**VARIABILIDADE GENÉTICA ISOENZIMÁTICA EM UMA POPULAÇÃO DE
Eucalyptus grandis Hill ex Maiden SUBMETIDA
A DIFERENTES INTENSIDADES DE SELEÇÃO**

EDSON SEIZO MORI

Engenheiro Florestal

Orientador: Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Maio - 1993

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - FCLQ/USP

M854v Mori, Edson Seizo
Variabilidade genética isoenzimática em uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção. Piracicaba, 1993.

119p.

Tese - ESALQ
Bibliografia

1. Eletroforese 2. Eucalipto - Melhoramento
3. Eucalipto - População - Variabilidade genética 4.
Eucalipto - Seleção I. Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 634.9734

VARIABILIDADE GENÉTICA ISOENZIMÁTICA EM UMA POPULAÇÃO DE
Eucalyptus grandis Hill ex Maiden SUBMETIDA
A DIFERENTES INTENSIDADES DE SELEÇÃO

EDSON SEIZO MORI

Aprovado em: 23.06.93

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama	ESALQ/USP
Prof. Dr. Roland Vencovsky	ESALQ/USP
Prof. Dr. Mário Ferreira	ESALQ/USP
Prof ^a Dr ^a Catalina Romero Lopes	IB/UNESP
Prof. Dr. Mário Luiz Teixeira de Moraes	FEIS/UNESP

Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama

- Orientador -

Aos meus pais Kiyoshi

e Ieitico

DEDICO

À minha esposa Neide

e nossos filhos:

Gisele, Otávio

e Augusto

OFEREÇO

Ao nosso Grande Mestre

JESUS

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me auxiliaram nesta importante etapa de minha vida profissional. Especial deferência ficam registradas para:

Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama pela orientação, amizade e a quem mais devo este trabalho;

Prof. Dr. Norberto da Silva pelo apoio irrestrito e amizade sempre presente;

Profa. Dra Catalina Romero Lopes, Prof. Celso Marino e equipe de trabalho do Departamento de Genética do IB/UNESP/Botucatu pela cessão de seu laboratório para nosso uso e apoio sobre as técnicas de eletroforese de enzimas;

Prof. Dr. Mário Luiz Teixeira de Moraes, grande companheiro, amigo de todas as horas e pelas preciosas sugestões em nosso trabalho;

Prof. Dr. Roland Vencovsky pelas preciosas sugestões feitas a este trabalho, principalmente sobre a metodologia biométrica;

Prof. Dr. Mário Ferreira pelas sugestões de grande importância que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho;

Companhia Suzano de Papel e Celulose por ter cedido seu material genético e parte dos materiais de consumo utilizados no presente trabalho; agradecimentos especiais aos engenheiros Shinitiro Oda, Ana Luiza de M. Menck e Eduardo e ao técnico Edson Luiz Marchi e equipe pela preciosa colaboração e amizade;

IPEF-ESALQ/USP, por ter concedido o início de nosso Curso de pós-graduação;

Departamento de Agricultura e Melhoramento Vegetal, FCA - Botucatu e UNESP pela oportunidade da realização desta Pós-graduação;

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida;

Docentes e funcionários dos Departamentos de Genética e Ciências Florestais da ESALQ/USP pelos ensinamentos concedidos e amizade;

Marião, Paiva, Luiz António, Chico, Maria Inês Faraldo, Maisa, Marquinhos, Marcão e demais colegas de pós-graduação, pela convivência, amizade e troca de experiências profissionais e de vida;

Elza Martins pelo auxílio nas atividades de laboratório na ESALQ;

Funcionários do Departamento de Agricultura e Melhoramento Vegetal da FCA/UNESP - Botucatu pela amizade e apoio em nosso presente trabalho: Edna Maria P. da Silva, Vera L. Rossi, Rubens R. de Souza, Ciro V. de Oliveira, Paulo Silva, Teresa M. da Silva, Edna A. Leite, Jalmira T. R. Pagnozzi, Maurilio A. de OLiveira, Dorival P. de Arruda, Rosemeire A. B. Ballesteros e José P. Albuquerque;

Funcionários do Departamento de Genética do IB/UNESP - Botucatu apoio e amizade;

o amigo que me apoiou, mas ficou ausente desta relação.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Informações gerais sobre o <i>E. grandis</i>	4
2.2. Variabilidade em populações de espécies florestais.....	6
2.3. Sistema reprodutivo de espécies florestais.....	13
2.3.1. Autofecundação em espécies florestais.....	15
2.3.2. Fecundação cruzada em espécies florestais.	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Material	22
3.1.1. População de <i>E. grandis</i>	22
3.1.2. Tecidos de plantas para eletroforese.....	24
3.1.2.1. Plantas com cinco meses de idade...	24
3.1.2.2. Plantas com nove anos de idade.....	25
3.2. Métodos	25
3.2.1. Análises eletroforéticas	26
3.2.1.1. Escolha dos sistemas isoenzimáticos	26
3.2.1.2. Extração de isoenzimas	27
3.2.1.3. Procedimentos de eletroforese	27
3.2.1.4. Leitura dos zimogramas	33

3.2.2. Análise genético-biométrica	33
3.2.2.1. Análise de variância	33
3.2.2.2. Componentes de variância	36
3.2.2.3. Variabilidade genética	39
a. Heterozigosidade ($\hat{H}$)	39
b. índice de fixação ou coeficiente de endogamia ($\hat{F}$)	40
c. Distância genética ($\hat{D}$)	40
d. índice de identidade genética ($\hat{I}$) ...	41
e. Estatísticas $\hat{F}$	42
3.2.2.4. Sistema reprodutivo	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Procedimentos de eletroforese e padrões de iso- enzimas	45
4.2. Interpretação genética dos zimogramas	51
4.3. Estimativas de parâmetros genético-biométricos.	57
4.4. Análises de variância individuais e conjunta ..	69
4.5. Perdas de alelos por redução no N_e populacional	79
4.6. Fluxo gênico contaminante	84
5. CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
APÊNDICE	108

VARIABILIDADE GENÉTICA ISOENZIMÁTICA EM UMA POPULAÇÃO DE
Eucalyptus grandis Hill ex Maiden SUBMETIDA A DIFERENTES
INTENSIDADES DE SELEÇÃO

Autor: Edson Seizo Mori

Orientador: Paulo Yoshio Kageyama

RESUMO

Uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, instalada no município de Itatinga-S.P., foi submetida a diferentes intensidades de seleção e agrupadas em lotes para recombinação de genótipos superiores, denominados de Pomares de Sementes.

Cinco subpopulações experimentais foram utilizadas para estudos de isoenzimas. Foram compostas por 6, 14 e 35 clones, previamente selecionadas para características quantitativas comerciais. Utilizou-se, também, duas sub-populações formadas pelas progênies de meios irmãos dos 6 clones polinizados pelos 35 clones e dos 14 clones recombinados entre si, ambas por meio de polinizações abertas.

A eletroforese de isoenzimas foi realizada em meios suportes de penetrose de milho, utilizando plântulas com 5 meses e com 9 anos de idade. Avaliou-se todos os clones-mães e 20 progênies das populações selecionadas compostas por 14 e 6 clones, por meio de 8 locos isoenzimáticos.

cos, a relacionar: IDH (3 alelos), MDH₁ (2 alelos), MDH₂ (2 alelos), LAP₂ (6 alelos), SKDH (4 alelos), Alfa-EST₁ (6 alelos), Alfa-EST₂ (3 alelos) e Alfa-EST₃ (4 alelos).

Com base em interpretações genotípicas dos locos isoenzimáticos, procedeu-se estimativas biométricas dos parâmetros de variabilidade e daqueles que inferiram sobre o sistema reprodutivo das populações. As principais conclusões foram:

a . O material estudado apresentou endogamia dentro das subpopulações ($\hat{f} = 0,0769$) e a taxa média de cruzamentos ($\hat{t}\%$) foi de 88%, mostrando desvios na panmixia das subpopulações; a espécie apresentou comportamento de planta intermediária preferencialmente alógama;

b . Houve presença de fluxo gênico contaminante nos lotes de recombinação, apesar dos seus isolamentos a distâncias superiores a 500 m. das populações comerciais;

c . Houve pequena distância genética entre as subpopulações, como observado nas estimativas dos parâmetros $\hat{F}_{ST} = 0,011$ (WRIGHT, 1978), $\hat{\theta}_2 = 0,000$ (WEIR, 1990) e $\hat{D} = 0,010$ (NEI, 1972);

d . As seleções ocasionaram perdas alélicas e levaram à fixação de alelos em locos isoenzimáticos originalmente polimórficos.

GENETIC VARIABILITY OF ISOZYMES IN A POPULATION OF
Eucalyptus grandis Hill ex Maiden SUBMITTED TO DIFFERENT
SELECTION INTENSITIES

Author: Edson Seizo Mori

Adviser: Paulo Yoshio Kageyama

SUMMARY

An *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden population located in Itatinga county, São Paulo State, Brazil, was submitted to different selection intensities and planted in different seed orchard for seed production.

Five experimental subpopulations were utilized for isozyme studies. They were composed by samples of 6, 14 and 35 clones, previously by selected for commercial quantitative traits. Half-sib progenies from the 6 clones, open pollinated by 35 clones and half-sib from 14 clones, open pollinated among them were also analysed.

Elektrophoretic plates were run in corn starch gel utilizing seedlings with 5 months and plants with 9 years old. Every clone and twenty individuals per progeny were analysed for 8 isozymes loci including: IDH (3 alleles), MDH₁ (2 alleles), MDH₂ (2 alleles), LAP₂ (6 alleles), SKDH (4 alleles), Alfa-EST₁ (6 alleles), Alfa-EST₂ (3 alleles) and Alfa-EST₃ (4 alleles).

Based on genetic interpretation of isozymes loci, variability parameters related to mating system were estimated. The main conclusions were:

- a. Inbreeding was notice within the studied subpopulations ($\hat{f} = 0.0769$) and the average outcrossing rate was 88%, demonstrating a deviation from a perfect panmixia, an indication that *E. grandis* is a partially open pollinated species;
- b. A contaminant gene flow was observed in the seed orchards, even considering an isolation distance higher than 500m from commercial plantings;
- c. There was small genetic distances among subpopulations, as observed by the following parameters: $\hat{F}_{ST} = 0.011$ (WRIGTH, 1978), $\hat{\theta}_2 = 0.000$ (WEIR, 1990) and $\hat{D} = 0.010$ (NEI, 1972);
- d. Due to the selection process some polimorphic loci, in the original subpopulations, were fixed in homozygous conditions.

1 . INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden é uma das espécies mais utilizadas em plantações comerciais no Brasil. Do ponto de vista genético, é uma das mais estudadas do gênero e, praticamente, toda pesquisa em melhoramento genético, no país, é desenvolvida na forma tradicional, através de experimentos de campo, envolvendo longos períodos de avaliações.

A técnica de eletroforese de isoenzimas tem sido aplicada em povoamentos naturais de *Eucalyptus grandis* na Austrália, com muito sucesso . Possibilita a obtenção de respostas rápidas para uma cultura que possui ciclo reprodutivo relativamente longo (MORAN & BELL, 1983). A vantagem do método é devida ao fato de que as isoenzimas são produtos primários da expressão gênica (RUDIN & LINDGREEN, 1977). Dessa forma, a técnica oferece a oportunidade para se obter informações sobre o genoma de indivíduos num curto espaço de tempo e com menor influência ambiental.

A área comumente utilizada para recombinação de genótipos superiores de eucaliptos é denominada Pomar de

Sementes, sendo que poucos estudos básicos foram feitos sobre o sistema reprodutivo nesta importante etapa do melhoramento genético florestal. Estudos sobre variabilidade isoenzimática em populações de tamanhos efetivos restritos, como são os casos de populações base para melhoramento, praticamente inexistem. Pesquisas dessa natureza seriam importantes por possibilitarem uma melhor escolha da estratégia para condução de programas de melhoramento genético florestal.

A perda de variabilidade através de deriva genética, em etapas de seleção em um programa de melhoramento genético, pode ser muito acentuada, dependendo do tamanho efetivo populacional utilizado. Programas visando altos ganhos, a curto prazo, se mal acompanhados, podem sofrer sérios riscos por vulnerabilidade genética. O *Eucalyptus grandis*, por ser uma espécie preferencialmente alógama, perene, de ciclo vegetativo longo, tem sofrido, na maioria das vezes, alta pressão de seleção inicial. Este procedimento tem acarretado maiores produtividades em estágios iniciais, naturalmente, em detrimento de perdas gênicas ao longo do programa.

O monitoramento do processo de erosão genética é uma importante ferramenta à disposição do melhorista, para que possa modificar e interceder em estratégia de condução de programas de melhoramento, a qualquer momento, quando necessário.

Visando acompanhar e avaliar a variabilidade genética no decorrer de um programa de melhoramento, o presente trabalho teve por objetivos os seguintes:

a . determinar o sistema reprodutivo dos indivíduos da população melhorada (Pomar de Sementes) de **Eucalyptus grandis**;

b . quantificar a variabilidade genética na população de **Eucalyptus grandis** submetida a diferentes intensidades de seleção.

2 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 . Informações gerais sobre o *Eucalyptus grandis*

O gênero *Eucalyptus* pertence à família *Myrtaceae*, apresenta por volta de 600 espécies taxonômicas, grande número de variedades e alguns híbridos interespecíficos. A grande maioria delas são endêmicas da Austrália, mas um número reduzido de espécies aparecem em ilhas da vizinhança (PRYOR, 1976).

O *Eucalyptus grandis* ocorre naturalmente na Austrália, desde o norte do Estado de New South Wales até o sul de Queensland, equivalendo latitudes compreendidas entre 32°51' a 17° (BURGESS, 1983). Segundo HALL et alii (1970), a precipitação pluviométrica varia de 1.000 a 1.700 mm anuais, predominantemente no verão, sendo que a estação seca não ultrapassa 3 meses. As geadas são ocasionais nas regiões mais interiores do continente. A temperatura média das máximas do mês mais quente está compreendida entre 29 a 32°C e a média das mínimas do mês mais frio entre 5 a 6°C.

Em regiões naturais a espécie é tipicamente encontrada em povoamentos homogêneos e, também, consorciados ao *Eucalyptus pilularis* ou com espécies da floresta pluvial (BURGESS, 1983).

O *Eucalyptus grandis*, por sua importância silvicultural, dotado de excelentes qualidades como matéria prima madeireira, com bom comportamento adaptativo a amplas condições ecológicas, é uma das espécies importantes plantadas no Brasil e em muitos países de clima tropical. Coff's Harbour-Austrália é a origem da população mais plantada, com programas de melhoramento em gerações avançadas de seleção, principalmente, para produtividade (KAGEYAMA, 1983).

A madeira de *Eucalyptus grandis* é de fácil manuseio, apresentando densidade de madeira que varia entre 580 a 640 Kg/m³ a 12% de umidade. É utilizada intensivamente na Austrália e África do Sul, no ramo de construções e caixotaria. Normalmente a madeira apresenta, quando oriunda de árvores de rápido crescimento, problemas de empenamento, contrações e rachaduras na ocasião do desbobo. Plantações convenientemente manejadas podem apresentar madeiras de excelentes qualidades para serraria e laminação. Juntamente com o *E. saligna*, constituem-se na principal fonte de matéria-prima para celulose e papel no Brasil (FERREIRA, 1978).

Segundo HALL et alii (1970), o *E. grandis* é utilizado para tábuas e construção em geral, postes, papel e celulose, energia e outros usos. AGUIAR (1985) acrescenta, ainda, que a espécie, também, é utilizada para vigas laminadas, painéis compensados e outros tipos de chapas de boa qualidade.

2.2 . Variabilidade em populações de espécies florestais

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

Os genes passados de uma geração para outra são amostras da geração parental. Por isso, a frequência gênica está sujeita à variação causada pela amostragem entre gerações sucessivas e, quanto menor for o número de pais, maior será a variação entre as amostras. Em populações grandes a variação atribuída à amostragem é tão pequena que pode ser desprezada. Na prática, considera-se uma população grande aquela na qual o número de indivíduos está na ordem das centenas e não das dezenas (FALCONER, 1987).

Uma população finita está sujeita a desvios nas proporções esperadas por Hardy-Weinberg. Há, também, erros sistemáticos de amostragem causados por deriva, ocasionando diferentes grupos de genótipos. O erro pode se tornar importante em situações onde possam existir grande número de alelos raros (CROW & KIMURA, 1970).

FALCONER (1987) relatou, ainda, que em pequenas populações as frequências gênicas estão sujeitas a flutuações ao acaso, originadas pela amostragem de gametas. Os gametas que transmitem genes para a geração seguinte carregam a amostra de genes da geração parental e, se a amostra não for adequada, as frequências gênicas estarão sujeitas a modificações entre uma geração e a seguinte. Esta mudança de frequências gênicas, ao acaso, é denominada de processo dispersivo ou deriva genética.

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

Para se quantificar a variação existente em uma determinada população, é necessário quantificar os locos polimórficos e a percentagem de indivíduos heterozigotos existentes na população. Através de metodologia tradicional de genética quantitativa seria difícil determinar a quantidade de locos polimórficos existentes. A técnica de eletroforese de enzimas oferece a oportunidade para se estimar, de imediato, a quantidade de locos em homozigose e heterozigose presentes nos indivíduos. Normalmente, para a estimativa da variação genética, utilizam-se duas medidas principais: o polimorfismo e a quantidade de heterozigose (AYALA & KIGER JR., 1984).

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

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

PAIVA (1992) estudou a proporção de locos polimórficos em dois seringais (*Hevea brasiliensis*) nativos, através da análise de 4 locos isoenzimáticos. O critério utilizado foi considerar um loco polimórfico quando a

frequência do alelo mais comum não ultrapassar 95%. O autor citado verificou que uma das populações apresentou 100% de polimorfismo e a outra 75%.

