

DETECÇÃO DE ENDOGAMIA EM SEMENTES DE *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden*

Aida Sanac SATO**
Edson Scizo MORI***

RESUMO

Um Pomar de Sementes Comercial de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden constituído por 14 clones, selecionados para a característica de maior densidade básica em uma população base originária de Coff's Harbour - Austrália, foi instalado no município de Botucatu - SP em 1982. Vários fatores podem levar à depressão endogâmica, afetando a qualidade das sementes produzidas em um pomar. A eletroforese de isoenzimas foi aplicada para detectar o nível de endogamia em um lote de sementes comerciais, para avaliar a sua qualidade. A técnica foi realizada em meio suporte de penetrose de milho à 13%, utilizando cotilédones com aproximadamente 15-20 dias de germinação e plantas com aproximadamente 1 mês da idade. Foram analisadas 14 progênies por meio de 8 locos enzimáticos: MDH-1 (1 alelo); MDH-2 (2 alelos); ACP-1 (4 alelos); ACP-3 (3 alelos); α -EST-1 (4 alelos); α -EST-2 (2 alelos); LAP-2 (5 alelos); GOT-2 (3 alelos); e em seguida procedeu-se estimativas biométricas (coeficiente de endogamia - \hat{f} ; e taxa aparente de fertilização cruzada - \hat{t}_a) com base nas interpretações dos locos enzimáticos. As conclusões foram: 1) o lote de sementes apresentou endogamia dentro da população ($\hat{f} = 0,071$) e taxa aparente média de fertilização cruzada (\hat{t}_a) de 87,2% o que mostra que o *Eucalyptus grandis* apresenta um comportamento de planta intermediária, preferencialmente alógama, 2) o lote de sementes apresentou boas qualidades para utilização comercial.

Palavras-chave: eletroforese de isoenzimas; pomar de sementes; endogamia; qualidade de sementes; autofecundação; *Eucalyptus grandis*.

1 INTRODUÇÃO

A produção de sementes do gênero *Eucalyptus*, em escala comercial, geralmente é obtida do cruzamento de indivíduos superiores agrupados em Pomares de Sementes por polinização livre. Cruzamentos entre aparentados e autofecundação, entre outros fatores, podem diminuir o potencial das progênies, devido à depressão

ABSTRACT

A commercial seed orchard of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, with 14 clones, selected for the highest basic density of wood in a base-population from Coff's Harbour-Australia, was planted in Botucatu county, São Paulo State, in 1982. Several elements can lead to an endogamic depression, affecting the quality of seeds produced in the orchard. The electrophoresis of isozymes was applied to determine the level of inbreeding and the quality of a commercial seed lot. The technique was developed in corn starch gel using cotyledons approximately 15-20 days of germination and seedlings approximately one month old. Fourteen progenies were analysed using 8 isozyme loci: MDH-1 (1 allele); MDH-2 (2 alleles); ACP-1 (4 alleles); ACP-3 (3 alleles); α -EST-1 (4 alleles); α -EST-2 (2 alleles); LAP-2 (5 alleles); GOT-2 (3 alleles). Biometric parameters related to the mating system (coefficient of inbreeding - \hat{f} ; outcrossing rate - \hat{t}) were estimated, based on the interpretation of the isozymes loci. The conclusions were: 1) the inbreeding in the lot seeds was $\hat{f} = 0.071$ and the average outcrossing rate (\hat{t}) in the studied population was 87.2%, demonstrating that *Eucalyptus grandis* is an intermediary plant, preferentially allogamous, 2) the lot of seeds have good qualities for commercial utilization.

Key words: electrophoresis of isozymes; seed orchard; inbreeding; seed quality; self-fertilization; *Eucalyptus grandis*.

endogâmica. Portanto, vários fatores devem ser levados em conta na formação do Pomar de Sementes para minimizar a endogamia, como: sincronismo de florescimento, distribuição dos indivíduos na área, espaçamento, agentes polinizadores, isolamento do Pomar, etc. Embora a espécie seja classificada como alógama, ela permite uma certa taxa de autofecundação, que pode ser alta se o Pomar de Sementes não for bem planejado.

(*) Aceito para publicação em outubro de 1996.

(**) Instituto Florestal, Caixa Postal 1322, 01059-970, São Paulo, SP, Brasil.

(***) Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP, Caixa Postal 237, 18603-970, Botucatu, SP, Brasil.

O presente trabalho tem por objetivo, detectar o nível de endogamia em lotes de sementes comerciais para avaliação de sua qualidade através da técnica de Eletroforese de Isoenzimas em gel de amido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os métodos de melhoramento que vêm sendo aplicados, baseiam-se principalmente na seleção intensiva de árvores fenotipicamente superiores e sua utilização nos Pomares de Sementes. Após, são instalados Testes de Progênes com sementes das árvores do Pomar, visando determinar o valor genotípico das árvores selecionadas e posterior utilização como base para a seleção na geração seguinte (KAGEYAMA, 1981).

