



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

SABRINA DELGADO SOARES

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÃO DE MELHORAMENTO DE
MOGNO AFRICANO (*Khaya ivorensis* A. Chev.)

Goiânia, GO – Brasil

Agosto, 2014

SABRINA DELGADO SOARES

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÃO DE MELHORAMENTO DE
MOGNO AFRICANO (*Khaya ivorensis* A. Chev.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador:
Prof. Dr. Evandro Novaes

Goiânia, GO - Brasil

Agosto, 2014

SABRINA DELGADO SOARES

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÃO DE
MELHORAMENTO DE MOGNO AFRICANO (*Khaya
ivorensis* A. Chev.)**

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 04 de Agosto de 2014, pela
Banca Examinadora constituída pelos membros:

Prof. Dr. Evandro Novaes
Presidente – EA/UFG

Dra. Cristiane Aparecida Fioravante Reis
Membro – Embrapa Florestas

Prof. Dra. Mariana Pires de Campos Telles
Membro – ICB/UFG

Goiânia, Goiás

Brasil

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1 MOGNO COMO ALTERNATIVA PARA A EXPLORAÇÃO PREDATÓRIA DE MADEIRAS NOBRES	10
2.2 GÊNERO <i>Khaya</i>	13
2.3 INTRODUÇÃO DO MOGNO AFRICANO NO BRASIL E PERSPECTIVAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO	16
2.4 USO DE MARCADORES MOLECULARES EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO.....	18
2.5 DIVERSIDADE GENÉTICA APLICADA AO MELHORAMENTO FLORESTAL ..	19
2.6 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 ORIGEM E COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	28
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA	30
3.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA	31
3.4 SELEÇÃO E TRIAGEM DOS LOCOS MICROSSATÉLITES	31
3.5 AMPLIFICAÇÃO DOS LOCOS MICROSSATÉLITES.....	32
3.6 ELETROFORESE CAPILAR.....	33
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
3.7.1 Diversidade genética	34
3.7.2 Divergência e Estrutura Genética.....	35
4 RESULTADOS	37
4.1 TRANSFERABILIDADE DOS PRIMERS MICROSSATÉLITES	37
4.2 ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA.....	38
4.3 ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL.....	41
5 DISCUSSÃO	47
5.1 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL	47
5.2 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DAS SUBPOPULAÇÕES.....	50
5.3 ESTRUTURA GENÉTICA DAS SUBPOPULAÇÕES.....	52
6 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus e a Nossa Senhora. Por me darem saúde, força, guiar os meus passos e iluminar o meu caminho.

À minha família, ao meu pai (Paulo César), meu irmão (Bruno) e em especial à minha mãe (Maria Delgado) pelo carinho. Que por diversas vezes me acompanhou durante as idas e vindas de Goiânia, buscando sempre me incentivar e não deixar com que eu desistisse a cada viagem que deveria fazer.

Ao meu querido esposo, Divino Henrique, pela paciência, amor e compreensão durante os períodos em que fui ausente em casa.

À minha amiga Amanda Cândido pelo companheirismo, carinho e pelo apoio durante a minha estada nesses dois anos.

Ao meu orientador, professor Evandro Novaes, pelo exemplo, confiança, amizade, compreensão e por ter me dado todo estímulo e oportunidade de realizar este trabalho.

Pelo apoio e incentivo da empresa Mudas Nobres que forneceu subsídios e o material para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Genética e Genômica de Plantas da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (EA/UFG) e a equipe que o compõe. Em especial à Ludmila Bandeira que com toda paciência soube me orientar e me ensinar sobre cada passo na bancada que deveria ser adotado neste trabalho e pelo desenvolvimento dos *primers* para a espécie em estudo. Ao professor Alexandre Siqueira Guedes Coelho, pelos ensinamentos prestados.

À minha amiga Stela Barros Ribeiro, que sempre levarei comigo como exemplo de dedicação e solidariedade, que nos momentos mais difíceis, sempre estava presente no laboratório para me ajudar.

À minha amiga Kelly de Jesus Silva Maciel pela amizade, carinho e colaboração durante esse período.

Ao programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PGBM), Instituto de Ciências Biológicas da UFG e todos os docentes do programa pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Universidade Federal de Goiás pela estrutura e apoio no desenvolvimento da pesquisa.

À CAPES e a FAPEG pela bolsa de estudos e pelo financiamento da pesquisa.

RESUMO

SOARES, S. D. **Diversidade genética em população de melhoramento de mogno africano (*Khaya ivorensis*)**. 2014. 69 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.¹

A forte demanda por madeira nobre impulsiona o corte seletivo de árvores e a degradação das florestas brasileiras. Devido ao extrativismo predatório, o mogno brasileiro (*Swietenia macrophylla*) encontra-se em risco de extinção e proibido de corte pelo IBAMA. Uma alternativa ao extrativismo e às tentativas fracassadas de plantios do mogno brasileiro é o mogno africano (*Khaya ivorensis*). A Universidade Federal Goiás em parceria com a empresa Mudanças Nobres iniciaram pesquisas para melhoramento genético do *K. ivorensis*. O objetivo do presente trabalho foi estimar a diversidade e a divergência genética em 53 árvores superiores selecionada no âmbito desse programa de melhoramento. Os clones foram selecionados em três populações diferentes, plantadas em fazendas no estado do Pará a partir de populações da Costa do Marfim e Tanzânia na África. Foram utilizadas 12 árvores de *Khaya senegalensis* como um grupo controle nas análises de divergência genética. Os genótipos dos indivíduos foram obtidos com oito locos microssatélites, desenvolvidos para *K. senegalensis*, através de eletroforese capilar na plataforma ABI-3100 (Applied Biosystems). O programa GeneMapper (Applied Biosystems) foi utilizado para determinar os alelos. Todos os locos foram 100% polimórficos, com número médio de alelos por loco de 5,875. A heterozigosidade esperada média foi menor ($H_E = 0,563$) que a heterozigosidade observada média ($H_O = 0,738$). Com isso, o índice de fixação médio intrapopulacional foi estimado em $f = -0,314$, indicando que a depressão por endogamia pode estar diminuindo a frequência de homozigotos quando comparado com o que seria esperado sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Já o índice de fixação médio entre as populações foi estimado em $\theta = 0,008$, indicando que somente 0,8% da variabilidade genética está estruturada entre as populações. O dendograma gerado a partir da matriz de distância genética de Rogers demonstrou dois grupos bem distintos, separando o grupo controle com *K. senegalensis* do restante das árvores de *K. ivorensis*. O grupo composto pelos *K. ivorensis* apresentou fraca consistência entre os nós, nos *bootstraps*, evidenciando a pequena diferenciação genética entre as árvores selecionadas. A falta de estruturação foi confirmada por uma abordagem Bayesiana com o programa *Structure*. A população de melhoramento possui diversidade genética comparável com a de populações naturais de mogno africano e mogno brasileiro. Os resultados de distância genética entre os clones, estimados neste trabalho, serão utilizados para escolha de genitores divergentes em futuros cruzamentos.

Palavras-chave: *Khaya ivorensis*, diversidade genética, microssatélites.

¹ Orientador: Prof. Dr. Evandro Novaes. Escola de Agronomia – UFG.

ABSTRACT

SOARES, S. D. **Genetic diversity in breeding population of African mahogany (*Khaya ivorensis*)**. 2014. 69 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.²

The strong demand for hardwood drives selective logging and degradation of forests ecosystems in Brazil. Due to its wood value and predatory logging, Brazilian mahogany (*Swietenia macrophylla*) is at risk of extinction. Currently, its trees are protected and banned from logging by the Brazilian Institute of Environment (IBAMA). Monoculture of the Brazilian mahogany is proven unsuccessful due to the attack of the *Hypsipyla grandella* larvae. An alternative to Brazilian mahogany plantation is the African mahogany (*Khaya ivorensis*), a species with similar high valued wood properties. The Universidade Federal de Goiás in partnership with Mudás Nobres Company started a breeding program with *Khaya ivorensis*. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity and divergence among 53 superior trees selected and cloned as part of the breeding strategies. Clones were selected from three different populations, planted in two farms in Pará state and originating from Ivory Coast and Tanzania populations. Twelve seedlings of *Khaya senegalensis* were also used as a control group in the analyses of genetic divergence. The individuals were genotyped with eight microsatellite loci developed for *K. senegalensis*, by capillary electrophoresis on the ABI-3100 (Applied Biosystems) platform. The software *GeneMapper* (Applied Biosystems) was used to genotype the alleles. The average number of alleles per locus was 5.875. The average expected heterozygosity was lower ($H_E = 0.563$) than the average observed heterozygosity ($H_O = 0.738$). Therefore, the average intrapopulation fixation index was negative ($f = -0.314$) indicating that high inbreeding depression is decreasing the frequency of homozygous when compared to what would be expected under Hardy-Weinberg Equilibrium. The average fixation index between populations was estimated at $\theta = 0.008$, indicating that only 0.8% of the genetic variability is due to differences between populations. The dendrogram generated from the matrix of Rogers' genetic distance showed two distinct groups, separating the control group with *K. senegalensis* from the *K. ivorensis* selected trees. The group composed of *K. ivorensis* had nodes with weak *bootstrap* consistency indicating weak genetic structure among selected trees. The lack of genetic structure was confirmed by a Bayesian approach on the *Structure* (version 2.3.4) program. The genetic diversity observed within the selected breeding population is comparable to that of natural populations of African and Brazilian mahoganies. The genetic distance estimated with this work will guide the selection of divergent progenitors to be crossed.

Key words: *Khaya ivorensis*, genetic diversity, microsatellites.

² Orientador: Prof. Dr. Evandro Novaes. Escola de Agronomia – UFG.

1 INTRODUÇÃO

A grande demanda por madeira estimula o corte seletivo de árvores de importância econômica, o que pode provocar a degradação nos ecossistemas brasileiros e aumentar o risco de extinção não só das espécies florestais exploradas e de outras que sofrem com a degradação do habitat. O desmatamento pode também ser feito para implantação de pastagens, lavouras, cidades e estradas (Novick et al., 2003; Gomes, 2010). Esses aspectos podem acarretar perda de diversidade genética, a qual pode diminuir a sustentabilidade das espécies, na medida em que aumenta as chances de endogamia e diminuir a habilidade de sobrevivência da espécie frente a mudanças no ambiente. A fiscalização para reduzir o nível de exploração ilegal das florestas não ocorre de maneira eficiente, agravando a problemática ambiental.

O Brasil destaca-se como segundo maior produtor mundial de madeira tropical e a Amazônia é a principal região fornecedora do país (SFB & IPAM, 2011). Estima-se que o destino dessa produção esteja concentrado em 38% ao consumidor final (mercado varejista), 16% à construção civil, 15% à produção industrial, 12% à exportação, 7% à geração de energia, 7% à indústria de compensados e 5% à indústria moveleira (IBAMA, 2010). De acordo com estimativas do ano de 2009, cerca de 36% da madeira que é retirada da Amazônia é de origem ilegal (Pereira et al. 2010). Vale ressaltar que mesmo a retirada de madeira de forma legal, através de autorizações de desmatamento pelo IBAMA e órgãos competentes, em geral, não é um processo sustentável (Serrano et al., 2013).

Como o governo estabeleceu normas que buscam a diminuição da exploração madeireira nativa, os plantios florestais são uma alternativa racional e sustentável para o fornecimento de produtos madeireiros (Silva, 2013). No Brasil, a maioria dos reflorestamentos acontece com espécies exóticas, principalmente pertencentes aos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus* (Falesi & Baena, 1999). Apesar do rápido crescimento e boa adaptabilidade às condições edafoclimáticas do país, os gêneros *Eucalyptus* e *Pinus* ainda não conseguiram substituir completamente a demanda por madeira “nobre”, geralmente nativa, preferida por algumas indústrias como as de movelaria fina de madeira serrada, construção civil e naval. Essa demanda aliada às dificuldades de fiscalização fazem com que a maior parte das serrarias do Brasil ainda seja abastecida através do extrativismo de ecossistemas nativos (Sobral et al., 2002).

Os mognos africanos (*Khaya anthoteca*, *Khaya ivorensis*, *Khaya senegalensis*) também são espécies exóticas que merecem destaque, por possuírem madeira considerada “nobre” que pode vir a substituir a demanda ainda preenchida pela oferta de madeira nativa, extraída de maneira ilegal e/ou insustentável. Apesar de não apresentarem o crescimento tão rápido como os dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*, a madeira do mogno africano possui propriedades físico-mecânicas similares ao mogno brasileiro (*Swietenia macrophylla*) (Pinheiro et al., 2011). Dentre os mognos africanos, a espécie *K. ivorensis* merece destaque por possuir crescimento mais rápido, melhor desrama natural e fuste mais retilíneo (Gomes, 2010; Pinheiro et al., 2011). Além desses aspectos, a espécie não é vulnerável a praga que inviabiliza os plantios do mogno brasileiro, conhecida como broca-do-ponteiro (*Hysipyla grandella*) (Falesi & Baena, 1999).

Os vários plantios de mogno africano estabelecidos no país provêm de algumas árvores que foram introduzidas na década dos anos 70 e de alguns produtores que conseguiram importar sementes de regiões da África, onde a espécie é nativa (Falesi & Baena, 1999). A introdução do mogno africano no Brasil é recente, quando comparada com espécies de *Eucalyptus* e *Pinus*. Assim, são necessárias pesquisas em diversas áreas como, silvicultura e manejo da espécie, tecnologia da madeira, entomologia e patologia florestal, etc. Também é importante conhecer o nível de diversidade genética dos plantios estabelecidos no país, para avaliar sua sustentabilidade e a possibilidade de utilizar esse recurso genético em programas de melhoramento genéticos da espécie.

O advento dos marcadores moleculares facilitou e melhorou a estimativa do grau de variabilidade genética existente dentro e entre populações, possibilitando grandes avanços nos estudos de genética de populações. Entre os marcadores em nível de DNA, os microssatélites destacam-se pela co-dominância, multi-alelismo e alto nível de polimorfismo detectável. Com isso, é possível obter estimativas de diferenças genéticas mesmo entre os indivíduos geneticamente próximos (aparentados). As informações obtidas através desses marcadores permitem inferir diversos parâmetros genéticos como nível de heterozigosidade ou diversidade, bem como o grau de estruturação e distância genética entre diferentes grupos de indivíduos. Essas informações são muito úteis no monitoramento e gerenciamento da variabilidade

genética disponível em ecossistemas naturais, bancos de germoplasma ou programas de melhoramento genético (Grattapaglia, 2010).

Nesse sentido, o presente trabalho objetiva através de marcadores microssatélites:

- Estimar a diversidade genética em uma população de melhoramento de *K. ivorensis* selecionada em plantios no Estado do Pará;
- Estimar a divergência genética entre as árvores de *K. ivorensis* selecionadas, e
- Avaliar a estrutura genética entre e dentro das populações amostradas para subsidiar as futuras ações no âmbito do programa de melhoramento genético de *K. ivorensis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MOGNO COMO ALTERNATIVA PARA A EXPLORAÇÃO PREDATÓRIA DE MADEIRAS NOBRES

Os ecossistemas brasileiros vêm sofrendo forte degradação, não só pelo desmatamento para abertura de novas fronteiras agrícolas, como também pelo corte seletivo de árvores de madeira nobre. O corte seletivo tem destaque na Floresta Amazônica e Mata Atlântica, podendo causar forte erosão genética nas espécies-alvo da exploração. Além disso, todo o ecossistema é afetado na medida em que, para se fazer a extração, carreadores são construídos e as toras são arrastadas levando consigo outras espécies de plantas, alterando assim a cobertura florestal da área degradada. No período de 1980-1998, as espécies que mais sofreram corte seletivo nos ecossistemas brasileiro foram o mogno, jatobá, virola, cedro, angelim e ipê, representando 40% do volume explorado (Angelo et al., 2001).

As madeiras dessas espécies destacam-se pelo alto valor comercial, sendo utilizadas em serrarias para movelaria, construção civil, naval, entre outras aplicações. Dentre as espécies mais valiosas que já foi explorada da Amazônia, destaque pode ser dado ao mogno brasileiro (*S. macrophylla* King) da família Meliaceae (Barros & Veríssimo, 2002).

De acordo com os dados de Maués (2001) o Pará é um dos principais responsáveis pelo corte seletivo de espécies madeireiras da família Meliaceae como o mogno (*S. macrophylla* King), o cedro (*Cedrela odorata* L.) e a Andiroba (*Carapa guianensis*). No estado são exportados grandes volumes de produtos derivados da madeira, retirados através de cortes seletivos a taxas insustentáveis. Várias espécies de grande importância madeireira da Floresta Amazônica foram incluídas na lista vermelha de espécies ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN). O mogno brasileiro (*S. macrophylla*) é considerado uma espécie vulnerável na lista da IUCN. Posteriormente, devido à alta exploração para abastecer o comércio internacional, foi criada a Convenção Internacional sobre o Comércio de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES) em uma reunião dos membros da IUCN. A espécie de mogno *S. macrophylla* foi incluída na lista de espécies ameaçadas em acordo internacional promulgado pela CITES, que entrou em vigor em 15 de novembro de 2003. Através deste documento, os governos

buscam promover a sobrevivência de espécies ameaçadas através de acordos e cooperações, afim de, controlar as cotas de exportação de cada país quanto a utilização de toras, madeiras serrada e compensada (CITES, 2013).

Uma alternativa para a exploração predatória de madeira nobre de espécies nativa é o plantio de espécies florestais. Para preservar espécies madeireiras ameaçadas, é importante que haja oferta de madeira de florestas plantadas para atender a necessidade global. A madeira proveniente de florestas plantadas é um recurso natural renovável. A utilização de espécies exóticas surge como uma solução para evitar a fragmentação de florestas nativas e de espécies que estão proibidas para exploração (Silva, 2013).