A estrutura genética de populações, refletida na variação inter-locos nos estudos de isoenzimas, está sujeita a forças evolutivas tais como a mutação, a seleção e a deriva genética. A variação intra-locos, identificável nos estudos de laboratório, depende do tamanho da amostra e das frequências dos alelos no loco estudado (NEI & ROYCHOUDHURY, 1974). Do levantamento bibliográfico realizado até o momento, a heterozigosidade (H) em populações de espécies florestais varia de 0,19 a 0,41. As coníferas têm apresentado valores de heterozigosidade média superiores às folhosas.

Com base no estudo de 18 locos isoenzimáticos, MORAN & HOPPER (1983), estudando a diversidade genética em duas subespécies de *Eucalyptus caesia* no sudeste da Austrália, encontraram os seguintes resultados de diversidade genética média ($\bar{H}$) e diferenciação de população ($DST/\bar{H}$) como apresentado na Tabela 1.

TABELA 1. Diferenciação genética em duas sub-espécies de *Eucalyptus caesia*.

Subespécies	$\bar{H}$	DST / $\bar{H}$ (%)
caesia	0,106	99,4
magna	0,102	42,9
total	0,123	134,7

$\bar{H}$ é a diversidade genética média dentro de populações por loco variável;

DST = HT - $\bar{H}$, onde HT é a diversidade genética total por loco variável por espécie (NEI, 1975).

Fonte: MORAN & HOPPER (1983).

A diversidade genética média dentro de populações de *Eucalyptus caesia* foi baixa ($\bar{H}$ = 0,123), em contraste, a somatória da diversidade genética entre as sub-espécies *E. caesia caesia* e *E. caesia magna* foi extremamente alta (DST / $\bar{H}\%$ = 134.7%)

HOPPER & MORAN (1981), estudando 11 populações naturais de *Eucalyptus stoatei*, através de 3 locos isoenzimáticos e 6 alelos, observaram heterozigosidades (quantidades de heterozigose) médias de 0,40 para as populações parentais e 0,33 para as populações de suas progênies. Para o *Eucalyptus regnans*, os valores de heterozigosidade foram de 0,35 para a população parental e 0,32 para a população de suas progênies (MORAN et alii, 1989). Estes autores estudaram uma população composta por 40 progênies, analisadas através de 10 locos isoenzimáticos.

Estudando duas populações de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* F.F & M.F. Allemão), uma de Bauru-S.P. e a outra de Selvíria-M.S., MORAES (1992) encontrou maior variação genética dentro de populações ($\hat{H}_S = 96,4\%$) e a menor variação foi obtida entre as populações ($\hat{G}_{St} = 3,6\%$).

PAIVA (1992) também constatou que a maior proporção da variabilidade genética foi encontrada dentro de populações ($\hat{H}_S = 0,3351$) de seringueira, correspondendo a 99,8% da variação total e a variação entre populações foi de apenas 0,03%.

Apesar do fato da aroeira ser uma planta dióica, MORAES (1992) encontrou valores expressivos de endogamia em duas populações naturais da espécie. Os índices de fixação de WRIGHT (1978) apresentados foram de 0,499 dentro de populações ($\hat{F}_{IS}$) e 0,035 entre as populações

($\hat{F}_{ST}$). Testando a metodologia de WEIR (1990), também, pôde-se observar que o coeficiente de endogamia dentro de populações foi de 0,495 e a distância genética entre populações foi de 0,049. Estes valores expressivos, segundo o autor citado, ocorreram em consequência de cruzamentos entre indivíduos aparentados que se distribuem próximos uns aos outros em condições naturais de florestas perturbadas pelo homem.

A heterozigosidade de 11 populações naturais de *Pinus rigida* foi determinada por GURIES & LEDIG (1982). Os autores citados encontraram maior heterozigosidade entre árvores dentro das populações do que entre populações. Quando compararam as populações, observaram que as mais periféricas, quanto à distribuição geográfica da espécie, tenderam a apresentar menor variabilidade genética.

Estudos de WEBER et alii (1984) com *Pseudotsuga menziensis* demonstraram que alguns locos isoenzimáticos atuantes em tecidos de folhas juvenis e adultas da espécie, também estão atuantes em sementes e plântulas. Segundo MORAN & BELL (1983), os locos MDH₁, MDH₂, PGI₁, PGI₂, 6PGD₁, 6PGD₂ e SKDH₁ apresentaram as mesmas atividades isoenzimáticas em tecidos de sementes, plântulas, folhas juvenis e adultas de espécies de *Eucalyptus*. Alguns locos apresentaram atividades isoenzimáticas específicas para determinados tecidos. Os locos ACP₁, ACP₂, GOT₁, GOT₂, GOT₃, LAP₁, LAP₂ e PGM₁ somente apresentaram atividada-

des em fase de plântula; o loco IDH_1 não apresentou atividade na fase de semente.

O método de multilocos para a estimativa do sistema reprodutivo de RITLAND & JAIN (1981) e a estratégia de amostragem apresentada por SHAW & BROWN (1982) sugerem que para estudos de eucaliptos seria mais eficiente o emprego de 5 a 10 locos, com alto a moderado número de alelos. Porém, quanto maior o número de locos estudados as estimativas serão melhores e mais representativas.

Alguns locos isoenzimáticos de eucaliptos foram agrupados em classes, de acordo com seus níveis de variabilidade genética (MORAN & BELL, 1983). O loco LAP_2 foi classificado como altamente polimórfico. Os locos $SKDH_1$, MDH_2 , PGM_1 , ACP_3 , GOT_2 e ADH_1 foram considerados moderadamente polimórficos e os locos IDH_1 , MDH_1 , EST_2 , LAP_1 , GOT_1 , GOT_3 , ACP_1 , ACP_2 , δPGD_1 , δPGD_2 , GDH_1 e GDH_2 apresentaram-se como pouco polimórficos. O loco PGI_1 foi considerado monomórfico. Apesar de, os autores citados apresentarem esta classificação de polimorfismo, pouco auxilia, pois é muito subjetiva. Cada espécie ou população pode se comportar diferentemente.

2.3 . Sistema reprodutivo de espécies florestais

Os eucaliptos possuem flores hermafroditas, com ocorrência de protandria na maior parte das espécies. A

protândria é um mecanismo que contribui para a panmixia e sua ocorrência vem reforçar a predominância de cruzamentos no gênero *Eucalyptus* (HODGSON, 1976).

No Brasil, o principal inseto polinizador de eucaliptos é a abelha *Apis mellifera* L., introduzida da Europa. Dentre os insetos polinizadores nativos, os mais importantes, segundo AMARAL (1960), pertencem aos gêneros *Megachilinae*, *Bombus*, *Xylocarpa* e outros.

Utilizando as raças Cordovan e a Caucasiana de *Apis mellifera* L., marcadas com ^{32}P , LEVIN (1961) determinou o comportamento das abelhas na cultura de alfafa em pleno florescimento. Constatou atividades de coleta mais intensa a distâncias de aproximadamente 100m da colméia. Os estudos mostraram, também, que foram encontradas abelhas marcadas a distância de até 1.462m das colméias.

LEE (1961), também utilizando o ^{32}P , estudou o comportamento da raça Cordovan, de *Apis mellifera*, em plantações de mirtilos e de maçã, mostrando que o número de abelhas diminui com o aumento da distância das colméias. Operárias radioativas foram encontradas até a distância de 4.200m das colméias.

Marcadores isoenzimáticos vêm sendo utilizados para se estimar o grau de dispersão efetiva e contaminação de pólen em pomares de sementes. Estudos sobre dispersão de pólen em dois pomares de sementes de *Pinus sylvestris*, através de marcadores isoenzimáticos, foram ci-

tados por ADAMS (1983), comentando que estudos dessa natureza têm muita importância, tanto para programas de melhoramento, como para se obter informações sobre a estrutura genética de populações.

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

2.3.1 . Autofecundação em espécies florestais

A ocorrência de autofecundação em espécies florestais tem sido detectada a partir de estudos com marcadores morfológicos (albinismo, nanismo, cores de cotilédones, etc), a partir de frequência de óvulos abortados (KAGEYAMA, 1981) e, mais recentemente, pelo uso das isoenzimas (BROWN & ALLARD, 1970; KAGEYAMA, 1981).

Melhoristas e geneticistas florestais, tradicionalmente, utilizam características morfológicas, controladas por um simples par de genes. Para estudos genéticos, o albinismo é o mais utilizado para estimativas de proporção de descendência formadas a partir de autofecunda-

ção. Uma árvore heterozigota, para esta característica rara, poderá apresentar progênies albinas (característica recessiva) quando cruzada, mas apresentará 25% de genótipos homozigotos recessivos se autofecundada (MITTON, 1983).

ANDRADE (1960) e VAN WYK (1980) também utilizaram o albinismo para estudos de autofertilização. MAEDA (1987), estudando o albinismo em pomares de sementes de *Eucalyptus grandis*, encontrou uma taxa de autofecundação média de 5,6%, representando um coeficiente de endogamia de 0,03.

Em coníferas, o fluxo gênico também tem sido estudado com base em marcadores morfológicos. Normalmente, pesquisas dessa natureza baseiam-se em pequeno número de indivíduos e geralmente os valores encontrados para autofecundação são menores que 20% (SQUILACE, 1974).

As espécies de *Eucalyptus* são consideradas predominantemente de cruzamento, mas aceitam certas taxas de autofertilização (PRYOR, 1976). Estimativas utilizando variações isoenzimáticas confirmaram que para a espécie *Eucalyptus obliqua* (BROWN et alii, 1975) ocorreu uma taxa de 24% de autofecundação e para o *E. pauciflora* (PHILLIPS & BROWN, 1977) a autofecundação chegou a 37%.

A taxa de autofecundação é um importante fator para determinar a composição genética e o tamanho de plantações comerciais. Sua presença pode reduzir a produção de sementes e a produtividade de plantações (SORENSEN,

1971). Em programas de melhoramento, há evidências de depressão por endogamia em diversas espécies florestais. O desenvolvimento de estratégias para se evitar a endogamia pode possibilitar ganhos consideráveis (MORAN et alii, 1980).

GRIFFIN et alii (1987) encontraram grande parcela de endogamia em *Eucalyptus regnans*, devida ao cruzamento entre aparentados crescendo em suas proximidades na população. Este efeito marcante da autofecundação sobre o crescimento de plantas, germinação de sementes e outras características em eucaliptos tem sido bem documentados. As evidências sugerem que o sistema reprodutivo misto é mantido, sob condições naturais, por seleção contrária aos endogâmicos, ocorrendo auto-desbaste no estabelecimento da população.

2.3.2 . Fecundação cruzada em espécies florestais

A técnica de eletroforese de isoenzimas vem apresentando resultados satisfatórios para a determinação de estimativas de taxas de cruzamento em populações de plantas (BROWN & ALLARD, 1970). De fato, este procedimento possibilita analisar um grande número de locos num indivíduo, permitindo formular procedimentos estatísticos, para se estimar a fertilização cruzada (BROWN et alii, 1978;

RITLAND & JAIN, 1981; SHAW et alii, 1981).

Revendo a literatura sobre 10 espécies de *Eucalyptus*, MORAN & BELL (1983) observaram que o gênero possui um modelo de acasalamento misto, com predominância para cruzamentos e ocorrência de certa parcela de autofecundação.

MORAN & BROWN (1980), estudando uma população de *Eucalyptus delegatensis*, encontraram uma taxa média de cruzamento de 77%. Variações que ocorreram nas taxas de cruzamento da espécie, em períodos diferentes, podem ser resultados de influências ambientais. Os autores citados observaram, também, diferentes estimativas para taxas de cruzamento: plantios mais jovens apresentaram 66% de cruzamentos e para plantios mais velhos uma taxa de 85%. No decorrer do tempo, sob a ação da seleção natural, os indivíduos com genótipos mais endogâmicos, tendem a perecer. Por esta razão, plantios mais velhos possuem a tendência de possuírem taxas de cruzamentos mais elevados que os plantios mais jovens.

Dentro de uma espécie, a variação geográfica pode influenciar o sistema reprodutivo, através de variações de clima, estresse por umidade, altitude, natureza dos polinizadores, etc (CLEG, 1980). O autor citado observou que populações de diferentes altitudes apresentaram diferentes taxas de cruzamento.

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

Diversos estudos em populações naturais de espécies de eucaliptos têm mostrado que as espécies possuem um sistema reprodutivo preferencialmente por cruzamento. Todavia, têm apresentado uma substancial fração de endogamia, por volta de 22%, demonstrando haver certa taxa de autofertilização e de cruzamentos entre aparentados (BROWN et alii, 1975; PHILIPS & BROWN, 1977; BROWN & MORAN, 1981; MORAN & BELL, 1983).

GRIFFIN & COTTERILL (1988) mostraram um aumento de 12% na taxa de crescimento nas plantações de *Eucalyptus regnans* com 4 anos de idade, originadas de cruzamentos controlados, quando comparados a plantas originadas de sementes de polinização aberta.

Em espécies polinizadas predominantemente por pássaros, como é o caso do *Eucalyptus stoatei*, a atividade de coleta de néctar entre flores sugere haver uma alta taxa de polinização cruzada na população; entretanto, a ta-

xa de cruzamento observada por HOPPER & MORAN (1981) foi de 82%.

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

A Tabela 2 apresenta taxas médias de cruzamentos ($\hat{t}_s$) para 10 espécies de *Eucalyptus*. Os valores das taxas são semelhantes sugerindo que as espécies do gênero, de modo geral, obedecem a um modelo de sistema reprodutivo misto, com predominância de cruzamento.

TABELA 2. Estimativas médias de taxas de cruzamentos ($\hat{ts}$) para algumas espécies de *Eucalyptus* em populações naturais.

ESPÉCIE	nº de populações	nº de locos	$\hat{ts}\%$	REFERÊNCIA
<i>E. obliqua</i>	4	3	76	BROWN et alii(1975)
<i>E. pauciflora</i>	3	7	63	PHILLIPS & BROWN(1977)
<i>E. delegatensis</i>	4	3	77	MORAN & BROWN(1980)
<i>E. regnans</i>	1	4	69	MORAN & BELL (1983)
<i>E. regnans</i>	1	10	74	MORAN et alii(1989)
<i>E. regnans</i> (*)	1	10	91	MORAN et alii(1989)
<i>E. stellulata</i>	1	3	77	MORAN & BELL (1983)
<i>E. stoatei</i>	1	3	82	HOPPER & MORAN(1981)
<i>E. kitsoniana</i>	2	3	77	FRIPPS(1982)
<i>E. citriodora</i>	1	3	86	YEH et alii(1983)
<i>E. grandis</i>	2	6	84	MORAN & BELL (1983)
<i>E. saligna</i>	1	6	77	MORAN & BELL (1983)
MÉDIA			78%	

Observação: (*)- Estimativa realizada em Pomar de Sementes.

3 . MATERIAL E MÉTODOS

3.1 . MATERIAL

3.1.1. População de *Eucalyptus grandis*

Utilizou-se uma população de *Eucalyptus grandis*, melhorada para características quantitativas comerciais, obtida dentro de um programa de melhoramento genético, em andamento. A citada população foi submetida a diferentes intensidades de seleção, com o objetivo de implantação de pomares de sementes na fase comercial do programa. A partir deste procedimento, teve-se início o presente trabalho, avaliando-se as subpopulações em duas gerações, conforme apresentado a seguir:

1. Subpopulação selecionada original composta por 35 clones (Pomar de Sementes Grande);
2. Subpopulação selecionada 1 composta por 14 clones da subpopulação selecionada original (Pomar de Sementes Intermediário);
3. Progênies da subpopulação selecionada 1 originárias da recombinação dos 14 clones, por polinização aberta (PG1);
4. Subpopulação selecionada 2 composta por 6 clones da subpopulação selecionada original (Pomar de Sementes Pequeno);
5. Progênies da subpopulação selecionada 2 originárias da recombinação dos 6 clones (parental feminino) pelos 35 clones da subpopulação selecionada original (parental masculino), por polinização aberta (PG2).

Coff's Harbour-Austrália é a primeira procedência da subpopulação selecionada original. Os Pomares de Sementes Grande, Intermediário e Pequeno localizam-se no município de Itatinga-S.P. e ocupam, respectivamente, áreas de 07, 01 e 01 hectares. Os clones, com 9 anos de idade, estão dispostos em espaçamento de 7 x 6 m entre rametes.

Para as análises eletroforéticas foram utilizadas amostras de 20 indivíduos para cada uma das progê

nies PG1 e PG2. O apêndice 01 apresenta os números dos clones e das progênies utilizados no presente estudo para esclarecimentos complementares.

3.1.2. Tecidos das plantas para eletroforese de isoenzimas

Para a extração das enzimas, foram utilizadas plantas em dois estádios de desenvolvimento: plantas com cinco meses após semeadura (progênies das subpopulações selecionadas 1 e 2) e plantas com nove anos de idade (subpopulações selecionadas original, 1 e 2).

3.1.2.1. Plantas com cinco meses de idade

As plantas foram cultivadas em condições de casa de vegetação com 50% de sombra, com doses periódicas de adubação nitrogenada para conservar os tecidos foliares tenros, pouco lignificados e com menores quantidades de compostos fenólicos, indesejáveis na ocasião da extração de enzimas.

Para o procedimento de extração, foram utilizadas as primeiras folhas das gemas apical e laterais presentes nos indivíduos.

3.1.2.2. Plantas com nove anos de idade

Para as plantas adultas foram adotados dois procedimentos:

- a. folhas de ramos colhidos da copa das árvores no campo;
- b. folhas de brotações, de gemas epicórmicas, de galhos colhidos no campo e deixados para brotar dentro de baldes com água, em casa de vegetação.

3.2. MÉTODOS

Para se compreender o procedimento de condução do presente trabalho, esclarece-se que foi realizada, inicialmente, uma etapa preliminar para definição e refinamento dos protocolos de eletroforese de enzimas para o *Eucalyptus grandis*. Existem referências bibliográficas para o gênero *Eucalyptus*, porém, para a espécie, poucos protocolos foram discriminados em literatura.

Após definição da metodologia de laboratório, procedeu-se a etapa de avaliações genéticas com base em padrões de isoenzimas.

