

**COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO NO VIVEIRO E
NO CAMPO DOS DESCENDENTES DE CLONES DE
Eucalyptus spp. AUTOFECUNDADOS E CRUZADOS**

REGIANE ABJAUD ESTOPA

2006

REGIANE ABJAUD ESTOPA

**COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO NO VIVEIRO E NO CAMPO DOS
DESCENDENTES DE CLONES DE *Eucalyptus* spp.
AUTOFECUNDADOS E CRUZADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-graduação
em Agronomia, área de concentração em Genética e
Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de
"Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Magno Antonio Patto Ramalho

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Estopa, Regiane Abjaud

Comparação do desempenho no viveiro e no campo dos descendentes de clones de *Eucalyptus* spp autofecundados e cruzados / Regiane Abjaud Estopa. -- Lavras : UFLA, 2006.

60 p. : il.

Orientador: Magno Antonio Patto Ramalho

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Eucalyptus* spp. 2. Endogamia. 3. Germinação. 4. Autofecundação. 5. Híbridos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.97342

REGIANE ABJAUD ESTOPA

**COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO NO VIVEIRO E NO CAMPO DOS
DESCENDENTES DE CLONES DE *Eucalyptus* spp.
AUTOFECUNDADOS E CRUZADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 21 de julho de 2006.

Prof. Dra. Flávia Maria Avelar Gonçalves

UFLA/DBI

Dr. Jupiter Israel Muro Abad

Aracruz Celulose S. A.

Prof. Dr. Magno Antonio Patto Ramalho

UFLA/DBI

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

por minha existência e pela presença constante em minha vida;

OFEREÇO

Aos meus pais, Donizetti e Joana, por minha formação, pelo apoio, paciência e amor com que me conduziram na vida;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está sempre presente, me guiando e abençoando os meus passos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor e orientador Magno Antonio Patto Ramalho, pela excepcional orientação, pelos ensinamentos, amizade e, principalmente, pela confiança depositada em mim no início deste curso.

Aos membros da banca examinadora, Flávia Maria Avelar Gonçalves e Jupiter Israel Muro Abad, pelas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores Antônio Cláudio David, Flávia Maria Avelar Gonçalves, João Bosco dos Santos e João Cândido, pela a inestimável ajuda na condução do trabalho.

Aos funcionários do DBI, Elaine, Zélia, Rafaela, Irondina, Lindolfo e Léo, pela convivência e auxílio durante o curso. E ao funcionário Jorge do Viveiro Florestal pela ajuda na fase inicial.

Aos colegas Adriano, Alex, Aisy, Breno, Flávia, Flavinha, Gracielle, Isabella, José Ângelo, Juarez, Renato e Vanessa, pela inestimável colaboração no trabalho e pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, Admilson, Francine, Gabriela e Marciane, em especial ao Laboratorista Lamartine, pela amizade e ajuda na condução deste trabalho.

À amiga Flavinha, pelo auxílio na realização deste trabalho e pelo companheirismo nos momentos de tristeza e alegria. E aos amigos Anderson, Eliene, Elisa, Evânia, Kaesel, Nara, Polianna e Rodrigo pela torcida e companheirismo durante este período.

A todos os colegas do GEN, pela amizade e apoio durante todo o curso de mestrado.

A toda a minha família, meus pais e irmãs, meu cunhado e meu sobrinho por me apoiarem e confiarem em minha vontade de alcançar meus objetivos. Especialmente, a minha irmã Aline, pelo companheirismo durante este período.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 O gênero <i>Eucalyptus</i>	3
2.2 Biologia floral do gênero <i>Eucalyptus</i>	5
2.3 Taxa de fecundação cruzada em <i>Eucalyptus</i>	6
2.4. Heterose	8
2.5 Depressão por endogamia	9
2.6 Germinação e emergência em <i>Eucalyptus</i>	11
2.7 Melhoramento do <i>Eucalyptus</i> no Brasil.....	15
2.8 Melhoramento visando a obtenção de clones	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Material e local de estudo	19
3.2 Experimento em viveiro.....	19
3.3 Experimento de campo	21
3.4 Identificação de marcadores moleculares	24
4 RESULTADOS	26
4.1 Dados obtidos em viveiro	26
4.2 Dados obtidos no campo.....	33
4.3 Plantas com desenvolvimento anormal no campo	40
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXO	55

RESUMO

ESTOPA, Regiane Abjaud. **Comparação do desempenho no viveiro e no campo dos descendentes de clones de *Eucalyptus* spp. autofecundados e cruzados.** 2006. 62 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Descendentes de clones de *Eucalyptus* autofecundados e cruzados foram avaliados com o objetivo de verificar a possível perda de vigor nas fases de germinação e crescimento inicial no viveiro e no campo. Também foi identificada no campo a frequência de plantas anormais com crescimento reduzido, em altura e folhas enrugadas. Procurou-se algum caráter morfológico ou molecular no viveiro que possibilitasse identificar o mais precocemente possível as plantas anormais. Para isso, foram avaliados descendentes de dois clones comerciais autofecundados (C01 e C02) e dois híbridos (C01 x C03 e C02 x C03). O trabalho constou de duas fases de avaliação. A primeira, conduzida em viveiro, cujo delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, constou de 4 tratamentos e 6 repetições, parcelas com 30 tubetes com uma única semente. Na segunda, no campo, foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com 4 tratamentos e 6 repetições, com 18 plantas por parcela. Avaliaram-se percentagem de germinação, índice de velocidade de emergência, sobrevivência e altura das plantas aos 35, 50, 65 e 80 dias no viveiro e, no campo, a percentagem de sobrevivência aos 6 meses e a altura aos 2, 4 e 6 meses. Foi isolado o DNA de folhas que foram coletadas de plantas com crescimento anormal e normal. Utilizando-se 639 *primers* de RAPD procurou-se identificar marcas moleculares associadas às plantas de desenvolvimento anormal. Concluiu-se que a germinação, a sobrevivência e o crescimento das plantas provenientes de autofecundação foram semelhantes aos dos híbridos, mostrando que, possivelmente, a perda de vigor não é expressiva para caracteres das etapas iniciais do desenvolvimento do *Eucalyptus*. A ocorrência de plantas anormais foi de 6,9% entre as plantas oriundas de autofecundação e 4,6% entre as plantas híbridas. Não foi identificada nenhuma marca morfológica no viveiro ou molecular, que possibilitasse o reconhecimento precoce das plantas com anomalia. O caráter tem expressividade variável, o que dificulta o estudo da segregação.

* Orientador : Magno Antonio Patto Ramalho – UFLA

ABSTRACT

ESTOPA, Regiane Abjaud. **Performance of inbred and outbred *Eucalyptus* spp. clones in the nursery and in the field.** 2006. 62 p. Dissertation (Master in Plant Genetics and Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Inbred and outbred *Eucalyptus* clones were assessed aiming to check a possible loss of vigor in the initial germination phases and growing in the nursery and in the field. It was also verified in the field the frequency of abnormal plants, with reduced growing and wrinkled leaves. A morphological or molecular character was searched in the nursery, which would allow to identify as early as possible, the abnormal plants. Offsprings from two commercial clones were assessed as inbreds (C01 and C02) and as hybrids (C01 x C03 and C02 x C03). The work consisted of two phases. The first one was conducted in the nursery, in a completely random design, with 4 treatments and 6 replications, in plots with 30 tubes with only one seed. The second one, in the field, used a randomized complete block design, with 4 treatments and 6 replications, with 18 plants per plot. The percentage of germination, germination speed index, survival and plant height were assessed at 35, 50, 65 and 80 days in the nursery. In the field, the survival percentage at 6 months and plant height at 2, 4 and 6 months were evaluated. DNA from normal and abnormal plant leaves were isolated. Molecular markers associated with plants with abnormal development were searched using 639 RAPD primers. Germination, survival and plant growth resulted from inbreds were similar to the hybrids, showing that possibly the loss of vigor is not expressive for traits in the early developmental stage of *Eucalyptus*. The occurrence of abnormal plants was 6.9 % between inbred plants and 4.6% between hybrid plants. No morphological or molecular markers were identified in the nursery, which would make possible the early recognition of abnormal plants. The character has variable expressivity, which makes difficult the segregation study.

* Guidance Committee: Magno Antonio Patto Ramalho – UFLA (Major Professor).

1 INTRODUÇÃO

A produção de papel e celulose é um componente importante do agronegócio brasileiro, com perspectivas de expansão para os próximos anos. O Brasil tem apresentado forte crescimento desse setor, tornando-se o principal produtor de celulose a partir do eucalipto como matéria-prima (Bacha, 2005). Entre as causas desse sucesso, merece destaque a obtenção de clones que incrementaram em um curto espaço de tempo a produtividade de celulose por área (Vencovsky & Ramalho, 2000).

A seleção clonal é uma técnica “fim de linha”, isto é, proporciona o máximo de ganho em uma única geração, mas, a partir daí, ganhos adicionais são difíceis. É importante que, além da seleção clonal, sejam conduzidos programas de melhoramento visando aumentar a chance de obter clones superiores. Desse modo, são geradas, continuamente, novas combinações genotípicas para que possam ocorrer ganhos genéticos adicionais (Bison, 2004).

Na condução de programas de melhoramento, informações a respeito do controle genético das características auxiliam os melhoristas na tomada de decisão e ampliam a eficiência do processo. Nesse contexto, várias informações a respeito do controle genético de caracteres têm sido encontradas em algumas espécies cultivadas (Hallauer & Miranda Filho, 1988; Coors & Pandey, 1999). Contudo, em plantas perenes devido, sobretudo, ao tempo gasto na obtenção dos dados as informações disponíveis são mais restritas.

No gênero *Eucalyptus*, esforços têm sido dedicados à obtenção dessas informações, tanto no exterior como no Brasil (Rezende, 2001). A respeito do controle genético, a existência de heterose ou a depressão por endogamia são informações mais expressivas, porque elas orientam qual a estratégia mais apropriada na obtenção de novos clones. Bison et al. (2004) avaliaram o efeito

da depressão por endogamia em dez clones comerciais de *Eucalyptus* e constataram que ela foi, de pequena magnitude para circunferência à altura do peito e, especialmente, para a densidade. Questionaram, contudo, que esse valor pode estar subestimado. Uma das razões estaria no processo de obtenção das mudas, isto é, a mortalidade das plântulas ou o menor desenvolvimento delas, devido à expressão de alelos recessivos prejudiciais na fase de *seedling* sendo eliminadas ainda no viveiro. Não foram encontradas, na literatura, informações da depressão por endogamia na germinação e emergência ou nas fases iniciais do desenvolvimento em eucalipto que permitam comprovar esse fato.

Embora o sucesso com clone no Brasil tenha sido marcante, ainda há a implantação de áreas extensas por meio de sementes. Nesses plantios, é comum observar algumas plantas com desenvolvimento anormal, reduzindo a produtividade por área. Seria importante elucidar por que isso ocorre, qual a sua frequência e se seria possível identificar algum marcador morfológico ou molecular que possibilitasse identificar, ainda no viveiro, plantas que irão expressar o sintoma no campo.

Pelo exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a possível perda de vigor nas fases iniciais de desenvolvimento no viveiro e no campo, a partir do desempenho de descendentes de clones autofecundados e cruzados e, ainda, a frequência de ocorrência de plantas anormais no campo e a possibilidade de identificar algum “sistema” de eliminar essas ainda no viveiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* foi formalmente nomeado por L' Hérítier de Brutelle, em 1789, a partir da espécie *E. obliqua*. Várias espécies foram catalogadas e, atualmente, o gênero possui mais de 700.

A classificação taxonômica deste gênero era bastante simples até 1995, mas, a partir de então, muitas controvérsias surgiram na classificação de *Angophora*, *Corymbia* e *Eucalyptus*.

Em 1995, em um trabalho de análise filogenética morfológica de Hill e Johnson, algumas espécies da família *Myrtaceae* foram divididas em dois gêneros, o *Eucalyptus* e outro gênero constituído por *Angophora* e *Corymbia*. No mesmo ano, Udovicic et al. (1995), em análise filogenética molecular, encontraram uma classificação semelhante para os gêneros. Porém, segundo Brooker (2000), este trabalho foi inconclusivo, pois, existem algumas contradições nos dados analisados.