A madeira do mogno brasileiro foi e ainda é altamente desejada nos mercados interno e Europeu. Na década de 80, o Governo Brasileiro comprovou a existência de uma grande cadeia de ilegalidades envolvendo órgãos públicos, como a Funai, na exploração do mogno brasileiro em terras indígenas e áreas públicas (Greenpeace 2001). O resultado dessa e outras atividades de exploração predatória é que o mogno brasileiro encontra-se sob forte ameaça de extinção (WWF 2010). Na tentativa de frear essas atividades predatórias, em dezembro de 2001, o IBAMA apresentou a Instrução Normativa nº 22, cujo Art. 1º suspende o transporte, o beneficiamento, e a comercialização de mogno *S. macrophylla*, por tempo indeterminado. A falta de alternativas para plantios florestais com espécies de madeira nobre acaba estimulando a exploração predatória do mogno brasileiro.

A maioria dos plantios com espécies nativas tem sido feita com o mogno brasileiro para fins de enriquecimento de florestas, plantações e em sistemas agroflorestais (Maués, 2001). No entanto, o monocultivo do mogno brasileiro (*S. macrophylla* King) já foi avaliado em diversas regiões do Brasil e os resultados de produtividade são quase sempre ruins. Os ataques provocados pela mariposa *Hypsipyla grandella*, conhecida como broca do ponteiro, invariavelmente tornam inviável o plantio da espécie (Lunz et al., 2009).

A broca do ponteiro abre galerias no caule da planta, especialmente no meristema apical, fazendo com que haja um aumento na brotação lateral, diminuindo a altura de fuste e, conseqüentemente, o valor da madeira. Em alguns casos os danos causados pela *H. grandella* podem até causar a mortalidade das árvores. Os ataques iniciam em plantas jovens e atingem, praticamente, todas as árvores, depreciando muito

o valor da madeira. Diversas estratégias têm sido postas em prática como alternativas de controle do lepidóptero, mas até o momento nenhuma é economicamente viável e apresenta êxito completo (Lunz et al., 2009).

Devido à falta de estratégias bem sucedidas de manejo da principal praga do mogno brasileiro (*H. grandella*), tem sido estimulada a introdução e o cultivo de espécies exóticas da família Meliaceae, como o cedro australiano (*Toona ciliata*) e o mogno africano (*Khaya* spp.). A espécie *K. ivorensis* A. Chev. apresenta-se como uma alternativa aos plantios frustrados do mogno brasileiro, já que apresenta resistência a broca do ponteiro e boa adaptação a diversas condições de clima e solo do Brasil (Newton et al., 1993; Maués, 2001; Verzignassi et al., 2009; Pinheiro et al., 2011; Tremacoldi et al., 2013). No oeste e leste da África, no sul e sudeste da Ásia e Austrália as florestas de mognos africanos são atacadas primordialmente pela *Hypsipyla robusta*, que é inexistente nas Américas (Nair, 2007). Porém, é importante que as barreiras sanitárias sejam eficazes para evitar a entrada deste patógeno no continente Americano.

O mogno africano também possui madeira considerada nobre, com alto valor comercial devido a sua elevada durabilidade, facilidade de trabalhar e secar. As cotações de madeira do mogno africano de elevado diâmetro, com alta proporção de cerne, devidamente desdobrada e serrada, podem atingir R\$2.300,00. Outras características que fazem do *K. ivorensis* uma espécie altamente interessante são o fuste retilíneo ausente de ramificações, e a boa produtividade, que pode chegar próximo a 307 m³/ha aos 15 anos de idade dependendo do manejo (Pinheiro et al., 2011). Por essas características, esta tem sido uma das espécies preferidas por reflorestadores no estado do Pará (Falesi & Baena, 1999).

O *K. senegalensis* (Desr.) A. Juss., outra espécie de mogno africano, também merece destaque, principalmente pela sua excelente resistência ao déficit hídrico. No entanto, essa espécie também apresenta algumas características indesejáveis como menor taxa de crescimento, fuste menos reto e mais ramificado quando comparado ao *K. ivorensis* (Pinheiro et al., 2011).

Apesar do mogno *K. ivorensis* apresentar características desejáveis para plantio não há registros de trabalhos de melhoramento genético dessa espécie. As suas sementes são vendidas a um preço considerável e nem sempre possuem boas taxas de germinação (Fagundes, 2013). Esses problemas ocorrem primordialmente devido à recalcitrância das sementes e ao baixo número de matrizes em idade de florescimento.

No Brasil, o melhoramento genético do *K. ivorensis* pode ser uma alternativa interessante para se obter clones de alto desempenho e sementes melhoradas .

2.2 GÊNERO *Khaya*

O gênero *Khaya* pertence à família Meliaceae, que compreende cerca de 51 gêneros com 1.400 espécies. Essa família tem distribuição pantropical, ou seja, está presente em todas as regiões tropicais da África, Ásia e Américas. Estima-se que esta família contenha 550 espécies madeiráveis importantes para a economia florestal no mundo (Gouvêa, 2005; Pinheiro et al., 2011).

Referida família se divide em quatro subfamílias: *Capuronianthoideae*, *Quivisianthoideae*, *Swietenioideae* e *Melioideae*. Os gêneros *Swietenia* e *Khaya*, do mogno brasileiro e africano respectivamente, estão inseridos na subfamília *Swietenioideae*, mais especificamente na tribo *Swietenieae*. Dentre as espécies do gênero *Khaya*, destacam-se a *K. ivorensis*, *K. grandifoliola*, *K. anthoteca* e *K. senegalensis* como grandes produtoras de madeira. Essas quatro espécies são popularmente denominadas mognos africanos, devido a sua ocorrência natural no continente africano (Pinheiro et al., 2011).

Ao redor do mundo as árvores de *K. ivorensis* são conhecidas comercialmente por diferentes nomes: Acajou D'Afrique, na França e Bélgica; African mahogany na Inglaterra e Estados Unidos; *Khaya mahagoni* na Alemanha; Afrikaans mahoganie na Holanda e mogno africano pelos portugueses (Falesi & Baena, 1999).

O *K. ivorensis* é originário da costa ocidental da África (Figura 1). Trata-se de uma espécie florestal de grande importância, não apenas pelo alto valor da sua madeira no comércio internacional, mas também pelos aspectos relativos ao seu crescimento e resistência a algumas pragas que comumente atacam o mogno-brasileiro. Uma das características morfológicas que diferencia o mogno-africano *K. ivorensis* das outras espécies de mogno é a cor avermelhada das folhas mais jovens localizadas no ápice da planta (Figura 2). Essa coloração ocorre devido a concentração de antocianina nas folhas mais próximas ao meristema apical (Falesi & Baena, 1999). No mogno brasileiro, por exemplo, a cor da região apical é esverdeada.



Figura 1. Regiões com ocorrência nativa da espécie *K. ivorensis* A. Chev.: Angola, Camarões, República Central da África, Costa do Marfim, Guiné Equatorial, Gabão, Gana, Guiné, Nigéria e Togo (Fonte: GBIF, 2014).



Figura 2. Folhas avermelhadas no ápice das mudas de *K. ivorensis* no viveiro Mudas Nobres. Foto: Sabrina D. Soares.

Pinheiro et al. (2011) descrevem dados importantes de Barroso (1987) e Lemmens (2008) sobre algumas características do *K. ivorensis*. É uma espécie diploide ($2n = 50$) e monóica. As árvores adultas são, geralmente, de grande porte, podendo chegar a uma altura de 30 a 60 m e diâmetro na altura do peito (DAP) de 2,10 m. Em

geral, o fuste comercial se apresenta livre de ramificações até 30 m de altura, com casca de cor escura a marrom. As folhas são alternas, compostas e paripenadas, agrupadas em espiral próximo ao término dos galhos. Os galhos se apresentam roliços e grossos com coloração acinzentada. As flores são reunidas em inflorescência tipo panícula e são unissexuadas, numerosas e brancas, com perfume adocicado. As flores masculinas e femininas são semelhantes em sua aparência. Os frutos possuem cápsulas fibrosas ou lenhosas que são globosas, de coloração castanha. As cápsulas possuem cinco valvas que quando abertas liberam cerca de 15 sementes. Suas sementes são em forma de disco, achatadas e estreitamente aladas por toda a margem para dispersão anemocórica. De acordo com Pinheiro et al. (2011) são escassos os dados fenológicos relativos à espécie *K. ivorensis*. Na região de Viçosa - Minas Gerais, esta floresce durante o verão e logo em seguida acontece a frutificação, ocorrendo a liberação das sementes na primeira quinzena do mês de Maio.



Figura 3. Características fenotípicas da espécie *K. ivorensis*. A: Sementes achatadas. (Fonte: www.ibflorestas.org.br). B: comparação entre fuste de *S. macrophylla* (direita) e *K. ivorensis* (esquerda). (Fonte: www.mognoafricano.org). C: Coloração avermelhada da madeira de *K. ivorensis* de árvores cortadas aos 18 anos de idade. (Fonte: www.mudasanobres.com.br).

2.3 INTRODUÇÃO DO MOGNO AFRICANO NO BRASIL E PERSPECTIVAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO

As primeiras sementes de *K. ivorensis* foram introduzidas no Brasil no ano de 1976 por um funcionário do governo da Costa do Marfim (África) em visita ao Brasil. As sementes foram doadas ao pesquisador Italo Falesi, que na época era diretor do então Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Norte (IPEAN) localizado no estado do Pará. Posteriormente, esse instituto passou a ser Embrapa Amazônia Oriental. A partir destas sementes foram originadas cinco árvores. Uma das árvores foi cortada para estudar as características da madeira. Assim, atualmente existem quatro árvores em idade reprodutiva no local.

A maioria dos produtores de mogno africano do Brasil está no estado do Pará e abasteceram suas florestas com sementes provenientes dessas quatro árvores (Falesi & Baena, 1999). Essa constatação traz preocupação em relação a uma possível baixa diversidade genética dos plantios de mogno-africano do país. A existência de baixa diversidade genética pode representar um risco para a sustentabilidade desses plantios frente a um cenário de mudanças climáticas e a possível introdução de insetos-praga e patógenos.

Outros plantios estabelecidos provêm de sementes de populações nativas de algumas regiões da África Ocidental (Lemmens, 2008; Pinheiro et al., 2011). Um exemplo é o plantio localizado na fazenda de Norton Amador Costa (ex-pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental) Nesta, há plantios de mogno de sementes obtidas da Costa do Marfim e da Tanzânia. Esses plantios estão com 15 anos e há comercialização de sementes. No entanto, a procedência exata dessas sementes é desconhecida. Com isso, não se sabe o número de matrizes em que as sementes foram coletadas ou se foram coletadas em florestas naturais ou plantadas.

Como as florestas de mogno africano implantadas no país são todas para fins de produção de madeira, e não para pesquisa, é compreensível a falta de detalhamento da procedência de origem dessas florestas. Porém, para a formação de uma população-base de melhoramento é muito importante conhecer a procedência das sementes no sentido de maximizar a variabilidade genética e de identificar possíveis grupos heteróticos, caso haja estruturação genética entre as populações de origem. Entre as características definidas para a seleção de árvores geneticamente superiores

destacam-se as características de crescimento (volume) e qualidade da madeira, bem como a forma do fuste e resistência à doenças (Oda et al., 2007; Gomes, 2010).

São escassos trabalhos científicos publicados com a espécie de *K. ivorensis* conforme anteriormente comentado. No Brasil, foram publicadas pesquisas relacionadas à propagação vegetativa (Fagundes, 2013), propriedades físicas e mecânicas da madeira (Silva, 2013), análise da viabilidade técnica e econômico-financeiro para implantação da cultura (Gomes, 2010), ecofisiologia da planta (Albuquerque et al., 2013), suscetibilidade a mancha-alvo (Verzignassi et al., 2009), utilização da árvore em sistemas silvipastoril (Falesi & Baena, 1999; Castro et al., 2008). Em termos de melhoramento, ainda não há nenhum trabalho de melhoramento genético consolidado para as espécies de *Khaya* no país. No âmbito mundial, o único programa de melhoramento para o gênero ocorre na Austrália com o *K. senegalensis* (Nikles et al., 2008).

O estudo da distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações naturais de mogno, ou de qualquer espécie, é fundamental para definir estratégias de conservação, inferir o quanto a exploração madeireira pode afetar os níveis de diversidade genética. Além disso, o conhecimento dos níveis de diversidade e estrutura genética possibilita o desenvolvimento de pesquisas integradas para a conservação e melhoramento genético das espécies (Chalmers et al., 1994; White et al., 1999; Cruz et al., 2011; Lemes et al., 2011).

A partir das técnicas de melhoramento, aliadas à experimentação e estudos de genética quantitativa é possível selecionar indivíduos com genótipos superiores para a formação de florestas mais produtivas. Em espécies com técnicas de propagação vegetativa estabelecidas, como é o caso do mogno africano, a clonagem de genótipos superiores acelera a taxa de ganho genético. O aumento da eficácia e a diminuição do tempo dos ciclos de melhoramento são importantes principalmente em espécies florestais, que são culturas com longos ciclos reprodutivos (Nass et al., 2001; Grattapaglia, 2007).

2.4 USO DE MARCADORES MOLECULARES EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO

Tradicionalmente, a caracterização da variabilidade pode ser feita através da observação de características morfológicas denominados marcadores morfológicos. Porém, tais características são difíceis de serem avaliadas, pois podem ser expressas somente em fases específicas da ontogenia da planta, além de muitas vezes se alterarem de acordo com o ambiente (plasticidade). Com o advento dos marcadores bioquímicos, como as isoenzimas e dos marcadores moleculares ao nível de DNA, diversas estratégias tem sido desenvolvidas para avaliar a diversidade genética das espécies. Tais marcadores possibilitaram avanços nas pesquisas em genética e biologia molecular de plantas por permitir a detecção da variabilidade genética existente (Golle et al., 2009; Cruz et al., 2011). A utilização de marcadores moleculares em espécies florestais é feita desde os anos 80.

Uma das premissas básicas para obtenção de ganho genético, durante o processo de melhoramento, é a existência e manutenção da diversidade genética ao longo dos ciclos de seleção. Desta maneira, os marcadores moleculares atuam como ferramentas importantes para o monitoramento da variabilidade genética existente nas coleções de germoplasma e populações de melhoramento. Além disso, os marcadores também são ferramentas úteis para a proteção varietal, o controle de qualidade de cruzamentos, estimativa do grau de parentesco entre cultivares e acessos em bancos de germoplasma, no mapeamento genético de caracteres importantes, como resistência a insetos-praga e doenças dentre outras (Mori, 1993; Nass et al., 2001; Grattapaglia, 2007). É ampla a quantidade de marcadores moleculares utilizados em estudos de genética de populações, conservação e melhoramento de plantas e de animais (Nass et al., 2001; Zucchi, 2002; Faleiro, 2007; Melo, 2012).

Uma das ferramentas moleculares em destaque é a utilização de marcadores microsatélites conhecidos também sequências simples repetitivas (SSRs). No genoma de eucariotos são encontradas em várias regiões sequências repetidas complexas e outras mais simples (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os locos microsatélites são um tipo sequências simples, dispostas no DNA como repetições de um a seis nucleotídeos lado a lado (em *tandem*). Essas sequências repetidas são encontradas amplamente em todo o genoma, incluindo regiões gênicas. Tais regiões repetitivas podem ser

amplificadas pela reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando iniciadores (*primers*) que flanqueiam a região microssatélite. As regiões microssatélites são altamente mutáveis, devido a erros incorridos pela DNA polimerase durante a replicação dessas regiões. Com isso, esses locos tendem a ser altamente polimórficos entre indivíduos, sendo dessa maneira utilizados como marcadores genéticos (Tautz & Renz, 1984; Morgante et al., 2002; Martin et al., 2010; Hoshino et al., 2012).

Diversas são as vantagens dos marcadores microssatélites em relação a outras classes de marcadores. Destacam-se por serem codominantes, ou seja, permitem a distinção entre genótipos homocigotos e heterocigotos; apresentam alto polimorfismo; são multi-alelicos, ou seja, diversos alelos podem ser detectados em cada loco analisado e assim diferenciar com clareza e precisão até mesmo indivíduos geneticamente próximos e podem ser utilizados em sistemas “multiplex” através de sequenciador automático, onde mais de um par de *primer* específico é colocado simultaneamente na mesma reação de PCR. As reações multiplex são possíveis devido à marcação fluorescente presente em um dos *primers* de cada par. Além disso, possuem alta reprodutibilidade entre laboratórios, bem como alta transferibilidade, ou seja, *primers* desenvolvidos para uma espécie podem ser utilizados para indivíduos da mesma espécie ou de espécies geneticamente relacionadas, como por exemplo, espécies que pertencem ao mesmo gênero ou gêneros relacionados (Brondani et al., 1998; Collevatti et al., 1999; Grattapaglia, 2007; Faleiro, 2007; Cruz et al., 2011; Cosson et al., 2014).

Em estudos de espécies florestais de grande importância econômica existem diversos *primers* desenvolvidos como para espécies de *Eucalyptus* (Brondani et al., 1998; Steane et al., 2001; Brondani et al., 2002; Brondani et al., 2006) e *Pinus* (Ecth & May-Marquardt, 1997; Elsik et al., 2000). Por outro lado, é restrito o número de marcadores microssatélites descritos para as espécies de mogno do gênero *Swietenia* (White & Powell, 1997; Lemes et al., 2002) e *Khaya* (Sexton et al., 2010; Lemes et al., 2011; Karan et al., 2012).

2.5 DIVERSIDADE GENÉTICA APLICADA AO MELHORAMENTO FLORESTAL

Os marcadores microssatélites atuam como grandes ferramentas para avaliar magnitude e distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações, sejam elas naturais ou de melhoramento (Nass et al., 2001; Grattapaglia, 2007; Borém &

Miranda, 2013). É importante destacar que os resultados fornecidos pelos marcadores moleculares, geralmente neutros, não estão associados ao potencial ou ao desempenho dos indivíduos da população para as características de interesse econômico. Isso se deve ao número reduzido de marcadores geralmente utilizados nas avaliações de diversidade genética. Vale ressaltar que as informações obtidas se restringem aos aspectos de ancestralidade, heterozigiosidade observada e divergência genética ou genômica entre os indivíduos estudados (Grattapaglia, 2007). Essas informações são muito úteis no monitoramento e gerenciamento da variabilidade genética das populações, sejam elas naturais ou de melhoramento.