3.2.1. Análises eletroforéticas

3.2.1.1. Escolha dos sistemas isoenzimáticos

Realizaram-se análises eletroforéticas dos 18 sistemas isoenzimáticos e seus respectivos códigos (E.C.) da "Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry (1976)", discriminados a seguir: Aspartato Aminotransferase (AAT- E.C.2.6.1.1); Fosfatase Ácida (ACP- E.C.3.1.3.2); Álcool Desidrogenase (ADH- E.C.1.1.1.1); Catalase (CAT- E.C.1.11.1.6); Diaforase (DIA-E.C.1.8.1.4); Alfa-Esterase (Alfa-EST- E.C.3.1.1.1); Beta-Esterase (Beta-EST- E.C.3.1.1.1); Glutamato Desidrogenase (GDH- E.C.1.4.1.3); Glucose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH- E.C.1.1.1.49); Isocitrato Desidrogenase (IDH- E.C.1.1.1.42); Leucina Aminopeptidase (LAP- E.C.3.4.11.1); Manitol Desidrogenase (MADH- E.C.1.1.1.67); Malato Desidrogenase (MDH- E.C.1.1.1.37); Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Desidrogenase (NADHDH- E.C.1.6.99.3); Peroxidase (PER- E.C.1.11.1.7); Polifenoloxidase (PPO- E.C.1.14.18.1); Sorbitol Desidrogenase (SDH- E.C.1.1.1.14) e Shiquimato Desidrogenase (SKDH- E.C.1.1.1.25).

Após os testes preliminares, optou-se por desenvolver apenas os sistemas enzimáticos IDH, MDH, LAP, SKDH e Alfa-EST, que apresentaram os melhores resultados

para os tecidos de limbos foliares de plantas com 2 a 5 meses e com 9 anos de idade.

3.2.1.2. Extração de isoenzimas

Para a extração de isoenzimas foi empregada, para cada amostra, 30 mg de tecidos de limbo foliar, 08 mg de PVPP (Polivinil Polipirrolidona) e 100 µl da solução de extração de ALFENAS et alii (1991).

Os tecidos foram macerados em placas de porcelana com bastão de vidro, em ambiente com temperatura por volta de 5°C, para evitar a desnaturação das isoenzimas.

3.2.1.3. Procedimentos de eletroforese

A técnica de eletroforese baseou-se na migração das isoenzimas em géis de penetrose horizontais dentro de câmaras frias, com temperatura variando de 2 a 5°C.

Os sistemas tampão gel/eletrodo utilizados são apresentados na Tabela 03.

TABELA 03. Sistemas tampão gel/eletrodo para diferentes sistemas enzimáticos.

ENZIMA	TAMPÃO	REFERÊNCIA
<hr/>		
. CITRATO-MORFOLINA (CM)		CLAYTON & TRETIK (1972)
IDH	eletrodo: 0,04M ácido cítrico	
MDH	pH 6,1 titulado com	
LAP	N-(3-aminopropil)morfolina	
	gel: diluição de 1:20 do Tampão do eletrodo	
<hr/>		
. TRIS-CITRATO (TC)		SOLTIS et alii (1983)
SKDH	eletrodo: 0,223M Tris	
Alfa-EST	0,086M ácido cítrico	
	pH 7,5 titulado com NaOH	
	gel: diluição para 3,5% do tampão do eletrodo	
<hr/>		

Para a corrida eletroforética, utilizou-se 40 mA de corrente constante e voltagem de 160 V para o sistema TC e 280 V para o sistema CM. Após 30 minutos do início das corridas as amostras de papéis de filtro que continham as isoenzimas eram retirados. Para ambos os casos o tempo de corrida foi de 08 horas, quando a frente do marcador bromofenol atingia de 08 a 10 cm de migração.

Utilizaram-se géis de penetrose de milho, a uma concentração de 13%, como meio suporte para a eletroforese. O amido mais comumente utilizado na literatura é o de batata. Porém, foram realizados testes com a penetrose de milho e observou-se que a mesma apresentava o mesmo padrão de zimograma para todos os sistemas isoenzimáticos utilizados. Tendo em vista que a penetrose tem custo menor que o amido de batata, que é importado e de custo mais elevado, optou-se pela utilização da penetrose de milho.

Os sistemas enzimáticos empregados para o desenvolvimento do estudo foram:

- Isocitrato Desidrogenase (IDH - E.C.1.1.1.42);
- Malato Desidrogenase (MDH - E.C.1.1.1.37);
- Leucina Aminopeptidase (LAP - E.C.3.4.11.1);
- Shiquimato Desidrogenase (SKDH - E.C.1.1.1.25);
- Esterase (ALFA-EST - E.C.3.1.1.1).

Completada a migração e separação das isoenzimas, os géis foram cortados em 4 fatias de 2,5 mm de espessura cada uma. Para os géis do sistema CM de CLAYTON & TRETIK (1972), a primeira camada (superior) foi eliminada, a segunda utilizada para a coloração da Isocitrato desidrogenase (IDH), a terceira para a Malato desidrogenase (MDH) e a quarta para a Leucina aminopeptidase (LAP). No caso dos géis do sistema TC de SOLTIS et alii (1983), as duas primeiras camadas foram desprezadas, sendo a terceira utilizada para a coloração da Shiquimato desidrogenase

(SKDH) e a quarta para a Alfa-Esterase (A-EST).

Os protocolos utilizados na revelação das isoenzimas sofreram modificações a partir de:

- SOLTIS et alii (1983) para o IDH e LAP;
- YAMADA & GURIES (1989) para o MDH e SKDH;
- STUBER et alii (1988) para a ALFA-EST e

apresentados a seguir:

- Alfa-EST (Alfa- Esterase)

Solução" A "

.Alfa-Naftil Acetato	02ml (40mg)
.Tampão fosfato de sódio, pH 6,0	80ml

Solução" B "

.Fast Garnet GBC (salt)	80mg
.N-Propanol	05ml
tampão fosfato de sódio, pH 6,0	20ml

Procedimento: o gel foi mergulhado na solução" A " por 20 minutos, após o período, adicionou-se a solução B; tempo de revelação: 40 minutos; temperatura: 37°C.

-IDH (Isocitrato desidrogenase)

.DL-Ácido Isocítrico, Na ₃	200mg
.MTT	15mg

.NADP ⁺	15mg
.PMS	02mg
.MgCl ₂	02mg
.Tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0	100ml

Procedimento: diluíram-se todos os reagentes no tampão e os géis foram mergulhados na solução e incubados no escuro; tempo de revelação: 30 minutos; temperatura: 37°C.

-LAP (Leucina aminopeptidase)

.L-Leucina-Beta-naftilamida-HCl	15mg
.Fast Black K (salt)	30mg
.Tampão Tris-maleato, pH 6,0	100ml

Procedimento: diluíram-se os dois reagentes no tampão e os géis foram mergulhados na solução e incubados no escuro; tempo de revelação: 60 minutos; temperatura: 37°C

-MDH (Malato desidrogenase)

.DL-Ácido málico 0,5M, pH 8,0	04ml
.MTT	10mg
.NAD ⁺	20mg
.PMS	02mg
.Tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,5	100ml

Procedimento: todos os reagentes de coloração foram diluídos no tampão e a este foi acrescentada a solução do substrato; os géis foram mergulhados na solução e incubados no escuro; tempo de revelação: 30 minutos; temperatura: 37°C

-SKDH (Shiquimato desidrogenase)

.Ácido shiquímico	100mg
.MTT	10mg
.NADP ⁺	10mg
.PMS	02mg
.Tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,5	100ml

Procedimento: misturaram-se todos os reagentes e posteriormente os géis foram mergulhados nesta solução e incubados no escuro; tempo de revelação: 30 minutos; temperatura: 37°C.

Reveladas as isoenzimas os géis foram lavados com água destilada e fixados em solução de glicerina a 10%, por 15 minutos e desidratados em solução de metanol 65% mais glicerina 0,5%, por 2 horas. Em seguida, após desidratação completa dos géis, foram colocados em bastidores para secagem em folhas de papel celofane, segundo a metodologia descrita por ALFENAS et alii (1991).

3.2.1.4. Leitura dos zimogramas

A leitura dos zimogramas ocorreu logo após a fixação das isoenzimas, quando foram desenhadas em filme plástico com canetas de retroprojektor, guardando as dimensões originais, todas as bandas presentes nos géis, inclusive a marca de migração do bromofenol, presente em todos os géis para comparações relativas entre eles. O parâmetro utilizado foi o RM (migração relativa) descrita por CHELIAK & PITEL (1984). Considerou-se como banda padrão aquela que apareceu com maior frequência na população.

3.2.2. Análise genético-biométrica

3.2.2.1. Análise de variância

Para a estimativa dos parâmetros genéticos variância entre subpopulações (σ_p^2), variância entre famílias/subpopulação (σ_F^2), variância entre indivíduos/família/subpopulação (σ_I^2), variância entre genes/indivíduo/família/subpopulação (σ_G^2), variância total (σ_T^2), grau de parentesco dentro de famílias ($\hat{\theta}_1$), distância genética entre subpopulações ($\hat{\theta}_2$), coeficiente de endogamia entre plantas nas subpopulações ($\hat{F}$), coeficiente de endogamia dentro de subpopulações ($\hat{f}$) e taxa aparente de cruzamentos ($\hat{t}$), utilizou-se a análise de variância em esquema hierárquico des-

balanceado, conforme modelo desenvolvido por WEIR (1990) e VENCovsky (1992). Este procedimento baseia-se em realizar uma análise de variância para cada alelo identificado nas leituras dos zimogramas de isoenzimas.

O modelo matemático empregado, contendo três níveis hierárquicos foi:

$$Y_{ijkl} = m + p_i + f_j(i) + h_k(ij) + g_l(ijk)$$

onde: Y_{ijkl} é a frequência do gene l , dentro do indivíduo k , da família j , da população i ;

m é a média geral;

p_i é o efeito da subpopulação i , com $i=1,2,\dots,a$;

$f_j(i)$ é o efeito da família j dentro da subpopulação i , com $j=1,2,\dots,b_i$;

$h_k(ij)$ é o efeito do indivíduo k dentro da família j e da subpopulação i , com $k=1,2,\dots,c_{ij}$;

$g_l(ijk)$ é o efeito do gene l , dentro do indivíduo k , na família j , da subpopulação i , com $l=1,2,\dots,n_{ijk}$.

O esquema de análise de variância está apresentado na tabela 04.

TABELA 04. Esquema da análise de variância de modelo hierárquico desbalanceado, para um alelo de um loco, contendo como fontes de variação subpopulações (P); famílias (F/P); indivíduos (I/F/P) e genes (G/I/F/P), segundo WEIR (1990).

TV	GL	QM	E(QM)
Populações	$a - 1$	QM_P	$\sigma_6^2 + 2\sigma_1^2 + k_2\sigma_F^2 + k_3\sigma_P^2$
Famílias	$\sum_{i=1}^a b_i - a$	QM_F	$\sigma_6^2 + 2\sigma_1^2 + k_1\sigma_F^2$
Indivíduos	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} c_{ij} - \sum_{i=1}^a b_i$	QM_I	$\sigma_6^2 + 2\sigma_1^2$
Genes	$n - \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} c_{ij}$	QM_G	σ_6^2

nota: k_1 , k_2 e k_3 foram calculados conforme procedimentos de ANDERSON & BANCROFT (1952) e SNEDECOR (1956).

3.2.2.2. Componentes de variância

As estimativas dos componentes de variância foram obtidas segundo a metodologia de WEIR (1990) e desdobradas a partir da Tabela 04, conforme se segue:

$$\hat{\sigma}_G^2 = QM_G$$

$$\hat{\sigma}_I^2 = (QM_I - QM_G) / 2$$

$$\hat{\sigma}_F^2 = (QM_F - QM_I) / k_1$$

$$\hat{\sigma}_P^2 = (QM_P - QM_I - k_2 \cdot \hat{\sigma}_F^2) / k_3$$

$$\hat{\sigma}_T^2 = \hat{\sigma}_G^2 + \hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_F^2 + \hat{\sigma}_P^2 = \hat{p} (1 - \hat{p})$$

Para a análise de variâncias, o procedimento adotado seguiu o proposto por WEIR (1990) e VENCOSKY (1992) onde os dados de entrada de frequências alélicas foram $x = 1$, se o alelo em análise está presente, e $x = 0$ quando ausente no indivíduo em questão. Portanto, o conteúdo genético de determinado gene é:

$$\hat{\sigma}_T^2 = \hat{p} (1 - \hat{p})$$

$$\hat{\sigma}_P^2 = \hat{p} (1 - \hat{p}) \hat{\theta}_2$$

$$\hat{\sigma}_F^2 = \hat{p} (1 - \hat{p}) (\hat{\theta}_1 - \hat{\theta}_2)$$

$$\hat{\sigma}_I^2 = \hat{p} (1 - \hat{p}) (\hat{F} - \hat{\theta}_1)$$

$$\hat{\sigma}_G^2 = \hat{p} (1 - \hat{p}) (1 - \hat{F})$$

onde: $\hat{p}$ é a frequência do alelo em questão;

$\hat{\theta}_2$ é a medida do grau de associação ou correlação das frequências gênicas dentro das subpopulações; é, também, uma medida de quantificação das distâncias genéticas entre subpopulações;

$\hat{\theta}_1$ é o coeficiente de coancestralidade;

$\hat{F}$ é o coeficiente de endogamia para toda a espécie, descrita por Wright.

Os coeficientes de coancestralidade ($\hat{\theta}_1$), correlação das frequências gênicas dentro de subpopulações ($\hat{\theta}_2$), o coeficiente de endogamia (de Wright) para a espécie ($\hat{F}$), o coeficiente de endogamia dentro de subpopulação ($\hat{f}$) e a taxa de fertilização cruzada da espécie ($\hat{t}$), para cada alelo foram obtidos através de:

$$\hat{\theta}_1 = (\hat{\sigma}_P^2 + \hat{\sigma}_F^2) / \hat{\sigma}_T^2$$

$$\hat{\theta}_2 = \hat{\sigma}_P^2 / \hat{\sigma}_T^2$$

$$\hat{F} = 1 - (\hat{\sigma}_G^2 / \hat{\sigma}_T^2)$$

$$\hat{f} = (\hat{F} - \hat{\theta}_2) / (1 - \hat{\theta}_2)$$

$$\hat{t} = (1 - \hat{f}) / (1 + \hat{f})$$

A análise conjunta considerando todos os alelos de cada um dos locos separadamente e todos os locos simultaneamente, para as estimativas dos parâmetros $\hat{\theta}_1$, $\hat{\theta}_2$, $\hat{F}$, $\hat{f}$ e $\hat{t}$ foi obtida através da média dos quadrados médios individuais, ponderados pelos graus de liberdade:

$$QM_P = (\sum SQ_P) / (\sum GL_P) ;$$

$$QM_F = (\sum SQ_F) / (\sum GL_F) ;$$

$$QM_I = (\sum SQ_I) / (\sum GL_I) ;$$

$$QM_G = (\sum SQ_G) / (\sum GL_G) .$$

3.2.2.3. Variabilidade genética

Para a obtenção de estimativas de frequências alélicas e genotípicas, testes de contingência, medida de variabilidade genética, as estatísticas F de WRIGHT (1978), distância genética e identidade de NEI (1972) entre subpopulações, utilizou-se um pacote estatístico para computador denominado BIOSYS-1, desenvolvido por SWOFFORD & SELANDER (1989), que apresentou as estimativas dos parâmetros mostrados nos sub-ítems de a até e, apresentados a seguir.

Para se estimar o polimorfismo de um determinado loco, considerou-se como tal aquele cuja frequência do alelo mais comum não ultrapassava a 0,95.

a . Heterozigosidade ($\hat{H}$)

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

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

onde P_{ii} é a frequência observada de genótipos homozigotos do alelo i .

Segundo NEI (1975), para se calcular heterozigosidade média ($\bar{H}$), considera-se a média desses valores, obtidos em todos os locos analisados.

b . índice de fixação ou coeficiente de endogamia ($\hat{F}$)

O índice de fixação desenvolvido por WRIGHT (1965) baseia-se em frequências observadas ($\hat{H}_O$) e esperadas ($\hat{H}_e$) de heterozigotos. A expressão é :

$$\hat{F} = 1 - (\hat{H}_O / \hat{H}_e)$$

c . Distância genética ($\hat{D}$)

A distância genética ($\hat{D}$) entre duas subpopulações foi estimada conforme os procedimentos descritos em NEI (1972). A expressão é:

$$\hat{D} = - \ln \hat{I}$$

onde $\hat{I}$ é o índice de identidade genética.

d . índice de identidade genética ($\hat{I}$)

Baseados em frequências alélicas de locos homólogos nas diferentes subpopulações, o índice de identidade genética ($\hat{I}$) utilizado neste trabalho foi baseado em NEI (1972):

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

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

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

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

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

e . Estatísticas $\hat{F}$

O outro procedimento utilizado para se obter a diversidade genética foi o descrito por WRIGHT (1965), que consiste nas seguintes expressões:

$$(1 - \hat{F}_{IT}) = (1 - \hat{F}_{IS})(1 - \hat{F}_{ST})$$

$$\text{ou} \quad \hat{F}_{IT} = \hat{F}_{ST} + (1 - \hat{F}_{ST}) \cdot \hat{F}_{IS}$$

sendo: $\hat{F}_{IT}$ é o índice de fixação para a subpopulação, ou seja, é a probabilidade total de identidade num determinado indivíduo I;

$\hat{F}_{IS}$ é o índice de fixação que ocorre dentro de subpopulação, ou seja, é a probabilidade de que 2 genes sejam homólogos no indivíduo I derivado do mesmo gene de um ancestral comum dentro da subpopulação;

$\hat{F}_{ST}$ é o índice de fixação para alelos por locos, ou seja, é a probabilidade de que 2 genes sejam homólogos, combinados ao acaso na subpopulação, ambos originários de um gene na subpopulação.

