendo P_i - a frequência estimada do i ésimo alelo.

A heterozigosidade média esperada foi obtida pela média aritmética de todos os locos estudados.

$$H_E = 1 - \sum P_i^2;$$

sendo P_i a frequência estimada do i ésimo alelo

3.6. Conteúdo de informação polimórfica (PIC)

A informatividade genética PIC (conteúdo de informação polimórfica), de cada loco microssatélite, foi avaliada por meio da frequência dos alelos, com a expressão:

$$PIC = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

em que P_{ij} é a frequência do j-alelo no i-marcador.

3.7 Índice de fixação de Wright

O índice de fixação de (WRIGHT, 1965) ou o coeficiente de endogamia foi estimado com base na heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E). A fórmula utilizada foi:

$$F_{IS} = (H_E - H_O) / H_E$$

As relações genéticas entre as matrizes foram avaliadas por meio de matriz de dissimilaridade, construída com uso do complemento do índice de similaridade para dados codominantes e multialélicos, com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2001).

Esse índice foi obtido pela divisão do total de alelos comuns pelo número total de alelos avaliados em cada indivíduo.

3.8 Teste F

Para confirmação do resultado da análise conjunta de comparação entre os marcadores G-SSR e EST-SSR em resposta ao conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi realizado teste F, utilizando o programa Statistica 6.0 (Statsoft Inc., EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os locos analisados apresentaram polimorfismo (Tabela 2), o que é desejável para o programa de melhoramento e esperado quando se estuda populações oriundas de cruzamentos entre genitores que vêm de um processo de melhoramento com manutenção da variabilidade genética (SILVA et al, 2010). Os primers utilizados neste estudo mostraram 148 alelos encontrados na análise dos 18 locos analisados.

O número de alelos por loco variou de 4 a 15, com uma média de 8,2 no geral. Entre os EST-SSR o loco Embra 954 apresentou o maior número de alelos (12), enquanto Embra 950 e 941 o menor número de alelos (4). Entre os microssatélites genômicos o loco Embra 665 destacou-se apresentando (15) alelos, enquanto o loco Embra 646 apresentou (5) alelos. Por se tratar de regiões conservadas os EST-SSR podem apresentar valores para polimorfismo abaixo dos microssatélites oriundos de bibliotecas genômicas (VARSHNEY et al., 2005). Estudos semelhantes utilizando deste mesmo método de distinção entre marcadores SSR-G e SSR-EST encontraram superioridade por parte dos SSR-G (FARIA et al., 2010; GUPTA et al., 2003; YU et al., 2004).

Os valores de PIC para os 18 primers variaram de 0,59 para o loco Embra 915 a 0,89 para o loco Embra 648, com uma média de 0.81 (Tabela 2).

Analisando estes marcadores de forma individual EST-SSR, o valor de PIC variou de 0, 59 para o loco Embra 915 e 0, 8612 para o loco Embra 1445, com uma média de 0, 77. Já para marcadores Genômicos-SSR o valor de PIC variou de 0, 80 para o loco Embra 646 e 0, 89 para o loco Embra 648, com média de 0, 8522. Esta informação demonstra um valor elevado do PIC, destacado principalmente pelos marcadores SSR-genômicos com a média de 0,89, em que mesmo o valor médio para EST-SSR continua elevado para os valores encontrados nesta avaliação. Valores aproximados também foram encontrados por (CUPERTINO et al., 2010), analisando diversidade genética de híbridos de *Eucalyptus* ssp. Estes elevados valores observados para PIC comprovam alta diversidade nos genótipos da população avaliada e comprovam que os primers utilizados são altamente polimórficos e úteis nos estudos de diversidade genética em *Eucalyptus*.

O maior valor para heterozigosidade esperada foi encontrado para o loco Embra 645 com valor de 0, 89 e a menor para Embra 915 com valor de 0, 66 (Tabela 2). A

heterozigidade observada variou de 0,55 a 0,90 para os locos Embra 679 e Embra 665, respectivamente; valores considerados altos (SILVA, 2010).

A eficiência destes marcadores pode ser vista em avaliações realizadas para acessar diversidade genética em outras culturas (HANAI, 2008; MISSIO, et al.,2009). Mulato et al. (2010), avaliando germoplasma de soja, concluiu que os marcadores SSR podem ser de grande importância neste tipo de estudo e também a análise conjunta com os marcadores genômicos.

Tabela 2 – Tamanho fragmento amplificado, número de alelos (A), conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterosigozidade observada (H_O) e heterosigozidade esperada (H_E) por G-SSR e EST-SSR.

EST-SSR							
Locus	Sequência	Fragmento (pb)	A	PIC	H_O	H_E	F_{is}
Embra 844	(GAAA) ₁₆	200-230	7	0,70	0,90	0,86	-0,05
Embra 915	(GAG) ₉	200-215	6	0,59	0,90	0,66	-0,36
Embra 1445	(AG) ₆	120-140	8	0,86	0,90	0,87	-0,02
Embra 949	(CT) ₁₆	260-280	8	0,86	0,80	0,87	0,13
Embra 954	(CTGC) ₄	150-180	12	0,83	0,90	0,85	-0,31
Embra 950	(CTCG) ₄	160-180	4	0,70	0,95	0,75	-0,32
Embra 941	(CT) ₁₆	220-230	4	0,70	0,05	0,75	-0,23
Embra 979	(CT) ₁₇	270-330	8	0,86	0,85	0,87	-0,17
Embra 1213	(CT) ₉	200-230	8	0,84	1,0	0,85	-0,17
Média			7,2	0,77			-0,17
GENÔMICOS							
Embra 645	(AG) ₁₁	188-208	11	0,8845	0,75	0,89	0,16
Embra 646	(GA) ₁₇	132-160	5	0,8094	0,7	0,83	0,16
Embra 648	(TC) ₁₃	158-192	11	0,8993	0,85	0,89	0,04
Embra 655	(GA) ₁₂	100-145	8	0,8602	0,9	0,88	-0,02
Embra 665	(GA) ₁₃	110-165	15	0,8289	0,9	0,85	-0,06
Embra 679	(AG) ₁₁	283-294	6	0,8096	0,55	0,83	0,34
Embra604	(GAAA) ₁₆	218-245	7	0,8395	0,65	0,86	0,24
embra 661	(AG) ₁₇	135-162	11	0,8906	0,80	0,90	0,16
embra 668	(GAG) ₁₀	110-138	9	0,8749	0,80	0,89	0,07
Média			9,2	0,8552	0,75	0,86	0,12

Dentre os 20 genitores avaliados em termos de distância genética calculada a partir dos marcadores G-SSR, as maiores distâncias foram encontradas entre os genótipos Matriz-001 e Matriz-011 com valor de 0,92 e a menor entre os genótipos P044G e P002H com valor de 0,42, na análise de discriminação realizada por estes marcadores foi possível agrupar os 20 genitores em 5 grupos distintos (Figura 1).