Segundo MORI (1993) a perda de variabilidade através de deriva genética, em etapas de seleção em um programa de melhoramento genético, pode ser muito acentuada, dependendo do tamanho efetivo populacional utilizado. Programas que visam altos ganhos, a curto prazo, se mal acompanhados, podem sofrer sérios riscos por vulnerabilidade genética.

As principais características reprodutivas que devem afetar as estratégias de melhoramento são o sistema sexual, sistemas de cruzamento e suas conseqüências genéticas em termos de endogamia, hibridação interespecífica e relações de paternidade; características de desenvolvimento floral, fenologia do florescimento e frutificação, vetores de pólen e dispersão; precocidade e fecundidade. Cada um varia dentro e entre espécies, tanto no controle genético como no ambiental, oferecendo opções para seleção ou manipulação no sentido desejado pelo melhorista (GRIFFIN, 1990). Segundo o mesmo autor, se uma semente é produzida por autofecundação, a planta resultante é freqüentemente menos vigorosa que outra obtida por cruzamento - ela exibe depressão por endogamia.

Segundo Eldridge citado por KAGEYAMA (1981), o *Eucalyptus* é considerado bissexual, sendo que a protandria tem sido observada em algumas espécies, com exemplos de auto incompatibilidade e macho esterilidade.

A alogamia pode ser considerada como predominante em *Eucalyptus*. Embora ocorra a protandria, isso não elimina a possibilidade de auto fecundação, já que o florescimento da copa toda demora vários dias mais que o período em que uma flor é receptível.

Os resultados obtidos quanto à autofertilização natural em espécies florestais são bastante variáveis, porém a freqüência não tem sido alta a ponto de ser considerada de importância. A estimativa do grau de autofertilização no geral, determina após uma geração, um coeficiente de endogamia em torno de 0,025 a 0,050 (KAGEYAMA, 1981).

A técnica de Eletroforese de isoenzimas vem apresentando resultados satisfatórios para a determinação de estimativas de taxas de cruzamento em populações de plantas. Brown & Allard citados por MORI (1993).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Procedimentos de Eletroforese

Foram utilizadas sementes das 14 matrizes de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden do Pomar de Sementes Comercial - 15J (coleta individual) da Cia. Suzano de Papel e Celulose, originárias de Coff's Harbour - Austrália, instalado no município de Botucatu-SP.

Adotou-se 2 procedimentos para a extração de enzimas:

1. utilizando cotilédones com aproximadamente 15-20 dias de germinação em gerbox com papel de filtro em câmara de germinação à 25° C e controle de fotoperíodo;
2. utilizando planta semeada em vasos com substrato comercial em casa de vegetação com aproximadamente 1 mês após semeadura, tomando-se plantas ao acaso que apresentassem de 2 a 3 pares de folhas.

Para a maceração dos tecidos foi utilizada a solução de extração de ALFENAS *et al.* (1991). A aplicação das enzimas foi feita em gel de penetrose de milho a uma concentração de 13%, através de tiras de papel de filtro ("wicks"), molhadas no extrato enzimático que foram armazenadas em "freezer" para posterior utilização.

Os sistemas tampão eletrodo/gel e os sistemas enzimáticos utilizados foram:

- Tampão do eletrodo:
Tris ácido cítrico (Tris-0,135 M; Ác. cítrico-0,044 M) - pH 7,0
- Tampão do gel:
Histidina morfolina (Histidina-0,005 M) - pH 7,0
- Sistema enzimático:
Malato desidrogenase (MDH-EC 1.1.1.37.)
Fosfatase ácida (ACP-EC 3.1.3.2.)
Alfa Esterase (α -EST-EC 3.1.1.1.)
Leucina aminopeptidase (LAP-EC 3.4.11.1.)
Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT-EC 2.6.1.1.)

3.2 Procedimentos de Biometria

3.2.1 Coeficiente de endogamia (\hat{f})

As estimativas dos coeficientes de endogamia, dentro da população (\hat{f}), foram obtidas pela seguinte expressão, apresentada por WEIR (1990):

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

onde:

\hat{H}_e - estimativa da frequência esperada de heterozigotos

\hat{H}_o - estimativa da frequência observada de heterozigotos

3.2.2 Taxa de fertilização cruzada (\hat{t}_a)

As estimativas das taxas aparente de fertilização cruzada (\hat{t}_a), foram obtidas pela expressão apresentada por WEIR (1990):

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

onde:

\hat{f} - estimativa do coeficiente de endogamia

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O procedimento de extração de enzimas de cotilédones com aproximadamente 15-20 dias de germinação não pôde ser utilizado, pois o extrato obtido da maceração de apenas um cotilédone não atingiu a consistência desejada (muito diluída ou não suficientes para molhar a tira de papel de filtro).