No entanto, a mais recente classificação taxonômica do gênero (Brooker, 2000) considera o *Eucalyptus* como um único gênero, sendo formado por 13 subgêneros constituídos de uma única espécie cada e, 7 subgêneros contendo várias espécies. Atualmente, *Angophora* e *Corymbia* são subgêneros do gênero *Eucalyptus*, sendo que, essa mudança é conceitualmente filogenética.

Dentre as espécies de eucalipto em uso no Brasil, as mais utilizadas na indústria de celulose são *E. grandis* e *E. urophylla*, assim como o híbrido entre elas (Bertolucci et al., 1995). A espécie *E. grandis* é originária da Austrália, apresentando distribuição natural entre 16° e 33° de latitude Sul, sendo a maior ocorrência entre 26° e 33° Sul. A maioria das florestas naturais desta espécie ocorre no sul de Queensland e norte de New South Wales, em terras baixas na

região costeira e em colinas com uma altitude em torno de 600 m, não se estendo mais do que 100 km do mar (Eldridge et al., 1993). Esta é encontrada em vários tipos de solos, mas geralmente em solos profundos e bem drenados, com moderada fertilidade, não tolerando ambientes alagados. Nessas regiões, as precipitações variam de 1.000 a 18000 mm anuais.

Esta espécie possui crescimento exuberante e é amplamente plantada em regiões subtropicais. Ela não é resistente à seca, mas uma precipitação média anual de 900 mm é geralmente adequada, desde que bem distribuída. Geadas fortes limitam a plantação em áreas com altas altitudes (Turnbull & Pryor, 1984). No Brasil, esta espécie destacou-se pelo seu rápido crescimento e grande adaptação. Suas árvores são retas e fornecem excelente madeira para serraria, escoras e para a produção de celulose, sendo, por isso, uma espécie bastante utilizada nas áreas reflorestadas (Assis, 1996).

A espécie *E. urophylla* não é encontrada naturalmente na Austrália. Ela ocorre no Timor, Flores e outras ilhas da Indonésia, em latitudes que variam de 7° a 10° Sul, em altitudes de 300 a 3.000 m, com precipitações anuais de 1.000 a 2.000 mm. Apresenta crescimento muito bom em baixas altitudes e resistência ao cancro, causado pelo fungo *Cryphonectria cubensis* (Turnbull & Pryor, 1984). Esta é uma espécie de grande potencialidade para regiões de clima quente e de elevados déficits hídricos, devido ao seu bom desenvolvimento nestas condições, a boa qualidade da madeira para carvão, celulose, serraria e, principalmente, pela sua resistência ao cancro. Suas árvores são de grande porte, retas, com forte dominância apical e casca rugosa (Ruy, 1998).

2.2 Biologia floral do gênero *Eucalyptus*

O gênero eucalipto possui flores que são morfológicamente bissexuadas, isto é, têm os dois sexos na mesma flor. O número de flores simples por inflorescência pode variar de (1, 3, 7, 9 ou 11) e essa variação é responsável pela diferenciação taxonômica das espécies. A inflorescência é do tipo umbela, sendo cada uma presa na axila da folha por um pedúnculo. O botão floral desenvolve-se inicialmente envolvido por uma bráctea, sendo bastante uniforme dentro das espécies e variável entre elas. Pode ser peciolado ou séssil e é envolvido por uma ou duas capas que constituem o opérculo, com função de proteção das partes femininas e masculinas até a antese (Potts & Gore, 2000).

Na maioria das espécies, cada estame consiste de um filete que suporta uma antera. Espécies como *E. sideroxylon* possuem estames externos estéreis. Geralmente, os estames possuem comprimentos diferentes em uma flor. Diferenças no formato da antera, assim como no local onde o filete se liga, ocorrem com frequência no eucalipto, sendo estes elementos também utilizados na diferenciação entre as espécies (Tonaco, 2002).

A parte feminina é composta por estilete, estigma e ovário. O estilete apresenta diferenças em comprimento, espessura e rigidez, de acordo com a espécie. O ovário é multilocular e cada lóculo possui três tipos de estruturas: estéreis chamadas de ovulóides, óvulos viáveis e óvulos não viáveis. Cada ovário contém, aproximadamente, 4 ou 5 óvulos potencialmente viáveis e esse número varia com a espécie (Potts & Gore, 2000).

Logo após a abertura do opérculo, as anteras deiscentes expõem o pólen, então já pronto para iniciar a polinização. Os agentes polinizadores do eucalipto são basicamente insetos e, em alguns casos, pássaros; a diferença básica entre esses agentes polinizadores está na maior eficiência dos insetos em percorrer maiores distâncias e de se adaptarem a diferentes condições climáticas (Eldridge et al., 1993).

Existem evidências de que, em *Eucalyptus*, ocorre tanto fecundação cruzada como autofecundação (Pryor, 1976). Nas populações naturais, as espécies cultivadas de eucalipto exibem um sistema de cruzamento misto (Moran & Bell, 1983), mas predominantemente, apresentando fecundação cruzada e taxa de autofecundação de até 15%. Fenômenos como a macho esterilidade e auto-incompatibilidade influenciam essa elevada taxa de fecundação cruzada (Potts & Gore, 2000).

A maturidade fisiológica das sementes de eucalipto é, geralmente, acompanhada por visíveis mudanças no aspecto externo e na coloração dos frutos e das sementes. Os frutos consistem de cápsulas lenhosas e as sementes são pequenas. A produção de sementes varia enormemente por influência de fatores ambientais, agentes polinizadores e insetos predadores (Eldridge et al., 1993). As sementes, geralmente, estão maduras quando os frutos ficam duros e secos e a mudança de coloração das cápsulas pode ser um bom guia da maturidade das sementes.

Em trabalho conduzido por Hodgson (1976), foi constatado que sementes de *E. grandis* ficaram viáveis cerca de 4 a 5 meses após a antese e que o escurecimento do fruto ocorrido nas semanas seguintes serviu para indicar o processo de maturação.

2.3 Taxa de fecundação cruzada em *Eucalyptus*

Muito embora o eucalipto possua flores bissexuais, como já mencionado, há alguns fatores que favorecem a polinização cruzada. Um desses fatores é a protandria, isto é, maior precocidade do órgão masculino em relação ao feminino. Contudo, esse mecanismo não é muito eficiente em uma planta perene que floresce por períodos relativamente longos. Há outros mecanismos, tais

como macho esterilidade e auto-incompatibilidade geneticamente controlada (Tonaco, 2002). Contudo, esses mecanismos são ainda pouco estudados.

Em trabalhos encontrados na literatura, a taxa de fecundação cruzada varia em função da espécie, contudo, os valores citados comprovam a alogamia do eucalipto (Eldridge et al., 1993).

Populações naturais de nove espécies de eucalipto foram analisadas utilizando-se o polimorfismo de aloenzimas em sementes germinadas e mudas. Os resultados encontrados mostraram que a taxa de fecundação cruzada variou de 69% a 84% (Moran & Bell, 1983).

Em um trabalho de polinização artificial para avaliar a taxa de fecundação cruzada, uma mistura igual de pólen foi aplicada em estigmas receptivos, visando à autopolinização e à polinização cruzada, constatou-se que, em média, 81% de sementes obtidas eram provenientes da polinização cruzada. Existem algumas evidências para apoiar essa conclusão: embriões endogâmicos têm baixa viabilidade e competitividade no desenvolvimento do fruto. Em outras palavras, a depressão por endogamia é expressa nos estágios iniciais (Eldridge et al., 1993).

Em *E. camaldulensis*, utilizando aloenzimas como marcadores, verificou-se que a taxa de fecundação cruzada foi, em média, de 95% (Butcher & Williams, 2002), similar ao encontrado para *E. urophylla*, de 91% (House & Bell, 1994).

No Brasil, para avaliar a taxa de fecundação cruzada em *E. urophylla*, utilizaram-se dois marcadores moleculares, o RAPD E AFLP, em onze progênies de polinização aberta provenientes de populações melhoradas. Constatou-se que, para o marcador molecular RAPD, a taxa de fecundação cruzada foi de 93% e, para o AFLP, de 89% (Gaiotto et al., 1997).

Em outro trabalho realizado no Brasil, empregaram-se aloenzimas como marcadores para estimar o grau de hibridização natural entre *E. grandis* e *E.*

urophylla. Utilizaram-se parcelas com uma matriz de *E. grandis*, produtora de sementes, cercada por seis clones de *E. urophylla*, doadores de pólen. Assim, a partir da análise aloenzimática das progênies da árvore de *E. grandis*, foi estimada, em média, uma taxa de fecundação cruzada de 70,2%, variando entre 33% e 99% em árvores individuais (Campinhos et al., 1998).

Segundo Burgess et al. (1996), existe correlação positiva entre taxa de fecundação cruzada e crescimento em altura e diâmetro em *E. grandis*. Baixas taxas de crescimento só foram registradas para valores de taxa de cruzamento menores que 60%.

2.4 Heterose

O termo heterose ou vigor híbrido foi proposto por Shull (1908) e representa a superioridade da geração F_1 em relação à média dos pais. A sua ocorrência é condicionada à existência de divergência entre os genitores e à ocorrência de dominância na manifestação do caráter (Falconer & Mackay, 1996).

Muito embora a heterose seja um fenômeno antigo, de grande importância econômica, ainda há muitas dúvidas a respeito de sua ocorrência. Em 1952, foi realizada uma conferência no *Iowa State College* (Growen, 1952), para tentar explicar a ocorrência de heterose, mas, não houve um consenso. Mais de cinquenta anos depois, no México, foi realizado o Simpósio *The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops* (Coors & Pandey, 1999). As mais importantes autoridades em melhoramento genético do planeta estiveram presentes e, mesmo assim, o que se constata é que as dúvidas permanecem.

Acredita-se que a presença de dominância é fundamental, mas que interações epistáticas também podem estar presentes (Goodnight, 1999) e até

mesmo diferença no conteúdo de DNA dos genitores envolvidos (Fu & Donner, 2002).

Em *Eucalyptus* não existem muitas informações consistentes a respeito da heterose. Resultados preliminares mostram que esta existe para caracteres associados ao crescimento (Resende & Resende, 2000). Contudo, não tem sido detectada heterose para densidade da madeira, rendimento de celulose e teor de lignina (Assis, 2000).

Na cultura do milho, Gomes et al. (2000), avaliando a heterose para o caráter germinação em sementes de linhagens, híbridos simples e recíprocos, constatou que a heterose foi, em média, de 2,65% para os híbridos simples e 4% para os recíprocos. Por outro lado, para a mesma espécie, avaliando-se desenvolvimento da raiz durante a germinação e emergência de linhagens e híbridos, constatou-se a heterose foi de 51%, em média, cinco dias após a germinação (Hoecker et al., 2006).

No Brasil, foram avaliadas famílias de meios-irmãos de *E.grandis* e de *E. urophylla* e famílias de irmãos germanos interpopulacionais. Aos dois anos de idade, constatou-se que a heterose foi alta para a circunferência à altura do peito e que houve presença de dominância no controle deste caráter. Para a densidade da madeira, a heterose foi de praticamente nula e a interação alélica de dominância teve menor importância em sua expressão (Bison et al., 2004).

2.5 Depressão por endogamia

Fenômeno contrário à heterose é a endogamia, ou seja, a perda de vigor devido ao acasalamento de indivíduos aparentados. Esse acasalamento entre indivíduos aparentados pode ser devido a problemas de amostragem genética (Falconer & Mackay, 1996), à existência de um ancestral comum em gerações anteriores ou, até mesmo, a uma estratégia nos programas de melhoramento.

O acasalamento entre indivíduos aparentados provoca aumento da homozigose e decréscimo da heterozigose na descendência. Esses fatos permitem que alelos recessivos de efeito desfavorável, encobertos nos heterozigotos, se manifestem em homozigose, causando redução no valor adaptativo do indivíduo, denominada de depressão por endogamia ou perda de vigor. A quantidade ou o número desses alelos desfavoráveis são chamados de carga genética. Portanto, quanto maior a carga genética, maior a depressão por endogamia.