A análise de agrupamento dos genótipos mostrou-se bastante consistente, onde foi possível entender a separação dos 20 indivíduos em cinco grupos (Figura 1): GRUPO I (Matriz-006, Matriz-008, Matriz-007, Matriz-009, Matriz-010, Matriz-003, Matriz-004 e Matriz-005), GRUPO II (Matriz-001 e Matriz-002), GRUPO III (Matriz-014, Matriz-015, Matriz-012, Matriz-016, Matriz-011), GRUPO IV (Matriz-019 e Matriz-020) e GRUPO V (Matriz-013, Matriz-017 e Matriz-018),

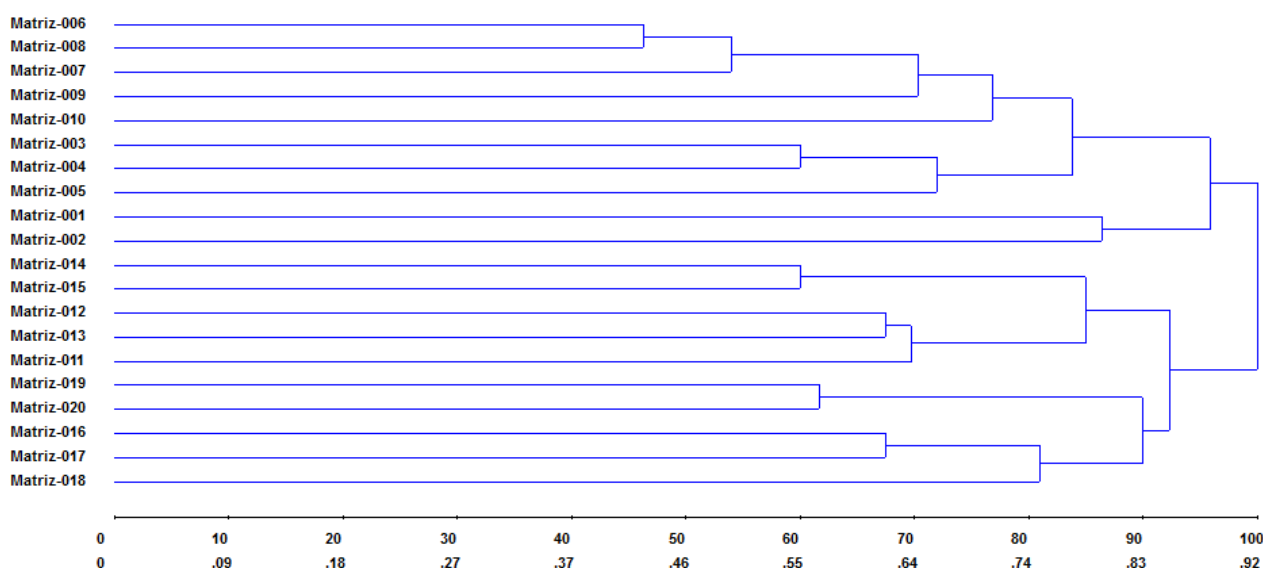


Figura 1 – Dendrogram da análise de agrupamento hierárquica pelo método UPGMA, com base no complemento aritmético para marcadores genômicos SSR; de 20 genitores de *Eucalytus ssp.*

Para os marcadores SSR-EST as maiores distâncias ficaram entre os genótipos Matriz-001 e Matriz-017 com valor de 0,8925 e a menor entre os genótipos Matriz-002 e Matriz-003 com valor de 0, sendo possível o agrupamento dos 20 genótipos em 4 grupos distintos: GRUPO I (Matriz-013, Matriz-020, Matriz-001, Matriz-015, Matriz-010), GRUPO II (Matriz-003, Matriz-012, Matriz-009, Matriz-005, Matriz-016, Matriz-002, Matriz-014, Matriz-007, Matriz-011 Matriz-018 e Matriz-004), GRUPO III (Matriz-008 e Matriz-017); e GRUPO IV (Matriz-006). (Figura 2).