3.2.2.4. Sistema Reprodutivo

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

$$\hat{f} = (1 - \hat{t}) / (1 + \hat{t})$$

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

$$\hat{t} = (1 - \hat{f}) / (1 + \hat{f})$$

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

(1990). A expressão é a seguinte:

$$\hat{f} = (\hat{H}_e - \hat{H}_o) / \hat{H}_e$$

onde:

$\hat{H}_e = 1 - \sum P_u^2$, sendo P_u^2 a frequência esperada de homozigotos para o alelo u ;

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

As variâncias referentes à taxa de cruzamento e coeficiente de endogamia podem ser estimadas através de WEIR (1990) e Vencovsky (1992), citado por PAIVA (1992).

4 . RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Procedimentos de eletroforese e padrões de isoenzimas

Diferentes procedimentos foram utilizados, para se obter os protocolos finais de eletroforese para o desenvolvimento do presente estudo. Tecidos de sementes e cotilédones foram utilizados, testando-se diversas soluções de extração. Utilizou-se, também, extrações com e sem nitrogênio líquido.

Para folhas, a extração de enzimas sem a utilização de nitrogênio líquido foi a melhor opção. Nos tecidos foliares, existem grandes quantidades de substâncias fenólicas que dificultam o processo de extração. Para se obter uma boa extração em folhas, é necessário utilizar tecidos tenros e pouco lignificados. A solução de extração que melhor resultado apresentou foi o de ALFENAS et alii (1991).

Embora os padrões de zimogramas obtidos a partir de extrações de tecidos de sementes e cotilédones

terem se apresentado promissores, têm como inconveniente destruir os indivíduos para se proceder a extração, pois estes órgãos de eucaliptos, em geral, são muito pequenos. Por esta razão, optou-se por utilizar tecidos de limbo foliares de plântulas, com conservação das mesmas, para futuras avaliações e acompanhamentos.

BURGESS & BELL (1983) apresentaram protocolos desenvolvidos para o *Eucalyptus grandis*. Preliminarmente, estes foram testados, mas com pouco sucesso para as condições e material utilizado no presente trabalho. Os autores citados utilizaram plântulas com 5 dias e com 5 semanas de idade e, neste trabalho, foram utilizados materiais com 5 meses e com 9 anos de idade.

Outros sistemas de corridas para eletroforese de enzimas foram pesquisados, tais como os protocolos de FRIPP (1982), desenvolvidos para o *Eucalyptus kitsoniana* e os apresentados por MORAN & BELL (1983), para as espécies do gênero *Eucalytus* em geral. Todavia, os protocolos que melhores resultados apresentaram foram os TC e B/TC de SOLTIS et alii (1983); CM de CLAYTON & TRETIK (1972); HC e HT de FILDES & HARRIS (1966) e LB/T de RIDGWAY et alii (1970).

A tabela 05 apresenta o resultado dos 18 sistemas enzimáticos testados, utilizando folhas jovens de plântulas com 2 a 5 meses de idade.

TABELA 05. Sistemas enzimáticos testados em 6 sistemas tampão gel/eletrodo [TC - Tris citrato, CM - Citrato morfolina, HC - Histidina Citrato, HT - Histidina Tris, LB/T - Lítio Borato (gel) e Tris (eletrodo) e B/TC - Borato (gel) e Tris Citrato (eletrodo)] e seus respectivos níveis de resolução eletroforética (0, 1, 2 e 3).

Sistema Enzimático	Sistema tampão gel e eletrodo						Máximo
	TC	CM	HC	HT	LB/T	B/TC	
AAT	2	0	-	2	-	1+	2
ACP	1+	2	2+	2	0	1+	2+
ADH	3	0	-	3	-	-	3
CAT	3	0	-	-	-	-	3
DIA	2+	1	-	1	-	-	2+
Alfa-EST	3	1	1+	-	-	-	3
Beta-EST	3	1	1+	-	-	-	3
GDH	2	-	-	2	2	-	2
G6PDH	2	0	-	-	-	-	2
IDH	2	3	-	-	-	-	3
LAP	2+	3	-	2	-	-	3
MADH	1	0	-	-	-	-	1
MDH	2+	3	1+	-	0	1+	3
NADHDH	2	-	-	-	-	-	2
PER	2	3	-	-	0	-	3
PPO	-	0	-	-	-	-	0
SDH	1	-	-	-	-	-	1
SKDH	3	1	-	-	-	-	3

classes de padrões eletroforéticos:

- = não testado;

0 = não apareceram bandas;

1 = padrão de bandas ruins (borrões);

2 = padrão de bandas pouco nítidas ou não separadas;

3 = padrão de bandas nítidas e separadas

Observação: .o sinal (+) significa um padrão um pouco melhor que a média da classe a que pertence;

Dos sistemas enzimáticos estudados em *Eucalyptus grandis*, não se conseguiu nenhum resultado positivo para o PPO (Polifenoloxidase). Para os sistemas MADH (Manitol Desidrogenase) e SDH (Sorbitol Desidrogenase), apareceram somente alguns borrões, mostrando haver potencialidades, se melhor estudados.

Os sistemas AAT (Aspartato Aminotransferase), GDH (Glutamato Desidrogenase), G6PDH (Glucose-6-Fosfato Desidrogenase) e NADHHDH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Desidrogenase) apresentaram padrões de bandas pouco nítidos nos zimogramas quando utilizados tecidos de folhas jovens.

Dentre as enzimas estudadas, as que melhores resultados apresentaram foram:

- ACP (Fosfatase Ácida)

A enzima apresentou atividades nos três tipos de tecidos estudados. Os padrões conseguidos para sementes e cotilédones foram excelentes. Para folhas jovens, porém, obteve-se somente um padrão 2 com bandas pouco nítidas para alguns locos. Do ponto de vista estrutural a enzima é formada por uma subunidade polipeptídica (monômero) e o fenótipo do zimograma de um heterozigoto apresenta duas bandas.

- ADH (Álcool Desidrogenase)

A ADH parece estar presente em abundância desde a semente até os primeiros estádios de plântula (2 meses após germinação). A partir deste estágio, pode não haver atividade enzimática suficiente para aparecer nos zimogramas. O heterozigoto mostra um fenótipo composto por três bandas no zimograma. Estruturalmente a enzima é formada por duas subunidades polipeptídicas (dímero).

- CAT (Catalase)

Como para o caso da ADH, a CAT apresentou bons resultados somente para folhas jovens de plântulas com até 2 meses de idade. Plântulas com mais idade podem apresentar ou não atividade enzimática. O heterozigoto é formado por 4 subunidades polipeptídicas (tetramero).

- DIA (Diaforase)

A DIA também parece estar ligada ao estágio de desenvolvimento da plântula. Em idades mais jovens o padrão isoenzimático aparece com maior nitidez. Para o *E. grandis*, o heterozigoto é composto por 1 subunidade polipeptídica (monômero).

- Alfa e Beta-EST (Alfa e Beta-Esterase)

As Alfa e Beta-Esterase apresentaram atividades enzimáticas coincidentes para os 3 tipos de tecidos utilizados (sementes, cotilédones e folhas). Apresentam 4 locos enzimáticos e o heterozigoto possui um padrão monomérico (1 subunidade polipeptídica).

- IDH (Isocitrato Desidrogenase)

Esta enzima apresentou um padrão de resolução muito bom. Aparece somente um loco enzimático no zimograma de *E. grandis*. Os heterozigotos são monoméricos (1 subunidade polipeptídica).

- **LAP (Leucina Aminopeptidase)**

Possui 2 locos enzimáticos, porém o mais rápido possui pouca atividade, às vezes não sendo visível em todos os zimogramas. O loco mais lento possui uma atividade bastante intensa e apresenta grande polimorfismo de alelos. O heterozigoto é monomérico (1 subunidade polipeptídica).

- **MDH (Malato Desidrogenase)**

Das isoenzimas estudadas, a MDH foi a que apresentou bandas mais nítidas e padrão mais constante em todos os zimogramas. O *E. grandis* possui 2 locos enzimáticos, sendo o mais rápido quase monomórfico e o mais lento apresentando somente 2 alelos na população estudada. O heterozigoto é composto por 2 subunidades polipeptídicas (dímero).

- **PER (Peroxidase)**

A Peroxidase ocorre em sementes, cotilédones, radículas e em folhas jovens de plântulas com idade até 2 meses. Possui atividades anódica e catódica. O heterozigoto apresenta um padrão monomérico (1 subunidade polipeptídica).

- **SKDH (Shiquimato Desidrogenase)**

Esta enzima apresentou somente 1 loco enzimático no material estudado e o heterozigoto é monomérico (1 subunidade polipeptídica).

Com base nos resultados obtidos para os sistemas enzimáticos testados, optou-se por utilizar os 5 sistemas (IDH, MDH, LAP, ALFA-EST e SKDH) que apresentaram os melhores padrões de zimogramas, para tecidos de limbo foliar nas idades de 5 meses após semeadura e de 9 anos.

4.2 . Interpretação genética de zimogramas

Leitura e interpretação de zimogramas constituem etapa muito importante para a análise genética através de isoenzimas. A literatura aponta muitos trabalhos apresentando padrões genéticos em diferentes locos isoenzimáticos em diversas espécies de eucaliptos, tais como os de BROWN et alii (1975), MORAN & BROWN (1980), FRIPP (1982), MORAN & BELL (1983), BURGESS & BELL (1983), MORAN & HOPPER (1983), dentre outros.

A análise do polimorfismo genético observado nos diferentes locos isoenzimáticos estudados, obedeceu a critérios de distâncias de migração das bandas no gel, em relação ao alelo mais frequente nos indivíduos em todas as populações. Considerou-se 100 a migração do alelo mais frequente e os demais foram codificados de acordo com a distância relativa à banda, deste alelo padrão.

As figuras 01 e 02 mostram os esquemas dos padrões eletroforéticos, encontrados na leitura dos zimogramas dos 8 locos isoenzimáticos para as 5 populações.

FIGURA 01. Zimogramas dos padrões eletroforéticos apresentando os fenótipos dos locos IDH, SKDH, MDH₁ e MDH₂ e seus respectivos RMs e genótipos.

FIGURA 02. Zimogramas dos padrões eletroforéticos apresentando os fenótipos dos locos LAP₂, EST₁, EST₂ e EST₃ com seus respectivos RMs e genótipos.

No sistema isoenzimático isocitrato desidrogenase (IDH), houve o aparecimento de um loco bem nítido e um segundo loco cuja presença foi esporádica, com presenças e ausências de bandas entre amostras. Por esta razão, estudou-se somente o loco mais lento do zimograma. Nas populações em questão, observou-se a presença de 3 alelos, cuja migração relativa (RM) do alelo 2 foi de 119 em relação ao alelo 1, o mais frequente, que foi padronizado ter valor igual a 100. O alelo 3 teve migração mais lenta que os demais, com valor de RM igual a 86. Os heterozigotos presentes apresentaram comportamento de monômeros, ou seja, a enzima tem sua estrutura molecular composta por apenas uma subunidade de cadeia de polipeptídeos. BURGESS & BELL (1983) também encontraram um loco de IDH, com presença de 3 alelos em populações naturais de *Eucalyptus grandis*.

O sistema malato desidrogenase (MDH) também apresentou 2 locos isoenzimáticos (MDH₁ E MDH₂). O loco MDH₁ é monomórfico. A banda de migração do alelo 1, o mais comum, foi considerado padrão, com RM 100. O alelo 2, raro, teve migração mais lenta na marca de 92. O heterozigoto apresentou uma banda heterodimérica com RM 96.

No loco MDH₂, ocorreram 2 alelos com RMs iguais a 100 (alelo 1) e 62. O heterozigoto tem comportamento dimérico apresentando, no fenótipo, uma banda heterodimérica com RM igual a 81.

Os padrões de zimograma encontrados estão em conformidade aos descritos por MORAN & BELL (1983). De maneira geral, em eucaliptos existem 3 locos de MDH, todos possuem conformação molecular dimérica, sem bandas heterodiméricas entre locos. O loco MDH₃, segundo os autores, não aparecem consistentemente em todos os géis e materiais testados. Por esta razão, são pouco utilizados em estudos genéticos.

BURGESS & BELL (1983), comparando populações naturais das espécies *Eucalyptus grandis* e *E. saligna*, apresentaram padrões de zimogramas semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Mostraram no loco MDH₁, o de maior migração, a presença de 1 alelo mais rápido, com altíssima frequência (0,99) e apenas mais um alelo raro (0,001), mais lento. No segundo loco MDH₂, observaram a presença de 2 alelos, sendo o mais rápido o de maior frequência (0,78) e o mais lento com frequência 0,22. Para os dois locos, os resultados foram muito semelhantes aos padrões encontrados no presente trabalho.

Encontrou-se, também, 2 locos isoenzimáticos na leucina aminopeptidase (LAP). Como no caso do IDH, o loco 1 não apareceu com muita constância nos géis e considerou-se, somente, os resultados do LAP₂. O heterozigoto da isoenzima é composto de uma única subunidade (monômero). Identificou-se neste loco a presença de 6 alelos com RM iguais a 100, 113, 124, 138, 141 e 90, respectivamente, pa-

ra os alelos de 1 a 6. Todos os genótipos observados estão presentes na Figura 02 .

BURGESS & BELL (1983) confirmaram a presença de 2 alelos no *Eucalyptus grandis* e *E. saligna*, com aparecimento de 7 alelos no LAP₂, o mais lento e com presença mais nítida e forte após coloração. Diversas outras espécies de eucaliptos foram citados por MORAN & BELL (1983) e apresentaram padrões de zimograma similares aos de *E. grandis*, variando em termos de frequências gênicas e números de alelos.

O sistema enzimático shiquimato desidrogenase (SKDH) apresentou um único loco gênico com 4 alelos. Os valores de RMs foram 100, 112, 89 e 80, respectivamente, para os alelos de 1 a 4. Os heterozigotos são monoméricos.

Baseados em literatura, MORAN & BELL (1983) observaram um simples loco monomérico SKDH, em diversas espécies do gênero *Eucalyptus*. O loco pode apresentar-se muito polimórfico quanto aos seus alelos. Os autores assinalaram a presença de 5 alelos no *E. stellulata*.

Para o esterase (EST), ocorreram 4 locos isoenzimáticos. O EST₄ não foi possível ser analisado, por muitas vezes não apresentar nitidez suficiente para a análise genética.

Estão presentes no EST₁, alelos que, de 1 a 6, apresentaram respectivos RMs iguais a 100, 96, 102, 107, 116 e 93. Observou-se no EST₂ a presença de 3 alelos, sendo

100 o RM do alelo 1, 112 do alelo 2 e 93 para o outro alelo. Os heterozigotos para os três locos estudados apresentaram comportamento de enzimas monoméricas. Existe uma sobreposição entre o alelo 2 do EST₁ com o alelo 2 do EST₂. Os dois locos migram superpostos. O alelo 3 apresenta-se nitidamente isolado dos demais.

O EST₃ apresentou 4 alelos com RMs iguais a 100, 115, 120 e 92, respectivamente para os alelos de 1 a 4.

Todos os 3 locos estudados por BURGESS & BELL (1983) foram, igualmente, monoméricos, em conformidade aos encontrados no presente trabalho. O EST₂ foi o loco melhor estudado pelos autores pelo seu polimorfismo alélico e nitidez de apresentação nos géis.

4.3. Parâmetros genético-biométricos

Para a estimativa da variabilidade genética, através de parâmetros isoenzimáticos, a tabela 06 apresenta as frequências de 26 alelos de 8 locos, nas 5 subpopulações estudadas.

TABELA 06. Frequências alélicas nas 5 subpopulações de *E.grandis*.

LOCO	ALELO	SUBPOPULAÇÃO					MÉDIA
		1	2	3	4	5	
IDH	1	0,929	0,893	0,924	0,750	0,758	0,851
	2	0,057	0,107	0,076	0,167	0,200	0,121
	3	0,014	0,000	0,000	0,083	0,042	0,028
	n	35	14	275	6	120	-
MDH ₁	1	1,000	1,000	0,998	1,000	1,000	1,000
	2	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000
	n	35	14	275	6	120	-
MDH ₂	1	0,829	0,857	0,898	0,833	0,863	0,856
	2	0,171	0,143	0,102	0,167	0,138	0,144
	n	35	14	275	6	120	-
LAP ₂	1	0,514	0,536	0,543	0,583	0,487	0,532
	2	0,129	0,179	0,157	0,083	0,191	0,148
	3	0,243	0,214	0,206	0,333	0,212	0,242
	4	0,071	0,071	0,087	0,000	0,102	0,066
	5	0,043	0,000	0,007	0,000	0,004	0,011
	6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,001
	n	35	14	276	6	120	-
SKDH	1	0,886	0,964	0,946	1,000	0,971	0,953
	2	0,029	0,000	0,013	0,000	0,004	0,009
	3	0,057	0,036	0,040	0,000	0,021	0,031
	4	0,029	0,000	0,002	0,000	0,004	0,007
	n	35	14	276	6	120	-
EST ₁	1	0,543	0,500	0,502	0,667	0,596	0,561
	2	0,186	0,214	0,214	0,250	0,167	0,206
	3	0,143	0,179	0,179	0,000	0,112	0,123
	4	0,086	0,107	0,105	0,083	0,104	0,097
	5	0,043	0,000	0,000	0,000	0,017	0,012
	6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,001
	n	35	14	280	6	120	-
EST ₂	1	0,686	0,679	0,688	0,750	0,804	0,721
	2	0,314	0,321	0,312	0,250	0,179	0,275
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,004
	n	35	14	279	6	120	-
EST ₃	1	0,800	0,857	0,773	1,000	0,835	0,853
	2	0,171	0,143	0,227	0,000	0,131	0,135
	3	0,014	0,000	0,000	0,000	0,025	0,008
	4	0,014	0,000	0,000	0,000	0,008	0,004
	n	35	14	275	6	118	-

n - número de indivíduos analisados

O loco MDH₁ apresentou-se monomórfico para as 5 subpopulações. Para os demais locos estudados houve polimorfismo de alelos, estando presentes 2 alelos no MDH₂,

3 alelos nos IDH e EST₂, 4 alelos nos SKDH e EST₃ e 6 alelos nos locos LAP₂ e EST₁.

