

CORREÇÕES DE PARÂMETROS GENÉTICOS QUANTITATIVOS UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES EM TESTES DE PROGÊNIES DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari.

Evandro Vagner Tambarussi, Edson Seizo Mori, Mário Luiz Teixeira de Moraes, Alexandre Magno Sebbenn e Léo Zimback - Outras Sub-Áreas Afins - Engenharia Florestal- Departamento de Produção Vegetal – Agricultura e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas/ UNESP-Botucatu.

A introdução de espécies florestais exóticas no Brasil trouxe grandes benefícios para o desenvolvimento econômico do país, principalmente em áreas que as características edafo-climáticas eram desfavoráveis à agricultura. Entre as espécies arbóreas exóticas, espécies do gênero *Pinus* vêm se destacando como uma das mais importantes em projetos de reflorestamento no Brasil, ocupando o segundo lugar em área florestal plantada no país, ficando atrás apenas de espécies de *Eucalypto*. A área estimada pela Sociedade Brasileira de Silvicultura em 2001, foi de 1.84 milhões ha de *Pinus* e 2.96 milhões ha de *Eucalypto* (Estatísticas, 2006). Dentre as espécies de *Pinus* cultivadas no Brasil, destaca-se o *Pinus caribaea hondurensis*, muito plantado por indústrias de papel e celulose (fibra longa), laminação e serraria e produção de resina, devido ao seu rápido crescimento, adaptação e boa qualidade da madeira para a região sudeste, oeste e norte do Brasil. O *P. caribaea* var. *hondurensis* ocorrer naturalmente em Belize, Guatemala, Honduras, Nicarágua e México (Perry, 1991). Mais recentemente novas áreas naturais foram encontradas em El Salvador (Camcore, 1996). *P. caribaea* var. *hondurensis* ocorre geralmente em altitudes que variam do nível do mar a 500 m de altitude, podendo chegar, em alguns locais, a 1.000 m de altitude (Hodge & Dvorak, 2001). O crescimento das árvores pode chegar a 30 m (Richardson, 1998). A espécie é recomendada para plantios entre o norte do estado de São Paulo até a Amazônia (Golfari, 1967). Sua madeira é de utilidade para serrarias e produção de celulose. Contudo, a maior parte dos plantios de *P. caribaea hondurensis* no Brasil, têm origem, direta ou indireta, de uma mesma fonte de germoplasma de Agudos-SP, onde foram instalados pomares de sementes à partir de matrizes selecionadas da procedência de Poptun, região da Guatemala, onde a variedade da espécie é nativa (Bertolani *et al.*, 1984; Moura & Dvorak, 2001). Esse material foi submetido a diversas estratégias de melhoramento com diferentes objetivos, o que pode ter levado a perda da variabilidade genética como consequência da alta pressão de seleção das etapas de um programa de melhoramento (Mori, 1993). Para quantificação da variabilidade genética por locos microsatélites e estimativa de parâmetros de sistema reprodutivo, folhas foram coletadas em seis árvores de cada parcela das 35 famílias. A extração de DNA baseou-se em Doyle & Doyle (1987) e modificado por Grattapaglia e Sederoff (1994). O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro do tipo GeneQuant*Pro* e sua concentração foi ajustada para 5ng.µL, para a utilização na reação de polimerização em cadeia (PCR). Para espécies do gênero *Pinus* já existem