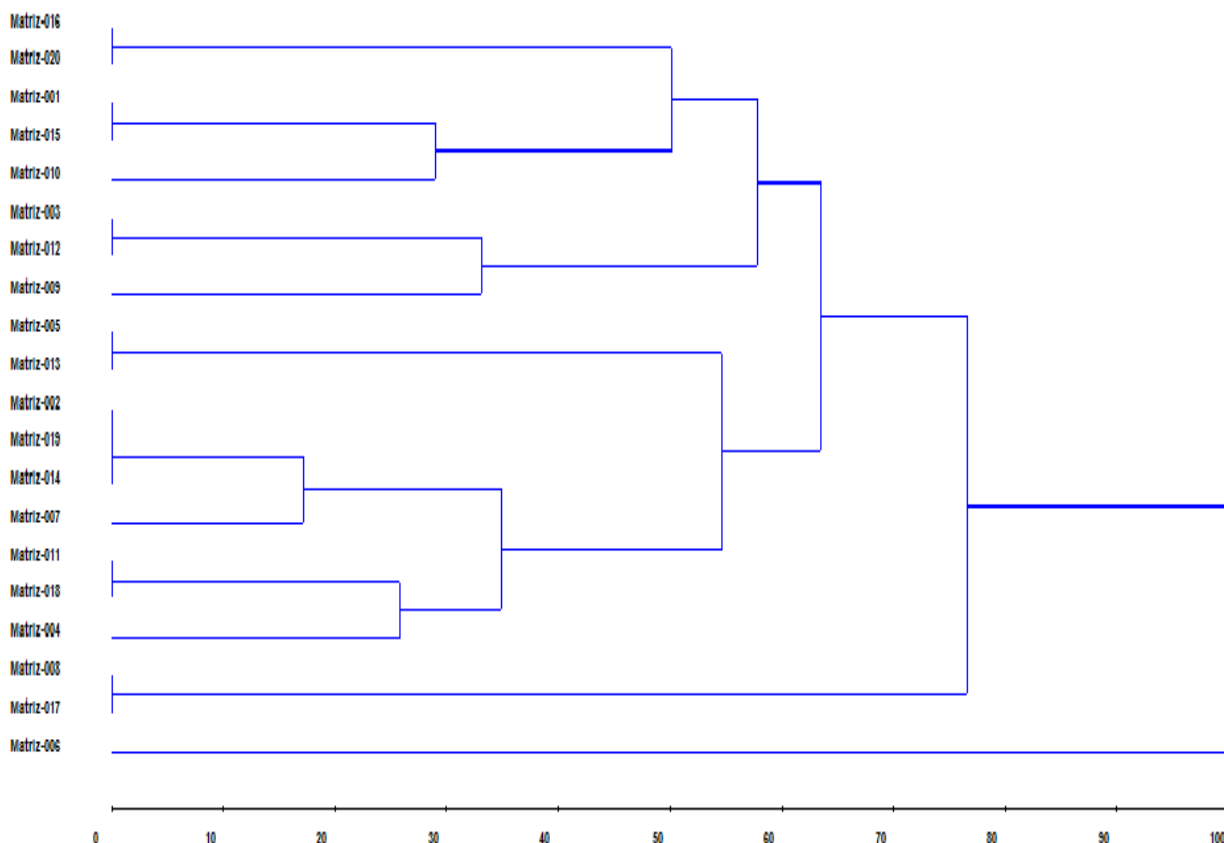


Figura 2 - Dendrograma da análise de agrupamento hierárquica pelo método UPGMA, com base no complemento aritmético do índice de Jaccard para marcadores EST-SSR ; de 20 genitores de *Eucalytus ssp.*

Na análise conjunta dos marcadores G-SSR e EST-SSR, o dendrograma gerado evidenciou uma tendência em agrupar os genótipos aos marcadores G-SSR (Figura 3), indicando desta forma que para este estudo houve realmente superioridade destes em acessar diferentes alelos nos genótipos da população. Este resultado foi confirmado no teste F a 5% probabilidade, onde os SSR-genômicos foram significativos para valores de PIC ($F= 5,5$) (Tabela 3) com maior quantidade de polimorfismo.

Para a correlação entre as matrizes de dados gerados a partir de locos SSR-genômicos e SSR-EST, calculado por meio do teste de Mantel com 1000 simulações mostrou uma correlação (0,59**) sendo significativo o que comprova alguma ligação entre estes marcadores e o tipo de identidade compartilhado com estes dados moleculares.

Tabela 3 – Comparação do número médio de alelos (A) e de conteúdo de informação polimórfica (PIC) para os dois tipos de marcadores Genômicos e EST-SSR.

Parâmetros	Média	F	Erro padrão	p
A				
Genômicos-SSR	7,2			
EST-SSR	9,2			
PIC				
		5,505		0,0321*
Genômicos-SSR	0,7731		0,0331	
EST-SSR	0,8552		0,0116	

* Significativo a 5%, teste F.

5. CONCLUSÕES

Os marcadores microsatélites genômicos permitem detectar uma maior quantidade de polimorfismo na população em estudo do que os EST-SSR, permitindo maior cobertura na investigação de variabilidade genética existente.

Os genótipos da população em estudo apresentam alta variabilidade genética sendo possível separá-los em cinco grupos distintos na avaliação por marcadores genômicos e quatro grupos para marcadores EST-SSR.

REFERÊNCIAS

Chaix, G.; Gerber, S.; Razafimaharo, V.; Vigneron, P.; Verhaegen, D.; Hamon, S. Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*. *Theor Appl Genet*, v.107. p. 705–712. 2003.

Cupertino, F.B.; Leal, J.B.; Corrêa, R.X. Gaiotto, F.A. Comparative study between genomic and EST microsatellite markers to estimate genetic diversity of *Eucalyptus* hybrids. *Biologia Plantarum*. v. 55. p. 379-382. 2010.

Ellis, J.R.; Burke, J.M. EST-SSRs as a resource for population genetic Analyses. *Heredity*. v. 99. p.125–132. 2007.

- Faria, D. A.; Mamani, E. M. C.; Pappas, M.R.; Pappas Jr, G. J. ; Grattapaglia, D. A. Selected Set of EST-Derived Microsatellites, Polymorphic and Transferable across Species of *Eucalyptus*. *Journal of Heredity*. v.10, p.512–520. 2010.
- Furlan, R. A; Mori, E. S.; Tambarussi, E. V.; Moraes, C. B.; Jesus, F. A.; Zimback, L. Estrutura genética de populações de melhoramento de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* por meio de marcadores microssatélites. *Bragantia*. Campinas. v.66. n.4. p.553-563. 2007.
- Gao, L.F.; Jing, R.L.; Huo, N.X.; Li, Y.; Li, X.P.; Zhou, R.H.; Chang, X.P.; Tang, J.F.; Ma, Z.Y.; Jia, J.Z. One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, v.108, p.1392 - 1400, 2004.
- García, M.; Villalba, P.; Acuña, C.; Oberschelp, J.; Harrand, L.; Surenciski, M.; Martínez, M.; Petroli, C.; Sansaloni, C.; Faria, D.; Grattapaglia, D.; Poltri, S.M. A genetic linkage map for a Full sib population of *Eucalyptus grandis* using SSR, DARt, CG-SSR and EST-SSR markers. IUFRO. Tree biotechnology conference. Arraial D´Ajuda – Bahia. Brazil. 2011.
- Gupta, P.K.; Rustgi, S.; Sharma, S.; Singh, R.; Kumar, N.; Balyan, H.S. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol Genet Genomics*. v.270. p.315–323. 2003.
- Hanai, L.R. Desenvolvimento de marcadores SSR-EST e construção de mapas genéticos em feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Universidade de São Paulo. Tese doutorado. 2008.
- Missio, R. F.; Caixeta, E. T.; Zambolim, E. M.; Pena, G. F.; Ribeiro, A. P.; Zambolim, L.Pereira, A. A.; Sakiyama, N. S. Assessment of EST-SSR markers for genetic analysis on coffee. *Bragantia*. Campinas. v. 68. n. 3. p. 573-581. 2009.
- Mulato, B.M.; Möller, M.; Zucchi, M. I.; Quecini, V.; Pinheiro, J. B. Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília. v.45. n. 3. p. 276-283. 2010.
- Nishitani,C.; Terakami,S.; Sawamura,Y.; Takada, N.; Yamamoto, T. Development of novel EST-SSR markers derived from Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Breeding Science*. v.59. p.391– 400 .2009.
- Rocha, M. G. B.; Muro_Abad, J. I. M.; Pires, I. E.; Araújo, E. F. *Fingerprint* and genetic diversity analyses of *Eucalyptus* ssp. genotypes using RAPD and SSR markers. *Scientia Forestalis*. n.62. p. 24-31. 2002.
- Santos, L. S.; Sabóia, E.N.; Almeida, D. P.; Muro_Abad, J. I.; Missiaglia, A.; Pereira, N.E.; Ahnert, D.; Gaiotto, F.A.; Corrêa, R.X.Evaluation of the genetic diversity of a set of parents of *Eucalyptus* spp. by using microsatellite markers to direct matings. IUFRO. Tree biotechnology conference. Arraial D´Ajuda. Bahia, Brasil. 2011.
- Silva, J. M; Sousa, A. C. B.; Souza, A. P.; Mori, E. S.; Freitas, M. L.; Sebbenn, A. M.; Moraes, M. L. T. Development and characterization of 14 microsatellite loci from an enriched genomic library of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. *Conservation Genet. Resour*. v.1. p. 465–469. 2009.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*. v.23, p.48-55. 2005.