Dos locos polimórficos, os alelos mais frequentes foram apresentados no intervalo de 0,953 de frequência no SKDH, até 0,532 no LAP₂. Dentre os menos frequentes, os valores variaram entre 0,001 no LAP₂ e EST₁ até 0,144 no MDH₁.

No loco IDH observou-se 3 alelos. O alelo 3, menos frequente, não está presente nas subpopulações 2 e 3. A frequência mais alta foi verificada ser do alelo 1 da subpopulação 1 (0,929) e a mais baixa foi a do alelo 3 da mesma subpopulação (0,014).

Existem, praticamente, 2 alelos na EST₂, presentes nas subpopulações 1, 2, 3 e 4. Na subpopulação 5, houve o aparecimento do alelo 3, em baixa frequência (0,017). No loco EST₃ a subpopulação 3 tem o alelo 1 fixado. Nas subpopulações 2 e 3, aparecem o alelo 2 e as subpopulações 1 e 5 apresentaram um total de 4 alelos.

A variabilidade das 5 subpopulações é apresentada na tabela 07, através das estimativas dos parâmetros: número médio de alelos por loco, percentagem de locos polimórficos a 99% e 95%, e heterozigosidade média esperada (H_e) e observada (H_o).

TABELA 07. Variabilidade genética de 5 subpopulações de *Eucalyptus grandis* com base em 8 locos.

	SUBPOPULAÇÕES				
	1	2	3	4	5
TAMANHO DA AMOSTRA	35,0	14,0	275,1	6,0	119,5
MÉDIA POR LOCO	(0,0)	(0,0)	(1,2)	(0,0)	(0,3)
NÚMERO MÉDIO DE ALELOS POR LOCO	3,3	2,4	2,9	2,0	3,6
	(0,5)	(0,4)	(0,4)	(0,3)	(0,6)
PERCENTAGEM DE LOCOS POLIMÓRFICOS (0,95)	87,5	75,0	87,5	62,5	75,0
PERCENTAGEM DE LOCOS POLIMÓRFICOS (0,99)	87,5	87,5	87,5	62,5	87,5
QUANTIDADE DE HETEROZIGOSE MÉDIA OBSERVADA ($\hat{H}_o$)	0,364	0,321	0,286	0,313	0,288
	(0,092)	(0,093)	(0,081)	(0,107)	(0,073)
QUANTIDADE DE HETEROZIGOSE MÉDIA ESPERADA ($\hat{H}_e$)	0,340	0,321	0,313	0,284	0,320
	(0,083)	(0,090)	(0,087)	(0,088)	(0,083)

Observação: a quantidade de heterozigose esperada foi baseada em NEI(1978)
 . os números entre parenteses referem-se aos desvios padrões

Os tamanhos das amostras médias por loco foram de 35,0; 14,0; 275,1; 6,0 e 119,5, respectivamente, para as subpopulações de 1 a 5. Houve variação no número médio de alelos por loco. As subpopulações de 1 a 5, tiveram médias respectivas de 3,3; 2,4; 2,9; 2,0 e 3,6 alelos por loco.

A percentagem de locos polimórficos foi calculada sob dois critérios: quando o alelo mais frequente não atingir valores de frequência superior a 0,95 e 0,99. Para o primeiro critério, observou-se valores de 87,5% para as subpopulações 1 e 3; 75,0% para as subpopulações 2 e 5 e 62,5% para a subpopulação 4. Considerando-se o critério de

0,99 todas as subpopulações apresentaram valores de 87,5%, exceto a subpopulação 4 que mostrou valor de 62,5%.

As quantidades de heterozigose média observada ($\hat{H}_O$) foram de 0,364; 0,321; 0,286; 0,313 e 0,288, respectivamente para as subpopulações de 3 a 5 e os valores de média esperada ($\hat{H}_e$) foram de 0,340; 0,321; 0,313; 0,284 e 0,320. As frequências esperada ($\hat{H}_e$) e observada ($\hat{H}_O$) de heterozigotos e o índice de fixação ($\hat{F}$) são apresentados na Tabela 08.

TABELA 08. Frequência esperada ($\hat{H}_e$) e observada ($\hat{H}_O$) de heterozigotos e índice de fixação ($\hat{F}$) de WRIGHT (1978) presentes nos diferentes locos.

LOCO	SUBPOPULAÇÃO	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_O$	$\hat{F}$
IDH	3	0,140	0,107	0,235
	5	0,385	0,300	0,217
MDH ₂	3	0,183	0,160	0,125
	5	0,238	0,258	-0,089
LAP ₂	3	0,632	0,570	0,096
	5	0,674	0,602	0,103
SKDH	3	0,104	0,098	0,059
	5	0,057	0,058	-0,023
EST ₁	3	0,660	0,614	0,068
	5	0,596	0,525	0,115
EST ₂	3	0,430	0,387	0,098
	5	0,322	0,233	0,273
EST ₃	3	0,352	0,345	0,016
	5	0,286	0,331	-0,159
MÉDIA	3	0,357	0,326	0,099
	5	0,365	0,330	0,062
	GERAL	0,361	0,328	0,081

Dentre as subpopulações estudadas, apenas a 3 e a 5 estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (como se observa na tabela 10), e frequências esperadas de heterozigotos somente podem ser estimadas em condição especial de equilíbrio. As frequências esperadas de heterozigotos para cada loco na subpopulação 3 variaram de 0,104 (SKDH) a 0,660 (EST₁) e para a subpopulação 5 variaram de 0,057 (SKDH) a 0,674 (LAP₂). A média para todos os locos e subpopulações foi de 0,361.

As frequências observadas de heterozigotos para cada loco da subpopulação 3 abrangeram um intervalo de 0,098 (SKDH) a 0,614 (EST₁) e para a subpopulação 5 a variação foi de 0,058 (SKDH) a 0,602 (LAP₂). Considerando todos os locos e subpopulações, obteve-se uma média de 0,328.

O índice de fixação ($\hat{F}$), para a subpopulação 3 teve uma variação de 0,016 (EST₃) a 0,235 (IDH) e a subpopulação 5 apresentou valores de -0,159 (EST₃) a 0,273 (EST₂). O índice de fixação médio foi igual a 0,081.

Para subpopulações em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o índice de fixação ($\hat{F}$) deveria ser zero. Valores acima de zero indicam ocorrência de endogamia e valores abaixo do nulo representam uma seleção favorável aos heterozogotos (BROWN et alii, 1975).

Valores positivos de F podem ser devidos a um ou ambos dos seguintes mecanismos (LI, 1955): i) endogamia devida a autofertilização; ii) diferenças em frequên-

cias alélicas no conjunto de pólen efetivo de cada árvore dentro de uma população (Efeito Wahlund). O segundo mecanismo representa a endogamia relativa na composição genotípica esperada se a população amostrada constituiu uma amostragem panmítica.

A subpopulação 3 apresentou índices de fixação com valores positivos para todos os locos e a subpopulação 5 apresentou 3 locos com valores negativos (MDH_2 , $SKDH$ e EST_3). Estes índices demonstraram estar havendo maior taxa de endogamia na subpopulação 3 em relação a 5, segundo as hipóteses explicativas de LI (1955). Relacionando este fato com a distribuição espacial, no campo, dos rametes dos clones dos dois pomares de sementes, observou-se que o pomar que originou a subpopulação 3, por ser originada pela recombinação de menor número de clones (14), teve maior probabilidade de intercruzar com rametes do mesmo clone, presentes na proximidades, ocasionando maior taxa de autofertilização, quando comparado a subpopulação 5 (progênies oriundas pela formação de 6 clones-mães com 35 clones polinizadores). O efeito Wahlund também deve estar presente, principalmente, na subpopulação 3 pois, além da distribuição dos rametes, o número deles não foi totalmente proporcional a todos os clones no pomar.

Os índices de fixação de WRIGTH (1978) são apresentados na Tabela 09. Apresenta-se os índices de fixação dentro ($\hat{F}_{IS}$), entre subpopulações ($\hat{F}_{ST}$) e total ($\hat{F}_{IT}$)

da espécie para todos os alelos, considerando-se as duas subpopulações de *Eucalyptus grandis*.

TABELA 09. índices de fixação dentro ($\hat{F}_{IS}$), entre subpopulações ($\hat{F}_{ST}$) e total da espécie ($\hat{F}_{IT}$), conforme procedimentos de WRIGHT (1.978), por alelo para as 2 subpopulações de *E. grandis*.

LOCO	$\hat{F}$	ALELO						MÉDIA
		1	2	3	4	5	6	
IDH	IS	0,196	0,296	-0,043	.	.	.	0,222
	ST	0,052	0,033	0,021	.	.	.	0,041
	IT	0,238	0,319	-0,021	.	.	.	0,254
MDH ₂	IS	0,004	0,004	.	.	.	.	0,004
	ST	0,003	0,003	.	.	.	.	0,003
	IT	0,007	0,007	.	.	.	.	0,007
LAP ₂	IS	0,107	0,067	0,161	0,025	-0,006	-0,004	0,100
	ST	0,003	0,002	0,000	0,001	0,000	0,002	0,002
	IT	0,109	0,069	0,161	0,026	-0,006	-0,002	0,101
SKDH	IS	0,043	0,207	-0,034	-0,003	.	.	0,030
	ST	0,004	0,002	0,003	0,000	.	.	0,003
	IT	0,047	0,208	-0,031	-0,003	.	.	0,033
EST ₁	IS	0,042	0,198	0,022	0,143	-0,017	-0,004	0,091
	ST	0,009	0,004	0,009	0,000	0,008	0,002	0,006
	IT	0,050	0,201	0,031	0,143	-0,008	-0,002	0,096
EST ₂	IS	0,177	0,177	-0,017	.	.	.	0,173
	ST	0,018	0,024	0,008	.	.	.	0,020
	IT	0,192	0,196	-0,008	.	.	.	0,190
EST ₃	IS	-0,078	-0,050	-0,026	-0,009	.	.	-0,062
	ST	0,006	0,016	0,013	0,004	.	.	0,011
	IT	-0,071	-0,033	-0,013	-0,004	.	.	-0,051
MÉDIA	IS							0,090
	ST							0,011
	IT							0,101

Da endogamia total, a maior parcela parece estar ligada à fixação dentro da subpopulação, que apresenta sempre os maiores valores. Em média o $\hat{F}_{IS}$ (dentro de subpopulação) foi 0,090, o $\hat{F}_{ST}$ (entre subpopulações) foi 0,011 e o $\hat{F}_{IT}$ (total para a espécie) foi de 0,100.

Os índices de fixação para aroeira, segundo MORAES (1992), foram muito diferentes aos obtidos para o *Eucalyptus grandis* no presente trabalho. Para a aroeira o índice de fixação dentro de populações foi alto ($\hat{F}_{IS} = 0,449$) quando comparado ao valor 0,090 encontrado para o *E. grandis*. Para seringueira, PAIVA (1992) obteve o parâmetro F_{IS} igual a 0,144 , também superior à espécie em estudo. É importante observar que os dois autores trabalharam com populações naturais e o trabalho ora conduzido teve seus dados obtidos a partir de subpopulações oriundas de pomares de sementes, ou seja, de plantações.

A Tabela 10 apresenta os números esperados e observados para os homozigotos com o alelo mais comum, heterozigotos composto para o alelo mais comum e o raro e os outros heterozigotos e o teste de qui-quadrado para todos os locos das 2 subpopulações.

TABELA 10. Qui-quadrado para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg para diferente locos e 2 subpopulações

LOCOS	CLASSES (1)	SUBPOPULAÇÃO 3			SUBPOPULAÇÃO 5		
		N _O	N _e	χ^2	N _O	N _e	χ^2
IDH	1	-	-		73,0	68,9	
	2	-	-		36,0	44,2	
	3	-	-		11,0	6,9	
							3,2 ^{ns}
LAP ₂	1	87,0	79,4		31,0	27,9	
	2	119,0	134,3		53,0	59,2	
	3	64,0	56,4		34,0	30,9	
				3,1 ^{ns}			0,9 ^{ns}
SKDH	1	248,0	246,8		113,0	113,1	
	2	26,0	28,4		7,0	6,8	
	3	2,0	0,8		0,0	0,1	
				0,7 ^{ns}			0,0 ^{ns}
EST ₁	1	73,0	70,4		44,0	42,5	
	2	135,0	140,2		55,0	58,0	
	3	72,0	69,4		21,0	19,5	
				0,3 ^{ns}			0,1 ^{ns}
EST ₂	1	-	-		83,0	77,5	
	2	-	-		27,0	37,9	
	3	-	-		10,0	4,5	
							8,3 ^{**}
EST ₃	1	-	-		79,0	82,1	
	2	-	-		39,0	32,7	
	3	-	-		0,0	3,1	
							3,5 ^{ns}

(1) - 1. número de homozigotos para o alelo mais comum;
 2. número de heterozigotos compostos pelos alelos mais comum e o raro;
 3. número de homozigotos para o alelo raro e outros heterozigotos.

Os valores de qui-quadrado obtidos apontaram valores não significativos para todos os locos polimórficos das subpopulações 3 e 5, com exceção da EST₂ na subpopulação 5, que apresentou desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg, com χ^2 igual a 8,3.

Estes resultados demonstraram estar havendo nos pomares de sementes (lotes para recombinação de indivíduos selecionados) um fluxo gênico interno com pequenos desvios da panmixia. De maneira geral, existe uma tendência, embora não significativa, de se observar que o número de homozigotos para o alelo mais comum é sempre superior ao esperado. Este fato apenas não ocorreu para o loco EST₃ da subpopulação 5. Uma certa taxa de endocruzamento pode ter ocorrido.

Apesar de os pomares de sementes terem sido implantados em delineamentos a promover a panmixia, alguns desvios estão ocorrendo nos cruzamentos entre indivíduos. O mesmo fato ocorreu nos pomares de sementes de **Eucalyptus regnans** (MORAN et alii, 1989); em **Pinus taeda**, praticamente não houveram desvios na panmixia dos pomares (FRIEDMAN & ADAMS, 1985).

A Tabela 11 apresenta os valores de qui-quadrado (χ^2) para cada loco, considerando-se as subpopulações 3 e 5, em conjunto.

TABELA 11. Teste de contingência (χ^2) conciderando todos os locos e 2 subpopulações.

LOCOS	Nº DE ALELOS	G.L.	χ^2
IDH	3	2	50,43**
MDH ₁	2	1	0,44 ^{ns}
MDH ₂	2	1	2,13 ^{ns}
LAP ₂	6	5	5,00 ^{ns}
SKDH	4	3	3,45 ^{ns}
EST ₁	6	5	21,00**
EST ₂	3	2	23,28**
EST ₃	4	3	27,10**

O teste de contingência apresentou-se altamente significativo para os locos IDH ($\chi^2 = 50,43$), EST₁ ($\chi^2 = 21,00$), EST₂ ($\chi^2 = 23,28$) e EST₃ ($\chi^2 = 27,10$) e apresentou-se não significativo para os locos MDH₁ ($\chi^2 = 0,44$), MDH₂ ($\chi^2 = 2,13$), LAP₂ ($\chi^2 = 5,00$) e SKDH ($\chi^2 = 3,45$). Os resultados demonstram haver diferenças entre as duas subpopulações para metade dos locos e maior parte dos alelos.

Estas diferenças podem ser devidas, principalmente, pelo fato de que a subpopulação 5 é resultado do cruzamento de 6 clones-mães com 35 clones polinizadores e a subpopulação 3 é o resultado do intercruzamento de apenas

parte destes clones (de 14 clones). Pode estar existindo o efeito de amostragem, aliado a frequências gênicas preferenciais dos 6 clones-mães da subpopulação 5.

As duas subpopulações, também foram comparadas através das estimativas dos parâmetros: estatísticas F de WRIGHT (1978), distância entre subpopulações $\hat{\sigma}_2$ de WEIR (1990) e distância de NEI (1972), que são apresentados na Tabela 14. Os três parâmetros estudados a partir da metodologia de seus respectivos autores citados, mostraram-se muito semelhantes entre si, demonstrando estar havendo diferenças muito pequenas ou nulas entre as duas subpopulações. Entretanto, o χ^2 , por ser um teste muito sensível, que detecta pequenas variações, mostrou estar havendo diferenças entre as duas subpopulações estudadas.

4.4 . Análises de variâncias individuais e conjunta

A partir das duas subpopulações (3 e 5) que estão praticamente em equilíbrio de Hardy-Weinberg, procedeu-se as análises de variâncias. As tabelas dos Apêndices 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08 e 09 apresentam os resultados de quadrado médio para cada alelo de todos os locos e, também, da análise conjunta. Os valores da K_1 , K_2 e K_3 estão incluídos no Apêndice 10.

As estimativas de variâncias entre populações ($\hat{\sigma}_p^2$), entre famílias/populações ($\hat{\sigma}_F^2$), entre indi-

víduos/famílias/populações ($\hat{\sigma}_I^2$), entre genes/indivíduos/famílias/populações ($\hat{\sigma}_G^2$) e a variância genética total ($\hat{\sigma}_T^2$) estão mostradas no Apêndice 11.

A estimativa da variância entre genes ($\hat{\sigma}_G^2$) variou de 0,0012 para o alelo 6 do EST₁ a 0,2375 para o alelo 1, também deste loco. As variâncias entre indivíduos ($\hat{\sigma}_I^2$) apresentaram muitos resultados negativos para diversos alelos e locos e variaram desde -0,0569 para o alelo 1 da EST₁ até 0,0077 para o alelo 3 do LAP₂. Para as estimativas de variâncias entre famílias ($\hat{\sigma}_F^2$), os valores encontrados foram de 0,0000 (nulos) para os alelos 5 e 6 do LAP₂, 4 do SKDH, 5 e 6 da EST₁, 3 da EST₂ e alelo 4 da EST₃ até 0,0743 do alelo 1 da EST₁. Para a variância entre populações, também foram encontrados muitos valores negativos, sendo o menor valor -0,0054 para o alelo 2 da EST₁ e o maior igual a 0,0166 para o alelo 1 do IDH. O alelo 6 da EST₁ apresentou o menor valor de estimativa de variância total ($\hat{\sigma}_T^2$) igual a 0,0012 e o alelo 1 do mesmo loco apresentou o maior valor (0,2501).