Vários marcadores, incluindo os SSRs, foram utilizados para estudos de diversidade e estrutura genética de populações de melhoramento, como em *Pinus* (Furlan et al., 2007) e eucalipto (Alves et al., 2009). Sem diversidade genética as espécies não conseguem evoluir e se adaptar às mudanças ambientais (Templeton, 2006). Para fins de melhoramento, a diversidade genética em características de interesse é a base que garante ganhos com os ciclos de seleção. O estudo da diversidade em características de interesse possibilita a identificação de genitores adequados que resultarão em híbridos mais heterozigotos, com um maior efeito heterótico e proporcionando maior segregação e variabilidade genética em cruzamentos futuros (Cruz et al., 2011; Borém & Miranda, 2013; Suteu et al., 2013).

Através de métodos preditivos, ou seja, através de diferenças morfológicas, fisiológicas e moleculares, é possível estimar medidas de dissimilaridade. Tais medidas podem ser utilizadas estatisticamente para predição do grau de divergência genética existente na população através de parâmetros, como a medida de distância genética. Essas informações permitem com que os genótipos analisados em uma população, sejam identificados como próximos ou distantes geneticamente, possibilitando em um futuro programa de melhoramento a escolha de cruzamentos com genótipos mais divergentes (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Oliveira et al., 2000; Cruz et al., 2011). Estudos feitos com espécies florestais, como o eucalipto (Xavier et al., 1996; Scapim et al., 1999; Alves et al., 2009; Souza et al., 2010), utilizaram a divergência genética para a escolha de genitores em programas de melhoramento florestal. Além disso, outros estudos feitos em batata-doce (Oliveira et al., 2000), milho (Flint-Garcia et al., 2009; Suteu et al., 2013) e feijão (Ribeiro et al., 2001; Elias et al., 2007) também recorreram a este parâmetro para o desenvolvimento de cultivares melhoradas. Segundo Falconer

(1987) um nível elevado de variabilidade genética em uma população segregante é função da divergência genética entre os parentais envolvidos nos cruzamentos.

O fato de dois genitores serem próximos geneticamente pode significar que estes indivíduos possuem ou compartilham alelos em comum. Caso ocorra um cruzamento entre estes indivíduos pode ocorrer uma baixa do vigor, devido à depressão por endogamia. Ao contrário, quando acontecem cruzamentos com indivíduos geneticamente distantes o resultado pode ser um aumento de vigor, ou seja, uma maior manifestação da heterose. A heterose representa o aumento de vigor, da altura de planta, da produtividade e de outros fenômenos fisiológicos que são gerados pelo cruzamento de indivíduos divergentes (Borém & Miranda, 2013). Isso significa que a heterose reflete a superioridade do indivíduo híbrido em relação aos seus genitores (Santos et al., 1988; Borém & Miranda, 2013).

O termo heterose foi proposto por Shull no século XX e consigo surgiram três hipóteses (teorias) em busca de desvendar o seu mecanismo genético. Entre elas estão a hipótese da dominância, da sobredominância e a epistasia. A primeira, conhecida como hipótese de dominância, tem como pressuposto que a maioria dos efeitos não desejáveis são causados por alelos recessivos, ou seja, os alelos dominantes são que determinam o aparecimento dos efeitos favoráveis para o indivíduo. A heterose, nesse caso, é devido à ação complementar de alelos dominantes que estão na maioria dos locos. De acordo com a segunda hipótese, conhecida como de sobredominância, o heterozigoto tem um maior vigor do que qualquer condição homozigota, supondo que a presença de alelos divergentes em cada loco resultaria em um desempenho superior à daqueles que apresentaram um único tipo alélico em cada loco. Ou seja, cada alelo possuiria funções distintas e a condição heterozigota seria favorável em relação à homozigota. As hipóteses de dominância e sobredominância sugerem que o efeito da endogamia causa uma queda do vigor, enquanto que com os cruzamentos o vigor híbrido pode ser recuperado. A terceira hipótese, conhecida como de epistasia, admite que em alguns cruzamentos ocorrem interações entre alelos de genes diferentes (epistasia) que afetam o mesmo fenótipo, culminando na expressão da heterose (Nass et al., 2001; Borém & Miranda, 2013).

Independente da hipótese é importante ressaltar que a seleção de genitores geneticamente divergentes para futuros cruzamentos deve principalmente levar em consideração o desempenho desses quanto às características de interesse econômico

(Xavier et al., 1996; Martins et al., 2002; Ghaderi et al., 1984; Cruz et al., 2011). O cruzamento entre parentais superiores e divergentes geneticamente é muito importante em um programa de melhoramento, dado que essas espécies sofrem muito com a depressão endogâmica (Kageyama, 1981; Gouvêa, 2009).

Entre as causas da depressão por endogamia está o cruzamento de indivíduos geneticamente próximos. As consequências desses cruzamentos são o aumento na frequência de indivíduos com genótipos homozigotos e uma redução da heterozigosidade. Em plantas alógamas, a depressão por endogamia é explicada pela expressão de alelos deletérios recessivos que possuem maior chance de ficarem em homozigose com os cruzamentos endogâmicos. Desse modo, quando há o cruzamento entre indivíduos aparentados, geralmente, o resultado é uma prole com reduzido valor fenotípico devido aos efeitos deletérios desses alelos. Várias são características afetadas pela endogamia, por exemplo, aquelas relacionadas à sobrevivência e ao crescimento da planta, tais como uma redução nas eficiências bioquímicas e fisiológicas de processos metabólicos basais como fotossíntese e respiração. Com isso, pode ocorrer uma redução da viabilidade do embrião, da sobrevivência das mudas, do vigor das árvores e da produção de sementes (Kageyama, 1981; White et al., 1999).

No caso de marcadores codominantes como os SSR as medidas de dissimilaridade (distância genética) são feitas a partir das frequências alélicas ou genotípicas. O cálculo é realizado sobre os locos individuais, sendo a distância final representada pela média das distâncias de cada loco (Sigrist, 2009). A estimativa de distância genética conota o grau de divergência genética entre os indivíduos ou populações par a par, sendo o produto final uma matriz de distâncias estimadas. A menor distância genética calculada entre indivíduos ou populações pode ser definida pelo valor zero (0), ou seja, os indivíduos e/ou populações não possuem diferenças significativas e, portanto, são idênticos ou muito próximos geneticamente. Enquanto que o maior o valor da distância, é dado pelo valor de um (1), ou seja, as populações e/ou indivíduos não possuem alelos em comum, sendo dessa maneira completamente distintos (Weir, 1996).

O coeficiente de Rogers (1972), modificado por Wright (1978), é bastante utilizado como uma medida de dissimilaridade na caracterização dos acessos de uma população de melhoramento. Trata-se de uma medida de distância Euclidiana onde não é conotado processo evolutivo como migração, seleção, mutação e deriva.

A identificação de grupos, a partir da matriz de distâncias genéticas não é fácil. A simples análise visual dos dados em matrizes de distância não permite a identificação de grupos de genótipos mais similares, principalmente, quando a matriz é muito extensa. Por isso, a aplicação de técnicas multivariadas como a análise de componentes principais e a análise de agrupamento é bastante útil. Com a aplicação dessas técnicas é possível visualizar a distância entre os genótipos (ou populações) por meio de gráficos de coordenadas principais ou de dendrogramas, no caso das análises de agrupamento, facilitando a identificação de grupos com indivíduos menos divergentes (Evanno et al., 2005; Cruz et al., 2011).

Entre os métodos de agrupamento mais utilizados em programas de melhoramento estão os métodos de agrupamento hierárquicos e os métodos de otimização. Nos métodos hierárquicos, os indivíduos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis até que se obtenha o agrupamento de todos os indivíduos. Ao final, as distâncias entre os diferentes indivíduos e grupos de indivíduos são representadas em um dendrograma. Entre os métodos hierárquicos utilizados com maior frequência destaca-se o método da ligação média não ponderada (UPGMA – *Unweighted pair-group method using arithmetic averages*). O UPGMA utiliza as médias aritméticas não ponderadas das medidas de dissimilaridade, evitando caracterizar a dissimilaridade por valores extremos entre os genótipos que estão sendo considerados. Como os métodos de agrupamento geram resultados que são uma aproximação da matriz de dissimilaridade, pode ocorrer a formação de grupos não confiáveis. Diante disso, pode-se avaliar a concordância entre a matriz e o dendrograma que foi gerado a partir do coeficiente de correlação cofenética (Cruz & Regazzi, 2001; Templeton, 2006; Cruz et al., 2011). Segundo Sokal & Rolf (1962) uma das características que favorece a utilização do método UPGMA é maximização da correlação cofenética. Quanto maior o valor obtido pelo coeficiente de correlação cofenética, melhor é a concordância entre a matriz de distâncias originais e as distâncias representadas no dendrograma. Além disso, outra forma de conferir a qualidade dos grupos representados no dendrograma é através da estimativa da consistência dos seus nós (ou ramificações) por meio da reamostragem ou *bootstrapping*. Essa técnica se baseia na reamostragem com reposição das variáveis no conjunto de dados originais para avaliar o número de vezes que cada grupo foi formado, dentre as diversas reamostragens realizadas (Cruz et al., 2011).

2.6 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

Uma população é definida pelo conjunto de indivíduos da mesma espécie, que convivem em um determinado ambiente e que podem se intercruzar. Dessa maneira, o conceito envolve um componente genético caracterizado pelos indivíduos da mesma espécie e um espacial que se refere ao ambiente onde estão inseridos. Normalmente, os indivíduos não são distribuídos uniformemente no ambiente em que vivem. Além disso, nem sempre indivíduos isolados no espaço deixam de estabelecer fluxo alélico entre si, o que dificulta a delimitação das populações. Logo, a avaliação da estrutura genética das populações visa reconhecer heterogeneidades na distribuição das frequências alélicas e genotípicas, ao longo do espaço, para possibilitar a delimitação de grupos de indivíduos que possivelmente estão se intercrucando com grande frequência (Robinson, 1998; Hartl & Clarck, 2010; Cruz et al., 2011).

Com o advento dos marcadores moleculares se tornou possível quantificar a diversidade genética e inferir como esta se distribui entre e dentro de populações, definindo assim sua estrutura. Entre os parâmetros utilizados para caracterização da diversidade genética estão o número médio de alelos por loco polimórfico, a heterozigosidade esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg (diversidade gênica de Nei), a heterozigosidade observada e o índice de fixação (Robinson, 1998; Zucchi, 2002; Gandara, 2009; Cruz et al., 2011). A frequência dos heterozigotos é uma medida simples e bastante importante, pois quanto maior o número de alelos e mais uniforme são suas frequências, maior é a variabilidade genética e maior tende a ser a frequência dos heterozigotos. A frequência de heterozigotos é estimada para cada loco individualmente, obtendo-se a média para os vários locos como um estimador da diversidade genética (White et al., 1999; Weir, 1996). Em geral, espécies arbóreas tropicais concentram a maior parte da variação genética dentro de suas populações e diversos são os fatores que contribuem para essa baixa estrutura genética entre populações. O porte arbóreo dessas espécies contribui para uma eficiente dispersão de pólen e sementes. A longevidade das espécies perenes diminui a taxa de perda de alelos por deriva genética. Por fim, a distribuição geográfica é geralmente mais ampla nessas espécies, quando comparadas às espécies herbáceas anuais, o que também diminui a perda de alelos por deriva genética, aumentando a variabilidade genética

dentro de populações ao mesmo tempo em que diminui a estruturação genética (Loveless & Hamrick, 1984; Collevatti et al., 2001; Gandara, 2009).

Dentre as metodologias para caracterização da estrutura genética das populações e de populações subdivididas destacam-se a estatística F de Wright (1951), a análise da diversidade genética em populações subdivididas (Nei, 1977) e os coeficientes de ancestralidade de Cockerham (análise da variância das frequências gênicas) que são análogos ao modelo de Wright (Cockerham, 1969; Weir, 1996). Tais abordagens estimam a distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações, são semelhantes quanto à base genética e são complementares quanto ao significado da estimativa (Nagylaki, 1998; Robinson, 1998).

A abordagem de Wright tende a quantificar os níveis de diferenciação genética devido aos efeitos do endocruzamento (endogamia) de acordo com a subdivisão populacional, sendo conhecido como índices de fixação. Wright definiu como parâmetro o coeficiente F , que foi acrescido de subscritos para demonstrar a endogamia em níveis hierárquicos de subdivisão. De acordo com o autor, as estatísticas F permitem avaliar os níveis médios de endogamia ao nível populacional (F_{IS}) e total (F_{IT}) e a distribuição da variabilidade genética entre as populações (F_{ST}). Diversas metodologias foram propostas para as estatísticas F para corrigir os efeitos de amostragem devido ao número de subpopulações e à quantidade de indivíduos que constituem as mesmas. Em função disso, Cockerham (1973) redefiniu as estatísticas F relacionando o coeficiente de endogamia e o de coancestralidade, em que $F_{IT} = F$, $F_{ST} = \theta$ e $F_{IS} = f$ (Hartl & Clark, 2010; Cruz et al., 2011).

Os índices de fixação são parâmetros essenciais para conhecer a estrutura genética das subpopulações. De acordo com Wright (1951) e Robinson (1998) considerando uma população com um nível hierárquico de subdivisão (subpopulações) pode-se estimar os coeficientes de endogamia como F_{IT} , F_{ST} e F_{IS} . Onde:

F_{IT} ou F calcula o desvio das frequências genotípicas da população em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esses desvios estão relacionados a cruzamentos não ao acaso dentro da população, incluindo a endogamia em todos os níveis, seja por autofecundação ou por cruzamentos entre indivíduos aparentados.

F_{ST} ou θ é o coeficiente de ancestralidade, trata-se de um parâmetro que indica o grau de diferenciação genética entre as populações e a correlação dos alelos dentro de indivíduos em uma mesma população.

F_{IS} ou f representa a fixação em nível de indivíduos, ou seja, mede a probabilidade de que os dois alelos de um loco presentes no mesmo indivíduo sejam idênticos por descendência. Assim, f é uma medida de correlação de gametas, devido à endogamia dentro das subpopulações.

A redução de heterozigosidade em uma população panmítica pode ser medida através do coeficiente de endogamia (f). Em uma população em que não existe endogamia o valor de f não difere significativamente de 0. Isso significa que os cruzamentos ocorrem ao acaso (panmixia) e as frequências alélicas e genotípicas estão de acordo com o que é esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Quando existe endogamia total a população obterá valor de f igual a 1, ou seja, todos os alelos da população encontram-se em homozigose nos diferentes indivíduos (Templeton, 2006; Hartl & Clark, 2010; Melo, 2012)

O valor de F_{ST} pode variar de zero a um. Quanto mais baixo for o valor da estimativa pode-se dizer que a frequência dos alelos nas diferentes subpopulações é aproximadamente a mesma. Por outro lado, quanto maior o valor F_{ST} , mais diferentes serão as frequências alélicas nas diferentes subpopulações. Ou seja, $F_{ST} = 1$ ocorre quando as subpopulações possuem alelos distintos entre elas. Quando F_{ST} for igual a zero, pode-se dizer que as subpopulações possuem frequências alélicas similares demonstrando a inexistência de diferenciação ou estruturação genética entre elas (Melo, 2012). A interpretação biológica das estimativas de F_{ST} foi definida por Wright (1978) e apresentado da seguinte maneira por Hartl & Clarck (2010):

- F_{ST} variando de 0 a 0,05 indica pequena diferenciação genética;
- F_{ST} variando de 0,05 a 0,15 indica moderada diferenciação genética;
- F_{ST} variando de 0,15 a 0,25 indica grande diferenciação genética, e
- F_{ST} com valor acima de 0,25 representa uma diferenciação genética muito grande.

Além das medidas de diversidade genética, distância e estrutura populacional (estatísticas F) informações adicionais podem ser inferidas através de estatísticas que utilizam a abordagem Bayesiana para complementar informações sobre a estrutura genética de populações (Evanno et al., 2005). Essa análise pode ser utilizada como ferramenta para conservação de espécies ameaçadas de extinção, alvo de contrabando e biopirataria e em programas de melhoramento genético (Manel et al., 2003; Correia, 2011). O pesquisador pode inferir através das frequências alélicas dos

indivíduos, a partir de dados multilocos, a probabilidade de cada genótipo pertencer a uma determinada população. Dessa forma, os genótipos podem ser caracterizados de acordo com sua origem, considerando que o método Bayesiano de alocação dos indivíduos pressupõe que todas as populações originais estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e de ligação (Pritchard et al., 2000).

Essa abordagem é vantajosa em estudos onde se desconhece a origem do material, como em populações base de melhoramento, coleções ou bancos de germoplasma onde com frequência a fonte dos materiais não é conhecida ou confiável. Como a análise não estabelece populações *a priori*, a determinação das populações e de seus componentes ocorre de acordo com as informações dos genótipos dos indivíduos obtidos em diversos locos. Diversas são as aplicações para esse método e entre elas destacam-se a possibilidade de inferir a estrutura genética da população, a identificação de populações distintas geneticamente, a atribuição de indivíduos a populações desconhecidas, alocação de proporções genômicas em populações híbridas e a identificação de indivíduos migrantes e miscigenados nas populações em estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORIGEM E COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O presente trabalho é parte de uma parceria entre a Universidade Federal de Goiás (UFG) e a empresa Mudas Nobres, situada em Goiânia-GO. Através dessa parceria, a UFG vem desenvolvendo pesquisas para estabelecer um programa de melhoramento genético e melhorar o manejo *K. ivorensis* plantado no país.

No âmbito do melhoramento genético da espécie, as pesquisas foram iniciadas com a seleção massal de 53 árvores localizadas em duas fazendas do Estado do Pará. A seleção se baseou nos fenótipos diretamente relacionados à produtividade da madeira: altura e diâmetro na altura do peito (DAP). A seleção foi feita de maneira criteriosa procurando descartar árvores que se beneficiaram da mortalidade de árvores vizinhas.