Yu, J.K.; Rota, M. L.; Kantety, R. V.; Sorrells, M. E. EST derived SSR markers for comparative mapping in wheat and Rice. *Mol. Genomics*. v. 271. p. 742–751. 2004.

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR MEIO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS EM PROGÊNIE DE *Eucalyptus ssp.* .

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de dois testes de progênies de irmãos completos de *Eucalyptus ssp.* . A análise de variância realizada nos dois experimentos apresentou efeitos significativos á 1% e 5% para todas as características analisadas, DAP, ALT e VOL. As médias das famílias para característica Diâmetro a Altura do Peito no experimento Capão Bonito do Sul (CBS) variaram entre 16,87 e 7,69 cm, e a altura variou entre 18,98 e 10.5 m, e o volume variou entre 0, 1780 e 0, 0440 m³.arv⁻¹. No experimento Jacareí (JAC) DAP variou entre 17,25 e 6,58 cm, a altura variou entre 19,25 e 8,31 m, e o volume variou entre 0, 5077 e 0, 0311 m³.arv⁻¹. No experimento CBS as herdabilidades em nível de famílias obtiveram valores altos para DAP (86,65%), altura (81,47%) e volume (89,27%), os valores do experimento Jacareí também se mostraram altos com DAP (88,97%), altura (83,7%) e volume (90,61%). As características DAP, ALT e VOL nas progênies avaliadas em JAC e CBS apresentam herdabilidade compatível com o uso do valor fenotípico como bom preditor para o ganho genotípico por seleção na geração seguinte. As análises permitiram concluir que existe variabilidade genética entre as famílias para as características avaliadas, e que o programa de melhoramento está mantendo esta variabilidade, sendo essa condição favorável para proceder à seleção com ganhos genéticos na população.

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR MEIO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS EM PROGÊNIE DE *Eucalyptus ssp.*

ABSTRACT

The present study had as objective to evaluate the genetic variability of two tests of progenies of complete brothers of *Eucalyptus ssp.*, and to predict the gains with the selection. The analysis of variance carried through in the two experiments presented significant effect 1% and 5% for both the analyzed characteristics. Such observation implies to say that genetic variability exists enters the families for the evaluated characteristics, and that the improvement program is keeping this variability, being this favorable condition to process selection with genetic gains in the population. The averages of the families for characteristic DAP in the experiment CBS varied between 16,87 and 7.69 cm, the height varied between 18.98 and 10.5 m, and the volume varied between 0.1780 and 0.0440 m³.arv⁻¹, already for the experiment JAC DAP it varied between 17,25 and 6,58 cm, the height it varied between 19.25 and 8.31 m, and the volume varied between 0.5077 and 0.0311 m³.arv⁻¹. In experiment CBS the herdability to the level of families had gotten high values for DAP (86.65%), height (81.47%) and volume (89.27%), the values of the JAC experiment had also revealed high with DAP (88.97%), height (83.7%) and volume (90.61%). Characteristics DAP, ALT and VOL in the lineages evaluated in JAC and CBS present compatible herdability with the use of the phenotypic value as good predictor for the genotypic profit for selection in the following generation. The analysis concluded that there is genetic variation among families for characteristics evaluated, and that the improvement program is keeping this variability, and this favorable condition for selection to proceed with genetic gains in population.

1. INTRODUÇÃO

O objetivo fundamental do melhoramento florestal é garantir o aumento da produtividade e da qualidade da matéria-prima a cada ciclo de seleção, mantendo diversidade genética da população, para o melhoramento em médio e longo prazo (ODA, et al., 1989). Atualmente para espécies florestais é preciso considerar vários objetivos, como adaptação a diferentes condições ambientais, qualidades nas propriedades físicas e mecânicas da madeira, resistência a pragas e doença e ainda prezar pela manutenção da variabilidade genética (MORI, 1988, MORI, 1993, PIGATO; LOPES, 2001, BORÉM, 2009).

Muitas características de interesse no melhoramento florestal, como adaptação, crescimento, forma e qualidade da madeira, são avaliados a partir de caracteres quantitativos, pois são herdadas pela ação de muitos genes, de forma que cada um contribui para a herança dos caracteres, podendo ser de ação complexa (RAMALHO, 2008, ODA et al., 2007). Nos programas de melhoramento, os indivíduos desejáveis são escolhidos fenotipicamente para a característica desejada, porém, a aparência interessante pode ser consequência de um bom genótipo, ambiente favorável, ou ser resultado da interação de ambos (MORI et al., 1986; MORI et al., 1988; MARTINS, et al., 2005). A garantia do êxito do melhoramento genético está associada à capacidade de acerto na escolha dos melhores indivíduos que serão os genitores das próximas gerações. Uma das maneiras de identificar os indivíduos portadores de genes desejáveis é pela correlação entre o valor fenotípico e genotípico para as plantas candidatas à seleção. Para isso, é importante que se faça uma amostragem correta dos genótipos visando coletar o máximo possível da variabilidade alélica favorável da população (VENCOVSKY, 1969; OLIVEIRA, 1994), além de obter material com baixa carga genética, bom desempenho e boa adaptação (CRUZ, 2005).