Quando se analisou todos os alelos de todos os locos, conjuntamente, observou-se que não existem variações entre populações e entre indivíduos. A maior parte da variância total (0,0912) refere-se a variação entre genes (0,0813). A variação entre famílias apresentou-se com o valor de 0,0160.

A tabela 12 apresenta os resultados de $\hat{\theta}_1$, $\hat{\theta}_2$, $\hat{F}$, $\hat{f}$ e $\hat{t}$, estimados com base em VENCovsky (1992), através das variâncias estimadas a partir das análises de variâncias individuais e conjunta.

TABELA 23. Estimativas do grau de parentesco dentro de famílias ($\hat{\theta}_1$), da distância genética entre subpopulações ($\hat{\theta}_2$), dos coeficientes de endogamia entre plantas nas subpopulações ($\hat{F}$) e dentro de subpopulações ($\hat{f}$) e da taxa de cruzamentos ($\hat{t}$), considerando 28 alelos dos locos polimórficos em duas subpopulações

LOCOS	ALELOS	$\hat{\theta}_1$	$\hat{\theta}_2$	$\hat{F}$	$\hat{f}$	$\hat{t}$
IDH	1	0,3222	0,1354	0,3116	0,2038	0,6614
	2	0,2909	0,0453	0,3102	0,2775	0,5656
	3	0,1374	0,0534	0,0229	-0,0322	1,0666
MDH ₂	1	0,1555	-0,0182	0,0515	0,0684	0,8719
	2	0,1555	-0,0182	0,0515	0,0684	0,8719
LAP ₂	1	0,1685	-0,0180	0,1139	0,1296	0,7706
	2	0,2342	-0,0294	0,0539	0,0809	0,8503
	3	0,0838	-0,0141	0,1309	0,1430	0,7498
	4	0,1845	-0,0265	0,0808	0,1045	0,8107
	5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
	6	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
SKDH	1	0,1161	-0,0118	0,0711	0,0819	0,8485
	2	0,0400	0,0000	0,3200	0,3200	0,5151
	3	0,0785	-0,0060	-0,0332	-0,0270	1,0555
	4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
EST ₁	1	0,2779	-0,0192	0,0504	0,0683	0,8721
	2	0,2951	-0,0338	0,1698	0,1969	0,6709
	3	0,1302	-0,0022	0,0796	0,0816	0,8491
	4	0,1816	-0,0267	0,0652	0,0895	0,8357
	5	0,0196	0,0196	0,0196	0,0000	1,0000
	6	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
EST ₂	1	0,1376	0,0157	0,1685	0,1553	0,7312
	2	0,1521	0,0248	0,1804	0,1595	0,7248
	3	0,0196	0,0196	0,0196	0,0000	1,0000
EST ₃	1	0,0738	0,0018	-0,0085	-0,0103	1,0208
	2	0,0901	0,0199	0,0273	0,0075	0,9850
	3	0,0769	0,0385	0,0256	-0,0134	1,0272
	4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
MÉDIA		0,1222	0,0339	0,0990	0,0769	0,8782
CONJUNTA		0,1754	0,0000	0,1085	0,1085	0,8041

Estimou-se as médias aritmética e conjunta de todos os parâmetros, considerando todos os locos e alelos analisados (Tabela 12). Adotou-se este procedimento pois a aritmética é muito citada em literatura, porém a conjunta é a que melhor representa os resultados.

O grau de parentesco dentro de famílias ($\hat{\theta}_1$) variou de 0,3222, para o alelo 1 do IDH, a 0,0000 para os alelos 5 e 6 do LAP₂, 4 do SKDH, 6 do EST₁ e 4 do EST₃. Para a análise conjunta, considerando todos os alelos e locos, obteve-se o valor de 0,1754. Este valor é aproximadamente 1/6, valor intermediário entre 1/8, grau de parentesco entre indivíduos de famílias de meios-irmãos e 1/4, grau de parentesco entre indivíduos de famílias de irmãos-germanos.

O resultado mostra que pode ter havido uma tendência de cruzamento preferencial entre indivíduos da vizinhança, não apresentando um modelo de sistema reprodutivo panmítico perfeito. As famílias, que deveriam apresentar indivíduos meios-irmãos, apresentaram uma certa tendência de mostrar parte dos integrantes da família oriundos de mesmos progenitores masculinos (polinização preferencial). Sistemas de polinização aberta, realizadas através de insetos, no caso abelhas, estão sujeitos a este tipo de desvio na alogamia.

Para *Hevea brasiliensis*, PAIVA (1992) obteve, praticamente, o valor de 1/8 (0,1270) para o pa-

râmetro $\hat{\theta}_1$ (grau de parentesco dentro de famílias), o que equivale a famílias de meios-irmãos. Todavia, MORAES (1992), estudando aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), apresentou $\hat{\theta}_1$ igual a 0,2957, praticamente 1/3, mostrando um grau de parentesco muito estreito entre indivíduos dentro das famílias.

A distância genética entre subpopulações ($\hat{\theta}_2$) variou entre valores de -0,0338, para o alelo 2 da EST_1 , até 0,1354, no alelo 1 do loco IDH. Analisando todos os alelos e todos os locos em conjunto, observou-se não haver distância genética entre as subpopulações. Quando se analisou as médias, houve pequena distância entre elas. No presente caso, a distância entre as duas subpopulações está ligada, provavelmente, à amostragem diferenciada do conjunto gênico da subpopulação original. Observa-se haver semelhança entre as duas subpopulações, mesmo com tamanho efetivo populacional diferente.

Os valores de coeficientes de endogamia entre plantas da subpopulações ($\hat{F}$) e dentro de subpopulações ($\hat{f}$) foram iguais a 0,1085, para dados analisados no conjunto de 28 alelos presentes nos locos polimórficos. A média do coeficiente de endogamia entre plantas das subpopulações ($\hat{F}$) foi igual a 0,0990 e superior à média do coeficiente de endogamia dentro de subpopulações ($\hat{f}$) com valor de 0,0769, como era de se esperar.

No Brasil as estimativas de parâmetros em genética quantitativa de eucaliptos são, basicamente, feitas a partir de dados colhidos de testes de progênies de maios-irmãos. As estimativas do progresso genético esperado são sempre superestimados, pois a recombinação que ocorre para a formação das progênies é realizada por polinização livre. Este procedimento possibilita uma proporção de autofertilização e endogamia. O coeficiente de endogamia, que no presente caso foi 0,1085 é uma estimativa que pode servir como um indicativo da existencia de uma parcela de endogamia em pomares de sementes de *Eucalyptus grandis*, fato este também comprovado em literatura para o *Eucalyptus regnans* (MORAN et alii, 1989). O importante a ressaltar seria, que fossem realizadas estimativas de coeficiente de endogamia para cada população e recombinação havida. Estes coeficientes mais específicos, poderiam ser utilizados diretamente nas estimativas do progresso genético esperado em genética quantitativa.

O valor do coeficiente de endogamia ora encontrado não pode, nem deve, ser utilizado generalizadamente para todos os casos. Outras estimativas, com outras populações, devem ser realizadas para a obtenção de uma posição mais geral deste coeficiente em pomares de sementes com a espécie estudada.

As taxas de cruzamento variaram desde o valor de 0,5151, para o alelo 2 do SKDH, a 1,0666, apresenta-

do pelo alelo 3 do loco IDH. A média de todos os alelos e subpopulações foi de 0,8782. Quando analisados, conjuntamente, todos os alelos de todos os locos e subpopulações, obteve-se uma taxa de cruzamento igual a 0,8041.

BROWN et alii (1975) estudaram a taxa de cruzamento em 4 populações naturais de *Eucalyptus obliqua* e encontraram valores de 0,72 , 0,90 e 0,67 para taxas de cruzamento estimados, à partir, dos locos ADH₁, MDH e ACP, respectivamente, considerando todas as populações em estudo. A taxa de cruzamento média considerando 3 locos e 4 populações foi de 0,76. MORAN & BELL (1.983), em revisões feitas para 10 espécies do gênero *Eucalyptus* encontrou valor de $\hat{t}$ igual a 0,78.

Através da análise conjunta para todos os 7 locos e 2 subpopulações, encontrou-se um $\hat{t}$ igual a 0,8041 (Tabela 12), valor próximo aos encontrados por BROWN et alii (1975) e MORAN & BELL (1.983).

Quando considerada uma média simples dos valores inter-locos da análise fatorial, obteve-se o valor 0,8782 (Tabela 12). Quando analisado através de WEIR (1990), encontrou-se o valor de 0,8794 (Tabela 13). Comparando os dois valores observa-se uma diferença muito pequena.

O t estimado no presente trabalho, refere-se a taxa aparente de cruzamento, válido quando há o equilíbrio de Wright. Entretanto, para casos em que são conhecidos os genótipos maternos e de suas respectivas progênes, a metodologia mais apropriada para estimar a taxa de cruzamento (t) é a apresentada por BROWN et alii (1975).

No presente caso, o pomar de sementes foi instalado a partir de clones não aparentados. Toda endogamia presente refere-se a própria autofecundação, ou seja, de pólen advindos da própria árvore ou de rametes do mesmo clone nas proximidades. Observou-se que o valor 88% de taxa de cruzamentos obtido foi próximo ao encontrado por MORAN et alii (1989), em pomar de sementes de *Eucalyptus regnans* ($\hat{t} = 91\%$). No mesmo trabalho, os autores apresentaram uma taxa de 74% de cruzamentos para populações naturais de *E. regnans*, justificando a ocorrência de endogamia por auto fertilização, acrescida por endogamia causada por cruzamentos entre indivíduos aparentados, que normalmente podem ocorrer próximos, em povoamentos naturais.

O coeficiente de endogamia ($\hat{F}$) e a taxa de cruzamentos ($\hat{t}$), calculados segundo WEIR (1990) para os locos polimórficos, considerando-se as 2 subpopulações, são apresentados na Tabela 13.

TABELA 13. Coeficiente de endogamia ($\hat{F}$) e taxa de cruzamento ($\hat{t}$) para os locos polimórficos e 2 subpopulações

LOCO	SUBPOPULAÇÃO	$\hat{F}$	$\hat{t}$
IDH	3	0,2357	0,6185
	5	0,2167	0,6438
MDH ₂	3	0,1257	0,7767
	5	-0,0886	1,1944
LAP ₂	3	0,0981	0,8213
	5	0,1028	0,8135
SKDH	3	0,0577	0,8909
	5	-0,0175	1,0357
EST ₁	3	0,0697	0,8697
	5	0,1147	0,7943
EST ₂	3	0,1000	0,8182
	5	0,2673	0,5782
EST ₃	3	0,0199	0,9610
	5	-0,1988	1,4962
MÉDIA	3	0,1010	0,8223
	5	0,0567	0,9366
	GERAL	0,0788	0,8794

Os coeficientes de endogamia variaram de 0,2357 (IDH) a 0,0199 (EST₃), para a subpopulação 3 e de 0,2673 (EST₂) a -0,1988 (EST₃), para a subpopulação 5. A média do coeficiente de endogamia foi 0,0788.

As taxas de cruzamento foram apresentadas com valores de 0,9610 (EST₃) a 0,6185 (IDH) para a subpopulação 3 e de 1,4962 (EST₃) a 0,5782 (EST₂), para a subpopulação 5. A média da taxa de cruzamento para todos os locos e subpopulações foi de 0,8794.

As variações genéticas entre e dentro de subpopulações obtidas, através de diferentes metodologias utilizadas, podem ser comparadas na Tabela 14. Os parâmetros $\hat{F}_{ST}$, $\hat{\alpha}_2$ e $\hat{D}$ apresentam variações existentes entre subpopulações,

cuas metodologias foram apresentadas por WRIGHT (1978), WEIR (1990) e NEI (1972), respectivamente.

TABELA 14. Estimação das variações genéticas e coeficientes de endogamia dentro e entre subpopulações considerando todos os alelos e locos analisados, para as subpopulações 3 e 5 de *Eucalyptus grandis*, por três métodos.

WRIGHT (1.978)	WEIR (1.990)	NEI (1.972)
$\hat{F}_{IS} = 0,090$	$\hat{f} = 0,108$	-
$\hat{F}_{ST} = 0,011$	$\hat{\theta}_2 = 0,000$	$\hat{D} = 0,010$
$\hat{F}_{IT} = 0,100$	$\hat{F} = 0,108$	-

onde: $\hat{F}_{IS}$, $\hat{F}_{ST}$ e $\hat{F}_{IT}$ foram compilados da Tabela 12; $\hat{f}$, $\hat{\theta}_2$ e $\hat{F}$ da Tabela 11; $\hat{D}$ é a distância genética de NEI (1972) do Apêndice 12.

A grande parcela de endogamia se encontra presente dentro de subpopulações como ficou demonstrado por diferentes metodologias ($\hat{F}_{IS} = 0,090$ e $\hat{f} = 0,108$). A divergência genética entre subpopulações foi mínima com $\hat{F}_{ST} = 0,011$, nula para $\hat{\theta}_2$ e com $\hat{D} = 0,010$. As metodologias testadas mostraram pequenas diferenças entre si, apresentando a mesma tendência.

O fato de praticamente não existir diferenças entre as subpopulações é compreensível, pois estudou-se a mesma subpopulação com somente o número efetivo populacional diferente. A amostra de alelos presentes nas 14 progênies da subpopulação 3 representa a grande maioria dos alelos contidos nas 35 progênies da subpopulação 5.

4.5 . PERDAS DE ALELOS POR REDUÇÃO DO N_e POPULACIONAL

A Tabela 15 apresenta as frequências alélicas das 3 subpopulações compostas pelos clones-mães.

TABELA 15. Frequências alélicas de cinco locos nas três subpopulações estudadas

LOCO	ALELO	SUBPOPULAÇÃO				
		1	2	(desvio) (*)	4	(desvio) (*)
	Ne	35	14		6 (**)	
IDH	1	0,929	0,893		0,750	
	2	0,057	0,107		0,167	
	3	0,014	<u>0,000</u>	(0,022)	0,083	(0,034)
LAP ₂	1	0,514	0,536		0,583	
	2	0,129	0,179		0,083	
	3	0,243	0,214		0,333	
	4	0,071	0,071		<u>0,000</u>	(0,074)
	5	0,043	<u>0,000</u>	(0,038)	<u>0,000</u>	(0,058)
SKDH	1	0,886	0,964		1,000	
	2	0,029	<u>0,000</u>	(0,032)	<u>0,000</u>	(0,048)
	3	0,057	0,036		<u>0,000</u>	(0,067)
	4	0,029	<u>0,000</u>	(0,032)	<u>0,000</u>	(0,048)
EST ₁	1	0,543	0,500		0,667	
	2	0,186	0,214		0,250	
	3	0,143	0,179		<u>0,000</u>	(0,101)
	4	0,086	0,107		0,083	
	5	0,043	<u>0,000</u>	(0,038)	<u>0,000</u>	(0,058)
EST ₃	1	0,800	0,857		1,000	
	2	0,171	0,143		<u>0,000</u>	(0,109)
	3	0,014	<u>0,000</u>	(0,022)	<u>0,000</u>	(0,034)
	4	0,014	<u>0,000</u>	(0,022)	<u>0,000</u>	(0,034)

Ne - número efetivo populacional;

(*)- desvio padrão esperado da frequência;

(**)-apenas 3 clones são coincidentes aos 14 clones da subpopulação 2 (ver Apêndice 01).

Na Tabela 15 estão apresentados os valores de frequências observadas nos 3 conjuntos de clones que compõe os 3 pomares de sementes implantados. Estes pomares são formados por 35 clones (Pomar de Sementes Grande), por 14 clones (Pomar de Sementes Intermediário) e por 6 clones (Pomar de Sementes Pequeno).

O Pomar de Sementes Grande (PSG) contém a totalidade dos 35 clones em estudo (observar na Figura 1). O Pomar de Sementes Intermediário (PSI) e Pomar de Sementes Pequeno (PSP) são compostos por parte dos clones do PSG.

Dentre os 6 clones que constituem o PSP, apenas 3 clones são coincidentes aos 14 clones do PSI. Por esta razão, observa-se a ausência do alelo 3 neste Pomar e que está presente nos PSG (com 35 clones) e PSP (com 6 clones).

No loco LAP_2 , o PSG apresentou 5 alelos. O PSI perdeu o alelo de menor frequência (o número 5) e o PSP perdeu os alelos 4 e 5.

A redução da variabilidade genética é mais evidente no loco SKDH, composto pelo conjunto de 4 alelos, que foram reduzidos para a metade no PSI e fixado num único alelo no PSP.

Para o caso do EST_1 , de 5 alelos presentes no conjunto total de clones (PSG), houve redução para 4

alelos para o PSI e para 3 alelos para o PSP.

No EST₃, ocorreu o mesmo fato do SKDH; dos 4 alelos presentes no conjunto, perderam-se 2, quando o conjunto foi reduzido para 14 clones (PSI) e fixado em 1 único alelo quando reduzido para 6 clones (PSP).

O desvio padrão esperado da frequência do alelo 3 do loco IDH, para o PSI ($N_e = 14$) foi de 0,022 e maior que a frequência observada do próprio alelo (0,014). Este fato, demonstra haver possibilidades de perda do alelo, como de fato ocorreu (Tabela 15). Para o caso deste mesmo alelo no PSP, com N_e igual a 6, o desvio padrão esperado da frequência do alelo 3 foi de 0,034. Mesmo com este valor, o alelo foi mantido no PSP, com frequência alélica igual a 0,083.

Para os alelos 5, dos locos LAP₂ e EST₁, os desvios padrões esperados da frequência dos alelos foram ambos iguais a 0,038. Apesar do valor deste desvio, houve erosão destes genes no PSI.