Utilizou-se então o procedimento de extração de enzimas de plantas com aproximadamente 1 mês de idade semeadas em vaso com substrato comercial. Este apresentou resultados satisfatórios para análise de isoenzimas.

Estudando a frequência de alelos nos locos observa-se que a LAP-2 apresentou maior polimorfismo de alelos (5). A ACP-1 e a α -EST-1, apresentaram 4 alelos; a ACP-3 e a GOT-2 apresentaram 3 alelos; a MDH-2 e a α -EST-2 apresentaram 2 alelos e a MDH-1 apresentou apenas 1 alelo na população.

A TABELA 1 apresenta as frequências de todos os alelos presentes em 8 locos isoenzimáticos na população de progênies de polinização aberta de *Eucalyptus grandis*.

A frequência esperada média de heterozigotos na população ($\bar{H}_e = 0,300$) foi superior a média observada ($\bar{H}_o = 0,277$), evidenciando um certo desvio no comportamento panmítico de cruzamentos da população. Este desvio é apresentado pelo coeficiente de endogamia (\hat{f}) que foi igual a 7,1%.

A estimativa da taxa aparente de fertilização cruzada (\hat{t}_a) foi igual a 0,872, um valor bastante próximo ao encontrado por MORI (1993), em estudo realizado com *Eucalyptus grandis* com o mesmo material genético.

As estimativas da frequência esperada (\hat{H}_e) e observada (\hat{H}_o) de heterozigotos, do coeficiente de endogamia (\hat{f}) e da taxa aparente de fertilização cruzada (\hat{t}_a) encontradas na população, são apresentadas na TABELA 2.

MORI (1993) revendo a literatura, encontrou valores de taxa endogamia iguais ou superiores ao encontrado neste trabalho. Este fato mostra que o lote de sementes analisado possui boas qualidades para uso comercial.

TABELA 1 - Frequência de alelos em 8 locos de *Eucalyptus grandis*.

ALELO	LOCOS							
	MDH-1	MDH-2	ACP-1	ACP-3	EST-1	EST-2	LAP-2	GOT-2
1	1,000	0,860	0,697	0,798	0,809	0,783	0,621	0,917
2	---	0,140	0,252	0,196	0,080	0,217	0,175	0,068
3	---	---	0,032	0,006	0,069	---	0,139	0,015
4	---	---	0,018	---	0,043	---	0,057	---
5	---	---	---	---	---	---	0,007	---

TABELA 2 - Frequência esperada (\hat{H}_e) e observada (\hat{H}_o) de heterozigotos, coeficiente de endogamia (\hat{f}) e taxa aparente de fertilização cruzada (\hat{t}_a) observada para cada loco gênico.

PARÂMETRO	LOCOS									
	MDH-1	MDH-2	ACP-1	ACP-3	EST-1	EST-2	LAP-2	GOT-2	MÉDIA	ERRO
\hat{H}_e	0,000	0,240	0,449	0,325	0,333	0,340	0,560	0,155	0,300	0,061
\hat{H}_o	0,000	0,217	0,450	0,304	0,309	0,302	0,486	0,152	0,277	0,055
\hat{f}	----	0,096	-0,002	0,065	0,072	0,112	0,132	0,019	0,071	---
\hat{t}_a	----	0,825	1,004	0,878	0,866	0,799	0,767	0,963	0,872	---

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- a) a endogamia encontrada na população estudada foi baixa ($\hat{f} = 0,071$);
- b) por este lote de sementes estudado, a espécie é considerada intermediária ($\hat{t}_a = 0,872$);
- c) assim, o lote de sementes estudado possui boas qualidades para utilização comercial;
- d) recomenda-se também que esta metodologia passe a ser utilizada na caracterização de lotes de sementes comerciais, originadas de Pomares de Sementes.

6 AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Companhia Suzano de Papel e Celulose pelo suporte financeiro e à FCA-UNESP de Botucatu pela infra-estrutura, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C. *et al.* 1991. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 242p.
- GRIFFIN, A. R. 1990. Reprodução sexual e estratégias de melhoramento florestal com referência particular a *Eucalyptus*. In: REUNIÃO TÉCNICA DE POPULAÇÕES BASE DE *Eucalyptus*, IPEF, Piracicaba, set. 04-05. Piracicaba, IPEF. p.20-53.
- KAGEYAMA, P. Y. 1981. Endogamia em espécies florestais. *Série Técnica - IPEF*, Piracicaba, 2(8):1-40.
- MORI, E. S. 1993. *Variabilidade genética isoenzimática em uma população de Eucalyptus grandis Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção*. Piracicaba, ESALQ. 199p. (Tese de Doutorado)
- WEIR, B. S. 1990. *Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data*. North Carolina State University, Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 377p.