Os testes de progênes possibilitam amostragens representativas de populações, que após a caracterização genética, podem estar disponíveis ao melhoramento genético. Consequentemente, os testes de progênie representam uma alternativa para conservação genética, possibilitam estimar a estrutura genética de populações e selecionar indivíduos (KAGEYAMA, 1980). Por causa disso, eles são amplamente empregados nos programas de melhoramento florestal. Um dos aspectos mais importantes da genética quantitativa é a descrição e explicação da variabilidade genotípica de um caráter de interesse, em

termos de parâmetros genéticos baseado nas leis mendelianas, decompondo a variância genética com base no conhecimento dos processos genéticos envolvidos na herança dos caracteres (CRUZ; REGAZZI, 1997, VENCOVSKY et al., 2001, CRUZ, 2005).

Dentre os parâmetros genéticos quantitativos que mais interessam ao melhorista em testes de progênies, podemos citar as estimativas das variâncias e os coeficientes de variação genética, a herdabilidade no sentido amplo e restrito, o ganho genético, as correlações genética e fenotípica, a acurácia com a seleção e o valor genético dos indivíduos (RESENDE, 2002; CRUZ, 2005). Tais estimativas são comumente alcançadas empregando estatísticas baseadas na análise de variância. Estas análises foram inicialmente desenvolvidas para considerar as diferenças entre as médias e depois adaptada para a estimação dos componentes de variância (SEARLE et al., 1992). Baseada na contraposição de duas hipóteses de teste, seja das médias dos tratamentos ou associadas aos componentes de variância, sendo a conclusão baseado no teste F (SEARLE, 1971). Estes componentes de variância são obtidos pela decomposição dos quadrados médios da ANOVA, com base nas suas esperanças matemáticas (CRUZ; REGAZZI, 1994). A existência da variabilidade genética é avaliada pelo teste de nulidade do componente de variância relativo ao valor genético da população pelo teste F na análise de variância, permitindo ao melhorista efetuar a seleção na população, e estimar os ganhos genéticos (CRUZ; REGAZZI, 1994). Dependendo do método adotado, das características avaliadas e os componentes genéticos associados.

A escolha dos genitores para o desenvolvimento de populações, capazes de propiciarem os ganhos de seleção desejados, constitui uma das etapas mais críticas do programa de melhoramento. O presente estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de dois testes de progênies de irmãos completos de *Eucalyptus* ssp.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

A partir da combinação de 20 genótipos de *Eucalyptus grandis*, *E.urophylla* e híbrido *E. grandis* e x *E. urophylla*, foram obtidas 44 famílias em diferentes combinações. Os controles

experimentais em campo incluem uma cultivar clonal da empresa FIBRIA. As medidas em campo consistem do diâmetro à altura do peito e altura coletados aos três anos de idade. Os testes de progênies foram oriundos de dois experimentos de irmãos completos de cruzamentos entre clones operacionais Jacareí e Capão Bonito do sul, ambos os municípios no estado de São Paulo. O plantio foi feito em espaçamento 3 x 3 m.

2.2 Variáveis mensuradas

A mensuração das variáveis quantitativas foi realizada aos três anos de idade com medição de altura total (ALT), diâmetro à altura do peito (DAP) e volume (VOL) obtido pela fórmula:

Volume= 0.0000661588*DAP^{1.6412303760} *ALT^{1.0977490470}, para experimento CBS;

e Volume= 0.00006729470*DAP^{1.76579179600} *ALT^{0.99331995250}, para experimento JAC.

2.3 Distância genética e agrupamento dos genótipos

Para as análises de dissimilaridade foram utilizadas as médias das famílias para obtenção da Distância Euclidiana Média, como medida de dissimilaridade conforme descrito por (CRUZ; REGAZZI (1994) usando o programa GENES (CRUZ, 2009), dada pela fórmula:

$$d_{ij} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (x_{ij} - x_{i'j})^2}$$

onde:

d_{ij} , é a distância Euclidiana Média entre as famílias "i" e a família "j";

n, é o número de caracteres avaliados;

x_{ij} , é a observação do i-ésimo progenitor, em relação ao j-ésimo caráter.

O agrupamento das progênies foi feito pelo método de Tocher, conforme (CRUZ e REGAZZI, 1994), utilizando a matriz de dissimilaridade, obtida pelo cálculo das Distâncias Médias Euclidianas utilizando do programa GENES.

2.3 Análise de variância e estimativas de parâmetros genéticos

As características mensuradas em campo foram: Altura Total (ALT), Diâmetro a Altura do Peito (DAP) e Volume Individual (VOL). Com base nos dados, foi feita a análise de variância para os experimentos Jacareí e Capão bonito-sul utilizando o programa GENES, conforme descrito por (CRUZ; REGAZZI, 1994).

A hipótese de existência de variabilidade genética significativa, entre as famílias amostradas da população, foi testada, sendo $H_0: \sigma_g^2 = 0$. O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + b_j + \varepsilon_{ij}$$

em que,

Y_{ijk} = observação na planta k, da progênie i no bloco j;

μ = média geral;

g_i = efeito da progênie i ($i = 1, 2, \dots, g$), $g_i \sim \text{NID}(0, \sigma_g^2)$ independentes;

b_j = efeito do bloco j ($j = 1, 2, \dots, b$), $b_j \sim \text{NID}(0, \sigma_b^2)$ independentes; e

ε_{ij} = efeito do ambiente, em que $\varepsilon_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$.

Quadro 1 – Esquema da análise de variância para análise dos experimentos em blocos ao acaso, considerando os dois testes de progênies.

F. V.	G. L.	Q. M.	E (Q. M.)
Blocos Ajustados	b – 1	QMB	$\sigma^2 + g\sigma_b^2$
Famílias Ajustadas	g – 1	QMP	$\sigma^2 + \bar{n}\sigma_g^2$
Resíduo	t-g-r+1	QMR	σ^2

QMB = Quadrado médio de bloco;

QMP = Quadrado médio de famílias;

QMR = Quadrado médio do resíduo;

t = Total de parcelas do experimento

Os estimadores dos parâmetros genéticos são:

a) Variância fenotípica média:

$$\hat{\sigma}_f^2 = \frac{QMP}{\bar{n}}$$

em que,

\bar{n} = é o número médio de repetições dado por:

$$\frac{1}{\bar{n}} = \frac{1}{g} \sum_{i=1}^g \frac{1}{n}$$

b) Variância genotípica média:

$$\hat{\sigma}_g^2 = \hat{\sigma}_f^2 - \hat{\sigma}^2$$

em que,

$\hat{\sigma}^2$ = é a estimativa da variância ambiental média.

c) Variância ambiental média:

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{QMR}{\bar{n}}$$

d) Herdabilidade (Unidade de Seleção: média da família):

$$h^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_f^2}$$

e) Coeficiente de variação genotípica:

$$CV_g = \frac{100\hat{\sigma}_g}{\bar{X}}$$

\bar{X} = é a estimativa da média geral da característica.

f) Coeficiente de variação experimental:

$$CV_e = 100 \frac{\sqrt{QMR}}{\bar{X}}$$

g) Correlação intraclasse:

$$\rho = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_g^2 + \bar{n}\hat{\sigma}^2} = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_g^2 + QMR}$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estimativas das variâncias, coeficientes de variação e herdabilidade

As análises de variância foram realizadas para os dois testes de progênie em campo: Jacareí e Capão Bonito do sul com delineamento em blocos ao acaso com uma planta por parcela. Os dados foram coletados aos três anos de idade para os dois experimentos.