A primeira seleção foi realizada na Fazenda de Norton Amador Costa, localizada no Pará, que possui mais de 1.500 árvores provenientes de sementes coletadas na África, especificamente de populações da Costa do Marfim e da Tanzânia. Como essas árvores potencialmente vieram do centro de origem da espécie, pelo menos no caso das procedentes da Costa do Marfim, elas podem ser um excelente recurso genético para o melhoramento da espécie. A segunda seleção foi realizada na Fazenda de Hiroshi Okajima, também localizada no Pará, que possui árvores geradas a partir de sementes coletadas das cinco primeiras árvores de *K. ivorensis*, localizadas na Embrapa Amazônia Oriental, que introduziram a espécie no país. Essas cinco árvores foram plantadas há 37 anos e ainda encontram-se na Embrapa Amazônia Oriental. No total foram coletados materiais vegetais (borbulhas) de 53 árvores superiores, sendo 33 árvores da Fazenda do Sr. Norton e 20 da Fazenda do Sr. Okajima. As borbulhas foram enxertadas para transporte e posterior multiplicação do material selecionado no viveiro Mudas Nobres, em Goiânia.

A Tabela 1 contém a identificação, procedência, idade e os dados de altura e DAP das 53 árvores de *K. ivorensis* constituintes da população-base de melhoramento.

Tabela 1. Altura, diâmetro à altura do peito (DAP), população de procedência e idade das árvores 53 árvores selecionadas de *K. ivorensis*.

Indivíduos**	Altura de fuste (m)	DAP (cm)	População	Idade na seleção (anos)
01i	07,48	30,9	Fazenda Okajima	16
02i	10,01	38	Fazenda Okajima	16
04i	10,00	26	Fazenda Okajima	16
06i	11,80	-	Fazenda Okajima	16
07i	10,50	29	Fazenda Okajima	16
08i	10,70	28	Fazenda Okajima	16
09i	09,90	41	Fazenda Okajima	16
10i	11,20	41	Fazenda Okajima	16
11i	11,70	34	Fazenda Okajima	16
12i	10,50	36	Fazenda Okajima	16
13i	10,20	39	Fazenda Okajima	16
14i	11,50	33	Fazenda Okajima	16
16i	11,50	39	Fazenda Okajima	16
17i	11,00	35	Fazenda Okajima	16
18i	13,00	33	Fazenda Okajima	16
23i	09,70	36	Fazenda Okajima	16
24oka	-	-	Fazenda Okajima	18
25oka	-	-	Fazenda Okajima	18
26oka	-	-	Fazenda Okajima	18
27oka	-	-	Fazenda Okajima	18
01n	07,54	60,47	Fazenda Norton_Tz*	12
02n	10,35	59,64	Fazenda Norton_Tz	12
03n	10,74	57,30	Fazenda Norton_Tz	12
04n	11,26	68,75	Fazenda Norton_Tz	12
07n	10,33	66,84	Fazenda Norton_Tz	12
08n	10,56	47,73	Fazenda Norton_Tz	12
10n	10,56	57,30	Fazenda Norton_Tz	12
11n	08,93	64,62	Fazenda Norton_Tz	12
12n	08,53	63,03	Fazenda Norton_Tz	12
13n	09,16	54,11	Fazenda Norton_Tz	12
14n	08,46	60,47	Fazenda Norton_Tz	12
17n	10,24	66,21	Fazenda Norton_Tz	12
19n	10,29	57,93	Fazenda Norton_Tz	12
20n	11,90	63,66	Fazenda Norton_Tz	12
21n	10,74	58,57	Fazenda Norton_Tz	12
23n	12,57	55,39	Fazenda Norton_Tz	12
24n	08,18	63,66	Fazenda Norton_Tz	12
25n	10,14	59,52	Fazenda Norton_Tz	12
26n	09,81	58,71	Fazenda Norton_Tz	12
28n	11,82	61,43	Fazenda Norton_Tz	12
30n	09,90	57,30	Fazenda Norton_Tz	12
31n	11,96	66,84	Fazenda Norton_CM*	12
32n	08,66	65,57	Fazenda Norton_CM	12
33n	09,83	57,29	Fazenda Norton_CM	12
34n	09,91	59,84	Fazenda Norton_CM	12
36n	08,87	60,47	Fazenda Norton_CM	12
39n	08,36	64,93	Fazenda Norton_CM	12
44n	10,80	63,66	Fazenda Norton_CM	12
45n	11,28	65,57	Fazenda Norton_CM	12
46n	-	-	Fazenda Norton_CM	12
47n	10,69	59,20	Fazenda Norton_CM	12
49n	11,13	58,57	Fazenda Norton_CM	12
51n	12,76	57,30	Fazenda Norton_CM	12

*Árvores oriundas de sementes da Tanzânia (Tz) e Costa do Marfim (CM). ** Identificação para as amostras coletadas na fazenda do Sr. Okajima (i e oka) e na fazenda do Sr. Norton (n).

As análises moleculares também foram conduzidas com um grupo constituído de 12 árvores de *K. senegalensis* provenientes do viveiro Mudas Nobres. Esses genótipos serviram como grupo externo nas análises de estrutura e distância genética para comparação com as árvores de *K. ivorensis*.

Foram coletadas amostras foliares das 53 árvores adultas selecionadas. Em campo, as folhas foram imediatamente embaladas e acondicionadas em gelo, a fim de conservar a integridade do seu DNA até a chegada ao freezer (-80°C) do Laboratório de Genética e Genômica de Plantas da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (EA/UFG).

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para extração do DNA genômico do tecido foliar das 53 árvores selecionadas foi utilizado o protocolo de extração descrito por Doyle & Doyle (1990) adaptado por Ferreira & Grattapaglia (1998).

Foram adicionados aproximadamente 50mg de tecido foliar fresco em tubos Eppendorf de 1,5 ml. As amostras foram maceradas em presença de nitrogênio líquido. Após a maceração, foi adicionado tampão de extração CTAB 2% contendo 2 µL de β-mercaptaetanol para cada ml de tampão de extração, previamente aquecido. Os tubos contendo a amostra macerada e o tampão foram mantidos em banho-maria a 60-65°C por 30 minutos, sendo invertidos a cada 10 minutos. Após retirada dos tubos do banho-maria acrescentou-se 600 µL de CIA (clorofórmio-alcool isoamílico 24:1). Os tubos foram agitados por cinco minutos e centrifugados por cinco minutos a 12.000 rpm. A fase superior, originada após centrifugação, foi transferida para outros tubos novos de 1,5ml, adicionando-se ~50 µL de solução CTAB 10%, 1,4 M NaCl e homogeneizando os tubos por cinco minutos. Em uma segunda extração adicionou-se 600 µL mL de CIA, agitando, centrifugando e transferindo o sobrenadante como na primeira extração. Ao sobrenadante adicionou-se ~400 µL de isopropanol frio (-20°C) e inverteu-se os tubos delicadamente para precipitação dos ácidos nucleicos. As amostras foram então colocadas no freezer (-20°) por uma hora.

Após precipitação do DNA, os tubos foram centrifugados a 7.500 rpm durante 5 minutos para formação de um pellet. Após centrifugação foram descartados os sobrenadantes das amostras, tomando cuidado para não descartar os *pellets* formados.

Estes foram lavados duas vezes com 1 ml de etanol (70%), ficando imersos por 5 minutos quando a solução foi descartada. Ao final, realizou-se uma última lavagem com 1 mL de etanol absoluto (95%) durante 3 minutos. O etanol foi removido e os pellets foram secados em temperatura ambiente. Para ressuspensão do DNA foi adicionado ao tubo contendo o pellet ~80 μ L de solução TE (100Mm Tris-HCl pH 8,0 + 10Mm EDTA pH 8,0). As amostras de DNA extraídas foram acondicionadas em geladeira.

Para as amostras que apresentaram pellets escuros (cor marrom), após a secagem em temperatura ambiente, foi realizado ainda uma lavagem com 500 μ L de solução NaCl 1M, deixando os tubos em banho-maria a 65°C por 20 minutos. Os pellets foram ressuspensos na solução de NaCl e então os microtubos foram centrifugados a 7.500 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes originados foram transferidos para novos tubos de 1,5ml, onde adicionou-se 340 μ L de isopropanol, homogeneizando bem os tubos por cinco minutos. Os microtubos foram então mantidos em *freezer* por uma hora. Decorrido o tempo, repetiu-se a etapa de precipitação, secagem e ressuspensão do DNA em TE.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A qualidade do DNA genômico extraído foi avaliada no aparelho Nanodrop (Thermo Scientific). A razão entre as absorbâncias A260/A280 estipulada foi de 1,7 e 2,0 para garantir a qualidade do DNA, evitando contaminações excessivas com compostos proteicos e polissacarídeos. A quantificação das amostras foi feita por marcador de peso molecular conhecido como λ (Invitrogen™), em gel de agarose 0,8% com 10 μ L de brometo de etídeo para 300 mL de gel. Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 6ng/ μ L e avaliadas novamente no Nanodrop e em géis de agarose.

3.4 SELEÇÃO E TRIAGEM DOS LOCOS MICROSSATÉLITES

Uma busca na literatura revelou a inexistência de *primers* microssatélites desenvolvidos para *K. ivorensis*. No entanto, para a congênera *K. senegalensis* foram encontrados dois trabalhos, sendo 13 (Sexton et al., 2010) e 11 (Karan et al., 2012) sequências de pares de *primers* microssatélites (SSRs). Como já havia sido demonstrado

uma alta transferabilidade dos marcadores microssatélites entre os gêneros *Swietenia* e *Khaya* (Lemes et al., 2011), presumiu-se que os *primers* de *K. senegalensis* funcionariam com eficiência em *K. ivorensis*. Esses 24 pares de *primers* foram sintetizados e enviados ao Laboratório de Genética e Genômica de Plantas. Esses 24 locos foram submetidos a uma triagem inicial para avaliar, em gel de agarose 3%, a sua amplificação com seis amostras de DNA de seis árvores de *K. ivorensis* selecionadas. Para triagem foram realizadas reações de PCR com concentração final de 10 μ L contendo 3,0 μ L de DNA (3 ng/ μ L); 0,6 μ L de *primer* não marcado com fluorescência (2,5 picomoles/ μ L); 1 unidade de DNA Taq polimerase (5U/uL); 0,8uL de MgCl (50mM); 1,3 uL de Tampão (10x); 1,3 uL de BSA (25mg/mL); 1,3 uL de dNTP's (25mM) e água q.s.p. As reações foram testadas tanto em sistema *touchdown* como em programa com a temperatura ótima de anelamento (50° ou 55°, dependendo do loco). Os resultados de amplificação foram superiores com a temperatura de anelamento ótima e esse programa de termociclagem segue descrito na próxima seção (3.5). Dos 24 locos SSRs avaliados nessa triagem, 21 amplificaram bandas que foram visualizadas no gel de agarose 3%. Desses 21 locos SSRs, 19 foram marcados com uma das fluorescências 6-FAM (7 locos), HEX (7 locos) e NED-Replacement (5 locos) para permitir a genotipagem semi-automatizada dos locos na plataforma ABI-3100 (Applied Biosystems).

3.5 AMPLIFICAÇÃO DOS LOCOS MICROSSATÉLITES

Os 19 locos marcados foram novamente submetidos a uma triagem com seis amostras de DNA. Desta vez, como os locos estavam marcados com fluorocromos, a amplificação foi avaliada na plataforma ABI-3100. A partir dessa triagem foram selecionados oito locos polimórficos (Tabela 2) para genotipagem das árvores de mogno africano selecionadas. Para amplificação dos oito locos microssatélites via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizou-se o Kit Multiplex PCR da QUIAGEN® no termociclador T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD). Um dos *primers* de cada par foi marcado com uma das três fluorescências 6-FAM, HEX e NED. Para as reações de PCR foram montados quatro sistemas multiplex (duplex) e somente um loco ficou isolado. As reações de PCR foram realizadas em placas de 96 poços contendo 1,0 μ L de DNA a 6 ng/ μ L; 0,5 μ L de *primer* não marcado com fluorescência a 2,5 picomoles/ μ L; 0,5 de

primer marcado com fluorescência a 2,5 picomoles/ μL ; 2,5 μL de Master Mix e 0,5 μL de Qsolution (QUIAGEN[®]).

As reações de PCR foram feitas de acordo com a temperatura de anelamento dos *primers* que variou entre 50 e 55°C. As condições de amplificação para as reações foram uma desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, seguido por 35 ciclos contendo uma desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* por 30 segundos com temperatura de 50-55°C dependendo do par de *primers*, e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final dos 35 ciclos procedeu-se uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Ao final de cada PCR os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,0% contendo 10 μL de Brometo de Etídeo para 300 ml, utilizando tampão de corrida TBE 1X e marcador de peso molecular λ DNA/Hind III Fragments da Invitrogen[™]. Os géis foram visualizados em transluminador UV.

3.6 ELETROFORESE CAPILAR

Para realização da eletroforese capilar foi preparada uma placa contendo, em cada poço, uma solução com um volume final de 10 μL , sendo 1 μL de produto de PCR, 0,6 μL de fluorocromo ROX (marcador de fragmentos com tamanho conhecido) e 8,4 μL de Formamida. Antes de injetar as placas no sequenciador, estas foram mantidas a 95°C por cinco minutos no termociclador e colocadas no gelo imediatamente para desnaturação dos fragmentos de DNA. Ao final da eletroforese capilar, os eletroferogramas foram analisados no programa GeneMapper 3.5 (Applied Biosystems) para a genotipagem dos oito locos microssatélites. Os genótipos obtidos foram organizados em uma matriz com os locos microssatélites nas linhas e os indivíduos (árvores selecionadas) nas colunas.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para estimativa da diversidade e divergência genética na população selecionada de *K. ivorensis*, os dados foram organizados em uma matriz composta pelos genótipos dos indivíduos para os oito locos microssatélites.

Como a população selecionada é composta por árvores de origens diferentes, os dados genéticos foram analisados buscando inferir a existência de

diversidade genética, o grau de estruturação da diversidade entre as subpopulações e estimar a divergência genética entre as árvores de *K. ivorensis*. Para as análises, a subpopulação Norton foi subdividida em duas: uma com 12 árvores descendentes de população da Costa do Marfim e a segunda com 21 árvores descendentes de matrizes localizadas da Tanzânia. Dessa forma, as análises foram realizadas considerando as subpopulações Okajima, Norton Tanzânia (Tz) e Norton Costa do Marfim (CM), totalizando 53 indivíduos da população base de melhoramento.

3.7.1 Diversidade genética

As análises de diversidade genética foram realizadas utilizando os programas *Genetic Data Analysis* 1.0 (GDA) (Lewis & Zaykin, 2001) e FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002). Ambos programas utilizam a matriz de genótipos para estimar uma série de parâmetros de diversidade e de estruturação da variabilidade genética entre as populações, tanto em termos médios como para locos isoladamente.

Com o programa GDA foram estimados o número de alelos por locos polimórficos (A_p), a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), e o índice de fixação intrapopulacional (f). Adicionalmente, o programa FSTAT foi utilizado para estimativa da riqueza alélica (A_r) das populações.

Além destas estimativas, o programa *Identy* 1.0 (Wagner e Sefec, 1999) foi utilizado para obter informações adicionais sobre os locos microsatélites. Foi avaliada a Probabilidade de Identidade Genética (PI) (Paetkau et al., 1995) e a Probabilidade de Exclusão de Paternidade (PE) (Weir, 1996). A primeira infere a probabilidade de dois indivíduos amostrados ao acaso em uma única população terem o mesmo genótipo. Já PE , determina o poder de um loco em conseguir excluir um indivíduo aleatório de ser atribuído à paternidade.

O programa GDA também foi utilizado para avaliar a estrutura genética das subpopulações, ou seja, a distribuição e organização da variabilidade genética dentro e entre as populações desse estudo. Para isso foram calculadas as estimativas de F de Wright: F , f e Theta (θ). As estimativas de F de Wright (1965) foram realizadas com o estimador de Weir & Cockerham (1984).

3.7.2 Divergência e Estrutura Genética

Os dados genotípicos de *K. ivorensis* e *K. senegalensis* foram utilizados para avaliação da divergência genética possibilitando avaliar a distância genética entre os indivíduos constituintes da população selecionada.

O programa Bood 3.1 (Coelho, 2001) foi utilizado para construção de uma matriz de distância genética utilizando a metodologia proposta por Rogers (1972) modificada por Wright (1978) e também para avaliação da consistência dos agrupamentos via *bootstrapping*.

A matriz de distância genética gerada foi inserida no programa R para análise de agrupamento utilizando o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Average*). O resultado final do agrupamento é representado através de um dendrograma. Para avaliar a representatividade do dendrograma gerado, estimou-se o coeficiente de correlação cofenética, que mede a correlação entre a distância de Rogers modificado na matriz original e as distâncias representadas no dendrograma. Adicionalmente, o programa Bood gerou 10.000 *bootstraps* para avaliar a consistência dos nós formados no dendrograma. Outra representação das distâncias genéticas entre as árvores de mogno-africano foi obtida com o gráfico de coordenadas principais (PCoA) obtido na programa R.

Adicionalmente, a estrutura genética da população selecionada também foi avaliada com o programa *Structure* 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Ao acessar a diversidade genética da população, a análise é feita com base nas frequências alélicas, buscando alocar os indivíduos em populações definidas de maneira que elas se aproximem ao máximo do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O programa utiliza uma abordagem Bayesiana, em que são feitas randomizações baseadas na Cadeia de Markov. Uma grande vantagem dessa abordagem é que ela não requer o conhecimento prévio da estrutura genética, sendo o número de populações e a alocação dos indivíduos definidas com base no modelo mais provável. A alocação de cada indivíduo nas diferentes populações é dada através do cálculo das frequências alélicas em cada evento de randomização. Dessa maneira, é calculada a probabilidade de cada indivíduo pertencer a uma dada população.