Assim, a obtenção de estimativas da depressão por endogamia possibilita inferir a respeito da estrutura genética das populações e do tipo de ação gênica predominante no controle genético dos caracteres. Na cultura do eucalipto existem poucos relatos dessas estimativas (Griffin & Cotterill, 1988; Hardner & Potts, 1995)

Alguns trabalhos foram realizados com o intuito de verificar a magnitude da depressão por endogamia em *Eucalyptus*. Dessa forma, Griffin & Cotterill (1988) avaliaram a autofecundação em *E. regnans*, aos 45 meses, em relação à performance das progênies obtidas por polinização aberta e por cruzamentos com outras plantas da população. Os autores constataram que a depressão por endogamia foi de 11,0% para o diâmetro e 18,0% para a altura. Como nesse trabalho, as sementes de polinização aberta foram obtidas sem a interferência do homem, é certo que ocorreram também autofecundações naturais. Assim, os valores obtidos possam estar subestimados.

Estudos detalhados do decréscimo no crescimento devido à endogamia foram feitos comparando-se o crescimento de progênies de *E. grandis* de autopolinização, polinização cruzada e polinização livre (Hodgon 1976a, b; Van Wyk, 1980), *E. gunni* (Potts et al. 1987), *E. nitens* (Tibbits 1989) e *E. regnans* (Eldridge & Griffin 1983; Griffin & Cotterill 1988). Todos estes estudos confirmam que autopolinização produz poucas sementes com germinação

reduzida e lento crescimento de mudas, se comparado com polinização cruzada. Para a polinização livre, os dados encontrados foram intermediários.

Em *E. globulus*, Hardner & Potts (1995) verificaram que houve significativa depressão por endogamia na altura (22,0%) e diâmetro (21,0%) das progênes autofecundadas em relação àquelas obtidas por cruzamentos, após 19 meses no campo. Para ambas as características, a depressão por endogamia tendeu a aumentar com a idade. Aos 43 meses, a depressão por endogamia foi de 26,0% para altura e 24,0% para diâmetro.

No Brasil, Bison et al. (2004) estimaram a depressão por endogamia utilizando dez clones comerciais de *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. saligna*. Para a avaliação em dois experimentos contíguos, foram utilizadas as gerações clonais (F₁) e a autofecundada (F₂). Assim, aos dois anos de idade, foram avaliadas a circunferência à altura do peito e a densidade básica da madeira. Constatou-se que a depressão por endogamia variou entre os clones e foi, em média, de 17,5% para a primeira e de 4,0% para a segunda. Contudo, era esperado que a depressão por endogamia no eucalipto fosse maior. Uma das razões é que, neste gênero, a taxa de autofecundação natural varia de 10,0% a 30,0%. Em cada geração, parte dos alelos letais é naturalmente eliminada, diminuindo gradativamente a depressão por endogamia.

2.6 Germinação e emergência em *Eucalyptus*

A germinação é o reinício do crescimento do embrião paralisado nas fases finais da maturação. Ou seja, a germinação de sementes propriamente dita pode ser definida como a seqüência de eventos fisiológicos que ocorrem antes da germinação da radícula, em sementes embebidas e não dormentes. O termo “germinação” é freqüentemente usado para o estabelecimento da plântula que é um evento pós-germinativo, ou seja, a emergência (Nonogaki, 2006). Os

processos fisiológicos do crescimento exigem atividades metabólicas aceleradas e a fase inicial de germinação consiste, primariamente, na ativação dos processos de aumento do teor de umidade e da atividade respiratória da semente. O embrião, envolvido por uma cobertura protetora constituída por várias camadas de tecidos vivos e mortos, possui reservas alimentares suficientes para atender a esse eventual aumento das atividades metabólicas (Popinigis, 1985).

As atividades metabólicas da semente culminam com efetiva retomada do crescimento pelo eixo embrionário, que acelera à medida que a semente, posta no substrato apropriado, absorve água (Carvalho & Nakagawa, 1988).

No viveiro, a primeira fase de desenvolvimento das mudas, da emergência das plântulas até 30-35 dias após, apresenta crescimento lento, pois as plântulas direcionam a maior parte de suas energias para a expansão da área foliar e a formação de raízes. Contudo, a partir dos 40 dias, intensifica a demanda de nutrientes, em função do rápido crescimento das mudas (Del Quiqui et al, 2004).

Vários fatores ambientais afetam a germinação e a emergência. A disponibilidade de água na fase de germinação afeta a velocidade de emergência. Algumas sementes não conseguem germinar quando o suprimento de água é reduzido nas primeiras fases de germinação ou produzem plântulas pouco vigorosas que não conseguem sobreviver às adversidades das condições ambientais. A textura do substrato também pode afetar a germinação de plântulas de eucalipto, proporcionando maior ou menor superfície de contato com as sementes. Quanto maior for a área de contato entre o substrato e a semente, mais rápida será a absorção de água, tornando a germinação mais eficiente.

Em *Eucalyptus citriodora*, foram avaliados os efeitos de substratos à base de vermiculita na produção de mudas de eucalipto, constatando-se que diferentes composições dos substratos afetaram a velocidade e a percentagem de

germinação das plântulas, conforme dados da Tabela 1 (Aguiar & Monogios, 1988).

Em *E. grandis* e *E. citriodora*, avaliando os efeitos da granulometria dos substratos e compostos orgânicos sobre a percentagem de germinação, Caproni (1992) encontrou variação de 59% a 83% em *E. grandis* e de 67% a 81% em *E. citriodora* (Tabela 2).

TABELA 1 Média da velocidade (IVG) e percentagem de germinação (%) de plântulas de *E. citriodora*, submetidas a diferentes tipos de substratos.

Composição dos compostos	Germinação de plântulas	
	IVG	%
Vermiculita fina + esterco	18,5 b ^{1/}	55,0 ab
Vermiculita superfina + esterco	16,7 b	52,0 b
Vermiculita micron + esterco	17,3 b	52,3 b
Mistura para sementeira + esterco	22,9 a	63,7 a
Mistura para sementeira Rendmax	19,7 ab	62,0 ab
Coefficiente de variação	9,2 %	5,5%

^{1/}Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tuckey ($P \leq 0,05$). Fonte: Aguiar & Monogios (1988).

TABELA 2 Percentagem média de germinação (%) das plântulas *E. grandis* e *E. citriodora* submetidos a diferentes granulometrias de substratos e a composto orgânico.

Granulometria	Germinação (%)	
	<i>E. grandis</i>	<i>E. citriodora</i>
Média adubada	67,36 ab ^{1/}	67,71 a
Média não adubada	78,47 ab	76,04 a
Fina adubada	59,72 b	77,09 a
Fina não adubada	83,33 a	81,25 a
Composto orgânico	69,45 ab	69,79 a

^{1/}Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tuckey (P≤0,05). Fonte: Caproni (1992).

Trabalhos encontrados na literatura relatam sobre a influência do tamanho da semente na performance da germinação (Nonogaki, 2006), mas, existem muitas controvérsias sobre o assunto. Em um desses trabalhos, verificou-se que a percentagem de germinação variou de 55% para sementes menores a 82% em sementes maiores em *E. maculata* (Silva et al., 1994). Já para *E. grandis* e *E. urophylla*, avaliando-se também a influência do tamanho sobre a qualidade da semente, constatou-se que, dentro de cada uma das espécies, a capacidade de germinação independeu do tamanho das sementes (Aguiar et al., 1980).

Outro fator que contribui para a queda na percentagem de germinação é a ocorrência de patógenos, ocasionando *damping off*. Eles afetam diretamente a germinação das plântulas de eucalipto e o desenvolvimento inicial das mudas. Vários pesquisadores relacionam a baixa percentagem de germinação com a

manifestação desta doença, denominada tombamento ou *damping off* em pré-germinação, a qual é confundida com a má germinação das sementes (Caproni, 1992).

2.7 Melhoramento do eucalipto do *Eucalyptus* no Brasil

As primeiras introduções de espécies e procedências de eucalipto ocorreram no Brasil, logo nos primeiros anos do século XX, tendo os primeiros estudos sido iniciados por Edmundo Navarro de Andrade, na ex-Companhia Paulista de Estradas de Ferro, no estado de São Paulo, a partir de 1904. Assim, foi estimulado o plantio do eucalipto para fornecer, em menor tempo, combustível para a ferrovia e madeira para postes e dormentes (Vencovsky & Ramalho, 2000; Ferreira & Santos, 1997).

As espécies identificadas como as mais promissoras foram *E. grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla*. Contudo, os plantios formados, mesmo por essas espécies, apresentavam baixa qualidade. Por isso, em 1941, Navarro de Andrade convidou Carlos Arnaldo Krug, chefe da Secção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), para, juntos, elaborarem um programa de melhoramento genético de eucaliptos. Esse programa foi considerado um dos mais avançados para sua época. Seus principais objetivos eram: a) melhorar a uniformidade das plantações; b) reduzir o número de falhas e o número de árvores dominadas das plantações; c) melhorar a forma do tronco, as características dos ramos, o crescimento em altura e diâmetro das árvores; d) melhorar a capacidade de brotação e e) aumentar a produção por unidade de área.

Para atingir esses objetivos, o programa instalado no IAC previa a seleção de árvores superiores, a seleção de áreas de produção de sementes, a hibridação interespecífica e seleção de mudas nos viveiros (Ferreira & Santos,

1997). Contudo, maior impulso se deu a partir de 1960, isso devido aos incentivos fiscais que estimularam o plantio dessa cultura em diversas regiões do país e, em consequência, maior atenção foi dada ao melhoramento por parte do setor privado e público, o qual passou a ser realizado sistematicamente (Vencovsky & Ramalho, 2000).

Assim, a primeira etapa do programa de melhoramento consistiu em proceder à avaliação de espécies e procedências visando à identificação das mais promissoras (Andrade et al., 1994). Posteriormente, os esforços foram concentrados na seleção massal de indivíduos superiores e seleção com famílias de meios-irmãos, com o objetivo de produzir sementes melhoradas de algumas espécies (Rezende, 2001).

Uma estratégia de melhoramento que forneceu excelente progresso genético foi a utilização de clones, que permite, por meio da multiplicação por via assexuada, a perpetuação de boas combinações híbridas (Campinhos & Ikemori, 1983). Esse avanço genético ocorreu quando os pesquisadores da empresa Aracruz Celulose S.A. vislumbraram a possibilidade de se proceder plantios clonais. Passaram, então, a selecionar árvores superiores, especialmente nos plantios comerciais, a maioria, ao que tudo indica, híbridos de *E. grandis* e *E. urophylla*. A primeira plantação clonal comercial de eucalipto no Brasil foi implantada em 1979, cerca de 12 anos após o início do seu cultivo pela empresa. Para isso, foi utilizada a propagação vegetativa de estacas retiradas das brotações de cepas (Ferreira & Santos, 1997).

Um clone corresponde a um híbrido simples, isso porque qualquer indivíduo na população segregante é oriundo da união de dois gametas, os quais, se duplicados, correspondem a duas linhagens parentais. Assim, a propagação vegetativa permite a perpetuação das melhores combinações híbridas, sem a necessidade de se obter linhagens como ocorre em outras espécies cultivadas (Andrade, 2002).

Atualmente, a silvicultura clonal de *Eucalyptus* tem sido uma das melhores formas de maximização da produtividade das florestas por meio da propagação vegetativa de genótipos selecionados, que tem permitido o estabelecimento de florestas clonais, proporcionando maior uniformidade, melhor adaptação dos clones aos ambientes de plantio, maior produção de madeira, racionalização das atividades operacionais e redução na idade de corte e nos custos de colheita e transporte (Silva, 2001). Tanto é assim que a produtividade de madeira passou de 20 m³/ha/ano, em 1960 para 40m³/ha/ano, em 1998 (Vencovsky & Ramalho, 2000).

Como já comentado, a seleção clonal é uma técnica de “fim de linha”, isto é, proporciona o máximo de ganho em uma única geração, mas, a partir daí, nenhum ganho adicional é conseguido. Assim, é importante que, além da seleção clonal, sejam conduzidos programas de melhoramento sexuado. Desse modo, são geradas, continuamente, novas combinações genotípicas para que possam ocorrer ganhos genéticos adicionais (Bison, 2004). Neste contexto, a autofecundação de clones superiores de eucalipto consiste em uma importante ferramenta no melhoramento genético, aumentando a variação entre progênies e melhorando a eficiência na seleção.