Conforme análise de variância (Quadro 1 e 2) os efeitos relacionados a genótipos foram significativos 1% e 5% de probabilidade para todas as características analisadas. Esta observação implica dizer que existe variabilidade genética entre as progênie para as características avaliadas, e que o programa de melhoramento está mantendo esta variabilidade, sendo essa condição favorável para proceder a seleção com ganhos genéticos na população (CRUZ,2005).

As médias das famílias para característica DAP no experimento em (CBS) variou entre 16,87 e 7,69 cm, a altura variou entre 18,98 e 10,5 m, e o volume variou entre 0,1060 e 0,0696 m³.arv⁻¹, já para o experimento (JAC) DAP variou entre 17,25 e 6,58 cm, a altura variou entre 19,25 e 8,31 m, e o volume variou entre 0,507 e 0,031 m³.arv⁻¹ (Quadro 3).

Conforme verificado no quadro 1 e 2 os coeficientes de variação experimental para DAP (41,60% e 34,08%), altura (40,44% e 25,62%) e volume (75,03% e 58,49%) foram elevados quando comparados à literatura para *Eucalyptus ssp.* (GARCIA, 1989; ROCHA et al. 2007). Rosado et al. (2009) avaliando testes de progênie para *Eucalyptus urophylla* encontrou valores de CV% para DAP, ALT e VOL de 9,51%, 7,45% e 20,79%, respectivamente. Em trabalho realizado por Rocha et al. (2007) os valores obtidos ficaram abaixo dos encontrados na análise de variância para este estudo com DAP (5,06%), ALT (4,76%), VOL (32,92%) para *E. urophylla*; e DAP (9,81%), ALT (8,11%), VOL (23,62%) para *E. grandis*.

No entanto valores altos foram encontrados em estudo realizado em um teste de progênie de *E. camaldulensis* por Silva et al. (2010) onde DAP ficou com valor de 31,24%; ALT de 57,04% e VOL de 73,20%. Alves (2009) investigando a diversidade genética por caracteres quantitativos em eucalipto também encontrou coeficientes de variação experimental considerados altos para estas características com DAP de 25,47%, ALT de 13,33% e VOL de 59,51%, onde valor para volume apresenta – se mais elevado devido ao caráter ser influenciado por outras duas variáveis (altura e diâmetro). O que se tem observado é que para populações com maior grau de melhoramento como de espécies como *E. grandis* e *E. urophylla* a variação ambiental tende a ser menor que para outras espécies de introduções recentes ou com menor grau de melhoramento como *E. camaldulensis*.

Quadro 1 - Resultado da análise de variância para os dados de diâmetro à altura do peito (DAP), altura total (ALT) e volume individual (VOL) em JAC para 49 famílias de *Eucalyptus ssp*, avaliados aos 3 anos de idade.

Quadrados médios					
	FV	GL	DAP	ALT	VOL
Jacareí	Blocos	29	22.34	14.86	0.003713
	Genótipos	49	108.85**	82.43**	0.0268**
	Resíduo	1205	15.85	15.27	0.002874
	CV (%)		41.60	40.44	75.03
	Média		10.83	13.61	0.087963
** Significativo, a 1(%) de probabilidade, pelo teste F.					

Quadro 2 - Resultado da análise de variância para os dados de diâmetro à Altura do peito (DAP), altura total (ALT) e volume individual (VOL) em CBS para 49 famílias de *Eucalyptus ssp*, avaliados aos 3 anos de idade.

Quadrados médios					
	FV	GL	DAP	ALT	VOL
Capão Bonito do Sul	Blocos	29	19,94	41,14	0,004131
	Genótipos	48	184,35**	186,10**	0,046415**
	Resíduo	1028	20,32	30,32	0,004356
	CV (%)		34,08	25,65	58,49
	Média		11,68	15,23	0,09166
** Significativo, a 1(%) de probabilidade, pelo teste F.					

Quadro 3 - Estimativas dos parâmetros genéticos e ambientais de experimento em blocos ao acaso em testes de progênies de irmãos completos em dois ambientes: coeficiente da variação experimental (CV_e), variância ambiental média (σ^2_e), variância fenotípica (σ^2_f), variância genotípica média (σ^2_g), herdabilidade média entre famílias (h^2 m), razão entre o coeficiente de variação genético e o coeficiente de variação experimental (CV_g/CV_e) para as características diâmetro a altura do peito (DAP), altura total (ALT) e volume individual (VOL), para *Eucalyptus* spp avaliados aos três anos de idade em Capão Bonito do Sul e Jacareí São Paulo.

Local	Caracteres	Média	Parâmetros					
			CV_e	σ^2_e	σ^2_f	σ^2_g	h^2 (m)	CV_g/CV_e
CBS	DAP (cm)	10,8	41,6	0,62	4,65	4,02	86,65	0,504
	ALT (m)	13,6	40,4	0,59	3,22	2,62	81,47	0,4147
	VOL ($m^3 \cdot arv^{-1}$)	0,0879	75,0	0,0001	0,0011	0,0009	89,27	0,5705
JAC	DAP (cm)	11,68	34,1	0,77	7,0	6,26	88,97	0,5552
	ALT (m)	15,23	25,6	1,15	7,1	5,95	83,7	0,443
	VOL ($m^3 \cdot arv^{-1}$)	0,09166	58,5	0,0017	0,0018	0,0161	90,61	0,6073

A herdabilidade tem por finalidade orientar o melhorista sobre a quantidade relativa de variância genética útil (FALCONER, 1987), e a possibilidade de ganho com a seleção. No experimento CBS os valores para herdabilidade ao nível de famílias obtiveram valores altos para DAP (86,65%), altura (81,47%) e volume (89,27%), os valores do experimento JAC também mostraram-se altos com DAP (88,97%), altura (83,7%) e volume (90,61%). Considerando as três características avaliadas os maiores valores de herdabilidade foram encontrados para volume. Esta resposta não foi encontrada em estudos anteriores onde altura sempre tem melhores respostas para valores elevados de herdabilidade. MURO ABAD (2000) analisando populações de *E. grandis* e *E. urophylla* obteve valores de ALT de 66,2%, DAP de 80%. Tal resultado também foi comprovado em trabalho realizado por ROCHA, et al. 2010, selecionando genitores de *E. urophylla* e *E. grandis*, as herdabilidades para DAP foi de 27,85%, ALT de 36,74% e 31,04%.