primers desenvolvidos, os quais podem ser usados dentro do mesmo táxon, ou em espécies com afinidade genética (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Byrne et al., 1996). Assim, primers foram transferidos de outras espécies de *Pinus* para o *P. caribaea hondurensis*. Testou-se 20 primers: RPS12, RPS 20, RPS 25b, RPS 84 (*P. strobus*, Echt et al. 1998), PSM 2, PSM 34 (*P. sylvestris*, Kostia et al. 1995), PR 4.6, PR 9.3 (*P. radiata*, Smith & Devey 1994), APC 3, APC 9, (*P. contorta* var. *latifolia*, Hicks et al. 1998), APC 11, APC 13 (*P. contorta* var. *latifolia*, Hicks et al. 1998), RPS 150, RPS 160 (*P. strobes*, Echt et al. 1998), PtTX 2037, PtTX 2034, PtTX 3011, PtTX 3029 (*P. taeda*, Elsik et al. 2000), RPTest01, and RPTest 09 (*P. taeda*, Echt & Burns 1999), sendo que apenas seis foram eficientemente transferidos e foram polimórficos para a espécie. O locos transferidos foram: PtTX2037, PtTX3029, RPTest 01, RPTest 09, PR4.6 and PSM2. As reações de amplificação foram realizadas em um aparelho termociclador Programmable Thermal Controller - 100 (MJ Research Inc.), utilizando o seguinte perfil térmico 5 min a 94°C, seguidos de 32 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos de anelamento, sendo as temperaturas de 57°C para os primers RPTest01, RPTest09, PtTX3029 e PSM2 e para os primers PR4.6 e o PtTX2037 60°C e 48°C respectivamente, 1 min a 72°C, seguidos de 10 min a 72°C para a extensão final. O volume total da mistura foi de 17µL, contendo 1,7µL de tampão 10 X PCR Buffer, 1 unidade de taq DNA polimerase, 3 µl de DNA (5 ng/µl), 0,6 µl de cada primer (10 µM), 1,5 µl de solução de dNTP (0,5 mM), e 0,85 µl de MgCl₂ 50mM. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose Metaphor (FMC Bioproducts) 3%; a coloração feita em banho de Brometo de Etídeo 2% (2mL em 1,5 L de água por 1 hora). As bandas foram visualizadas em luz ultravioleta e fotografadas. Com esta finalidade foi instalado em Selvíria – Mato Grosso do Sul, um experimento com 96 progênie de dez plantas e quatro testemunhas comerciais, em delineamento de látice 10 x 10 triplo avaliado para altura, DAP e volume para estimar parâmetros genéticos quantitativos, assim como a análise molecular de seis marcadores microsatélites em 35 progênie de seis plantas para estimar o modelo de reprodução para a correção dos parâmetros. Com os marcadores microsatélites obteve-se $r_{xy} = 0,253$ e $2.\theta_{xy} = 0,256$, sendo a população panmitica sem necessidade de correção de parâmetros. As variâncias genéticas aditivas ($\hat{\sigma}_A^2$) foram 1,58; 4,12 e 0,0316 para altura, DAP e volume respectivamente. Foram obtidos coeficientes de herdabilidades de plantas individuais (\hat{h}^2) de 0,44, 0,28 e 0,43, herdabilidades dentro de progênie (\hat{h}_d^2) de 0,50, 0,24 e 0,40, assim como herdabilidades em nível de média de progênie (\hat{h}_m^2) de 0,50, 0,50 e 0,58, para altura, DAP e volume respectivamente.

Referências Bibliográficas

- BERTOLANI, F.; NICONIELO, N. MIGLIORINI, A. J. Melhoramento genético e produção de sementes de *Pinus spp* na CAFMA- Agudos (SP). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL: MÉTODOS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE SEMENTES E MUDAS FLORESTAIS, Curitiba, 1984. **Anais...**Curitiba: FUPEF, 1984. 478-94 p.
- BYRNE, M., MARQUEZ-GARCIA, M. I., UREN, T., SMITH, D. S., MORAN, G. F. Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. **Aust. J. Bot.**, v. 44, p. 331-41, 1996.
- CAMCORE.. CAMCORE (Central America & Mexico Coniferous Resources Cooperative) Annual Report. Departament of Forestry, North Caroline State University, Raleigh, North Caroline, USA, 1996.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Arapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull**, n.19, p.11-15, 1987.
- ECHE, C. S.; MAY-MAQUARDT, P.; HSEIH, M.; ZAHORCHAK, R. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. **Genome**, v. 31. ,p. 1102-1108, 1996.
- ECHE, C. S., BURNS, R. (1999) SSR derived from *Pinus taeda* ESTs.<http://dendrome.ucdavis.edu/Data/ssr-est.html> <acesso em 09/04/2003>
- ESTADÍSTICAS. Disponível em :< <http://www.sbs.org.br/estadísticas.htm>> Acesso em: 02 ago. 2006.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília-DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220P.
- GOLFARI, L.. Coníferas aptas para repoblaciones forestales em el Estado de São Paulo. **Silvicultura em São Paulo**, n.6, p. 7-62, 1967.
- GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v.137, p.1121-1137, 1994.
- HODGE, G. R., DVORAK, W. S. Genetic parameters and provenance variation of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* in 48 international trials. **Canadian Journal of Forest Research**, 31, n.3, p. 496-511, 2001.
- MOURA, V. P. G.; DVORAK, W. S. Provenance and family variation of *Pinus Caribaea* var. *Hondurensis* from Guatemala and Honduras, grownd in Brazil, Colombia and Venezuela. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.36, n.2, p. 225-234, 2001.
- MORI, E. S. **Variabilidade genética de uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção**.1993. Tese (Doutorado- Genética e Melhoramento de plantas)- Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.
- PERRY, J. P. Jr. 1991. **The pines of Mexico and Central America**. Timber Press, OR
- RICHARDSON, D.M.. **Ecology and Biogeography of Pinus**. Cambridge University Press. ISBN 0-521-55176-5, 1998.
- SMITH, J. S. C. & DEVEY, M. E. Occurrence and inheritance of microsattelites in *Pinus radiata*. **Genome**. v.37, p. 977-983, 1994.

BOLSA- FAPESP