Inserido o painel com os dados da população, são fornecidas ao programa informações sobre o número de indivíduos (65, quando consideradas as subpopulações

Okajima, Norton e *K. senegalensis* e 53, para subpopulações Okajima, Norton_Tz e Norton_CM), a ploidia (2), o número de locos (8) e o identificador de dados perdidos (-9). Os parâmetros utilizados para análise estatística assumiram um *Burnin* de 50.000, que são os dados iniciais eliminados da Cadeia de Markov e posteriormente, 500.000 randomizações com Métodos de Monte Carlo através das Cadeias de Markov (MCMC). Utilizou-se um modelo que prevê a possibilidade de miscigenação entre as amostras e um modelo de frequências alélicas correlacionadas, que infere se as frequências alélicas em diferentes populações tendem a ser semelhantes aumentando a probabilidade de agrupar populações estreitamente relacionadas. As simulações foram feitas utilizando o número de clusters (K) variando de um (admitindo que não há estruturação genética) a oito (pressupondo a existência de estruturação genética com oito populações diferentes), com 30 iterações para cada K . Quanto maior o número de iterações, melhores são as estimativas de média e desvio padrão das razões de verossimilhança geradas para os diferentes modelos (K) avaliados pelo programa. A avaliação do melhor número de K é verificada pelo método desenvolvido por Evanno et al. (2005) utilizando o programa *Structure Harvester* (Earl & Holdt, 2012). O resultado é visualizado por gráficos de barra gerados pelo programa *Structure*.

4 RESULTADOS

4.1 TRANSFERIBILIDADE DOS *PRIMERS* MICROSSATÉLITES

Dos 19 *primers* microsatélites marcados com fluorescência que foram desenvolvidos para a espécie *K. senegalensis* oito foram utilizados para a espécie *K. ivorensis* (Tabela 2). Estes apresentaram melhor amplificação durante a eletroforese capilar e foram utilizados neste trabalho para realização das estimativas de diversidade, divergência e estrutura genética de *K. ivorensis*. A Tabela 3 demonstra as características dos oito locos microsatélites transferidos para *K. ivorensis*. Os motivos de repetição variam de dois (di) a quatro (tetra) nucleotídeos. A amplitude alélica ficou entre 92 e 265 pares de bases (pb).

Tabela 2. Caracterização dos oito locos microsatélites desenvolvidos para *K. senegalensis* por Sexton et al. (2010) (Ks) e Karan et al. (2012) (ssrKs) e transferidos para *K. ivorensis*.

<i>Primer</i>	Sequência dos <i>Primers</i> (5'-3')	Motivo	Amplitude Alélica* (pb)	Acesso GenBank
Ks022	F: TGGAGTAAAGTCGAGGGCTG R: GGCTGGATATGGCACTTGTT	(AAT) ₅ (CAT) ₃	183-209	(AJ000410)
Ks051	F: CTTAAGACATTTGACCAATCC R: GTCGGACAATTGTGTTTTAGT	(AAG) ₆	116-129	HQ200182
Ks86	F: ACAACTCTTTACGTCCACCT R: CATCATCTTCTTCTGTTACGG	(GCT) ₇	98-118	HQ200190
ssrKs09	F: GCAACAATGCACACAGGTC R: ATAGACGCATACTCCGCCC	(AC) ₁₇	132-148	JF423309
ssrKs15	F: TGTTCACTGGTCGGATGTG R: GTTGGTGGCGATATGCTCG	(ACAT) ₇	126-149	JF423312
ssrKs7	F: CAGCGAGCTATAATAAAGACCAAAG R: ACCTGATGACTTCTCTCTCTCTC	(AG) ₁₄	92-119	JF423307
Ks040	F: ACCATGCAATGCTAACTTTAT R: CTTTTGTGTCCAAAAATTGAC	(AAC) ₆	128-265	HQ200181
ssrKS16	F: TTGAGGGAGGAGCAAGACG R: TCTGGCCAATACCAAGTATCAC	(CTT) ₁₁	108-120	JF423313

* Amplitude alélica encontrada para os indivíduos de *K. ivorensis* da população de melhoramento.

A partir dos *primers* que foram transferidos foi possível montar sistemas multiplex (Tabela 3) devido à marcação dos *primers* com fluorescências. Apenas o loco *ssrKs16* foi amplificado isoladamente, em *simplex*, na PCR.

Tabela 3. *Primers* utilizados para amplificação dos locos microssatélites em *K. ivorensis*, com seus respectivos fluorocromos, temperatura de anelamento (T_a) e multiplex.

Primer	Fluorocromo	T_a	Multiplex
Ks022	6-FAM	55°C	Duplex 1
Ks051	HEX	55°C	Duplex 1
Ks86	NED	55°C	Duplex 2
<i>ssrKs09</i>	6-FAM	55°C	Duplex 2
<i>ssrKs15</i>	6-FAM	55°C	Duplex 3
<i>ssrKs7</i>	HEX	55°C	Duplex 3
Ks040	6-FAM	50°C	Duplex 4
<i>ssrKs16</i>	6-FAM	50°C	Simplex

4.2 ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA

Foi encontrado um total de 47 alelos para os oito locos microssatélites genotipados na população base de melhoramento. O número médio de alelos por locos (A_p) foi igual a 5,875, variando entre três (loco *ssrKs16*) e 16 alelos (loco Ks040). A heterozigosidade média observada foi igual a 0,738. O loco *ssrKs7* apresentou o maior valor de heterozigosidade observada ($H_O = 0,979$) e o loco Ks022 o menor ($H_O = 0,442$). O loco que apresentou a maior heterozigosidade esperada foi o loco Ks040 ($H_E = 0,835$) enquanto que a menor ocorreu no loco Ks22 ($H_E = 0,365$), sendo a média de 0,563. O índice médio de fixação intrapopulacional (f) obteve valor médio negativo de -0,314 (Tabela 4).

O valor de probabilidade de exclusão (PE) variou de 0,180 (Ks022) a 0,663 (Ks040). Em conjunto, os oito locos são eficazes na exclusão de paternidade, totalizando uma PE de 0,970. A probabilidade de identidade (PI) variou de 0,50 (Ks040) a 0,444 (Ks022). No conjunto, os locos também são eficazes na discriminação dos genótipos, apresentando um valor de PI de $7,612 \times 10^{-6}$.

Tabela 4. Estimativas de diversidade genética para oito locos microssatélites para 53 indivíduos de *K. ivorensis*, selecionadas no Pará.

Locos	<i>n</i>	<i>A_p</i>	<i>H_E</i>	<i>H_O</i>	<i>f</i> *	<i>PE</i>	<i>PI</i>
Ks022	52	5	0,365	0,442	-0,211	0,180	0,444
ssrKs7	48	7	0,811	0,979	-0,209	0,605	0,068
Ks86	51	4	0,498	0,666	-0,342	0,214	0,352
ssrKs15	52	4	0,523	0,923	-0,777	0,211	0,347
ssrKs09	52	4	0,457	0,500	-0,092	0,243	0,339
Ks51	51	4	0,503	0,588	-0,169	0,238	0,328
ssrKs16	53	3	0,514	0,924	-0,812	0,199	0,361
Ks040	44	16	0,835	0,886	-0,061	0,663	0,050
Média	50,375	5,875	0,563	0,738	-0,314	0,970	7,612 x 10 ⁻⁶

A_p = número de alelos encontrados; *H_E* = heterozigosidade esperada; *H_O* = heterozigosidade observada; *f* = índice de fixação intrapopulacional. *PE* = probabilidade de exclusão de paternidade; *PI* = probabilidade de identidade. *Nível de significância de 95%.

Os alelos encontrados e as frequências alélicas de cada um dos oito locos microssatélites genotipados estão apresentados na Figura 4. As distribuições das frequências alélicas variaram entre os locos. Os locos *ssrKs7* e *ssrKs040* tiveram uma melhor distribuição dos alelos quando comparado com o restante, em que alguns poucos alelos tiveram uma frequência maior do que os outros.

Foram realizadas análises de diversidade genética com as árvores do Norton subdivididas em duas subpopulações: Norton_Tz e Norton_CM. As estimativas de diversidade apontam pouca diferença entre as duas subpopulações (Tabela 5). Por exemplo, enquanto Norton_CM obteve *H_O* = 0,746, Norton_Tz foi de 0,710. Nota-se que esses valores estão próximos ao encontrado na subpopulação Okajima (0,758).

A *H_E* média também variou pouco entre as subpopulações Norton_CM (*H_E* = 0,550) e Norton_Tz (*H_E* = 0,553). Esses valores também podem ser considerados próximos ao da subpopulação Okajima que apresentou uma *H_E* = 0,586. A estimativa de riqueza alélica, calculada com base em 11 indivíduos por subpopulação, foi maior para as subpopulações Okajima (*Ar* = 3,946) e Norton_Tz (*Ar* = 3,896) quando comparado com a subpopulação Norton_CM (*Ar* = 2,958). O índice de fixação intrapopulacional (*f*) médio variou de -0,377 (Subpopulação Norton_CM) a -0,296 (Subpopulação Norton_Tz). As estimativas negativas de *f* indicam excesso de heterozigotos quando comparado ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

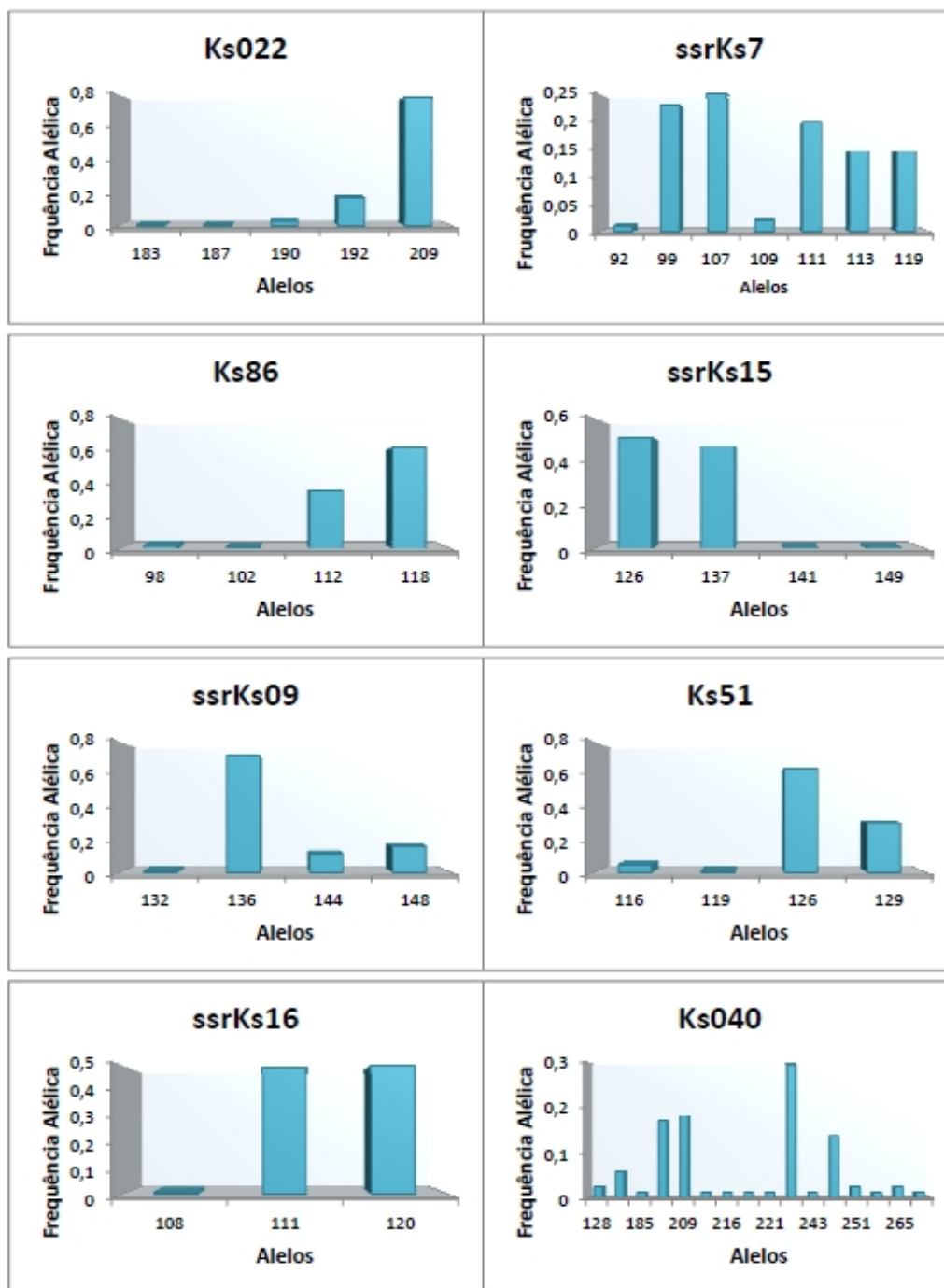


Figura 4. Distribuição das frequências alélicas para os oito locos microssatélites considerando 53 indivíduos de *K. ivorensis*, selecionadas no Pará. Os alelos estão representados no eixo *x* pelo tamanho do alelo.

Tabela 5. Estimativas de diversidade genética com base em oito marcadores microssatélites para as subpopulações Okajima, Norton Tanzânia e Norton Costa do Marfim.

Subpopulação	<i>n</i>	<i>P</i>	<i>A_P</i>	<i>H_E</i>	<i>H_O</i>	<i>f</i>	<i>Ar</i>
Okajima	19,500	1	4,625	0,586	0,758	-0,304	3,946
Norton_Tz	19,000	1	4,375	0,553	0,710	-0,296	3,896
Norton_CM	11,875	1	3,000	0,550	0,746	-0,377	2,958
Média	16,791	1	4,000	0,563	0,738	-0,324	3,600

n= número médio de indivíduos por loco; *P*= proporção de locos polimórficos; *A_P*= Número médio de alelos por loco polimórfico; *H_E*= Heterozigosidade esperada (diversidade genética de Nei); *H_O*= Heterozigosidade observada; *f*= Índice de fixação intrapopulacional, número médio de riqueza alélica (*Ar*) foi feito considerando 11 indivíduos.

4.3 ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL

Os resultados dos estimadores de Weir & Cockerham (1984) estão descritos na Tabela 6. O valor da estimativa $\theta = 0,008$ não foi significativo estatisticamente, com intervalo de consistência de 95% variando de -0,007 a 0,028. A não significância de θ indica que a variabilidade genética não está estruturada entre as subpopulações, mas sim concentrada dentro delas. As estimativas *f* e *F* obtidas com intervalo de confiança a 95% tiveram os valores de -0,321 e -0,311, respectivamente. Como já descrito, os valores negativos de *f* indicam excesso de heterozigotos e, portanto, ausência de endogamia nas populações avaliadas.

Ao analisar a estrutura genética considerando as subpopulações Okajima, Norton_Tz e Norton_CM (Tabela 6), as estimativas apresentaram valores muito próximos à análise feita com a subpopulação Norton consolidada. O valor de $\theta = 0,008$ indica que apenas 0,8% da variabilidade genética está estruturada entre as subpopulações. Além disso, o intervalo de consistência inclui o valor zero, indicando a não significância dessa estimativa.

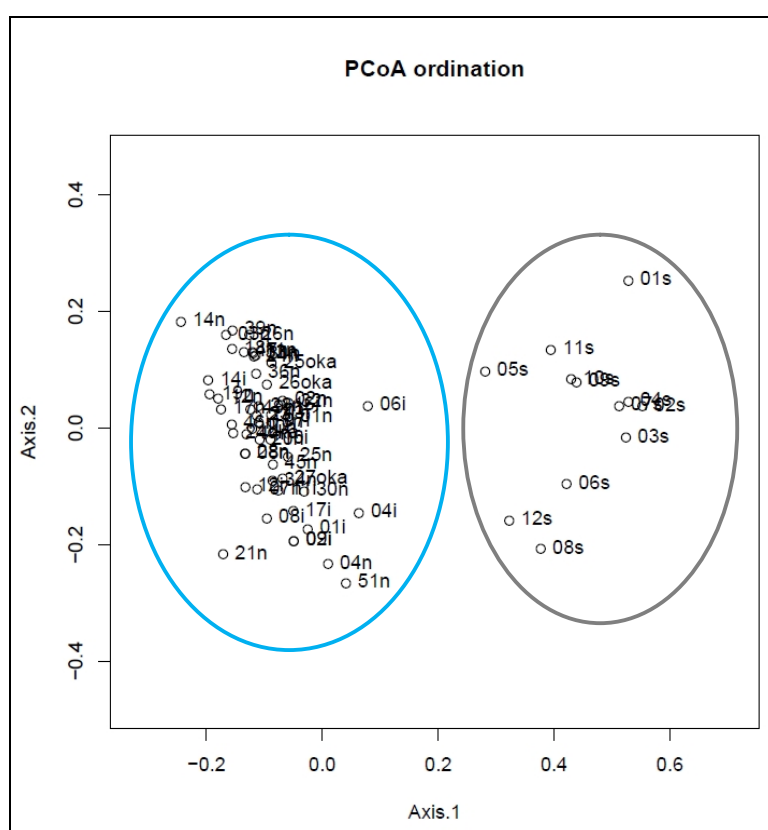
Tabela 6. Estimativa de parâmetros da estrutura genética das subpopulações e intervalo de consistência gerado para as estimativas. Onde: *f* = Índice de fixação intrapopulacional; θ = índice de fixação entre as populações e *F* = índice de fixação total.

Subpopulações Okajima, Norton_Tz e CM			
	<i>f</i>	<i>F</i>	θ
Estimativas	-0,321	-0,311	0,008
Limite superior*	-0,160	-0,141	0,028
Limite inferior*	-0,533	-0,528	-0,007

*Número de randomizações *bootstrap*: 10.000. Intervalo de confiança 95%.

Foram realizadas análises complementares para verificar a estruturação da variabilidade genética da população-base de melhoramento com base nos dados moleculares. Através do programa Bood foi gerada uma matriz de distância genética com os 53 indivíduos de *K. ivorensis* e mais 12 indivíduos de *K. senegalensis* utilizados como grupo controle, totalizando 65 indivíduos.

Os valores de correlação cofenética tanto para o gráfico PCoA ($r = 0,9000$) como para o dendrograma ($r = 0,9289$) foram altos e significativos, demonstrando que essas figuras representam bem as distâncias genética entre os genótipos.