Outro parâmetro utilizado para compreender a variabilidade genética como se expressa no caráter estudado é o coeficiente de variação genético (CV_g) (RESENDE, 2000). Quando a relação (CV_g/CV_e) coeficiente de variação genético e coeficiente de variação ambiental é maior que 1 (um), diz-se que há favorabilidade para a obtenção dos ganhos com a seleção (VENCOVSKY, 1987). Neste caso, em ambos os

experimentos os valores ficaram abaixo de 1 (um) nos testes de CBS e JAC no entanto para os dois testes eles se aproximam do recomendável o que sugere indicativos de sucesso na seleção (Quadro 3). Brotel et al. (2010), estimando parâmetros fenotípicos e genotípicos em clones de *Eucalyptus*, encontraram valores acima de 1 (um), onde para o DAP foi de 1,52; para ALT de 1,46 e para VOL de 1,46. Valores abaixo de 1 (um) também foram encontrados por Rocha et al. (2007) em estudo para seleção de híbridos interespecíficos, sendo para DAP de 0,23 ALT de 0,28 e VOL de 0,2.

Quadro 4 - Média dos quadrados mínimos (médias ajustadas) rank das melhores famílias para os dois testes de progênies avaliados aos três anos de idade nos dois ambientes.

Experimento CBS				Experimento JAC			
Família	DAP	ALT	VOL	Família	DAP	ALT	VOL
1	9,88	14,51	0,068112	1	8,32	11,3	0,050777
2	10,03	13,49	0,06456	2	7,14	9,57	0,035951
3	11,25	14,53	0,075899	3	12,18	15,65	0,100081
4	11,63	15,16	0,086209	4	8,4	10,91	0,042644
5	10,83	14,59	0,082725	5	11,44	13,22	0,093709
6	11,88	15,53	0,089571	6	10,19	12,15	0,083978
7	9,99	14,09	0,074003	7	10,56	13,31	0,09462
8	10,27	14,65	0,072519	8	12,42	15,01	0,100738
9	12,98	16,58	0,11016	9	13,49	15,92	0,120025
10	12,95	16,19	0,106658	10	11,52	14,72	0,095442
11	7,98	11,32	0,044064	11	8,54	10,81	0,062357
12	11,96	15,61	0,083987	12	11,14	15,09	0,082254
13	12,3	17,23	0,096596	13	12,68	16,43	0,113695
14	8,57	12,46	0,053631	14	9,44	13,39	0,06488
15	10,78	15,8	0,075391	15	9,18	13,32	0,055894
16	10,23	14,72	0,067309	16	8,57	12,24	0,053062
17	12,04	16,03	0,097578	17	11,38	15,03	0,102762
18	10,38	13,64	0,070446	18	8,4	11,38	0,052511
19	13,16	16,64	0,107071	19	10,6	14,55	0,075785
20	11,03	14,98	0,082013	20	12,17	16,03	0,11087
21	9,06	13,32	0,058316	21	10,56	13,74	0,081769
22	11,77	16,18	0,093726	22	13,52	17,17	0,126873
23	12,48	16,49	0,097096	23	12,61	15,6	0,110665
24	11,77	16,03	0,088143	24	11,03	14,34	0,093832
25	10,59	15,42	0,072023	25	8,86	13,08	0,056921
26	11,48	15,64	0,088366	26	11,27	14,38	0,084469
27	7,69	10,5	0,044212	27	7,04	9,72	0,036152
28	9,56	13,32	0,059763	28	7,47	9,7	0,036738
29	9,4	12,95	0,054831	29	6,96	9,24	0,031152
30	9,59	12,99	0,069889	30	6,58	8,56	0,04839
31	9,35	12,68	0,057972	31	6,82	8,31	0,031182
32	12,75	15,21	0,093955	32	7,98	9,96	0,041764
33	11,81	15,69	0,090646	33	8,17	11,38	0,047785
34	11,18	14,57	0,08402	34	10,31	12,81	0,072352
35	16,65	18,63	0,172275	35	9,65	12,26	0,068567
36	14,43	17	0,140286	36	8,84	10,27	0,051987
37	15,25	17,44	0,143262	37	8,07	11,14	0,045092
38	16,87	18,98	0,178307	38	10,04	13,07	0,068494
39	11,82	14,51	0,101007	39	17,25	19,25	0,20094
40	14,82	16,97	0,141573	40	12,89	16,2	0,130607
41	15,32	17,89	0,154636	41	14,34	17,35	0,141713
42	11,35	14,2	0,084013	42	17,22	17,62	0,189026
43	13,95	16,52	0,19669	43	13,8	15,48	0,134058
				44	13,96	15,32	0,144449
				45	13,11	15,38	0,140075
				46	15,85	19,19	0,179676
				47	10,65	14,21	0,07961
				48	9,2	11,94	0,058795
				49	12,68	13,95	0,106447

3.3 Divergência genética das progênies

Para análise de diversidade entre as progênies, foram utilizadas as seguintes características: diâmetro à altura do peito (DAP), altura total de planta (ALT) e volume individual (VOL).

O agrupamento dos indivíduos do teste de progênies do experimento JAC, utilizando o método de otimização de Tocher (CRUZ e REGAZZI, 1994), resultou na separação das 49 progênies em nove grupos (Quadro 1). Este procedimento baseia-se em valores pré-determinados, como critério para inclusão ou não de um genótipo no grupo, sendo este valor influenciado pela presença de discrepância entre os mesmos, o que possibilita agrupar os genótipos em poucos grupos. Os valores de dissimilaridade encontrados foram altos, o que indica variabilidade genética entre as famílias confirmando os resultados encontrados pela ANOVA, ou seja, o programa vem mantendo a variabilidade genética e contribuirá com ganhos genéticos ao longo da seleção. A menor divergência genética encontrada entre todas as famílias foi de 0,46 entre as famílias (1 e 4) e a maior de 6 entre as famílias (1 e 7) (Quadro 1). Avaliando progênies de *Eucalyptus urophylla* e *E. Grandis* (ROCHA et al., 2007) encontrou valores semelhantes para distância genética. O maior número de genótipos foi no grupo agrupado no grupo 2.