2.8 Melhoramento visando à obtenção de clones

Como já foi mencionado, o gênero *Eucalyptus* pode apresentar uma proporção significativa de progênies endogâmicas sob polinização aberta (Eldridge et al., 1993). Mesmo assim, é esperado que as plantas de eucalipto sejam normalmente muito heterozigóticas (Souza Júnior, 2001). A possibilidade de obtenção de genótipos heteróticos a partir de combinações ao acaso aliado a clonagem tem proporcionado grande avanço no melhoramento desse gênero no Brasil (Campinhos et al., 1998).

Em realidade, o clone corresponde à geração F_1 de um híbrido simples, pois é o produto de dois gametas, que, se duplicados, seriam duas linhagens. Desse modo, por meio de clones é possível perpetuar determinadas contribuições. No caso do *Eucalyptus*, essa tecnologia, como já mencionado, alcançou enorme sucesso devido à intensa seleção de matrizes superiores, aliada ao desenvolvimento de técnicas que possibilitaram a obtenção de milhares de indivíduos de matrizes superiores.

O desempenho médio de um clone para um dado caráter é fornecido por: $F_1 = m + a + 2d$, em que $m+a$ é a contribuição dos locos em homozigose já fixados e d é o desvio dos heterozigotos em relação à média. Quando se autofecunda um clone, a descendência apresenta média igual a: $F_2 = m + a + d$. Assim, o contraste das gerações $F_1 - F_2$ possibilita estimar a contribuição dos locos em heterozigose d . Portanto, avaliando-se simultaneamente o clone e a sua descendência autofecundada, pode-se inferir sobre a magnitude da depressão por endogamia (d) e, por conseguinte, se, no controle genético do caráter, ocorre dominância. Quanto maior a depressão por endogamia, maior é a frequência de locos em heterozigose, considerando que os locos têm a mesma contribuição para o caráter. Por outro lado, o contraste $2F_2 - F_1$ estima $m+a$. Quanto maior for a média da geração F_1 e a estimativa de $m+a$, maior é a frequência de locos com alelos favoráveis fixados no clone. Assim, avaliando-se vários clones e a descendência dos mesmos, provenientes de autofecundação, podem-se identificar aqueles com maior frequência de alelos favoráveis já fixados. Estes clones são os mais favoráveis para a seleção e, portanto, as suas descendências devem receber maior atenção no processo seletivo (Bison, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material e local de estudo

Para a instalação do experimento foram utilizadas sementes cedidas pela empresa Aracruz Celulose S. A, localizada no município de Aracruz, no Espírito Santo. Essas sementes provenientes da descendência de dois clones autofecundados, C01 e C02 e, dos híbridos entre os clones C01xC03 e C02xC03. Os clones C01 e C03 foram obtidos a partir de plantios comerciais de *E. grandis* em Rio Claro, SP e C02 em *E. urophylla*, também de Rio Claro.

O trabalho constou de duas fases de avaliação. A primeira foi conduzida em casa de vegetação (viveiro), localizada no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. A segunda, no campo no município de Ijaci, MG a 805 metros de altitude, 21°10'S de latitude e 45°55'W de longitude, na fazenda experimental da Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPE).

3.2 Experimento de viveiro

As sementes já beneficiadas enviadas pela empresa foram semeadas em casa de vegetação. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 4 tratamentos e 6 repetições. A parcela era constituída de 30 tubetes, tendo sido colocada uma semente por tubete. A semeadura foi realizada em 11/04/2005. O substrato utilizado foi casca de arroz carbonizada, vermiculita e terra de subsolo, na proporção de 5:3:2, esterilizado com brometo de metila. As irrigações eram realizadas a intervalos regulares por meio de sistema de nebulização.

Os seguintes dados foram anotados:

a) número de plântulas emergidas: quinze dias após a semeadura iniciou-se a contagem das plântulas normais emergidas. Esse processo se repetiu por 10 vezes, a intervalos de 2 dias. As plântulas eram consideradas emergidas quando atingiam a altura de 1 cm;

b) altura das plântulas: dados obtidos a partir dos 35 dias após a semeadura. Foram realizadas quatro avaliações, ou seja, aos 35, 50, 65 e 80 dias após a semeadura. A altura em centímetro era considerada do nível do substrato até a última gema no caule.

Procedeu-se à análise de variância dos seguintes dados:

a) porcentagem de germinação: considerando o número de plântulas emergidas aos 35 dias, dividido por 30, isto é, número total de sementes utilizadas vezes 100;

b) índice de velocidade de emergência (IVE): foi utilizada a expressão de Edmond & Drapala (1958), ou seja:

$$IVE = \frac{(G_1 \times N_1) + \dots + (G_{10} \times N_{10})}{N_1 + \dots + N_{10}}$$

Em que:

N: número de dias para a emergência nas diferentes datas de avaliação (1, 2, 3, ..., 10);

G: número de plântulas que emergiram nas diferentes datas de avaliação (1, 2, 3, ..., 10);

c) porcentagem de sobrevivência: considerou-se o número de plântulas sobreviventes aos 50, 65 e 80 dias, dividido pelo número de plântulas que emergiram aos 35 em cada parcela vezes 100:

d) altura das plântulas

Procedeu-se, inicialmente, à análise da variância por caráter, em cada época de avaliação, utilizando-se o seguinte modelo estatístico.

$$Y_{ij} = m + p_i + e_{(ij)}$$

Em que:

Y_{ij} : valor observado na parcela que recebeu o tratamento i , na repetição j ;

m : média geral do experimento;

p_i : efeito da população i , ($i = 1, 2, 3, 4$);

$e_{(ij)}$: erro experimental associado à observação Y_{ij} , tendo $e_{(ij)} \sim N(0, \sigma^2)$.

Posteriormente, para aqueles caracteres submetidos a mais de uma tomada de dados, foi efetuada a análise da variância considerando todas as avaliações.

$$Y_{ijk} = m + p_i + c_k + (pc)_{jk} + e_{(ijk)}$$

Em que:

Y_{ijk} : valor observado na parcela que recebeu o tratamento i , na repetição j , na época de avaliação k ;

m : média geral do experimento;

p_i : efeito da população i , ($i = 1, 2, 3, 4$);

c_k : é o efeito da época de avaliação k ($k = 1, 2, 3, 4$);

$(pc)_{jk}$: é o efeito da interação populações i e época de avaliação k ;

$e_{(ijk)}$: erro experimental associado à observação Y_{ijk} , tendo $e_{(ijk)} \sim N(0, \sigma^2)$.

3.3 Experimento de campo

A área experimental foi, anteriormente, utilizada como pastagem e foi submetida a uma gradagem antes da abertura das covas. A implantação do

experimento de campo foi em julho de 2005, aos 90 dias após a semeadura. As plantas foram identificadas no viveiro para se ter sua origem no campo.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com 4 tratamentos e 6 repetições. A parcela era constituída de 3 linhas com 6 plantas cada. O espaçamento entre plantas foi de 3x2 metros. Foram colocadas bordaduras em todas as laterais, utilizando-se as plantas restantes.

Foram aplicados, por cova, 200 g de fosfato e 100 g de N:P:K, formulação comercial de 8:28:16 + 0,5 Zn e, adicionalmente, 1% de boro.

Dados anotados:

a) percentagem de sobrevivência: seis meses após o transplantio foi feita a contagem do número de plantas sobreviventes;

b) altura das plantas: dados obtidos aos 2, 4 e 6 meses dias após transplantio. A altura, em centímetros, era considerada do nível solo até a última gema no caule.

Procedeu-se à análise de variância da altura e da porcentagem de sobrevivência. Considerou-se o número de plântulas sobreviventes por 6 meses, dividido por 18, isto é, pelo número de plantas que foram transplantadas para o campo vezes 100.

Inicialmente, foi realizada a análise da variância por caráter, em cada época de avaliação, utilizando-se o seguinte modelo estatístico.

$$Y_{ij} = m + p_i + r_j + e_{(ij)}$$

Em que:

Y_{ij} : valor observado na parcela que recebeu o tratamento i , na repetição j ;

m : média geral do experimento;

p_i : efeito da população i , ($i = 1, 2, 3, 4$);

r_j : efeito da repetição j , ($j = 1, 2, 3, \dots, 6$);

$e_{(ij)}$: erro experimental associado à observação Y_{ij} , tendo $e_{(ij)} \sim N(0, \sigma^2)$.

Posteriormente, para a altura das plantas submetidas a mais de uma tomada de dados, efetuou-se a análise da variância, considerando-se todas as avaliações. Adotou-se o delineamento de parcela subdividida no tempo (Ramalho et al., 2005), seguindo o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = m + b_j + p_i + c_k + (bp)_{ij} + (bc)_{jk} + (pc)_{ik} + e_{(ijk)}$$

Em que:

Y_{ijk} : valor observado na parcela que recebeu o tratamento i , na repetição j , na época de avaliação k ;

m : média geral do experimento;

b_j : o efeito de blocos j ($j = 1, 2, \dots, 6$);

p_i : efeito de populações i , ($i = 1, 2, 3$ e 4);

c_k : o efeito da época de avaliação k ($k = 1, 2, 3, 4$);

$(pc)_{ik}$: o efeito da interação entre populações i e época de avaliação k ;

$(bc)_{jk}$: o efeito da interação entre bloco j e a época de avaliação k ;

$(bp)_{ij}$: o efeito da interação entre populações i e o bloco j ;

$e_{(ijk)}$: erro experimental associado à observação Y_{ijk} , tendo $e_{(ijk)} \sim N(0, \sigma^2)$.

Para a realização das análises, foi utilizado o programa Sisvar (Ferreira, 2003). As médias dos tratamentos foram submetidas ao teste Scott & Knott (1974).

Foram obtidas as estimativas da correlação (r) por população, entre a altura média aos 80 dias no viveiro e aos 6 meses no campo. Para isso, foi utilizada a seguinte expressão:

$$r = \frac{\text{COV}_{xy}}{\sqrt{\sigma_x^2 \times \sigma_y^2}}$$

Em que:

Cov_{xy} é a covariância entre a média da altura da planta no viveiro (x) e a altura da mesma planta no campo (y). Esta covariância é genética, uma vez que os

dados das plantas foram tomados em ambientes diferentes e, portanto, não correlacionados.

σ_x^2, σ_y^2 é a variância na altura das plantas no viveiro e no campo. Foi considerada a variância fenotípica entre as plantas, pois, não foi possível isolar a variância genética.

3.4 Identificação do marcador molecular

Aos seis meses após o transplante, foram identificadas as plantas com desenvolvimento anormal, sobretudo aquelas com pequena altura, internódios curtos, ramos próximos ao solo e folhas enrugadas.

Foram coletadas cinco folhas das plantas anormais e de igual número das plantas normais próximas. Essas foram acondicionadas em sacos plásticos e, posteriormente, em caixa de isopor com gelo, antes de serem enviadas ao Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Lavras.

No laboratório, procedeu-se à extração do DNA de acordo com Nienhuis et al. (1995). Cerca de 200mg de folhas jovens foram trituradas em 800 μ L de tampão de extração, com 0,2% de β -mercaptoetanol, areia lavada e PVP (polivinilpirrolidona), em um almofariz. O tampão de extração constituiu de 2% de CTAB, 100 mM de Tris (pH 8,0), 20 mM de EDTA (pH 8,0), 1,4 M de NaCl e 1% PVP. O material macerado foi colocado em tubos de 1 mL, no banho-maria, por 60 minutos, a 65°C. A primeira extração dos ácidos nucléicos foi realizada com álcool isoamílico (24:1), separando-se a fase orgânica da aquosa por centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos e coletando-se o sobrenadante. À fase aquosa do novo tubo foram adicionados 60 μ L de solução de 10% de CTAB e 1,4M NaCl, sendo homogeneizados e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. À nova fase aquosa superior foram misturados 450 μ L de isopropanol gelado, permanecendo por 1 hora no freezer para precipitação do DNA.