As letras que estão à frente do número de cada indivíduo representa as populações Okajima (i), Norton (n) e *K. senegalensis* (s).

Figura 5. Gráfico das distâncias genéticas entre 53 indivíduos de *K. ivorensis* e 12 de *K. senegalensis* com base nos eixos 1 e 2 da análise de componentes principais.

O gráfico PCoA indica a formação de dois grupos bem distintos geneticamente sendo as árvores de *K. ivorensis* (círculo azul à esquerda) e de *K. senegalensis* (círculo cinza à direita). Esta estruturação genética também pode ser observada a partir da análise do dendrograma, onde é possível visualizar dois grupos distantes e separados com 100% de consistência pelas análises *bootstrap* (Figura 6). O

grupo controle composto por indivíduos de *K. senegalensis* (identificados com o “s” a frente do número) ficou bem separado do restante das árvores de *K. ivorensis*, demonstrando claramente a distância entre as espécies.

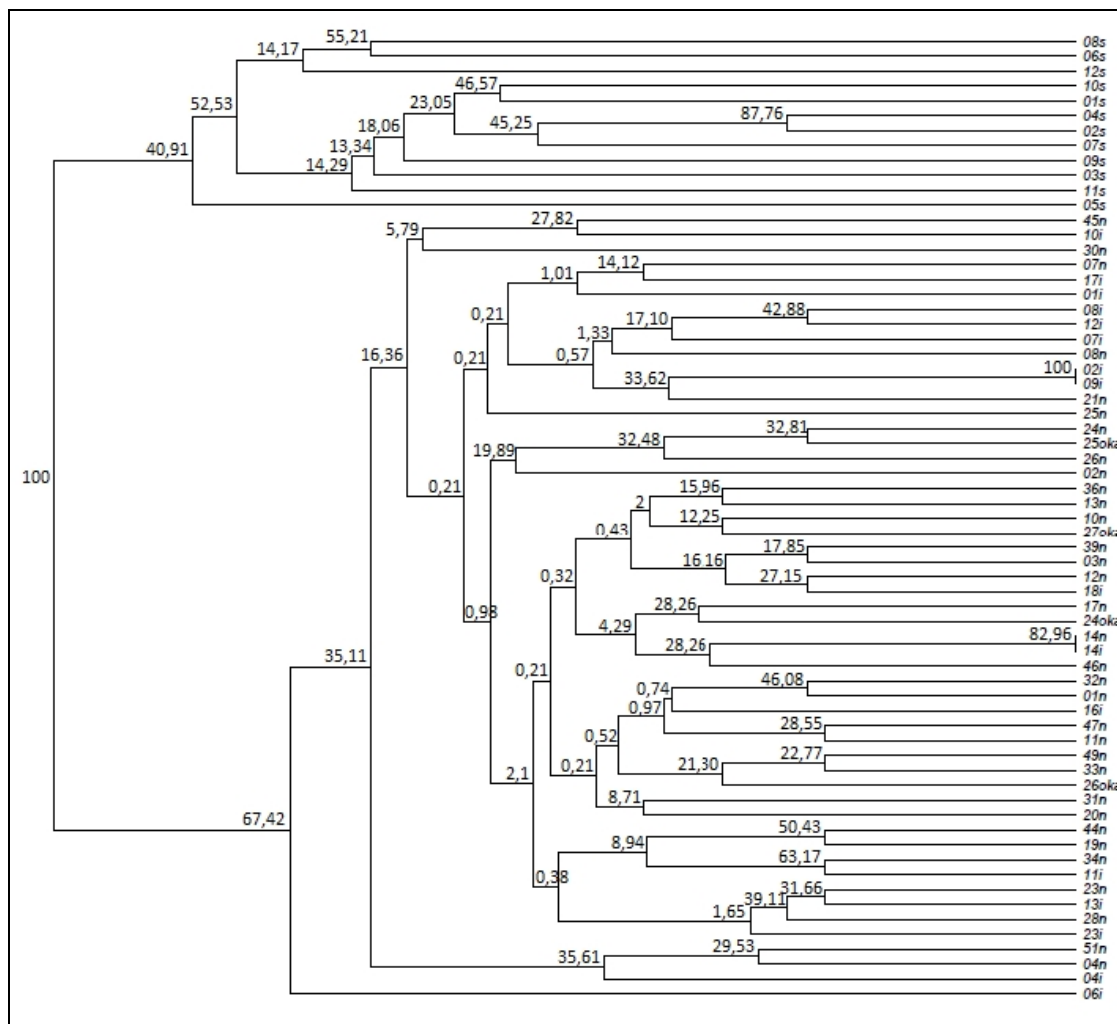


Figura 6. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a distância genética de Rogers (modificado) para os 65 indivíduos de mogno-africano.

As análises do gráfico de coordenadas principais e do dendrograma indicam a inexistência de estruturação genética entre as árvores selecionadas de *K. ivorensis*. No gráfico de coordenadas principais, os genótipos de *K. ivorensis* estão todos distribuídos em uma única nuvem dispersa sem a existência de grupos aparentes. Da mesma maneira, a análise dos *bootstraps* indicam falta de consistência entre os grupos de *K. ivorensis* representados no dendrograma. Entretanto, a análise dessas distâncias (Figura 6) pode ser útil para identificar indivíduos geneticamente mais distantes para guiar futuros cruzamentos, potencialmente mais heteróticos. Os indivíduos 06i e 45n

obtiveram maior distância genética (0,566). Na subpopulação Okajima ficaram com maior distância genética, os indivíduos 04i e 12i (0,612). Para subpopulação Norton, foram mais distantes 21n e 31n (0,707), enquanto que os mais próximos foram 33n e 49n; 19n e 44n; 11n e 47n com uma distância mínima de 0,176. A existência de dois pares de indivíduos (02i e 09i, bem como 14n e 14i) com distâncias genéticas iguais a zero indicam ausência de divergência entre eles nos oito locos genotipados. Esse resultado pode indicar problemas na identificação das folhas enviadas ao laboratório para extração de DNA. É altamente improvável a existência de indivíduos com o mesmo genótipo, dado que as árvores de *K. ivorensis* se reproduzem sexuadamente, provavelmente via alogamia.

A análise de variância das frequências alélicas (Tabela 6) não detectou estruturação genética significativa entre as subpopulações Okajima, Norton_CM e Norton_Tz. Outra abordagem é o estudo da estruturação utilizando modelos de clusterização para inferência das populações e posterior atribuição dos indivíduos às populações mais prováveis (Pritchard et al., 2000). O programa *Structure* utiliza uma abordagem Bayesiana para simultaneamente definir os clusters (populações) e inferir a alocação mais provável de cada indivíduo nas diferentes populações. Em uma primeira etapa, o programa *Structure* foi utilizado para verificar o grau de estruturação já esperado entre os indivíduos de *K. ivorensis* e *K. senegalensis*. Essa primeira análise foi realizada como um controle de qualidade da genotipagem e para verificar a existência de possíveis híbridos interespecíficos na população selecionada de *K. ivorensis*. Posteriormente, foi realizada uma segunda análise abordando somente as árvores de *K. ivorensis* considerando os indivíduos das subpopulações Okajima, Norton_Tz e Norton_CM.

A análise dos resultados do programa *Structure* para os 65 indivíduos, através do método de Evanno et al. (2005), indicou que o maior valor de ΔK (Figura 7) ocorreu para $K = 4$ (pico mais alto). Esse resultado indica a existência de estrutura genética organizada em quatro grupos ou populações mais prováveis. Os resultados da alocação dos indivíduos nessas populações demonstram que uma delas (coloração vermelha na Figura 8) é formada pelos indivíduos de *K. senegalensis*, enquanto os indivíduos de *K. ivorensis* estão distribuídos primordialmente em outras duas populações (colorações amarela e azul na Figura 8).

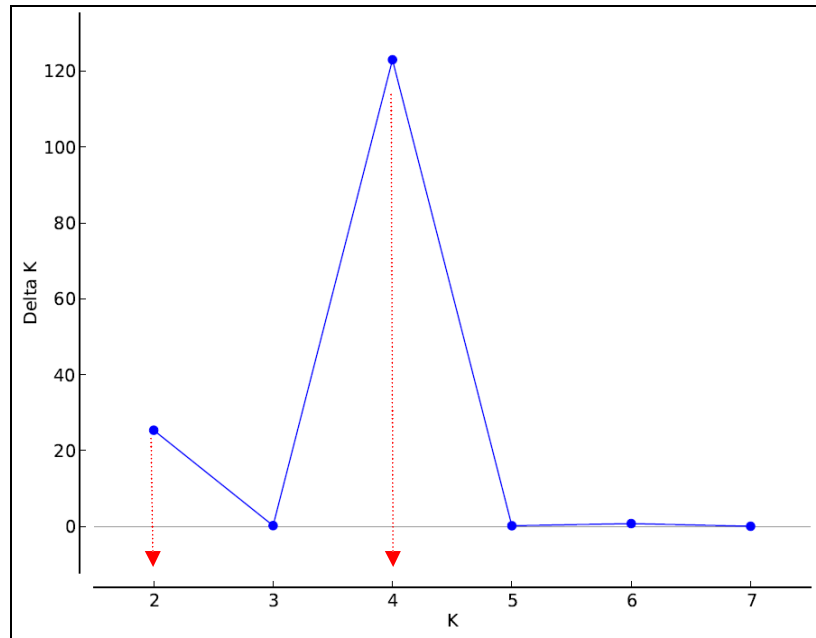


Figura 7. Valores de ΔK para os 53 indivíduos de *K. ivorensis* e dos 12 de *K. senegalensis*.

Um pico de ΔK para $K = 2$ indica que a estruturação com somente duas populações também é provável. Neste caso, a estruturação separa os indivíduos de *K. ivorensis*, alocados na população de coloração verde, dos indivíduos de *K. senegalensis*, alocados na população representada pela coloração vermelha (Figura 8).

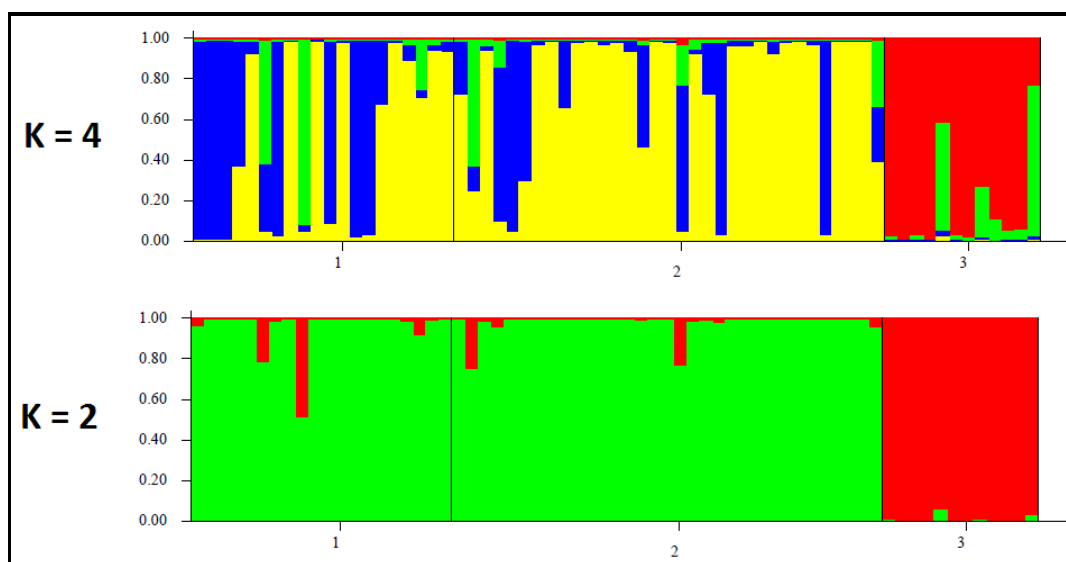


Figura 8. Teste de agrupamento dos 65 indivíduos de Mogno-africano, demonstrando o grau de estruturação genética dos indivíduos da população-base de melhoramento e o grupo controle. Onde: 1 – Subpopulação Okajima, 2 – Subpopulação Norton e 3 – Subpopulação Senegalensis.

Procedeu-se também a uma análise, no programa *Structure*, utilizando somente os 53 indivíduos de *K. ivorensis*. O maior valor ocorreu para $K = 5$ (Figura 9A). No entanto, a análise do gráfico de barras (Figura 10) com a alocação dos 53 indivíduos nas cinco populações, indica que todos os indivíduos possuem uma distribuição uniforme de probabilidade de alocação nas diferentes populações. Esse resultado indica ausência de estruturação entre os genótipos. Uma análise mais minuciosa dos resultados de média e desvio padrão das verossimilhanças dos diferentes modelos (K variando de 1 a 8) indica que o modelo mais provável é, de fato, aquele com $K = 1$ (ausência de estruturação). Esse modelo apresenta a maior verossimilhança e o menor desvio padrão entre as 30 repetições avaliadas (Figura 9B). Vale ressaltar que o método de ΔK de Evanno et al. (2005) foi concebido para encontrar o número mais provável de populações que contribuem para a estruturação genética, não avaliando os modelos com ausência de estruturação.

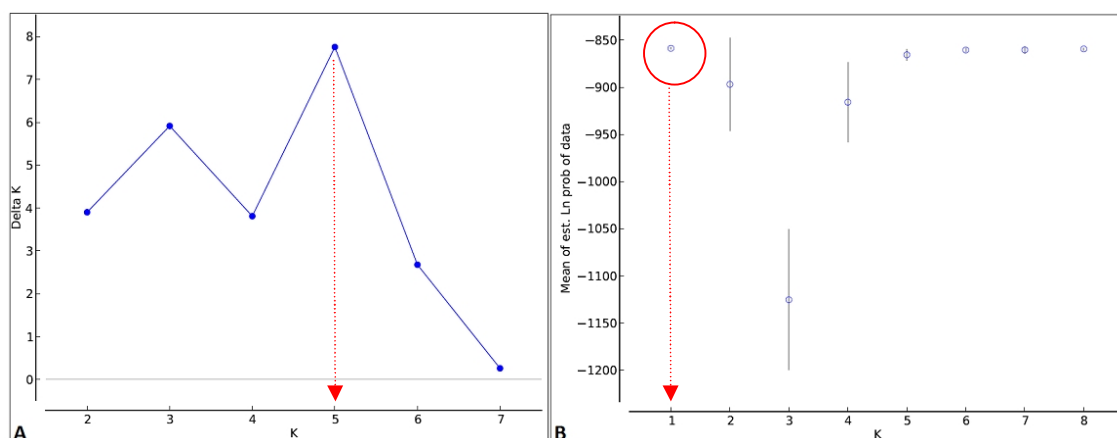
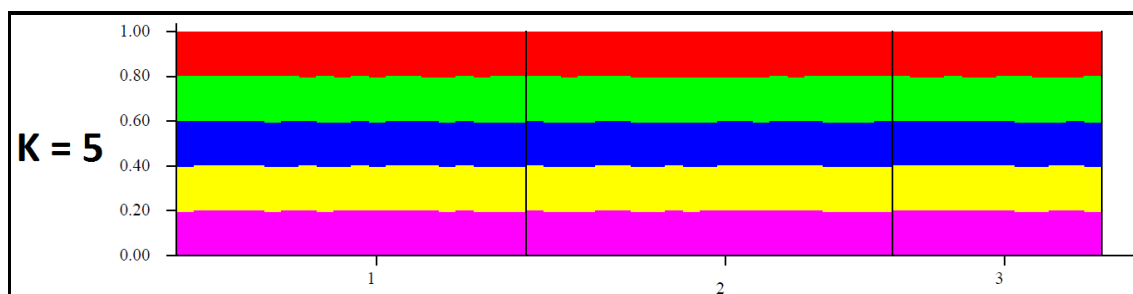


Figura 9. Valores de ΔK para cada valor de K , calculado de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005). O maior valor de ΔK corresponde ao K ótimo. A: valor de $K = 5$ verificado nas análises feitas com os 53 indivíduos da população de melhoramento. B: gráfico do desvio padrão para cada valor de K .



1 – Subpopulação Okajima, 2 – Subpopulação Norton_Tz e 3 – Subpopulação Norton_CM.

Figura 10. Estrutura genética de três populações de *K. ivorensis* pela análise do *Structure*.

5 DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL

Em busca na literatura, não foram encontrados trabalhos publicados com estudos de genética e/ou melhoramento da espécie *K. ivorensis* tanto no âmbito nacional como internacional. Dentro do gênero *Khaya*, existem alguns trabalhos relatados para *K. senegalensis* (Nikles et al., 2008; Sexton et al., 2010; Lemes et al., 2011; Karan et al., 2012) dado que essa espécie vem sendo alvo de programas de melhoramento genético na Austrália. Como é recente a introdução da espécie no Brasil faz-se necessário o estudo da diversidade genética do material introduzido. O conhecimento da magnitude da diversidade e estrutura genética de uma população são fatores primordiais para se iniciarem os trabalhos de melhoramento genético (Cruz et al., 2011).

Apesar da população base de melhoramento de *K. ivorensis* ser constituída por 53 indivíduos, muitos deles selecionados na subpopulação Okajima, proveniente de somente cinco árvores, esta apresenta valores relativamente altos e significativos de diversidade genética. Essa constatação pode ser feita ao se comparar os resultados desse trabalho com estudos de diversidade em populações naturais de espécies madeiras tropicais de importância econômica. A H_o média da população em estudo foi igual a 0,738. Trabalhos realizados para espécies arbóreas da família Meliaceae apresentaram valores médios de heterozigosidade observada parecidos com esses de *K. ivorensis*. A genotipagem de 10 locos microssatélites em uma amostra de 121 indivíduos adultos de *S. macrophylla* (mogno brasileiro) situados na Floresta Amazônica brasileira, encontrou um valor médio de $H_o = 0,73$ (Lemes et al., 2002). Um segundo estudo realizado com 100 indivíduos de *S. macrophylla*, amostrados em trechos de floresta que sofreram incêndios florestais na Costa Rica, obteve-se um valor médio de $H_o = 0,508$ utilizando cinco locos microssatélites (Céspedes et al., 2003). Oito microssatélites foram utilizados para genotipar 245 indivíduos de cedro branco (*Cedrela fissilis* Vell.), pertencentes a sete populações naturais situadas entre o Brasil e a Bolívia. A estimativa de H_o média obtida foi de 0,73 (Mangravite, 2012). Martins et al. (2008) utilizou quatro microssatélites para genotipar 54 indivíduos de cedro rosa (*C. odorata* L.) distribuídos em uma floresta primária, do município de Rio Branco no Acre e obteve o valor médio de $H_o = 0,743$. Um estudo feito com outra espécie de cedro (*Cedrela lilloi*), realizado com 140 indivíduos distribuídos em três populações da Selva de Yungas, na região

noroeste da Argentina, encontrou um valor médio de $H_O = 0,406$ utilizando oito microssatélites (Tarnowski, 2010). Essa estimativa é inferior àquela obtida na população do presente estudo.