Para todos os demais casos de perdas alélicas, os desvios padrões esperados das frequências dos alelos foram superiores as frequências alélicas do PSG, mostrando ter havido deriva genética para os PSI e PSP.

Dos 26 alelos dos 8 locos presentes nos 35 clones estudados, houve uma redução para 19 alelos para o PSI(14 clones) representando 73,1% do total e para 16 alelos para o PSP (6 clones) equivalendo 61,5% .

Importante ressaltar, que além da deriva genética podem estar ocorrendo modificações das frequências gênicas, também, por ligação de locos isoenzimáticos com características quantitativas envolvidas na seleção.

Na redução de variabilidade alélica ocasionada pela seleção de 35 para 14 clones, os alelos erodidos apresentaram frequências gênicas inferiores a 4,3% com média de 2,6%. Com a situação mais drástica, com seleção de 35 para 6 clones, houveram perdas de alelos com frequências inferiores a 17,1% com média de 6,1%.

HAMRICK (1991), estudando a manutenção da diversidade genética em *Pinus taeda*, fez comparações entre 2 pomares de sementes melhoradas com 16 populações naturais da espécie. Dos 69 alelos observados nas populações naturais, somente 62,3 e 60,9% do total foram mantidos nos 2 pomares de sementes. Dos alelos erodidos todos possuíam frequências gênicas inferiores a 10% e a maioria (66%) dos alelos ausentes nos pomares tiveram frequências abaixo de 1%.

Os dados do presente trabalho mostram que com a seleção para 14 clones a maioria dos alelos perdidos (71,4%) tiveram frequências de 2,9%, bem superior a encontrada por HAMRICK (1991) e com a seleção mais intensa para 6 clones a maioria das perdas (60,0%) tinham frequências, ainda maiores, com valores inferiores a 4,3%. Por outro lado, as percentagens de manutenções alélicas foram muito semelhantes em torno de 60 a 70%, significando que existem alelos em alta frequência nos dois casos e os que são perdidos por restrições drásticas dos tamanhos efetivos populacionais são aqueles de frequências mais raras.

Populações de tamanhos restritos conseguem manter a maioria dos alelos de alta frequência e é este facto que possibilita a manutenção ou até aumentos de produtividade e homogeneidade em populações comerciais. Num panorama a curto prazo, isto é desejável comercialmente, mas quando se trata de populações para melhoramento, onde a presença de alelos raros no conjunto gênico da população é recurso genético potencial para utilizações futuras, faz-se necessário cuidados especiais para não se perder alelos de baixa frequência que poderão fazer parte essencial do genoma das populações em gerações avançadas de melhoramento.

4.6 . Fluxo gênico contaminante

A maior parte dos trabalhos apresentados em literatura da área florestal, que necessitam esclarecimentos sobre os genótipos dos parentais (principalmente o masculino) e suas progênies, foram desenvolvidos em coníferas. Pode-se citar os trabalhos em *Larix decidua* (LEWADOWSKI et alii, 1991), *Pseudotsuga menziesii* (SHAW & ALLARD, 1982; ADAMS et alii, 1990), *Pinus monticola* (El-KASSABY et alii, 1987), *Pinus contorta* (PERRY & DANKIK, 1986), *Pinus sylvestris* (MUONA et alii, 1987; YASDANI & LINDGREN, 1991), *Pinus taeda* (FRIEDMAN & ADAMS, 1985), *Abies alba*

(SCHOROEDER, 1989), *Picea abies* (GIANNINI et alii, 1991; HERTEL, 1992), entre outros.

Em *Picea abies* K., como em todas as coníferas, a semente é formada por embrião e endosperma. O embrião ocorre pela fertilização da oosfera pelo grão de pólen, enquanto que o endosperma, também definido como megagametófito, ocorre pela germinação do macrosporo (MORGANTE et alii, 1989). Por esta razão, as ginospermas possibilitam a inferência do genótipo materno, pela análise do tecido do endosperma (n) e do alelo paterno, através da análise do embrião ($2n$).

Para o presente caso do *Eucalyptus grandis*, o genótipo materno foi inferido através da análise eletroforética direta do material adulto e também pela confirmação dos genótipos, pelas respectivas progênes de polinização aberta. O genótipo do parental masculino foi apresentado pelo genótipo das progênes de polinização aberta.

A Tabela 16 apresenta as frequências gênicas para 5 locos de 4 populações, sendo duas delas compostas pelos clones parentais (Subpopulações selecionadas 1 e 2) e as outras duas formadas pelas progênes de polinização aberta originárias das duas subpopulações selecionadas, acima citadas.

TABELA 16. Frequências alélicas de cinco locos, nas subpopulações selecionadas original e 1, e suas respectivas subpopulações compostas por progênies de polinização aberta.

LOCO	ALELO	SUBPOPULAÇÃO			
		SUBPOPULAÇÃO SELECIONADA 1	PROGÊNIES DA SUBPOPULAÇÃO SELECIONADA 1	SUBPOPULAÇÃO SELECIONADA ORIGINAL	PROGÊNIES DA SUBPOPULAÇÃO SELECIONADA 2
MDH ₁	1	1,000	0,998	-	-
	2	0,000	<u>0,002</u>	-	-
	n	14	275	-	-
LAP ₂	1	0,536	0,543	0,514	0,487
	2	0,179	0,157	0,129	0,191
	3	0,214	0,206	0,243	0,212
	4	0,071	0,087	0,071	0,102
	5	0,000	<u>0,007</u>	0,043	0,004
	6	0,000	0,000	0,000	<u>0,004</u>
	n	14	276	35	120
SKDH	1	0,964	0,946	-	-
	2	0,000	<u>0,013</u>	-	-
	3	0,036	0,040	-	-
	4	0,000	<u>0,002</u>	-	-
	n	14	276	-	-
EST ₁	1	-	-	0,543	0,596
	2	-	-	0,186	0,167
	3	-	-	0,143	0,112
	4	-	-	0,086	0,104
	5	-	-	0,043	0,017
	6	-	-	0,000	<u>0,004</u>
	n	-	-	35	120
EST ₂	1	-	-	0,686	0,804
	2	-	-	0,314	0,179
	3	-	-	0,000	<u>0,017</u>
	n	-	-	35	120

n - número de indivíduos analisados

Observa-se, na Tabela 16, o aparecimento de alelos raros, em baixa frequência, em alguns locos estudados. No loco MDH₁ houve a ocorrência do alelo 2 em frequência de 0,002 nas progênies (subpopulação 3). Este alelo não está presente na população parental (subpopulação 2). O mesmo ocorreu no LAP₂ com o aparecimento do alelo 5 com frequência 0,007. No SKDH ocorreram os alelos 2 e 3 com frequências de 0,013 e 0,002, respectivamente.

Para as progênies oriundas dos parentais da subpopulação 1, ou seja, a subpopulação 5, houve a constatação do mesmo fato para o alelo 6 do LAP₂, que apresentou frequência de 0,004, do alelo 6 (0,004) do EST₁ e do alelo 3 (0,017) do EST₂. O aparecimento de alelos em progênies cujos parentais não os contém em seu conjunto gênico evidencia a provável migração de genes estranhos no lote de recombinação.

O mesmo fato ocorreu quando MORAN et alii (1989) compararam as populações de progênies e seus clones-mães componentes de um pomar de sementes de *Eucalyptus regnans*. Observaram o aparecimento de alelos contaminantes em 3 dos 10 locos isoenzimáticos por eles estudados.

Pode-se supor, também, a presença de mutações, embora se saiba que taxas de mutações naturais são de baixíssima frequência (menor que 10^{-6}). A presença destes alelos, provavelmente, estejam em grande maioria ligados à migração de genes advindas de populações de eucaliptos da

vizinhança. Isto é perfeitamente possível, pois, embora o local estabelecido para a recombinação tenha certo isolamento espacial das plantações comerciais (por volta de 500m), aparentemente não foi suficiente para evitar a entrada de pólenes contaminantes.

Segundo AMARAL (1960), o polinizador mais frequente na espécie é a abelha 'europa' *Apis mellifera*, que tem hábito de vôo de até 4.200 m de distância (LEE, 1.961) quando não encontra flores para visitar e colher pólenes e néctares. Consequentemente, poderiam facilmente visitar os plantios comerciais e os pomares de sementes.

A quantificação de migração não foi possível ser estimada, pois a metodologia empregada não objetivou este fato. Entretanto, supõe-se, porém, que a quantidade de migração tenha sido muito maior do que a frequência destes alelos raros. Dentre os alelos mais comuns encontrados nas populações estudadas, estão presentes certas quantidades de alelos migrados ao pomar, e que a metodologia empregada para estudo, não permitiu identificá-los.

Do ponto de vista comercial, pequenas migrações provavelmente não tenham papel importante para a produtividade e qualidade das características comerciais. Em determinadas situações, as migrações podem ser benéficas em populações para melhoramento, pois introduz pequena quantidade de variabilidade às populações base para melhoramento. As migrações podem acrescentar variabilidade genética no

conjunto gênico de populações melhoradas.

Em pomares jovens, quando a sua produção de pólen é baixa ou inexistente, contaminações por pólenes advindos de populações inferiores podem representar grandes riscos de queda de produtividade nas plantações comerciais (MORI et alii, 1988).

Seria interessante a implantação de experimentação que possibilitasse quantificar a entrada de fluxo gênico contaminante e sua ligação com a possível alteração da produtividade almejada nos programas de melhoramento. Experimentos dessa natureza poderia dar bons subsídios para a instalação ideal de áreas de recombinação de genótipos superiores.

5. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se extrair os seguintes conclusões:

- a) Dos sistemas enzimáticos estudados, os que apresentaram as melhores resoluções nos zimogramas foram: IDH, MDH, LAP, SKDH, Alfa e Beta-EST, CAT, ADH e PER. Os três últimos mostraram excelentes padrões somente para plântulas em estágio de desenvolvimento até 2 meses de idade; as demais isoenzimas testadas apareceram nitidamente nos estádios de 2 meses, 5 meses e 9 anos;
- b) As subpopulações em questão apresentaram taxas de endogamia entre e, principalmente, dentro de subpopulações, evidenciando o fato de ter havido autofecundação nos indivíduos componentes do pomar de sementes;
- c) A panmixia nas subpopulações de *E. grandis* não foi perfeita; a taxa de cruzamentos efetivos entre os diferentes clones ($\hat{t}\%$) foi em média igual a 88%; quando analisados todos os locos e subpopulações em conjunto foi

de 80%. As subpopulações de *E. grandis* estudadas mostraram um comportamento de espécie intermediária preferencialmente alógama;

d) Houve pequena distância genética entre as subpopulações 3 e 5, evidenciando grande similaridade entre as frequências alélicas das duas subpopulações amostradas à partir de um mesmo conjunto gênico (subpopulação original);

e) Ocorreram perdas alélicas no conjunto gênico da subpopulação com a diminuição do tamanho efetivo; houve fixação de alelos em locos originalmente polimórficos na subpopulação composta por menor número de clones.

f) Houve presença de fluxo gênico contaminante nos dois pomares de sementes, apesar dos povoamentos comerciais estarem localizados a distâncias superiores a 500 m;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, W.T. Application of isozyme in tree breeding. In:
TANKSLEY, D. D. & ORTON, T.J. **Isozyme in Plant Genetics
and Breeding**. Amsterdam, Elsevier, 1983. v.1, p.381-
400.
- ADAMS, W.T.; NEALE, D.B.; DOERKSEN, A.H.; SMITH, D.B.
Inheritance and linkage of isozyme variants from seed
and vegetative buds tissues in Coastal Douglas-Fir
[*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* (Mirb.) Franco].
Silvae genetica, 39(3-4):153-167, 1990.
- AGUIAR, D.J.R. **Armazenamento de tora de Eucalyptus grandis
visando a produção de lâminas e compensado**. USP. 1985.
(Dissertação de Mestrado).
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Ele-
troforese de proteínas e isoenzimas de fungos e es-
sências florestais**. UFV, Viçosa-M.G., 1991. 242p.

- AMARAL, E. Utilidade das abelhas na polinização. **São Paulo Agrícola**, S. Paulo, 2(8):22-23, 1960.
- AMOS, B. & HOELZEL, A.R. Applications of molecular genetic techniques to the conservations of small populations. **Biological Conservations**, 61: 133-144, 1992.
- AYALA, F.J. & KIGER JR., J.A. **Modern Genetics**, 2^aed. Menlo Park, The Benjamin/Cumming, 1984.
- ANDERSON, R.L. & BANCROFT, T.A. **Statistical theory in research**. New York, MacGraw-Hill, 1952. p.325-30.
- ANDRADE, E.N. de. **O eucalipto**, 2a. ed. Jundiaí, CPEF, São Paulo, p.485-505. 1960.
- BROWN, A.H.D. Efficient experimental designs for the estimation of genetic parameters in plant populations. **Biometrics**, 31:145-160, 1975.
- BROWN, A.H.D. & ALLARD, R.W. Estimation of mating systems in open-pollinated maize populations using isozymes polymorphisms. **Genetics**, Princeton, 66:133-145, 1970.

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

BROWN, A.H.D. & MORAN, G.F. Isozymes and the genetic research of forest trees. In: M.T. Conkle (Editor), *Isozymes of North American forest trees and forest insects*. USDA, Berkeley, pp.1-10, 1981.

BROWN, A.H.D. & WEIR, B.S. Measuring genetic variability in plant populations. In: Tanksley, S.D.; Orton, T.J. (eds.) *Isozymes in plant genetics and breeding*. Part A. Elsevier, Amsterdam, p.219-39, 1983.

BROWN, A.H.D.; ZOHARY, D.; NEVO, E. Outcrossing rates and heterozigosity in natural populations of *Hordeum spontaneum* Koch in Israel. *Heredity*, **41**:49-62, 1978.

BURGUESS, I.P. A ocorrência natural de *Eucalyptus grandis* seu padrão de distribuição nas florestas, suas características e conservação. *Silvicultura*, São Paulo. **8**(31): 397-9, 1983.

BURGESS, I.P. & BELL, J.C. Comparative morphology and Allozyme Frequencies of *E. grandis* Hill ex Maiden and *E. saligna* Sm. *Australian Forest Research*, 13:133-49, 1983.

CHELIAK, W.N. & PITTEL, J.A. Techniques for Starch gel Electrophoresis of Enzymes from Forest Tree Species. Pataya National Forestry Institute, Canadian Forestry Service Information Report PI-X-42, 1984. 49p.

CLAYTON, J. & TRETIAK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. *J. Fisheries Res. Board Can.*, 29: 1169-1172, 1972.

CLEGG, M.T. Measuriment plant mating systems. *Bioscience*, 30: 814-818, 1980.

CROW, J.F. & KIMURA, M. An introduction to population gene tics theory. Harper International Edition, New York, 1970. 591p.

ELDRIDGE, K.G. Breeding systems variation and genetic improvement of tropical eucalypts. In: BURLEY, J.; STYLES, B.T. *Tropical trees*. London, Academic Press, p.101-8, 1976.

EL-KASSABY, Y.A.; MEAGHER, M.D.; PARKINSON, J.; PORTLOCK, F.T. Allozyme inheritance, heterozygosity and out crossing rate among *Pinus monticola* near Ladysmith, British Columbia. *Heredity*, 58:173-181, 1987.

FALCONER, D.S. *Introdução a genética quantitativa*. trad. M.A. SILVA & J.C. SILVA. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1987. 279p.

FERREIRA, M. Escolha de espécies de eucalipto. SIMPÓSIO EXPLORAÇÃO DE PEQUENOS MACIÇOS FLORESTAIS. São Paulo, Secretaria da Agricultura. USP/SBS. 1978.

FILDES, R. & HARRIS, H. Genetically determined variation of adenylate kinase in man. *Nature*, 209:261-63, 1966.

FRIDMAN, S.T. & ADAMS, W.T. Levels of outcrossing in two Loblolly Pine Seed Orchards. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 34(4-5):157-152, 1985.

FRIPP, Y.J. Allozyme variation and mating system in two populations of *Eucalyptus kitsoniana* (Luehn) Maiden. *Australian Forest Research*, 13:1-10, 1982.

GIANNINI, R.; MORGANTE, M.; VENDRAMIN, G.G. Allozyme variation in Italian populations of *Picea abies* (L.)

Karst. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 40(3-4):160-166, 1991

GRIFFIN, A.R. & COTTERILL, P.P. Genetic variation in grown of outcrossed, selfed and open-pollinated progenies of *Eucalyptus regnans* and some implications for breeding strategy. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 37:124-131, 1988.

GRIFFIN, A.R.; MORAN, G.F.; FRIPP, Y.J. Preferential outcrossing in *Eucalyptus regnans* F. Muell. *Australian Journal of Botany*, 35: 465-475. 1987.

GURIES, R.P. & LEDIG, F.T. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill). *Evolution* Lancaster, 36(2):387-402, 1982.

HALL, N.; JOHNSTON, R.D.; CHIPPENDALE, G.M. *Forest Trees of Australia*. Canberra, Australian Government Publishing Service. 1970, 333p.

HAMRICK, J.L. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P. S. (Ed.). *Isozymes in Plant Biology*. Portland, Dioscorides Press, 1989. p.87-105.

HAMRICK, J.L. Allozyme diversity of natural stands versus seed orchard Loblolly Pine. PROCEEDING OF THE TWENTY-THIRD MEETING AND ACTIVITY REPORTS OF THE CANADIAN TREE IMPROVEMENT ASSOCIATION, Ottawa, 21, 1991.

HERTEL, H. Aims and results of basic research in the Institute of Forest Tree Breeding in Waldsieversdorf, Germany. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 41(3):204, 1992.

HODGSON, L.M. Some aspects of flowering and reproductive behaviour in *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden at J.D.M. Keet Forest Research Station. I. Flowering, Controlled Pollination Methods, pollination and receptivity. *South Africa Forestry Journal*, Johannesburg, 97:18-28, 1976.

HOPPER, S.D.& MORAN, G.F. Bird pollination and the mating system of *Eucalyptus stoatei*. *Australian Journal of Botany*, 29:625-38, 1981

KAGEYAMA, P.Y. Endogamia em espécies florestais. *Série Técnica IPEF*, Piracicaba, 2(8):1-40, 1981.