Após precipitação, centrifugou-se novamente por 10 minutos a 14.000 rpm. A este material acrescentaram-se 200 μL de etanol 70% e centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 minutos. O “pellet” foi deixado em capela de fluxo laminar para secagem e, finalmente, os ácidos nucleicos foram solubilizados em tampão TE (100 μL) [1 mM de Tris e 0,1 mM EDTA] e quantificados pelo fluorímetro Hoeffer DQ 200 e, posteriormente, diluídos para a concentração de 10 ng/ μL , utilizada na reação de RAPD. Para as reações, foi utilizada a técnica de “bulk”, que consiste em proceder às análises a partir da mistura de DNA dos indivíduos de cada população. Preparou-se uma mistura contendo 10 μL do DNA de 10 plantas normais e outra com 10 plantas anormais, totalizando dois *bulks*.

O DNA obtido foi amplificado pelo método RAPD, utilizando-se 639 *primers* (Operon Technologies). Cada reação de amplificação de 12 μl continha 4,49 μl de água, 2,25 μl de DNA (10 ng. ml^{-1}), 0,66 μl de dNTP (mistura equitativa de dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,25 μl (1,0 mM) de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*), 1,0 μl de tampão de reação e 0,4 unidades da enzima Taq polimerase e 0,96 μl de diluente da enzima. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf MasterCycler Gradiente 5331. Cada ciclo de amplificação correspondeu a desnaturação, a 94°C, por dois minutos, o anelamento, a 42°C, por 30 segundos e a alongação, a 72°C, por 30 segundos. Após os 45 ciclos, procedeu-se a extensão final por dois minutos, a 72°C.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, em gel de agarose 1%, em tampão TBE (0,45 M Tris-Borato e 0,01 M EDTA), a 70V por 180 minutos. Posteriormente, foram corados com brometo de etídio na concentração de 0,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e visualizados em transluminador de luz ultravioleta Fotodyne e fotografados em câmara fotográfica EDA – 290 da Kodak.

4 RESULTADOS

4.1 Dados obtidos em viveiro

A germinação foi avaliada por meio de plântulas viáveis existentes aos 35 dias após a semeadura. Constatou-se que a precisão experimental na avaliação desse caráter foi boa. O coeficiente de variação foi inferior a 10% (Tabela 3).

Comparando-se a percentagem média de germinação, verifica-se que foram formados dois grupos. O primeiro, com maior percentagem média envolvendo as plântulas do clone C01 autofecundado e do híbrido entre os clones C02xC03, cuja percentagem média foi de 82,8%. Já no grupo com menor germinação, a média foi de 65,9%. Comparando-se a média dos descendentes provenientes da autofecundação (74,0%) e a dos híbridos (74,7%), verifica-se que a perda de vigor devido à autofecundação não deve ser expressiva na germinação (Tabela 4).

TABELA 3 Resumo da análise de variância da % de germinação na descendência de autofecundação e cruzamento de clones de *Eucalyptus*, aos 35 dias após a semeadura.

FV	GL	QM	P
Populações	3	0,3,01	0,014
Erro	20	0,67	
Média		74,33	
CV (%)		9,52	

TABELA 4 Percentagem média de plântulas germinadas obtidas pelas populações de *Eucalyptus* autofecundado e cruzado, aos 35 dias após a semeadura.

Populações	%
Autofecundação do clone C01	87,3 a ^{1/}
Autofecundação do clone C02	60,7 b
Cruzamento dos clones C01 x C03	71,1 b
Cruzamento dos clones C02 x C03	78,3 a

^{1/}As médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott & Knott (1974), com 99% de probabilidade.

A depressão por endogamia pode não se manifestar na germinação, porém, pode afetar o vigor germinativo. Para verificar esse fato, foi obtido o índice de velocidade de emergência pela expressão de Edmond & Drapala (1958). Verifica-se, pela análise de variância, que ocorreu diferença significativa ($P \leq 0,01$) entre as populações (Tabela 5). Contudo, quando se compara o desempenho dos descendentes de autofecundação e cruzamento, novamente, a diferença não foi expressiva (Tabela 6). Inclusive, os descendentes do clone C01 autofecundado apresentaram a maior velocidade de emergência.

TABELA 5 Resumo da análise de variância para o índice de velocidade de emergência (IVE) em dias, obtido pelas populações de *Eucalyptus* autofecundado e cruzado.

FV	GL	QM	P
Populações	3	10,61	0,002
Erro	20	1,47	
Média	30,15		
CV (%)	4,02		

TABELA 6 Índice de velocidade de emergência (IVE) em dias, obtido pelas populações de *Eucalyptus* autofecundado e cruzado.

Populações	IVE
Autofecundação do clone C01	28,22 b ^{1/}
Autofecundação do clone C02	31,04 a
Cruzamento dos clones C01 x C03	31,04 a
Cruzamento dos clones C02 x C03	30,30 a

^{1/}As médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott & Knott (1974), com 99% de probabilidade.

Um outro fator que a perda de vigor devido à endogamia poderia afetar seria a sobrevivência na fase inicial, ainda no viveiro. A análise da variância da percentagem de sobrevivência em relação ao número de plântulas que emergiram, aos 50, 65 e 80 dias após a semeadura, não mostrou diferença significativa entre as populações, nas três idades de avaliação (Tabela 7),

evidenciando também que os descendentes da autofecundação e híbridos não diferiram em sobrevivência. Os resultados médios apresentados na Tabela 8 confirmam essa observação. A sobrevivência média foi de 96,24%, mostrando que a mortalidade das plântulas após a germinação foi pequena. Também foi reduzida a diferença média na sobrevivência entre as populações.

TABELA 7 Resumo da análise de variância da sobrevivência (%) das plântulas provenientes da descendência de autofecundação e cruzamento de clones de *Eucalyptus*, aos 35, 50, 65 e 80 dias após a semeadura.

FV	GL	50 dias		65 dias		80 dias	
		QM	P	QM	P	QM	P
Populações	3	69,57	0,50	140,18	0,31	115,08	0,40
Erro	15	83,35		110,27		110,23	
Média		97,55		95,79		95,39	
CV (%)		9,36		10,96		11,00	

TABELA 8 Percentagem média de sobrevivência das plântulas provenientes da descendência de autofecundação e cruzamento de clones de *Eucalyptus*, aos 50, 65 e 80 dias após a semeadura.

Populações	% de sobrevivência			Média
	50 dias	65 dias	80 dias	
Autofecundação do clone C01	97,42	90,57	90,57	92,85 a^{1/}
Autofecundação do clone C02	92,78	92,78	92,78	92,78 a
Cruzamento dos clones C01 x C03	100,00	99,80	99,10	99,63 a
Cruzamento dos clones C02 x C03	100,00	100,00	99,12	99,71 a
Média	97,55	95,78	95,40	96,24

^{1/}As médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott & Knott (1974), com 99% de probabilidade.

O desenvolvimento das plântulas também foi considerado. Para isso, foi avaliada a altura das plântulas com diferentes épocas após a semeadura (Tabela 9). Pela análise de variância percebe-se que não ocorreu diferença significativa entre as populações, porém, como era esperado, a diferença foi significativa entre as idades ($P \leq 0,05$). O fato mais expressivo foi o da interação populações x idades ter sido significativa.

TABELA 9 Resumo da análise de variância da altura de plântulas (cm) obtidas pelas populações de *Eucalyptus* autofecundado e cruzado, em diferentes épocas de avaliação.

FV	GL	QM	P
Populações (P)	3	0,846	0,071
Época(C)	3	6,864	0,016
PxC	9	0,328	0,027
Erro	80	17,022	
Média		3,65	
CV (%)		17,02	

As alturas médias estão apresentadas na Tabela 10. Note-se que a classificação das populações, pelo teste de Scott Knott (1974), foi muito semelhante entre as idades, a despeito da interação populações x idades significativa. Em todas as épocas, as plântulas provenientes do clone C01 autofecundado foram as de maior crescimento médio. As demais populações foram agrupadas de modo semelhante.

TABELA 10 Altura média das plântulas (cm), valores mínimos e máximos e variância fenotípica, obtidos pelas populações de *Eucalyptus* autofecundado e cruzado, em diferentes idades após a semeadura.

Época	Observações	Populações			
		C01 ⊗	C02 ⊗	C01xC03	C02xC03
35 dias	Altura média	1,81 a ^{1/}	1,48 b	1,41 b	1,37 b
	Mínimo	1,47	0,86	1,30	1,26
	Máximo	1,95	1,81	1,51	1,56
	σ^2	0,36	0,22	0,11	0,07
50 dias	Altura média	4,05 a	3,64 b	3,20 c	3,17 c
	Mínimo	3,58	3,34	3,04	2,98
	Máximo	4,57	3,82	3,36	3,37
	σ^2	2,87	1,44	1,10	0,87
65 dias	Altura média	7,48 a	6,60 b	6,16 b	6,03 b
	Mínimo	6,33	5,94	5,67	5,43
	Máximo	10,1	7,31	6,90	6,52
	σ^2	10,43	6,33	4,97	3,90
80 dias	Altura média	11,82 a	10,05 b	9,50 b	9,04 b
	Mínimo	10,49	9,68	8,54	7,82
	Máximo	13,54	10,51	10,59	9,89
	σ^2	15,03	10,77	8,93	7,16

^{1/}As médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott & Knott (1974), com 93% de probabilidade.

É interessante ressaltar a diferença na variabilidade observada na altura entre as plantas autofecundadas e cruzadas. Por exemplo, a variância fenotípica média dentro das populações autofecundadas ($\sigma^2=12,9$) foi 1,6 vez superior à média das populações híbridas ($\sigma^2=8,0$), aos 80 dias após a semeadura.

4.2 Dados obtidos no campo

Para se comparar o desempenho e o vigor das plantas no viveiro e na fase inicial de desenvolvimento no campo, as mudas foram transplantadas para o campo, seguindo a mesma correspondência do viveiro.

A análise da variância da porcentagem de sobrevivência aos seis meses após o transplântio mostrou diferença significativa entre as populações ($P \leq 0,05$) (Tabela 11). Contudo, as médias das populações foram classificadas no mesmo grupo, pelo teste de Scott & Knott (1974) (Tabela 12). Observe-se que a sobrevivência foi de 75,5% e, também, que a sobrevivência das populações de autofecundação (81%) foi 1,16 vezes superior à dos híbridos (69,9%), embora esse contraste não seja significativo.

TABELA 11 Resumo da análise de variância da porcentagem de sobrevivência, obtida pelas populações de *Eucalyptus* autofecundado e cruzado aos seis meses após o transplântio.

FV	GL	QM	P
Populações	3	392,68	0,05
Blocos	5	412,52	
Erro	15	116,92	
Média		75,46	
CV (%)		14,33	

TABELA 12 Percentagem média de sobrevivência da plantas, obtida pelas populações de *Eucalyptus* autofecundado e cruzado, aos seis meses após o transplântio.

Populações	%
Autofecundação do clone C01	77,78 a ^{1/}
Autofecundação do clone C02	84,26 a
Cruzamento dos clones C01 x C03	64,81 a
Cruzamento dos clones C02 x C03	75,00 a
Médias	75,50

^{1/}As médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott & Knott (1974), com 93% de probabilidade.

Como já mencionado, a depressão por endogamia não se manifestou na sobrevivência no campo, mas, pode afetar o desempenho das plantas na fase inicial de campo. Para constatar tal fato, avaliou-se a altura das plantas aos 2, 4 e 6 meses após o plantio no campo.

A análise de variância para altura no campo não mostrou diferença significativa entre as populações, nas três épocas de avaliação, evidenciando que o desempenho médio das populações foi semelhante. As alturas médias das

plantas confirmam que o desempenho das quatro populações foi praticamente o mesmo (Tabela 13). Este fato evidenciou, novamente, que a depressão por endogamia pode não ser expressiva nesta fase.

TABELA 13 Resumo da análise de variância de altura (cm), obtida pelas populações de *Eucalyptus* autofecundado e cruzado, em diferentes épocas após o plantio das mudas no campo, aos 2, 4 e 6 meses.