É importante ressaltar que os diversos estudos citados acima foram realizados com populações naturais de espécies da família Meliaceae e que os valores encontrados de diversidade são próximos ou inferiores ao obtido na população selecionada de *K. ivorensis*. Esse resultado demonstra que, apesar das árvores terem origem em populações com base genética restrita, como é o caso da subpopulação do Sr. Okajima, essas possuem diversidade genética comparável àquelas observadas em populações naturais de espécies pertencentes à família Meliaceae.

Estudos feitos com *K. senegalensis* apresentaram valores de heterozigosidade inferiores aquelas do presente estudo. Lemes et al. (2011) utilizando 10 locos microssatélites para estudar 237 árvores de 12 populações naturais de *K. senegalensis* do Benin obtiveram heterozigosidade média observada de 0,486. Karan et al. (2012) utilizaram 12 microssatélites para analisar 73 acessos de *K. senegalensis* provenientes de 11 países cobrindo a distribuição natural da espécie. A heterozigosidade média observada desse trabalho foi de 0,621. Esses resultados corroboram que a população de 53 indivíduos de *K. ivorensis* selecionados possui diversidade genética comparável, ou superior ($H_O = 0,738$), àquela obtida em populações naturais de espécies filogeneticamente próximas.

A H_E média de 0,484 obtida por Lemes et al. (2011) foi inferior a encontrada por Karan et al. (2012) ($H_E = 0,739$), ambos com populações de *K. senegalensis*. O valor de heterozigosidade média esperada na população de melhoramento de *K. ivorensis* do presente estudo foi intermediário ($H_E = 0,563$) em relação aos valores obtidos em *K. senegalensis*. Esse valor de $H_E = 0,563$, quando comparado aos estudos com mogno brasileiro da espécie *S. macrophylla*, foi maior que o achado por Céspedes et al. (2003) ($H_E = 0,518$) e inferior ao encontrado por Lemes et al. (2002) ($H_E = 0,84$) e Lemes et al. (2003) ($H_E = 0,781$). Em estudo com populações de *S. humilis* de Honduras, foi obtido uma heterozigosidade esperada média igual a 0,546 (White & Powell, 1997).

A heterozigosidade é muito útil para quantificar o nível de variação genética existente nas populações, pois quanto maior a heterozigosidade maior é a diversidade alélica e, portanto, maiores são as possibilidades de combinações genotípicas (Souza et

al., 2010). Essa estimativa juntamente com o número de alelos por loco e riqueza alélica, indicam que ambas as subpopulações (Okajima e Norton) possuem diversidade genética com aproximadamente a mesma magnitude. A magnitude da diversidade demonstra que ambas podem ser exploradas para fins de melhoramento. Quando comparado com estudos de *Pinus* (Gauli et al., 2009; Yu et al., 2012), outro gênero florestal sob domesticação, as populações de *K. ivorensis* estudadas apresentam diversidade genética semelhante. Por outro lado, a diversidade genética observada nas populações de *K. ivorensis* é inferior àquela observada em outras espécies arbóreas introduzidas no país, como no caso de *Eucalyptus* (Brondani et al., 1998; Souza et al., 2010; Correia, 2011). Tal situação evidencia a necessidade de re-introdução de uma maior variabilidade genética a partir de seu centro de origem na África. O aumento da diversidade genética de *K. ivorensis* é importante para garantir a sustentabilidade e a adaptabilidade dos plantios da espécie nas diferentes regiões do país. Em termos de melhoramento genético, é a diversidade que possibilita a obtenção de ganhos de seleção em longo prazo.

Neste estudo, a população de *K. ivorensis* apresentou uma média 5,8 alelos por loco microssatélite, totalizando 47 alelos. Este resultado é inferior às estimativas encontradas em estudos envolvendo indivíduos de *K. senegalensis*, onde os autores utilizaram maior número de locos e de indivíduos quando comparados com este trabalho (Sexton et al., 2010; Lemes et al., 2011 e Karan et al., 2012). Um maior número de alelos se traduz em uma maior capacidade de gerar novas combinações genotípicas, ampliando, conseqüentemente, sua base genética (Kageyama et al., 2003). Resultados diversos foram encontrados em estudos envolvendo espécies florestais de diferentes espécies e gêneros. White e Powell (1997), em estudo realizado com 10 microssatélites em 88 indivíduos de *S. humilis* verificaram um total de 97 alelos genotipados, com média de aproximadamente 10 alelos por loco. De forma semelhante, um estudo realizado em 54 indivíduos de cedro rosa (*C. odorata* L.) utilizando quatro marcadores microssatélites apresentou total de 54 alelos, com média de 13,5 alelos por loco, resultado muito superior ao obtido neste estudo (Martins et al., 2008). Resultados semelhantes foram encontrados por Soldati (2013) e Gandara (2009), que estudaram populações de cedro (Meliaceae) das espécies *Cedrela balansae* e *C. fissilis*. Nesses trabalhos foram encontrados 62 e 150 alelos utilizando sete e oito locos microssatélites, respectivamente.

Por fim, apesar da população selecionada de *K. ivorensis* possuir alta heteroziguidade, mesmo quando comparado com espécies naturais, o número de alelos por loco é inferior ao encontrado em trabalhos envolvendo outras espécies da família Meliaceae. Essa diversidade alélica mais baixa aponta para a necessidade de se re-introduzir maior variabilidade genética a partir do centro de origem da espécie no continente Africano.

5.2 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DAS SUBPOPULAÇÕES

Quando comparadas entre si, as subpopulações Okajima, Norton_CM e Norton_Tz apresentaram aproximadamente os mesmos valores para H_O e H_E . O número de alelos por loco e a riqueza alélica apresentaram valores ligeiramente mais discrepantes, sendo que as subpopulações do Norton tiveram um menor número de alelos. A subpopulação Norton_CM obteve valores de A_p (3,000) e A_r (2,958) menores do que os observados na subpopulação Okajima ($A_p = 4,625$ e $A_r = 3,946$). Esses resultados foram surpreendentes por contradizerem a hipótese inicial de que as subpopulações vindas da África (Norton_CM e Norton_Tz) teriam maior diversidade do que a subpopulação Okajima, que foi originada a partir de sementes obtidas de somente cinco árvores da Embrapa Amazônia Oriental. Essas cinco árvores foram as primeiras de *K. ivorensis* introduzidas no país e não há relatos de populações adultas dessa espécie que poderiam contribuir com a polinização dessas matrizes, nas proximidades da Embrapa Amazônia Oriental.

Os resultados demonstrados acima indicam que as sementes procedentes da África para implantação das subpopulações Norton_CM e Norton_Tz também foram obtidas de poucas matrizes. Além disso, o número de alelos obtidos nos oito locos estudados e o fato da diversidade de *K. ivorensis* ser comparável a de populações naturais de espécies da família Meliaceae, indicam que as cinco árvores matrizes da subpopulação Okajima são geneticamente muito divergentes. O sequenciamento de genes conservados do DNA cloroplastidial pode indicar o número de haplótipos (alelos) presentes na subpopulação Okajima. Se essa população realmente se originou de somente cinco matrizes, o número de máximo de haplótipos deve ser 10, uma vez que a espécie é diploide. De fato, para a quase totalidade dos locos estudados, o número de

alelos não ultrapassou sete, mesmo considerando todas as três populações avaliadas. A única exceção ocorreu para o loco Ks040, onde foram observadas 16 variações alélicas.

O índice de fixação intrapopulacional (ou coeficiente de endogamia - f) foi estimado para as três subpopulações (Tabela 5) através da equação $(H_E - H_O)/H_E$ proposta por Nei (1978). Em todas as subpopulações, a estimativa do índice foi significativamente negativa, variando de -0,304 para Okajima a -0,377 para Norton_CM. O índice de fixação avalia se o balanço entre as frequências de locos homozigotos e heterozigotos está de acordo com o esperado sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Populações com excesso de homozigotos devido, por exemplo, à presença de endogamia, possuem f maior do que zero. Assim, esse índice torna-se uma ferramenta importante em estudos de genética de população (Kageyama et al., 2003). O valor negativo de f encontrado indicam que a frequência de heterozigotos observada é maior do que o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A depressão por endogamia é especialmente prevalente em populações adultas de espécies perenes (Miller & Gross, 2011), podendo diminuir a frequência de homozigotos e, conseqüentemente, tornar o valor de f negativo. A análise de 73 acessos de populações da distribuição natural de *K. senegalensis* (Karan et al., 2012) também encontrou valor de heterozigosidade observada menor do que o esperado ($f = -0,160$). Valores negativos, mas próximos de zero ($f = -0,038$), também foram encontrados em outro trabalho com *K. senegalensis* (Lemes et al., 2003). Em outras espécies arbóreas tropicais também já observou-se uma maior frequência de heterozigotos em relação ao esperado, como em cagaita (*Eugenia dysenterica*) com valor de $f = -0,017$ (Zucchi, 2002), em Pinus (*Pinus caribaea*) com $f = -0,006$ (Furlan et al., 2007), em *Trema micrantha* ($f = -0,090$) e *Cecropia pachystachya* ($f = -0,006$) (Kageyama et al., 2003).

Por outro lado, o resultado obtido para a população selecionada de *K. ivorensis* contrasta com o obtido em populações naturais de mogno brasileiro. Para essas espécies, estudos apontam valores médios de f significativamente maiores do que zero, sugerindo um déficit de heterozigotos e que a endogamia pode estar presente nessas populações. Populações naturais de *S. macrophylla* apresentaram valores médios de $f = 0,015$ (Céspedes et al., 2003), $f = 0,038$ (Lemes et al., 2003), $f = 0,024$ (Lowe et al., 2003) e $f = 0,149$ (Novick et al., 2003). Para a espécie de mogno *S. humilis*, White & Powell (1997) obtiveram $f = 0,217$ e White et al. (1999) valor de $f = 0,223$.

A caracterização das subpopulações Okajima, Norton_Tz e Norton_CM, onde selecionou-se as 53 árvores do mogno africano (*K. ivorensis*), permite observar um bom nível de diversidade genética. Apesar de serem subpopulações pequenas devido a seleção de indivíduos com características madeireiras favoráveis, as subpopulações demonstram níveis médios de heterozigosidade (H_O e H_E) e baixo nível de endogamia. Esses resultados indicam que a população selecionada de *K. ivorensis* pode ser utilizada em um programa de cruzamentos e seleção recorrente. As informações geradas no presente trabalho são muito importantes para a condução das ações futuras para o melhoramento genético do *K. ivorensis*. Conhecer a variabilidade genética entre e dentro das populações torna-se essencial para potencializar programas de melhoramento genético e conservação de germoplasma em condições *ex situ* e *in situ* (Silva et al., 2007).

5.3 ESTRUTURA GENÉTICA DAS SUBPOPULAÇÕES

A diversidade genética presente na população de *K. ivorensis* está em sua maior parte concentrada dentro das subpopulações. A partição da variabilidade genética entre e dentro de populações (Weir & Cockerham, 1984), não indica diferenças significativas entre as subpopulações (Tabela 6).

Nesse estudo, o valor de θ , que é análogo ao F_{ST} de Wright (1951), indica que somente 0,8% da variabilidade pode vir a ser atribuída a diferenças entre as subpopulações. Entretanto, esse valor não difere estatisticamente de zero. Hartl & Clark (2010) propuseram uma classificação qualitativa para facilitar a interpretação desta estimativa. Através desta escala qualitativa, o valor obtido no presente estudo indica uma pequena diferenciação genética entre as subpopulações Okajima, Norton_Tz e Norton_CM.

Na literatura são encontrados diversos estudos com marcadores moleculares buscando inferir a divergência genética entre populações de diferentes espécies da família Meliaceae (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de F_{ST} encontrados em estudos de espécies da família Meliaceae.

Nome Científico	Nome Vulgar	Número de Populações Avaliadas	Região/País	θ (F_{ST})	Autoria
<i>Swietenia macrophylla</i>	Mogno Brasileiro	05	Costa Rica	0,0631	Céspedes et al., 2003
<i>Swietenia macrophylla</i>	Mogno Brasileiro	07	Amazônia Brasileira	0,097	Lemes et al., 2003
<i>Swietenia humilis</i>	Mogno americano	03	Honduras	0,036	White e Powell, 1997
<i>Cedrela balansae</i>	Cedro	08	Argentina	0,049	Soldati, 2013
<i>Cedrela fissilis</i>	Cedro Rosa	03	São Paulo/Paraná/Minas Gerais	0,082*	Gandara, 2009
<i>Eugenia dysenterica</i>	Cagaiteira	10	Goiás	0,25	Zucchi, 2002
<i>Swietenia macrophylla</i>	Mogno Brasileiro	03	Costa Rica	0,24	Lowe et al., 2003
<i>Swietenia macrophylla</i>	Mogno Brasileiro	08	Região Mesoamérica	0,109	Novick et al., 2003
<i>Swietenia humilis</i>	Mogno americano	04	Honduras	0,032*	White et al., 1999
<i>Myrciaria dubia</i>	Camu-camu	17	Amazônia Brasileira	0,21	Rojas et al., 2011

*Valores encontrados de R_{ST} .

A pequena diferenciação genética encontrada entre as subpopulações de *K. ivorensis* desse estudo estão condizentes com subpopulações de espécies arbóreas da família Meliaceae. Subpopulações naturais de Cedro (*C. balansae*) obtiveram um valor de $F_{ST} = 0,049$ (Soldati, 2013). Em Honduras, um estudo realizado com *S. humilis* estimou que apenas 3,6% ($F_{ST} = 0,036$) da variação genética é atribuída à diferenciação entre as subpopulações (White & Powell, 1997). Para as subpopulações de *S. humilis* encontrou-se o valor de $R_{ST} = 0,032$ (White et al., 1999). Estes estudos, segundo a interpretação qualitativa do estimador, também apresentam pequena diferenciação genética entre as subpopulações. Porém, em subpopulações de mogno brasileiro *S. macrophylla* da Costa Rica e com subpopulações de cedro-rosa *C. fissilis* obtiveram uma diferenciação genética moderada entre as subpopulações, com valores maiores de $F_{ST} = 0,0631$ para a espécie de mogno (Céspedes et al., 2003) e de $R_{ST} = 0,082$ para a espécie de cedro (Gandara, 2009).

Na Amazônia brasileira foi detectado o valor de $\theta = 0,097$, que indicou uma moderada, mas significativa, diferenciação genética entre as subpopulações de *S. macrophylla* (Lemes et al., 2003). Este valor foi nove vezes maior que o encontrado para as subpopulações de *K. ivorensis*. Na Costa Rica, a análise de subpopulações de *S. macrophylla* utilizando microssatélites identificou valores maiores, com estimativas de $F_{ST} = 0,24$ (Lowe et al., 2003) e $\theta = 0,109$ (Novick et al., 2003). Os valores indicam que estas subpopulações possuem grande diferenciação genética quando comparada com outros trabalhos com espécies arbóreas da família Meliaceae, incluindo as subpopulações de *K. ivorensis* desse estudo. Por outro lado, também existem outros exemplos de estudos que encontraram valores altos de diferenciação em subpopulações de espécies arbóreas, como por exemplo, em *Myrciaria dubia* ($F_{ST} = 0,21$) (Rojas et al., 2011) e em *E. dysenterica* ($F_{ST} = 0,25$) (Zucchi, 2002). A baixa diferenciação genética encontrada para a subpopulação selecionada de *K. ivorensis* ($\theta = 0,008$) também foi encontrada em populações de melhoramento de *Pinus caribaea* ($F_{ST} = 0,021$) (Furlan et al. 2007).

Em resumo, a diversidade genética encontrada dentro das subpopulações de *K. ivorensis* desse estudo e a baixa divergência genética entre essas subpopulações estão de acordo com os resultados encontrados na maioria dos estudos com espécies arbóreas da família Meliaceae. O grau de diferenciação genética torna-se importantíssimo do ponto de vista de melhoramento, pois a partir desta estimativa é possível detectar a presença de estruturação genética facilitando a organização do germoplasma e o direcionamento de futuros cruzamentos na população de melhoramento (Furlan et al., 2007).

A fim de avaliar a distância genética entre os 53 indivíduos da população de *K. ivorensis*, os mesmos foram analisados em conjunto com o grupo controle composto por 12 indivíduos de *K. senegalensis*. Quanto mais próximo ao valor de um, maior é a distância genética entre os indivíduos ou populações. A distância genética entre os indivíduos da população de *K. ivorensis* e o *outgroup* (*K. senegalensis*) variou de 0,176777 a 0,957427. O padrão de divergência genética existente entre as duas espécies de mogno africano é claro no dendrograma (Figura 6). Como se esperava, é possível observar a formação de dois grupos bem distantes: um com *K. senegalensis* e outro com os indivíduos de *K. ivorensis*. Essa separação ocorreu, como esperado, consistentemente em 100% das 10.000 reamostragens *bootstrap*. Os valores de consistência gerados

validam a formação de cada ramificação (nó) no dendrograma (Cruz et al., 2011). A alta correlação cofenética ($r = 0,9288$) entre a matriz de distância genética e o dendrograma demonstra que a figura representa muito bem o padrão de divergência genética entre as 65 árvores analisadas.