Quadro 1 - Agrupamento 49 famílias referentes ao teste progênie Jacareí pelo método de otimização de Tocher, baseado na dissimilaridade expressa pela distância euclidiana média (d_{ij}).

Grupos	Famílias
1	2 29 27 28 32 30 31
2	7 21 47 26 19 12 24 10 5 17 8
3	14 15 25 38 35 34 6 48 16
4	4 18 37 1 33 11 36
5	3 23 40 9 13 20 45
6	43 44 22 41
7	39 42
8	46
9	49

Analisando o agrupamento para o teste de progênies de CBS, as 43 famílias foram agrupadas em 14 grupos (Quadro 2). Também foi encontrado valores elevados de dissimilaridade, indicando variabilidade genética entre as famílias, sendo a menor

divergência genética encontrada entre todas as famílias de 0,60 e a maior de 7,27 entre as famílias 1 e 12 e 6 e 8 respectivamente. O maior número de famílias foi no grupo 1. A tendência do método em formar grupos exclusivos e tomar as distâncias intergrupos favoreceu o agrupamento das famílias de forma individualizada, grupo 9, 10, 11, 12, 13, 14 (Quadro 2), evidenciando que estas podem ter vindo de populações distantes para formação do teste.

Quadro 2 - Agrupamento 43 famílias referentes ao teste progênie CBS pelo método de otimização de Tocher, baseado na dissimilaridade expressa pela distância euclidiana média (d_{ij}).

Grupos	Famílias
1	6 33 26 12 24 4 22 17 23
2	5 34 20 3 42 8 16 25
3	2 18 30 28 21 29 31
4	9 19 10 43
5	36 40 37
6	35 38
7	1 7
8	11 27
9	14
10	15
11	39
12	32
13	13
14	41

4. CONCLUSÕES:

Há variabilidade nas famílias para as características de DAP, altura e volume aos três anos de idade, comprovada pela coincidência entre agrupamento de Tocher e ANOVA.

O valor fenotípico é um bom preditor para o ganho genotípico por seleção na geração seguinte para as características DAP, ALT e VOL.

5. REFERÊNCIAS

- Abad, J. I. M. Diversidade genética por meio de marcadores moleculares e predição de ganhos em *Eucalyptus spp.* 2003. 98 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2003.
- Alves, P. F.; Silva, J.M.; Paula, D.R.; Mendes, H. S. J.; Silva, C. L. S. P.; Freitas, M. L. M.; Sebbenn, A. M.; Moraes, M. L. T. Diversidade genética e sistema de reprodução em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. procedente de Katherine River, Revista Instituto Florestal. São Paulo. v. 21. p. 169-179. 2009.
- Brotel, M. C. G. et al. Seleção de clones de *Eucalyptus* para biomassa florestal e qualidade da madeira. Scientia. Forestalis. Piracicaba. v. 38. p. 237-245. 2010.
- Cruz, C.D. Princípios de genética quantitativa. Viçosa, MG: UFV, 2005. 394p.
- Cruz, C.D.; Regazzi, A.J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa. 2.ed. 1997. 390p.
- Kageyama, P.Y. Variação genética em progênies de uma população de *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden. 1980. 125 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1980.
- Missio, R.F.; Dias, L.A.S.; Moraes, M.L.T.; Resende, M.D.V. Selection of *Pinus caribaea* var. bahamensis progenies based on the predicted genetic value. Crop Breeding and Applied Biotechnology, Londrina, v.4, n.4, p.399-407, 2004.
- Mori, E.S. Variabilidade genética isoenzimática em uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção. 1993. 119 f. Tese (Doutorado em Genética) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba. 1993.
- Mori, E.S.; Kageyama, P.Y.; Ferreira, M. Variação genética e interação progênies x locais em *Eucalyptus urophylla*. IPEF. Piracicaba. n.39, p. 53-63. 1988.
- Mori, E.S.; Lello, L.R.B.; Kageyama, P.Y. Efeitos da interação genótipo x ambiente em progênies de *Eucalyptus saligna* Smith. IPEF, Piracicaba, n.33, p.19 – 25. 1986.
- Oda, S.; Mello, E.J.; Silva, J.F.; Souza, I.C.G. Melhoramento florestal. In: BORÉM, A. (Ed.). Biotecnologia Florestal. Viçosa. 2007. p.51-71.
- Oda, S.; Menck, A.L.M.; Vencovsky, R. Problemas no melhoramento genético clássico do eucalipto em função da alta intensidade de seleção. IPEF: Instituto de pesquisas e Estudos Florestais, Piracicaba, n.41-42, p.8-17, 1989.
- Oliveira, V.R. Estudos para formação de populações base de *Eucalyptus tereticornis* Sm. 1994. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

Patiño-Valera, F. Variação genética em progênes de *Eucalyptus saligna* Smith e sua interação com o espaçamento. 1986. 192 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1986.

Pigato, S.M.P.C.; Lopes, C.R. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio de marcador molecular RAPD em um teste de progênes de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. Scientia Forestalis, Piracicaba, n.60, p.135-148, 2001.

Ramalho, M.A.P.; Santos, J.B.; Zimmermann, M.J. P. Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro. Goiânia. Ed. UFG, 271p. 1993.

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

Rocha, M.G.B.; Pires, I. E.; Rocha, R. B.; Xavier, A.; Cruz, C. D. Seleção de genitores de *Eucalyptus grandis* e de *Eucalyptus urophylla* para produção de híbridos interespecíficos utilizando REML/BLUP e informação de divergência genética. Revista Árvore. Viçosa. v.31. p.977-987. 2007.

Rosado, A. M.; Rosado, T.B.; Júnior, M. F. R.R.; Bhering, L. L.; Cruz, C. D. Ganhos genéticos preditos por diferentes métodos de seleção em progênes de *Eucalyptus urophylla*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília. v.44. p.1653-1659. 2009.

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 caribaea* var. *hondurensis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, v.35, n.11, p.2243-2253, 2000.