KAGEYAMA, P.Y. Seleção precoce a diferentes idades em progênies de *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden. Piracicaba, 1983. 147p. (Doutorado - Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz" (USP)).

LEE, W.R. The Nonrandom Distribution of Foraging Honey Bees Between Apiaries. *Journal of Economic Entomology*, Menasha, 54(5):928-33, 1961.

LEVIN, M.D. Distribution of Foragers from Honey-Bees Colonies Placed in the Midle of a Large Field of Alfafa. *Journal of Economic Entomology*. Menasha, 54(3):431-4, 1961.

LEWANDOWSKI, A.; BURCZYK, J.; MEJNARTOWICZ, L. Genetic structure and the mating system in an old stand of Polish Larch. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 40:75-79, 1991.

LI, C.C. *First Course in Population Genetics*. The Boxwood press, California, 1978. 631p.

MAEDA, J.M. Polinização entomófila em pomar de sementes clonal de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden na região de Botucatu-SP. Piracicaba, 1987, 91p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

MITTON, J. B. Conifers. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (eds.) *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, part B. Elsevier, Amsterdam, p.443-72, 1983.

- MORAES, M.L.T. Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F.& M.F. Allemão Anacardiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Engler). Piracicaba, 1992. 139p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- MORAN, G.F. & BELL, J.C. *Eucalyptus*. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (eds.) *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, part B. Elsevier, Amsterdam, p.423-41. 1983.
- MORAN, G.F.; BEL, J.C.; GRIFFIN, A.R. Reduction in levels of inbreeding in a seed orchard of *Eucalyptus regnans* F. Muell. compared with natural populations. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 38(1):32-35, 1989.
- MORAN, G.F.; BELL. J.C.; MATHESON, A.C. The genetic structure and levels of inbreeding in a *Pinus radiata* D.Don seed orchard. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 29 (5/6):190-3, 1980.
- MORAN, G.F. & BROWN, A.H.D. Temporal heterogeneity of outcrossing rates in alpine ash (*Eucalyptus delegatensis* R.T.Bak). *Theoretical and Applied Genetics*, 57:101-5. 1980.
-

- MORAN, G.F. & HOPPER, S.D. Genetic diversity and the insular population structure of the rare granite rock species, *Eucalyptus caesia* Benth. *Australian Journal of Botany*, 31:161-172, 1983.
- MORGANTE, M.; VENDRAMIN, G.G.; GIANINI, R. Genetics of GPGD and SKDH in Norway spruce. (*Picea abies* K.). *Journal of Genetics & Breeding*, 43:67-72, 1989.
- MORI, E.S.; KIKUTI, P.; SOUSA, V.A. de; RAMIREZ-CASTILHO, C.; FERREIRA, M. Pomares de sementes florestais. *IPEF-Série Técnica*, Piracicaba, 5(16):1-27, 1988.
- MUONA, O.; YAZDANI, R.; RUDIN, D. Genetic change between life stages in *Pinus sylvestris*: allozyme variation in seeds and planted seedlings. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 36(1):39-42, 1987.
- NEI, M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, Lancaster, 106:283-92, 1972.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70:3321-3323, 1973.

- NEI, M. **Molecular population genetics and evolution**. North Holland Amsterdam and New York, 1975.
- NEI, M. & ROYCHOUDHURY, A.K.. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. **Genetics**, 76:379-390. 1974.
- PAIVA, J.R. **Variabilidade enzimática em populações naturais de seringueira (Hevea brasiliensis (Willd) ex Adr. de Juss) Muell. Arg.)**. Piracicaba, 1992. 144p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz " / USP).
- PERRY, D.J. & DANKIK, B.P. Mating system dynamics of lodgepole pine in Alberta, Canadá. **Silvae Genetica**, 35(5/6): 190-195, 1986.
- PHILLIPS, M.A. & BROWN, A.H.D. Mating system and hibridity in *Eucalyptus pauciflora*. **Australian Journal Biological Science**, 30: 337-44, 1977.
- PRYOR, L.D. **The Biology of Eucalypts**. Edwards Arnold, London, 82p. 1976.
- PRYOR, L.D. & JOHNSON, L.A.S. **A classification of the Eucalyptus**. Canberra. The Australian National University. 1971. 101p.

RIDGWAY, G.; SHERBURNE, S.; LEWIS, R. Polymorphisms in the esterases of Atlantic herring. *Transactions of the American Fisheries Society*, 99:147-151, 1970.

RITLAND, K. & JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. *Heredity*, 47:35-52, 1981.

ROTHER, G.M. Eficacia y limitaciones de los estudios de isoenzimas en la genética de los árboles forestales. *Recursos Genéticos Forestales*. Información nº 18. FAO, Roma. p. 2-15. 1991.

RUDIN, D. Biochemical genetics and selection application of isozymes in tree breeding. In: IUFRO JOINT MEETING OF WORKING PARTIES ON POPULATION AND ECOLOGICAL GENETICS, BREEDING THEORY PROGENY TESTING Bordeaux, proceedings, p.145-64. 1976.

RUDIN, D. & LINDGREEN, D. Isozymes studies in seed orchards. *Studia Forestalia Suecia*, Stockholm, 139:1-23, 1977.

SHAW, D.V. & ALLARD, R.W. Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using Isozymes markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 62:113-120, 1982.

SHAW, D.V. & BROWN, A.H.D. Optimum number of marker loci for estimating outcrossing in plant populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 61:321-325. 1982.

SHAW, D.V.; KAHLER, A.L.; ALLARD, R.W. A multilocus estimator of mating system parameters in plant populations. *Proc.Nat.Acad. Sci.(USA)*, 78:1298-1302, 1981.

SCHROEDER, S. Outcrossing rates and seed characteristics in damaged natural populations of *Abies alba* Mill. *Silvae Genetica*, 38(5/6):185-189, 1989.

SNEDECOR, G.W. *Statistical methods*. Ames, The Iowa State University Press, 1956. p.271-5.

SOLTIS, D.E.; HAUFLER, C.H.; DARROW, D.C.; GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *American Fern Journal*, 73(1):9-26. 1983.

SORENSEN, F.C. Estimate of self-fertility in coastal Douglas-fir from inbreeding studies. *Silvae Genetica*, 20: 115-20, 1971.

SQUILLACE, A.E. Average genetic correlation among offspring from open-pollinated forest trees. *Silvae genetica*, 23: 149-156, 1974.

STUBER, C.W.; WENDEL, J.F.; GOODMAN, M.M.; SMITH, J.S.C. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea Maydis* L.). Technical Bulletin 286, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina. 87p. 1988.

SWOFFORD, D.L. & SELANDER, R.B. Biosys-1. A computer program for the analysis of Allelic Variation in Population Genetics and Biochemical Systematics. Release 1,7, David L. Swofford, Illinois Natural History Survey All Rights Reserved, Illinois, 1989.

VAN WYK, G. Inbreeding effects on *Eucalyptus grandis* families with different degree of relatedness. In: Simpósio IUFRO. Águas de São Pedro, 8p. 1980.

VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas In: Congresso Latino Americano de Genética, 10, Rio de Janeiro, 1992. *Proceedings, Revista Brasileira de Genética*. Suplemento 1, Ribeirão Preto, 15(1):53-60, 1992.

WEBER, J.C.; NEAL, D.B.; ADAMS, W.T. Inheritance of allozymes in needle tissue of Douglas-fir. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*. 1984.

WEIR, B.S. *Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data*. North Carolina State University, Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 377 p., 1990.

WRIGHT, S. Coefficients of inbreeding and relationship. *American Naturalist*, 56:330-8, 1922.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19:395-420, 1965.

WRIGHT, S. *Evolution and the genetics of populations*, vol. 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago, 1978.

YAMADA, M.M.; GURIES, R.P. *A manual for starch gel electrophoresis New chocolate lovers edition*. Staff Paper Series no.39. Department of Forestry. University of Wisconsin-Madison, 22p. 1989.

YASDANI, R. & LINDGREN, D. Variation of pollen contamination in a Scots Pine seed orchard. *Silvae Genetica*, 40(5-6):243-246, 1991.

YEH, F.C.; BRUNE, A.; CHELIAK, W.N.; CHIPMAN, D.C. Mating system of *Eucalyptus citriodora* in a seed-production area. *Canadian Journal of Forest Research*, Ottawa, 13(6):1051-55, 1983.

APÊNDICES

NÚMERO DOS CLONES E PROGENIES	
06-07-15-19-26-27-40-45-48-51-52-09-22-28-03-04-21-05-10-11-12-14-16-17-20-33-34-36-38-43-47-49-50-24-44 	população selecionada original
06-07-15-19-26-27-40-45-48-51-52-09-22-28 	população selecionada 1
06-07-15-19-26-27-40-45-48-51-52-09-22-28 	progenies da população selecionada 1 (recombinação destes clones)
09-22-28-03-04-21 	população selecionada 2
09-22-28-03-04-21 	progenies da população selecionada 2 (recombinação destes clones com todos os 35 clones)

Apêndice 1. Relação dos números de clones e progenies que
constituem o material de estudo.

Apêndice 2

Quadrados médios entre populações, família / população, indivíduo / família / população, gene / indivíduo / família / população no modelo hierárquico desbalanceado para 3 alelos do loco IDH identificados por eletroforese em 2 populações de *E. grandis*. Piracicaba, SP, 1993.

		ALELOS		
F.V.	G.L.	1	2	3
Populações	1	4,6976	2,6564	0,2889
Famílias	18	0,9780	1,0734	0,0518
Indivíduos	372	0,0818	0,0756	0,0098
Genes	391	0,0844	0,0716	0,0128

Apêndice 3

Quadrados médios entre populações, família / população, indivíduo / família / população, gene / indivíduo / família / população no modelo hierárquico desbalanceado para 2 alelos do loco MDH₂ identificados por eletroforese em 2 populações de *E. grandis*. Piracicaba, SP, 1993.

ALELOS			
F.V.	G.L.	-----	
		1	2

Populações	1	0,1639	0,1639
Famílias	18	0,7543	0,7543
Indivíduos	375	0,0732	0,0732
Genes	394	0,0939	0,0939

Apêndice 4

Quadrados médios entre populações, família / população, indivíduo / família / população, gene / indivíduo / família / população no modelo hierárquico desbalanceado para 6 alelos do loco LAP₂ identificados por eletroforese em 2 populações de *E. grandis*. Piracicaba, SP, 1993.

F.V.	G.L.	ALELOS					
		1	2	3	4	5	6
Populações	1	0,5205	0,1785	0,0099	0,0345	0,0017	0,0029
Famílias	18	1,9966	1,5032	0,7766	0,7365	0,0079	0,0012
Indivíduos	368	0,1936	0,0814	0,1575	0,0590	0,0063	0,0013
Genes	387	0,2209	0,1317	0,1421	0,0762	0,0064	0,0013

Apêndice 5

Quadrados médios entre populações, família / população, indivíduo / família / população, gene / indivíduo / família / população no modelo hierárquico desbalanceado para 4 alelos do loco SKDH identificados por eletroforese em 2 populações de *E. grandis*. Piracicaba, SP, 1993.

F.V.	G.L.	ALELOS			
		1	2	3	4
Populações	1	0,0784	0,0040	0,0609	0,0009
Famílias	18	0,2515	0,0222	0,1371	0,0025
Indivíduos	376	0,0355	0,0094	0,0267	0,0025
Genes	395	0,0392	0,0051	0,0342	0,0025

Apêndice 6

Quadrados médios entre populações, família / população, indivíduo / família / população, gene / indivíduo / família / população no modelo hierárquico desbalanceado para 6 alelos do loco EST_1 identificados por eletroforese em 2 populações de *E. grandis*. Piracicaba, SP, 1993.

F.V.	G.L.	ALELOS					
		1	2	3	4	5	6
Populações	1	1,4859	0,3809	0,7334	0,0002	0,0467	0,0029
Famílias	18	3,0969	2,1927	0,8211	0,8461	0,0046	0,0011
Indivíduos	380	0,11238	0,0925	0,1101	0,0656	0,0049	0,0012
Genes	400	0,2375	0,1325	0,1237	0,0875	0,0050	0,0012

Apêndice 7

Quadrados médios entre populações, família / população, indivíduo / família / população, gene / indivíduo / família / população no modelo hierárquico desbalanceado para 3 alelos do loco EST_2 identificados por eletroforese em 2 populações de *E. grandis*. Piracicaba, SP, 1993.

F.V.	G.L.	ALELOS		
		1	2	3
Populações	1	2.2580	2,8742	0,0466
Famílias	18	1,1734	1,2037	0,0046
Indivíduos	379	0,1818	0,1768	0,0049
Genes	399	0,1692	0,1654	0,0050

Apêndice 8

Quadrados médios entre populações, família / população, indivíduo / família / população, gene / indivíduo / família / população no modelo hierárquico desbalanceado para 4 alelos do loco EST_3 identificados por eletroforese em 2 populações de *E. grandis*. Piracicaba, SP, 1993.

		ALELOS			
F.V.	G.L.	1	2	3	4
Populações	1	0,7249	1,6565	0,1067	0,0119
Famílias	18	0,6091	0,5788	0,0193	0,0018
Indivíduos	373	0,1394	0,1363	0,0067	0,0025
Genes	395	0,1667	0,1565	0,0076	0,0025

Apêndice 9

Médias dos quadrados médios entre populações, família / população, indivíduo / família / população, gene / indivíduo / família / população no modelo hierárquico desbalanceado, obtidos na análise de variância conjunta para locos e alelos considerando 2 populações de *E. grandis*. Piracicaba, SP, 1993.

F.V.	G.L.	QM

Populações	28	0,6854
Famílias	504	0,7000
Indivíduos	10.487	0,0690
Genes	11.032	0,0813

Apêndice 10

Coefficientes K_1 , K_2 e K_3 estimados à partir das esperanças dos quadrados médios das análises de variâncias individuais para cada alelo dos diversos locos e da análise conjunta envolvendo 7 locos e 28 alelos em 2 populações de *E. grandis*. Piracicaba, SP, 1993.

LOCOS	Nº	ÍNDICES		
	DE			
	ALELOS	K_1	K_2	K_3
IDH	3	39,1691	39,6847	333,0509
MDH ₂	2	39,4828	39,7838	334,0776
LAP ₂	6	38,7741	39,1592	328,4183
SKDH	4	39,5861	39,8334	334,5529
EST ₁	6	40,0000	40,0096	336,1088
EST ₂	3	39,8964	39,9927	335,8444
EST ₃	4	39,2897	39,3933	330,3036
MÉDIA PONDERADA(*)		39,4396	39,6614	332,9082

(*) considerando alelos e locos para a análise conjunta

Apêndice 11

Estimativas das variâncias entre populações ($\hat{\sigma}_P^2$), entre famílias/populações ($\hat{\sigma}_F^2$), entre indivíduos/família/população ($\hat{\sigma}_I^2$), entre genes/indivíduo/família/população ($\hat{\sigma}_G^2$), da variância total ($\hat{\sigma}_T^2$) para 28 alelos em 7 locos encontrados nas duas populações de *E. grandis*. Piracicaba, SP, 1993.

LOCO	ALELO	$\hat{\sigma}_G^2$	$\hat{\sigma}_I^2$	$\hat{\sigma}_F^2$	$\hat{\sigma}_P^2$	$\hat{\sigma}_T^2$
IDH	1	0,0844	-0,0013	0,0229	0,0166	0,1226
	2	0,0716	0,0020	0,0255	0,0047	0,1038
	3	0,0128	-0,0015	0,0011	0,0007	0,0131
MDH ₂	1	0,0939	-0,0103	0,0172	-0,0018	0,0990
	2	0,0939	-0,0103	0,0172	-0,0018	0,0990
LAP ₂	1	0,2209	-0,0136	0,0465	-0,0045	0,2493
	2	0,1317	-0,0251	0,0367	-0,0041	0,1392
	3	0,1421	0,0077	0,0160	-0,0023	0,1635
	4	0,0762	-0,0086	0,0175	-0,0022	0,0829
	5	0,0064	0,0000	0,0000	0,0000	0,0064
	6	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013
SKDH	1	0,0392	-0,0019	0,0054	-0,0005	0,0422
	2	0,0051	0,0021	0,0003	0,0000	0,0075
	3	0,0342	-0,0037	0,0028	-0,0002	0,0331
	4	0,0025	0,0000	0,0000	0,0000	0,0025
EST ₁	1	0,2375	-0,0569	0,0743	-0,0048	0,2501
	2	0,1325	-0,0200	0,0525	-0,0054	0,1596
	3	0,1237	-0,0068	0,0178	-0,0003	0,1344
	4	0,0875	-0,0109	0,0195	-0,0025	0,0936
	5	0,0050	0,0000	0,0000	0,0001	0,0051
	6	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012
EST ₂	1	0,1692	0,0063	0,0248	0,0032	0,2035
	2	0,1654	0,0057	0,0257	0,0050	0,2018
	3	0,0050	0,0000	0,0000	0,0001	0,0051
EST ₃	1	0,1667	-0,0136	0,0119	0,0003	0,1653
	2	0,1565	-0,0101	0,0113	0,0032	0,1609
	3	0,0076	-0,0004	0,0003	0,0003	0,0078
	4	0,0025	0,0000	0,0000	0,0000	0,0025
ANOVA CONJUNTA(*)		0,0813	-0,0061	0,0160	0,0000	0,0912

(*) considerando todos os locos e todos os alelos.

Apêndice 12

Identidade ($\hat{I}$) e Distância ($\hat{D}$) Genéticas,
segundo NEI (1972), para todos os locos
polimórficos das populações 3 e 5.

LOCO	$\hat{I}$	$\hat{D}$
IDH ₁	0,983	0,017
MDH ₂	0,999	0,001
LAP ₂	0,995	0,005
SKDH	1,000	0,000
EST ₁	0,983	0,017
EST ₂	0,979	0,022
EST ₃	0,991	0,009
MÉDIA	0,990	0,010