FV	GL	QM	P
Blocos (B)	5	110474,515	
Populações (P)	3	33,883	0,825
Erro a (BxP)	15	12,523	
Idades (I)	15	461,467	0,121
Erro b (BxI)	3	175,731	
PxI	9	217,433	0,058
Erro c (PxBxI)	45	93,520	
Média		70,05	
CVa (%)		5,05	
CVb (%)		18,92	
CVc (%)		13,80	

Constatou-se interação populações x idades significativa ($P \leq 0,06$), indicando que o comportamento das populações foi coincidente nas diferentes

idades (Tabela 13). Veja que houve uma tendência das populações provenientes do clone C02 superarem, em altura média, as provenientes do clone C01, exceto para a avaliação aos 2 meses após o plantio no campo, em que a população proveniente da autofecundação do clone C01 apresentou média maior (Tabela 14).

TABELA 14 Médias de altura (cm), valores mínimos e máximos e variância fenotípica, obtidos pelas populações de *Eucalyptus* autofecundado e cruzado em diferentes épocas após o plantio no campo, aos 2, 4 e 6 meses.

Época	Observações	Populações			
		C01 ⊗	C02 ⊗	C01xC03	C02xC03
2 meses	Altura média	60,00 a ^{1/}	53,98 a	52,04 a	54,85 a
	Mínimo	48,82	51,25	43,38	43,92
	Máximo	65,00	55,72	60,00	66,19
	σ^2	35,46	4,45	53,98	52,04
4 meses	Altura média	125,40 a	136,18a	119,63 a	134,19 a
	Mínimo	109,36	124,72	103,88	121,62
	Máximo	137,00	151,00	129,60	161,00
	σ^2	98,72	113,67	85,91	216,33
6 meses	Altura média	230,94 a	260,13a	223,36 a	247,51 a
	Mínimo	192,91	237,88	200,00	223,54
	Máximo	264,50	304,40	251,47	290,88
	σ^2	538,41	648,69	328,64	552,30

^{1/}As médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott & Knott (1974), com 95% de probabilidade.

A variação na altura entre as plantas de uma mesma população não foi coincidente com as idades de avaliação. Aos dois meses, embora a magnitude das variâncias não fosse muito expressiva, os descendentes dos híbridos apresentaram maior variação fenotípica. Já aos 6 meses, a variância fenotípica entre os descendentes dos clones autofecundados ($\sigma^2=593,55$) foi superior à média da variância observada entre as plantas descendentes dos híbridos ($\sigma^2=440,47$) (Tabela 14).

É importante verificar qual a associação entre o desempenho das plantas no viveiro e, posteriormente, no campo. Para isso, estimou-se a correlação para a altura aos 80 dias após a semeadura no viveiro e aos 6 meses após o transplante no campo (Tabela 15).

Constatou-se que as correlações foram muito baixas; sendo $r = 0,10$ para as duas populações provenientes de autofecundação e para o híbrido C01xC03 e $r = 0,00$ para a população C02xC03. Veja, contudo, que essa é uma correlação “híbrida”, pois, no numerador, contém a covariância genética, uma vez que os dados das plantas foram tomados em ambientes diferentes e, portanto, não correlacionados. No denominador, foi considerada a variância fenotípica entre as plantas, pois, não foi possível isolar a variância genética. Mesmo considerando essa ressalva, as estimativas foram de pequena magnitude indicando que o bom desenvolvimento da planta no viveiro não necessariamente irá repercutir em bom desempenho no campo. Inclusive, foram identificadas as 10 plantas com maior altura no viveiro, aos 80 dias e as 10 com maior altura, aos 6 meses de idade no campo. Constatou-se que a coincidência foi muito pequena: no máximo duas plantas entre as dez em cada uma das quatro populações (Tabela 16).

TABELA 15 Estimativas de correlações entre a altura no viveiro, aos 80 dias após a semeadura e no campo, 6 meses após o plantio de plantas da descendência de autofecundação e cruzamento de clones de *Eucalyptus*.

Populações	Correlação
C01⊗	0,10 (0,41)
C02⊗	0,10 (0,52)
C01*C03	0,10 (0,50)
C02*C03	0,00 (0,00)

TABELA 16 Classificação das dez plantas com maior altura no viveiro, aos 80 dias após a semeadura e as dez no campo, aos 6 meses após o transplante, obtidas nas populações de autofecundação e cruzadas.

C01		C02		C01*C03		C02*C03	
Viveiro	Campo	Viveiro	Campo	Viveiro	Campo	Viveiro	Campo
65 ^{1/}	32 ^{2/}	9	74	52	19	27	19
66	51	18	75	63	36	11	35
9	54	64	6	28	32	36	72
48	68	6	84	6	59	40	11

42	12	72	82	11	14	80	6
13	52	17	34	24	15	48	2
36	33	53	83	40	67	67	27
6	42	44	66	59	49	77	9
61	7	59	53	30	58	51	12
14	41	33	91	19	7	60	8

1/ Número da planta no viveiro; 2/ Número da planta no campo.

4.3 Plantas com desenvolvimento anormal no campo

Em algumas situações, é comum observar, nos plantios comerciais, nos primeiros meses após o transplante, a ocorrência de plantas anormais. Essas plantas são denominadas de “galinha choca”, isso porque a planta fica com as folhas enrugadas, emite muitos galhos, não cresce e fica com aparência de um arbusto (Figura 1). É evidente que essa planta será improdutivo. Dependendo da quantidade, o dano econômico é expressivo, além de prejudicar o aspecto (maior desuniformidade) dos plantios realizados por meio de sementes.



FIGURA 1 Aspecto da planta com anormalidade no campo (“galinha choca”).

Esse fato ocorreu na descendência dos híbridos e também das plantas autofecundadas (Tabela 17). Veja, contudo, que a frequência de ocorrência variou entre as populações. No caso da população proveniente do clone C01 autofecundado, foram 10 plantas anormais entre as 84 sobreviventes no campo, ou seja, 11,9%. Já no caso da população C02 autofecundada, entre as 91 plantas sobreviventes 3 manifestaram o sintoma, ou seja, 3,3%. Na população proveniente do híbrido C01xC03, foram 10% e, no C02xC03, foram apenas 2,5% sobreviventes.

TABELA 17 Plantas com anormalidade de crescimento no campo (“galinha choca”), altura das respectivas plantas, no viveiro aos 80 dias e no campo aos 180 dias, obtidas nas populações de autofecundação e cruzadas.

População	N° da planta anormal	Altura (cm)	
		Viveiro	Campo
C01 ⊗	362	14,80	38,00
	174	14,50	50,00
	179	14,50	58,00
	105	11,00	80,00
	157	14,00	90,00
	370	14,50	136,00
	161	14,00	150,00

	160	16,00	158,00
	103	14,00	174,00
	76	9,20	230,00
	Média	13,65	116,40
	Média da população	11,82	228,35
	285	9,00	124,00
C02 ⊗	114	11,00	152,00
	113	9,50	264,00
	Média	9,83	180,00
	Média da população	10,05	260,13
	343	2,50	42,00
	19	8,00	46,00
	357	11,50	48,00
	325	4,50	58,00
C01*C03	358	12,00	60,00
	235	7,30	70,00
	251	13,50	80,00
	Média	8,47	57,71
	Média da população	9,50	223,36
	432	3,50	80,00
C02*C03	139	11,50	80,00
	Média	7,50	80,00
	Média da população	9,04	252,47

5 DISCUSSÕES

Das quatro populações utilizadas, duas são provenientes da autofecundação de dois clones comerciais da empresa, C01 e C02 e duas híbridas entre os clones C01xC03 e C02xC03. Como se observa, infelizmente, não foram obtidas sementes híbridas do cruzamento C01xC02, o que permitiria estimar a depressão por endogamia. Contudo, é possível fazer inferência a respeito da autofecundação e do híbrido, principalmente porque um dos pais é comum. Por exemplo, o clone C01 foi obtido de um plantio comercial de *E*.

urophylla e o C02 em *E. grandis*. Portanto, era esperado vigor nos cruzamentos, especialmente entre C01xC03, devido à divergência existente entre essas duas espécies. Vale salientar que as sementes das plantas que deram origem a esses clones foram provenientes de Rio Claro, há certeza da origem da planta mãe, porém o pai é desconhecido.

A percentagem média de germinação foi de 74,3% (Tabela 4). É difícil a comparação entre experimentos de percentagem de germinação, dadas as diferentes condições. Contudo, esse valor não difere do que é normalmente relatado em experimentos de germinação, conduzidos no Brasil e envolvendo algumas espécies de *Eucalyptus* (Tabelas 1 e 2).

A germinação média das populações autofecundadas (74,0%) foi semelhante às populações híbridas. Para os demais caracteres avaliados no viveiro, o desempenho dos descendentes de autofecundação foi muito semelhante aos de cruzamento. Por exemplo, o índice de velocidade de germinação média das duas populações autofecundadas foi de 29,6 dias e dos híbridos de 30,7 dias (Tabela 6). A altura média avaliada aos 80 dias foi de 10,93 cm nas populações autofecundadas e de 9,27 cm nas híbridas (Tabela 10). A diferença foi mais acentuada na sobrevivência aos 80 dias. Nesse caso, ela foi de 99,1% na média das populações híbridas e 91,68% nas autofecundadas (Tabela 8).

Em princípio, infere-se que não há depressão por endogamia na germinação das plântulas de *Eucalyptus*. Como já mencionado, é uma inferência indireta porque pode ser que os clones cruzados possuam constituição genética semelhante para esse caráter e o efeito da autofecundação ou do cruzamento seria o mesmo. Contudo, os valores obtidos nas populações autofecundadas são semelhantes, como já mencionado, aos normalmente obtidos na avaliação de germinação de sementes de polinização livre de *E. grandis* e *E. citriodora* (Aguilar & Monogios, 1988; Caproni, 1992).

Na literatura, não foi encontrado nenhum relato de uma possível depressão por endogamia na germinação do *Eucalyptus*. O único relato encontrado foi na formação da semente (Eldridge et al., 1993). Esses autores utilizaram igual proporção de autopólen e alopólen para verificar o efeito da autofecundação e do cruzamento e constataram que 81% das sementes foram provenientes da polinização cruzada. Segundo eles, embriões endogâmicos têm baixa viabilidade e competitividade no desenvolvimento do fruto. Em outras palavras, a depressão por endogamia é expressa nos estágios iniciais. Os únicos relatos encontrados com a endogamia na germinação referem-se à cultura do milho. A partir de um cruzamento dialélico envolvendo 6 linhagens, Gomes et al. (2000) encontraram heterose média de 3,3% com possível efeito recíproco na germinação. Por outro lado, para a mesma espécie, avaliando-se o desenvolvimento da raiz durante a germinação de linhagens e híbridos, a heterose média de 51% foi muito superior, cinco dias após a germinação (Hoecker et al., 2006).

As informações obtidas até 6 meses após o transplântio no campo também são semelhantes às relatadas no viveiro. A sobrevivência média aos 6 meses das populações autofecundadas foi de 81,0% e 69,9%, para a média das duas populações híbridas, diferença essa não significativa ($P \leq 0,05$). Na mesma idade, a altura média foi de 245,5 cm, nas populações autofecundadas e 235,4 cm, nas híbridas, diferenças também não significativas ($P \leq 0,05$) (Tabela 14). De modo análogo ao comentado anteriormente, pode-se inferir não ter ocorrido depressão por endogamia expressiva nas fases iniciais de desenvolvimento no campo.

Chama a atenção também a comparação entre as duas populações híbridas: uma entre clones oriundos de uma mesma espécie, C02 x C03 e outra de espécies diferentes, C01 x C03. Veja que o desempenho foi muito semelhante, em altura e sobrevivência, aos seis meses de idade. Na literatura,

foram encontrados alguns relatos da ocorrência de depressão por endogamia ou heterose para caracteres de espécies de *Eucalyptus*, porém, em avaliações realizadas com maior idade das plantas. Em trabalho conduzido no estado do Espírito Santo, foi estimada a depressão por endogamia em 10 clones comerciais oriundos de *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. saligna* aos dois anos de idade (Bison et al., 2004). Constataram que, para circunferência à altura do peito, a depressão média foi de 17,5% e de 4,0% para a densidade básica da madeira. Em *E. globulus*, Hardner & Potts (1995) estimaram a depressão por endogamia na altura de 22,0% e no diâmetro de 21,0%, aos 19 meses. Aos 43 meses, o efeito da endogamia acentuou-se, passando para 26,0% na altura e 24,0% no diâmetro. Já para *E. regnans*, a depressão por endogamia estimada aos 45 meses de idade foi de 11,0% para o diâmetro, 18,0% para a altura e 37,0% para o volume (Griffin & Cotteril, 1988).

Para a ocorrência de depressão por endogamia, há necessidade, além da presença de locos em heterozigose, o que é esperada em um clone, que ocorram dominância e ou epistasia no controle do caráter. Não foi encontrado nenhum relato da ocorrência de dominância para caracteres associados à germinação e ao desenvolvimento inicial em *Eucalyptus*. Esse tipo de informação é restrito até em plantas anuais. Em milho, foi encontrado vigor híbrido expressivo no teste de germinação sob estresse e pequeno no teste de germinação sem estresse (Gomes et al., 2000). Também em milho, como já comentado, foi constada a ocorrência de heterose em grande magnitude no desenvolvimento da radícula (Hoecker et al., 2006). Contudo, em revisão realizada por Nonogaki (2006), a respeito dos mecanismos bioquímicos e moleculares da germinação de sementes, não foi feita nenhuma menção da ocorrência de dominância e ou epistasia, embora fosse relatada a ocorrência de um grande número de genes envolvidos no processo.

É provável que a expressão dos locos com dominância se acentue com a idade devido à competição mais acentuada entre os indivíduos. Comentários a esse respeito foram feitos por Eldridge & Griffin (1983) ao observarem a ausência de resposta da autofecundação em *E. grandis* aos 2 anos após o plantio e efeito acentuado após 4 anos de idade. Essa mesma observação foi realizada por Burgess et al. (1996), avaliando taxa de fecundação cruzada em *E. grandis*.

A questão das plantas com desenvolvimento anormal no campo merece algumas considerações. A primeira é que o modo de expressão dos sintomas varia entre as plantas, o que dificulta a caracterização das que realmente devem ser consideradas anormais. Em princípio, o fenômeno é geneticamente controlado, provavelmente por alelos recessivos, já que os pais, no caso os clones, não há relatos de que manifestam o sintoma. Considerando que o clone corresponde à geração F₁ de híbrido simples (Bison et al., 2004), pode-se inferir que a descendência autofecundada de um clone corresponde à geração F₂. Considerando a descendência dos dois clones autofecundados, a segregação foi de 13 plantas anormais em um total de 175, ou seja, 15:1 ($\chi^2 = 0,14$ NS). Esse resultado indica que estão presentes dois genes, sendo um caso de genes duplicados, isto é, apenas quando presentes os alelos recessivos dos dois genes, a expressão do caráter “galinha choca” se manifesta (Ramalho et al., 2005).

No caso dos descendentes das populações híbridas, a segregação foi de 9 plantas anormais, em um total de 151 plantas avaliadas, ou seja, também uma segregação de 15:1 ($\chi^2 = 0,11$ NS). Contudo, para que a segregação se manifestasse nos descendentes dos híbridos, o genitor comum C03 deveria ser heterozigoto para ambos os genes, assim como os outros dois genitores C01 e C02. É evidente que essa é uma hipótese que necessita de estudos adicionais.

Fica claro, contudo, que é um caráter com controle genético que tem penetrância incompleta e expressividade variável, o que dificulta a inferência genética. É provável também que algumas plantas, tendo os genótipos com os

dois alelos recessivos, não sobrevivam no campo. Assim, parte da mortalidade poderia ser atribuída a esse caráter (Figura 2)

Procurou-se identificar algum marcador molecular associado à expressão desse caráter e, após avaliação de 639 *primers* utilizando RAPD (Quadro 1A), nenhuma marca se mostrou útil para identificar a expressão, mostrando que o controle pode não ser tão simples como sugerido.

Procurou-se também identificar marcador morfológico no viveiro associado a essa anomalia. Um dos caracteres considerados foi a altura da planta no viveiro. Observou-se que as plantas com o sintoma, em alguns casos, apresentaram altura média superior à média da população (Tabela 17). Por exemplo, para a população de autofecundação do clone C01, a média com 80 dias foi de 11,82 cm e todas as plantas que deram origem as anormais no campo apresentaram altura superior. No caso da população C02, o desempenho no viveiro de algumas plantas anormais no campo foi abaixo da média, contudo, muitas também com esse mesmo comportamento não apresentaram o sintoma. A mesma observação é válida para as populações híbridas. Diante do exposto, a identificação das plantas anormais precocemente no viveiro, em princípio, é pouco provável. Há necessidade, contudo, de procurar novas alternativas.



FIGURA 2 Demonstração da expressividade variável em plantas com anormalidade no campo (“galinha choca”), (a) aspecto rasteiro e (b) arbustivo. Ijaci, MG, 2006.

6 CONCLUSÕES

A germinação, a sobrevivência e o crescimento das plantas provenientes de autofecundação foram semelhantes ao dos híbridos, mostrando que, possivelmente, a perda de vigor não é expressiva para caracteres das etapas iniciais do desenvolvimento do *Eucalyptus*.

A ocorrência de plantas anormais foi de 6,9% entre as plantas oriundas de autofecundação e 4,6% entre as plantas híbridas. Não foi identificada

nenhuma marca morfológica, no viveiro ou molecular, que possibilitasse o reconhecimento precoce das plantas com anomalia. O caráter tem expressividade variável, o que dificulta o estudo da segregação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, H.B. **Eficiência dos experimentos com clones na cultura do eucalipto**. 2002. 162p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ANDRADE, H.B. et al. Avaliação de espécies e procedências de *Eucalyptus* L' Héritier (Myrtaceae) nas regiões norte e noroeste do Estado de Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, v.18, n.3, p.215-229, set./dez. 1994.
- AGUIAR, I.B.; MONOGIOS, G.G. Efeitos de substratos a base de vermiculita na produção de mudas de *Eucalyptus citriodora* em bandejas de isopor. **Científica**, Joticabal, v.16, n.1, p.133-140, 1988.
- AGUIAR, I.B. et al. Influência do tamanho sobre a germinação e o vigor de sementes de Eucalipto. **Semente**, Brasília, v.2, p.53-55, 1980.
- ASSIS, T.F. de. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.185, p.32-51, 1996.
- ASSIS, T.F. de. Production and use of *Eucalyptus* hybrids for industrial purposes. In: HYBRID BREEDING AND GENETICS OF FOREST TREES, 2000, Nossa, Austrália **Proceedings...** Brisbane: Department of Primary Industries, 2000. p.63-74.
- BACHA, C.J.C. Muita mata e pouca madeira. **Revista de Agronegócios da FGV**, v.25, n.7, p.36-39, 2005.
- BERTOLUCCI, F. de L.G.; REZENDE, G.D.S.P.; PANCHEL, R. Produção e utilização de híbridos de eucalipto. **Silvicultura**, São Paulo, v.26, n.51, p.12-16, 1995.
- BISON, O. **Melhoramento de eucalipto visando à obtenção de clones para a indústrias de celulose**. 2004.169p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BISON, O. AGUIAR, A M. REZENDE, G. D. S. P.; RAMALHO, M. A. P. Inbreeding depression in *Eucalyptus* clones. **Crop Breeding and applied Biotechnology**, v.4, p.459-464, 2004.

- BROOKER, M.I.H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L' Her. (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, v.13, p.79-148, 2000.
- BURGERSS, I. P. et al. The effect of outcrossing rate on the growth of selected families of *Eucalyptus grandis*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.45, p.97-100, 1996.
- BUTCHER, P.A.; WILLIAMS, E.R. Variation in outcrossing rates and growth in *Eucalyptus camaldulensis* from the Petford Region, Queensland; Evidence of Outcrossing Depression. **Silvae Genetica**, v.51, n.1, p.6-11, 2002.
- CAMPINHOS, E.N. et al. Interspecific hybridization and inbreeding effect in seed from a *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clonal orchard in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 21, p. 369-374, 1998.
- CAMPINHOS, E.; IKEMORI, Y.K. Introdução de novas técnicas na produção de mudas de essências florestais. **Silvicultura**, v.8, n.28, p.226-228, 1983.
- CAPRONI, A.L. **Efeitos de tamanho, potenciais hídricos e substratos na germinação de sementes e produção de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Eucalyptus citriodora* Hook.** 1992. 82p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CARVALHO, N.M. de.; NADAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** 3.ed.rev. Campinas, SP: Fundação Cargil, 1988. 424p.
- COORS, J.G.; PANDEY, S. **Genetics and exploitation of heterosis in crops.** Madison: American Society of Agronomy, 1999. 79p.
- DEL QUIQUI, E.R. et al. Crescimento e composição mineral de mudas de eucalipto cultivadas sob condições de diferentes fontes de fertilizantes. *Acta Scientiarum*. **Agronomy**, Maringá, v.26, n.3, p.93-99, 2004.
- EDMOND, J.B.; DRAPALA, W.S. The effects of temperature, sand and acetone on germination of okra seed . **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, New York, v.71, p.428-34, 1958.
- ELDRIDGE, K. et al. **Eucalypt domestication and breeding.** New York: Oxford University, 1993. 228p.

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

FALCONER, D.S.; MACKEY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. London: Longman Malaysia, 1996. 463p.

FERREIRA, D.F. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos**. Universidade Federal de Lavras, 2003. Software.

FERREIRA, M.; SANTOS, P.E.T. dos. Melhoramento genético florestal dos *Eucalyptus* no Brasil: breve histórico e perspectivas. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF *EUCALYPTUS*, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, 1997. v.1, p.14-34.

FU, H.; DONNER, H.K. Intraespecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. **Proc Natl. Acad. Sci., USA**, v.99, n.14, p.9573-9573, July 2002. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.132259199>. Acesso em: 2005.

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

GOMES, M.S. et al. Efeito da heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.1, p.7-17, 2000.

GOODNIGHT, C.J. **Genetics and exploitation of heterosis in crops**. Madison: American Society of Agronomy, 1999. p.59-68.

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

GROWEN, J.W. (Ed.). **Heterosis**. Ames: Iowa State Col., 1952.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2.ed. Ames: Iowa State University, 1988. 468p.

- HARDNER, C.M.; POTTS, B.M. Inbreeding depression and changes in variation after selfing in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 44, n.1, p.46-54, 1995.
- HILL, K.D.; JOHNSON, L.A.S. Systematic studies in the eucalypts 7. A revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae). **Telopea**, v.6, p.185-504, 1995.
- HODGSON, L.M. Some aspects of flowering and reproductive behaviour in *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden at J.D.M. Keet Forest Research Station. 2. The fruit, seed, seedlings, self fertility, selfing and inbreeding effects. **South African Forestry Journal**, Johannesburg, v.98, p.32-43, 1976.
- HOECKER, N. et al. Manifestation of heterosis during early maize (*Zea mays* L.) root development. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.112, n.5-6, p.421-429, 2006.
- HOUSE, A.P.N.; BELL, J.C. Isozyme variation and mating system in *Eucalyptus urophylla* ST Blake. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.43, n.2/3, p.167-179, 1994.
- MORAN, G.F.; BELL, J.C. *Eucalyptus*. In: TANSLEY, D.S.; ORTON, T.J. (Ed.). **Isoenzymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.423.
- NIENHUIS, J. et al. Genetic relationships among cultivars and landraces of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the America Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.120, n.2, p.300-306, 1995.
- NONOGAKI, H. Seed germination: the biochemical and molecular mechanisms. **Breeding Science**, v.56, p.93-105, 2006
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: Ministério da Agricultura, AGIPLAN, 1985. 269 p.
- POTTS, B.; GORE, P. Reproductive biology and controlled pollination of *Eucalyptus*: a review. In: SIMPOSIUM HYBRID BREEDING AND GENETICS OF FOREST TREES, 2000, Noosa, Austrália, 2000. **Proceedings...** Brisbane: Department of Primary Industries, 2000.

- POTTS, B.M.; POTTS, W.C.; CAUVIN, B. Inbreeding and interspecific hybridization in *Eucalyptus gunnii*. **Silvae Genetica**, v.36, p.194-199, 1987.
- PRYOR, L.D. **The biology of eucalypts**. London Edward Arnold, 1976. 82p.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B. Genética na agropecuária. **Lavras: UFLA, 2005. 472p.**
- REZENDE, G.D.S.P. Melhoramento genético do eucalipto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2001. 1 CD-ROM.
- RUY, O.F. Variação da qualidade da madeira em clones de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake da Ilha de Flores, Indonésia. **1998. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Madeira)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.**
- SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. Cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, Raleigh, v.30, n.3, p.507-512, Sept. 1974.
- SILVA, A. et al. Influência do tamanho sobre a qualidade das sementes de *Eucalyptus maculata* Hook. **Revista Brasileira de Sementes**, v.16, n.2, p.187-190, 1994.
- SILVA, L.F. Propagação vegetativa do eucalipto: experiência da International Paper do Brasil. **IPEF Notícias**, v.25, n.156, p.4-5, 2001.
- SOUZA JÚNIOR, C.L. de. Melhoramento de espécies alógamas. In: NASS, L.L. et al. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.159-199.
- TIBBITS, W.N. Controlled pollination studies with shining gum (*Eucalyptus nitens* (Deane and Maiden)). **Forestry**, v.62, p.111-126, 1989.
- TONACO, I.A.N. **Macho esterilidade em *Eucalyptus urophylla***. 2002. 51p. Dissertação (Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas)—Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- TURNBULL, J.W., PRYOR, L.D. Choice of species and seed sources. In: HILLS, W.E.; BROW, A.G. (Ed.). **Eucalyptus: for wood production**. Sydney: CSIRO/Academic, 1984. p.6-65.

UDOVICIC, F.; MCFADDEN, G.I.; LADIGES, P.Y. Phylogeny of *Eucalyptus*, and *Angophora* based on 5S rDNA spacer sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.4, p.247-256, 1995.

VAN WYK, G. Inbreeding effects on *Eucalyptus grandis* families in relation to degree of relatedness. **South African Forestry Journal**, v.116, p.60-63, 1980.

VENCOVSKY, R.; RAMALHO, M.A.P. Contribuições do melhoramento genético de plantas no Brasil. In: PATERNIANI, E. (Ed.). **Agricultura brasileira e pesquisa agropecuária**. Brasília: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 57-89.

ANEXOS

ANEXO A

Página

QUADRO 1A

Relação dos 639 *primers* de RAPD utilizados para identificação de alguma marca molecular associada ao “caráter galinha choca”.... 57

QUADRO 1A Relação dos 639 *primers* de RAPD utilizados para identificação de alguma marca molecular associada ao “caráter galinha choca”.

OPA 01	OPAI 09	OPAK 03	OPAM 04	OPAO 16
OPA 02	OPAI 10	OPAK 04	OPAM 05	OPAO 07
OPA 05	OPAI 11	OPAK 05	OPAM 06	OPAO 18
OPA 10	OPAI 12	OPAK 06	OPAM 07	OPAP 01
OPA 12	OPAI 13	OPAK 07	OPAM 08	OPAP 02
OPA 13	OPAI 14	OPAK 08	OPAM 09	OPAP 03
OPA 16	OPAI 15	OPAK 09	OPAM 10	OPAP 04
OPA 17	OPAI 16	OPAK 10	OPAM 11	OPAP 05
OPA 18	OPAI 17	OPAK 11	OPAM 12	OPAP 06
OPA 20	OPAI 18	OPAK 12	OPAM 13	OPAP 07
OPAA 09	OPAI 19	OPAK 13	OPAM 14	OPAP 08
OPAD 04	OPAI 20	OPAK 14	OPAM 15	OPAP 09
OPAD 10	OPAJ 01	OPAK 15	OPAM 16	OPAP 10
OPAD 17	OPAJ 03	OPAK 16	OPAM 17	OPAP 11
OPAE 01	OPAJ 04	OPAK 17	OPAM 20	OPAP 12
OPAE 18	OPAJ 05	OPAK 18	OPAN 01	OPAP 13
OPAF 5	OPAJ 06	OPAK 19	OPAN 03	OPAP 14
OPAF 13	OPAJ 07	OPAK 20	OPAN 04	OPAP 15
OPAF 16	OPAJ 08	OPAL 01	OPAN 05	OPAP 16
OPAG 07	OPAJ 09	OPAL 02	OPAN 07	OPAP 17
OPAG 10	OPAJ 10	OPAL 03	OPAN 08	OPAP 18
OPAG 18	OPAJ 11	OPAL 04	OPAN 13	OPAP 19
OPAH 03	OPAJ 12	OPAL 05	OPAN 16	OPAP 20
OPAH 10	OPAJ 13	OPAL 06	OPAN 17	OPAQ 01
OPAH 15	OPAJ 14	OPAL 07	OPAN 19	OPAQ 02
OPAI 01	OPAJ 15	OPAL 08	OPAN 20	OPAQ 03
OPAI 02	OPAJ 16	OPAL 09	OPAO 01	OPAQ 04
OPAI 03	OPAJ 17	OPAL 10	OPAO 03	OPAQ 05
OPAI 04	OPAJ 18	OPAL 11	OPAO 04	OPAQ 06
OPAI 05	OPAJ 19	OPAL 12	OPAO 05	OPAQ 07
OPAI 06	OPAJ 20	OPAM 01	OPAO 12	OPAQ 08
OPAI 07	OPAK 01	OPAM 02	OPAO 13	OPAQ 09
OPAI 08	OPAK 02	OPAM 03	OPAO 15	OPAQ 10

“...continua...”

“QUADRO 1A, Cont.”

OPAQ 11	OPAS 04	OPAT 20	OPAX 05	OPAZ 18
OPAQ 12	OPAS 05	OPAU 01	OPAX 06	OPAZ 19
OPAQ 13	OPAS 06	OPAU 02	OPAX 07	OPAZ 20
OPAQ 14	OPAS 07	OPAU 03	OPAX 08	OPAY 01
OPAQ 15	OPAS 08	OPAU 04	OPAX 09	OPAY 02
OPAQ 16	OPAS 09	OPAU 05	OPAX 10	OPAY 03
OPAQ 17	OPAS 10	OPAU 06	OPAX 11	OPAY 04
OPAQ 18	OPAS 11	OPAU 07	OPAX 12	OPAY 05
OPAQ 19	OPAS 12	OPAU 08	OPAX 13	OPAY 06
OPAQ 20	OPAS 13	OPAU 09	OPAX 14	OPAY 07
OPAR 01	OPAS 14	OPAU 10	OPAX 15	OPAY 08
OPAR 02	OPAS 15	OPAU 11	OPAX 16	OPAY 09
OPAR 03	OPAS 16	OPAU 12	OPAX 17	OPAY 10
OPAR 04	OPAS 17	OPAU 13	OPAX 18	OPAY 11
OPAR 05	OPAS 18	OPAU 14	OPAX 19	OPAY 12
OPAR 06	OPAS 19	OPAU 15	OPAX 20	OPAY 13
OPAR 07	OPAS 20	OPAU 16	OPAZ 01	OPAY 14
OPAR 08	OPAT 01	OPAU 17	OPAZ 02	OPAY 15
OPAR 09	OPAT 02	OPAU 18	OPAZ 03	OPAY 16
OPAR 10	OPAT 03	OPAU 19	OPAZ 04	OPAY 17
OPAR 11	OPAT 04	OPAV 01	OPAZ 05	OPAY 18
OPAR 12	OPAT 05	OPAV 02	OPAZ 06	OPAY 19
OPAR 13	OPAT 06	OPAV 03	OPAZ 07	OPAY 20
OPAR 14	OPAT 07	OPAV 04	OPAZ 08	OPAW 01
OPAR 15	OPAT 09	OPAV 05	OPAZ 09	OPAW 02
OPAR 16	OPAT 10	OPAV 07	OPAZ 10	OPAW 03
OPAR 17	OPAT 11	OPAV 09	OPAZ 11	OPAW 04
OPAR 18	OPAT 12	OPAV 10	OPAZ 12	OPAW 05
OPAR 19	OPAT 13	OPAV 15	OPAZ 13	OPAW 06
OPAR 20	OPAT 14	OPAX 01	OPAZ 14	OPAW 07
OPAS 01	OPAT 15	OPAX 02	OPAZ 15	OPAW 08
OPAS 02	OPAT 18	OPAX 03	OPAZ 16	OPAW 09
OPAS 03	OPAT 19	OPAX 04	OPAZ 17	OPAW 10

“...continua...”

“QUADRO 1A, Cont.”

OPAW 11	OPBB 03	OPD 14	OPF 13	OPJ 14
OPAW 12	OPBB 04	OPD 15	OPF 14	OPJ 15
OPAW 13	OPBB 05	OPD 16	OPF 15	OPJ 16
OPAW 14	OPBB 06	OPE 01	OPF 16	OPJ 17
OPAW 15	OPBB 07	OPE 02	OPF 17	OPJ 18
OPAW 16	OPBB 08	OPE 03	OPF 18	OPK 05
OPAW 17	OPBB 09	OPE 04	OPF 19	OPK 15
OPAW 18	OPBB 10	OPE 05	OPF 20	OPL 01
OPAW 19	OPBB 11	OPE 06	OPG 04	OPL 02
OPAW 20	OPBB 12	OPE 07	OPG 12	OPL 03
OPB 01	OPBB 13	OPE 08	OPG 16	OPL 05
OPB 02	OPBB 14	OPE 09	OPG 19	OPL 06
OPB 03	OPBB 15	OPE 10	OPH 02	OPL 07
OPB 04	OPBB 16	OPE 11	OPH 03	OPL 08
OPB 05	OPBB 17	OPE 13	OPH 05	OPL 09
OPB 06	OPBB 18	OPE 14	OPH 19	OPL 11
OPB 07	OPBB 19	OPE 15	OPI 01	OPL 12
OPB 08	OPBB 20	OPE 16	OPI 03	OPL 13
OPB 09	OPC 01	OPE 18	OPI 06	OPL 14
OPB 10	OPC 05	OPE 19	OPI 07	OPL 15
OPB 11	OPC 06	OPE 20	OPJ 01	OPL 16
OPB 12	OPC 11	OPF 01	OPJ 02	OPL 17
OPB 13	OPC 12	OPF 02	OPJ 03	OPL 18
OPB 14	OPC 13	OPF 03	OPJ 04	OPL 19
OPB 15	OPC 20	OPF 04	OPJ 05	OPL 20
OPB 16	OPD 05	OPF 05	OPJ 06	OPM 01
OPB 17	OPD 06	OPF 06	OPJ 07	OPM 02
OPB 18	OPD 07	OPF 07	OPJ 08	OPM 03
OPB 19	OPD 08	OPF 08	OPJ 09	OPM 04
OPB 20	OPD 09	OPF 09	OPJ 10	OPM 05
OPBA 07	OPD 10	OPF 10	OPJ 11	OPM 06
OPBB 01	OPD 11	OPF 11	OPJ 12	OPM 07
OPBB 02	OPD 12	OPF 12	OPJ 13	OPM 08

“...continua...”

“QUADRO 1A, Cont.”

OPM 09	OPN 10	OPP 03	OPS 18	OPW 08
OPM 10	OPN 11	OPP 11	OPS 20	OPW 09
OPM 11	OPN 12	OPQ 02	OPT 07	OPW 10
OPM 12	OPN 13	OPQ 03	OPU 20	OPW 11
OPM 13	OPN 14	OPQ 10	OPV 04	OPW 12
OPM 14	OPN 15	OPR 02	OPV 08	OPW 13
OPM 15	OPN 17	OPR 03	OPV 19	OPW 14
OPM 16	OPN 18	POR 12	OPX 06	OPW 15
OPM 17	OPN 19	OPS 01	OPX 11	OPW 16
OPM 18	OPN 20	OPS 02	OPX 17	OPW 17
OPM 19	OPO 01	OPS 03	OPX 18	OPW 18
OPM 20	OPO 02	OPS 04	OPX 19	OPW 19
OPN 01	OPO 07	OPS 06	OPY 05	
OPN 02	OPO 11	OPS 08	OPY 10	
OPN 03	OPO 12	OPS 09	OPY 18	
OPN 04	OPO 13	OPS 11	OPW 01	
OPN 05	OPO 16	OPS 12	OPW 03	
OPN 06	OPO 17	OPS 14	OPW 04	
OPN 08	OPO 19	OPS 15	OPW 06	
OPN 09	OPO 20	OPS 17	OPW 07	