Não há consistência, entre os grupos formados com as 53 árvores selecionadas de *K. ivorensis*, com menos de 50% dos *bootstrap* suportando a existência desses grupos. A única exceção ocorreu para a separação do genótipo 06i dos demais, que ocorre com consistência de 67%. Essa baixa consistência no agrupamento é explicada pela falta de estruturação genética evidente na população de melhoramento. Assim, como não existem diferenças significativas entre os grupos de indivíduos, não há formação de grupos consistentes. Esse baixo nível de estruturação genética contradiz a hipótese inicial de que as três subpopulações (Okajima, Norton_Tz e CM) apresentariam grandes diferenciações pelo fato de terem sido formadas por sementes oriundas de regiões distintas. Os resultados desse trabalho indicam que, provavelmente, as três subpopulações tenham sido originadas a partir de uma única população da África.

A baixa diferenciação genética entre as subpopulações de *K. ivorensis* também é corroborada pelos resultados de análise complementar realizada no programa *Structure*. Esse programa é muito útil para verificar o grau de organização da variabilidade genética na população. O diferencial desta análise é que durante a inserção dos dados não é necessário informar ao programa a origem dos indivíduos, ou seja, não se utiliza a informação de populações pré-estabelecidas. Ao contrário do que foi feito nas análises de estrutura genética com os estimadores F_{ST} ou θ , em que foram informadas as subpopulações *a priori* (Okajima, Norton_Tz e Norton_CM).

O programa *Structure* identifica as possíveis populações e atribui os indivíduos probabilisticamente às mesmas. Nesse caso, é assumido um modelo onde existem K populações, onde o número de populações (K) pode ser desconhecido. Assumindo valores diferentes de K , é possível testar qual é o número mais provável de populações. Cada uma das K populações é caracterizada pelo conjunto de frequências alélicas em cada locus (Pritchard et al., 2000). O valor de K mais provável será aquele em que cada uma das K populações possui frequências genotípicas mais próximas do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nesta análise, foi estipulado o valor de K variando de um a oito com um número elevado de iterações (30 simulações) para obter melhores

estimativas de média e variância para a probabilidade associada aos diferentes modelos testados (com K variando de 1 a 8). Para os indivíduos da população de melhoramento associados com o *outgroup* de *K. senegalensis*, o modelo com maior verossimilhança foi o de $K = 4$ (Figura 7), ou seja, a possível existência de quatro populações. Analisando o gráfico de barras (Figura 8) é possível observar que os indivíduos de *K. senegalensis* ficaram separados do restante dos indivíduos da população de *K. ivorensis*. Esse valor corrobora com o resultado observado no dendrograma, onde ocorreu a formação de dois grupos bem separados. Isso reflete o resultado que já se esperava, destacando a diferenciação genética existente entre as duas espécies.

A população de melhoramento também foi avaliada sem o grupo controle para avaliação da estruturação genética entre as árvores de *K. ivorensis*. De acordo com o método de Evanno et al. (2005) o valor de ΔK mais provável para esse conjunto de dados foi de $K = 5$ (Figura 9A). No entanto, o gráfico de barras (Figura 10) com o valor de $K = 5$ não demonstra que os indivíduos estão estruturados em cinco populações, dado que todos possuem probabilidades uniformes de pertencerem a todas as cinco populações. Segundo Evanno et al. (2005), um dos problemas do método empírico sugerido por eles para identificar o valor de K mais provável é que este não consegue avaliar a ausência de estruturação, que seria o valor de $K = 1$. Para a estimativa do valor de ΔK para escolha do melhor K , subtrai-se as estimativas médias de ΔK associados ao K sob teste com a média obtida para o modelo com $K-1$. Como o valor mínimo de K é um, fica impossível a estimativa de ΔK para $K = 1$, já que não existe $K = 0$.

A estimativa de ΔK leva em consideração não somente o salto de verossimilhança entre os modelos consecutivos (K e $K-1$), mas também o desvio padrão entre as iterações do modelo sob teste (Evanno et al., 2005). O desvio padrão entre as iterações tende a aumentar quando o K não corresponde ao real número de populações. Quando se avalia os valores de verossimilhança médio e desvio padrão estimados com as árvores selecionadas de *K. ivorensis* (Figura 9B), observa-se que o modelo mais provável é aquele com $K = 1$, ou seja, sem estruturação. Esse é o modelo mais verossímil e com menor desvio padrão entre as iterações. Esses resultados corroboram a baixa estimativa de θ , a ausência de consistência entre os grupos representados no dendrograma e a falta de grupos aparente no gráfico de coordenadas principais.

Sendo assim, em conjunto, esses resultados indicam que a distribuição da diversidade genética nas árvores selecionadas demonstrou mínima estrutura genética

entre as três subpopulações selecionadas (Okajima, Norton_Tz e Norton_CM). Estes resultados contrariam a hipótese inicial de que as populações poderiam apresentar uma maior estrutura genética, pelo fato de terem sido implantadas com sementes oriundas de diferentes origens. O presente estudo também mostrou que a subpopulação Okajima não tem grandes diferenças em relação às subpopulações Norton_Tz e CM, tanto em termos de nível de diversidade como de diferenciação genética. Com isso, existe uma alta probabilidade de que as sementes utilizadas para o plantio das cinco primeiras árvores da Embrapa Amazônia Oriental, que abasteceram a Fazenda do Sr. Okajima, e as sementes compradas da África que abasteceram a Fazenda do Norton vieram da mesma população de *K. ivorensis* ou de populações geneticamente conectadas na África. Outro fato importante a ser destacado é que a Tanzânia, país de onde vieram as sementes que originaram as árvores selecionadas no plantio Norton_Tz, não é centro de origem da espécie *K. ivorensis*. Portanto, essa subpopulação da Tanzânia deve ter se originado a partir da mesma população que originou as outras subpopulações.

Todas as informações obtidas neste estudo sobre a população de melhoramento de *K. ivorensis* são fundamentais para conhecer qual é o nível de diversidade genética e se existe diferenciação genética entre as diferentes populações introduzidas no país. Essas informações são muito importantes para guiar ações futuras de melhoramento genético da espécie e a conservação dos seus recursos genéticos.

6 CONCLUSÕES

1. A transferibilidade de marcadores microssatélites de *K. senegalensis* para *K. ivorensis* é factível;
2. O nível de diversidade genética dos indivíduos da Fazenda Okajima e da Fazenda Norton são semelhantes;
3. Há uma falta de estruturação genética entre as três subpopulações de onde as árvores foram selecionadas. Essa conclusão tem suporte tanto no baixo valor de índice de fixação entre subpopulações ($\theta = 0,008$), como pela fraca consistência entre os grupos obtidos na análise de agrupamento, e
4. A população de melhoramento constituída de *K. ivorensis* possui diversidade genética alta e comparável com a de populações naturais de mogno africano e mogno brasileiro. Com isso, é possível sua utilização em programa de melhoramento da espécie.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. P. F. et al. Ecofisiologia de plantas jovens de mogno africano submetidas a déficit hídrico e reidratação. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v. 48, n. 1, 2013.
- ALVES, P. F. et al. Diversidade genética e sistema de reprodução em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. procedente de Katherine River, Australia. **Revista Instituto Florestal**. v. 21, n. 2, 2009.
- ANGELO, H.; BRASIL, A. A.; DOS SANTOS, J. Madeiras tropicais: análise econômica das principais espécies florestais exportadas. **Acta Amazônica**. v. 31, n. 2, 2001.
- BARROS, A. C.; VERÍSSIMO, A. **A expansão madeireira na Amazônia: impactos e perspectivas para o desenvolvimento sustentável no Pará**. Belém: Imazon, 2002. 180 p.
- BARROSO, A. B. **Silvicultura especial de arboles maderables tropicales**. Habana: Editorial Científico-Técnica, 1987. 427 p.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 6. ed. Viçosa: UFV, 2013. 523 p.
- BRONDANI, R. P. V. et al. Development, characterization and mapping of microsatellite makers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 97, 1998.
- BRONDANI, R. P. V. et al. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. **BMC Plant Biology**. v. 6, 2006.
- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. **Molecular Genetic Genomics**. v. 267, 2002.
- CASTRO, A. C. et al. Sistema silvipastoril na Amazônia: ferramenta para elevar o desempenho produtivo de búfalos. **Ciência Rural**. v. 38, n. 8, 2008.
- CÉSPEDES, M.; GUTIERREZ, M. V.; HOLBROOK, N. M.; ROCHA, O. J. Restoration of genetic diversity in the dry Forest tree *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica. **Molecular Ecology**. v. 12, 2003.
- CHALMERS, K. J. et al. Evaluation of the extent of genetic variation in mahoganies (Meliaceae) using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 89, 1994.
- CITES. CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA. **Appendices I, II and III**, June 2013. Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>>. Acesso em: 08 jan. 2014.
- COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**. v. 23, mar. 1969.

- COCKERHAM, C. C. Analyses of gene frequencies. **Genetics**. v. 74, 1973.
- COELHO, A. S. G. **BOOD**: avaliação de dendrogramas baseada em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de *bootstrap*, versão 3.0. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2001.
- COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**. v. 83, 1999.
- COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**. v. 10, 2001.
- CORREIA, L. Q. **Avaliação comparativa de SNPs e microssatélites para identificação individual, determinação de parentesco e ancestralidade em espécies de *Eucalyptus***. 2011. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2011.
- COSSON, P.; DECROOCQ, V.; REVERS, F. Development and characterization of 96 microsatellite markers suitable for QTL mapping and accession control in an Arabidopsis core collection. **Plant Methods**. v. 10, n. 2, 2014.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 620 p.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa: UFV. 2001. 390 p.
- DESCRIÇÃO da espécie *Khaya ivorensis*. Disponível em: <www.mognoafricano.org/dicas/descricao-da-especie-kahaya-ivorensis/>. Acesso em: 12 jan. 2014.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, 1990.
- EARL, D. A.; HOLDT, B. M. Von. Structure harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**. v. 4, n. 2, 2012.
- ECTH, C. S.; MAY-MARQUARDT, P. Survey of microsatellite DNA in pine. **Genome**. v. 40, 1997.
- ELIAS, H. T. Variabilidade genética em germoplasma tradicional de feijão-preto em Santa Catarina. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v. 42, n. 10, 2007.
- ELSIK, C. G. et al. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. **Genome**. v. 43, 2000.

- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**. v. 14, 2005.
- FAGUNDES, P. R. O. **Propagação vegetativa de mogno africano**. 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2013.
- FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 1987. 279 p.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores-genético moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina (DF): Embrapa, 2007. 102 p.
- FALESI, I. C.; BAENA, A. R. C. **Mogno-africano *Khaya ivorensis* A. Chev. em sistema silvipastoril com leguminosa e revestimento natural do solo**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. 52 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 4).
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 1998. 220 p.
- FLINT-GARCIA, S. A. et al. Heterosis is prevalent for multiple traits in diverse maize germplasm. **PLoS ONE**, v. 4, 2009.
- FURLAN, R. de A., et al. Estrutura genética de populações de melhoramento de *Pinus caribaea* var. *Hondurensis* por meio de marcadores microsatélites. **Bragantia**. v. 66, n. 4, 2007.
- GANDARA, F. B. Diversidade genética de populações de cedro (*Cedrela fissilis* Vell. Meliaceae) no Centro-Sul do Brasil. 2009. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- GARRIS, A. J. et al. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**. v. 169, n. 3, 2005.
- GAULI, A. et al. Genetic similarity of natural populations and plantations of *Pinus roxburghii* Sarg in Nepal. **Annals of Forest Science**. v. 66, n. 7, 2009.
- GHADERI, A.; ADAMS, M. W.; NASSIB, A. M. Relationship between genetic distance and heterosis for yield and morphological traits in dry edible bean and fava bean. **Crop. Science**. v. 14, n. 1, 1984.
- GILLIES, A. C. M. et al. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. **Heredity**. v. 83, 1999.
- GBIF - Open Geospatial Consortium services, 2014. Disponível em: <<http://www.gbif.org/species/3852012#>>. Acesso em: 05 mar. 2014.
- GOLLE, D. P. et al. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**. v. 39, n. 5, 2009.

GOMES, D. M. **Análise de viabilidade técnica, econômico-financeiro para implantação da cultura do mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev.) na região oeste de Minas Gerais**. 2010. 70 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Gestão Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GOUDET, J. **FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices**, versão 2.9.3. 2002. Disponível em <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>>. Acesso em: 20 ago. 2013.

GOUVÊA, C. F. **Estudo do desenvolvimento floral em espécies arbóreas da família *Meliaceae***. 2005. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências: Biologia na Agricultura e no Meio Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: Borém, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa: UFV. 2007. cap. 8, p. 180-200.

GRATTAPAGLIA, D. Integração e operacionalização de um programa de melhoramento genético molecular. In: FONSECA, S. M. da et al. **Manual prático de melhoramento genético do Eucalipto**. Viçosa (MG): UFV, 2010. v. 1. p. 137-178.

GREENPEACE . **Nota do Greenpeace sobre a instrução normativa 22 do IBAMA sobre o Mogno**. 2001. Disponível em: <http://www.greenpeace.org/brasil/PageFiles/4138/gp_IBA_MAin22.pdf>. Acesso em: 25 out. 2012.

HARDY, O. J. et al. Microsatellite Allele Sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. **Genetics**. v. 163, 2003.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. Princípios de genética de populações. 4. ed. Artmed: Porto Alegre, 2010. 660 p.

HOSHINO, A. A., et al. Microsatellites as tools for genetic diversity analysis, genetic diversity in microorganisms. In: CALISKAN, M. **Genetic diversity in microorganisms**. Turkey: Intech, 2012. cap. 6, p. 149-170. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/geneticdiversity-in-microorganisms/microsatellites-as-tools-for-genetic-diversity-analysis>>. Acesso em: 25 fev. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **DOF: informação estratégica para a gestão florestal: período 2007-2009**. Brasília: Ibama, 2010. 56 p.

THE INTERNATIONAL TROPICAL TIMBER ORGANIZATION. **ITTO: sustaining tropical forests**. Annual Report, 2009. Disponível em: <www.itto.int>. Acesso em: 10 mar. 2014.

KAGEYAMA, P. Y. et al. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**. v. 64, 2003.

- KAGEYAMA, P. Y. Endogamia em espécies florestais. **IPEF – Série Técnica**. v. 2, n. 8, 1981.
- KARAN, M., et al. Rapid microsatellite marker development for african mahogany (*Khaya senegalensis*, Meliaceae) using next-generation sequencing and assessment of its intra-specific genetic diversity. **Molecular Ecology Resources**. v. 12, n. 2, 2012.
- LEMES, M. R. et al. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**. v. 12, 2003.
- LEMES, M. R. et al. Microsatellites for mahoganies: twelve new loci for *Swietenia macrophylla* and its high transferability to *Khaya senegalensis*. **American Journal of Botany**. 2011.
- LEMES M. R.; BRONDANI, R. P. V; GRATTAPAGLIA, D. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a Threatened Neotropical Timber Species. **Journal of Heredity**. v. 93, v. 4, 2002.
- LEMMENS, R. H. M. J. *Khaya ivorensis* A.Chev. In: LOUPPE, D.; OTENG-AMOAKO, A. A.; BRINK, M. (Edit.). **Timbers/Bois d'œuvre 1**. PROTA, Wageningen, Netherlands: Prota, 2008. Disponível em: <<http://www.prota4u.org/search.asp>>. Acesso em: 01 mar. 2013.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data, versão 1.0, 2001. Disponível em <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>. Acesso em: 15 set. 2010.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v. 15, 1984.
- LOWE, A. J. et al. Fine-scale genetic structure and gene flow within Costa Rican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*). **Heredity**. v. 90, 2003.
- LUNZ, A. M. et al. *Hypsipila grandella* em mogno (*Swietenia macrophylla*): situação atual e perspectivas. **Pesquisa Florestal Brasileira**. n. 59, 2009.
- MANEL, S et al. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 18, n. 4, 2003.
- MANGARAVITE, E. **Estrutura e diversidade genética no complexo *Cedrela fissilis* (Meliaceae) estimadas com marcadores microssatélites**. 2012. 42 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa. 2012.
- MARTIN, J. et al. Representativeness of microsatellite distributions in genomes, as revealed by 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. **BMC Genomics**. v. 11, n. 560, 2010.

MARTINS, I. S., PIRES, I. E., OLIVEIRA, M. C. de. Divergência genética em progênies de uma população de *Eucalyptus camaldulensis* DEHNH. **Floresta e Ambiente**. v. 9, n.1, 2002.

MARTINS, K. et al. Consequências genéticas da regeneração natural de espécies arbóreas em área antrópica, AC, Brasil. **Acta botânica brasílica**. v. 22, n. 3, 2008.

MAUÉS, M. M. A review of *Hypsipyla grandella* Zeller research in Pará State, Brazil. In: FLOYD, R. B.; HAUXWELL, C. **Hypsipyla ShootBorers in Meliaceae**. Austrália: ACIAR Proceedings, n. 97, 2001.

MELO, A. T. O. Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

MILLER, A. J.; GROSS, B. L. From forest to field: perennial fruit crop domestication. **American Journal of Botany**. v. 98, n. 9, 2011.

MILLER, F. et al. **Seja legal**: boas práticas para manter a madeira ilegal fora de seus negócios. Brasília: Rede Global de Floresta e Comércio do WWF. 2006. 80 p.

MORGANTE, M.; HENAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**. v. 30, 2002.

MORI, E. S. Variabilidade genética em uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção. 1993. 119 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1993.

MUDAS Nobres acompanhou primeira venda de mogno africano de investidores do Pará. Disponível em: <mudasnobres.com.br/noticias/52-mudas-nobres-acompanhou-primeira-venda-de-mogno-africano-de-investidores-do-para>. Acesso em: 12 jan. 2014.

NAGYLAKI, T. Fixation indices in subdivided populations. **Genetics**. v. 148, 1998.

NAIR, K. S. S. Tropical forest insect pests ecology, impact, and management. Cambridge (UK): Cambridge University Press, 2007. 424 p. Disponível em: <www.cambridge.org/9780521873321>. Acesso em: 12 fev. 2014.

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L. et al. **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. cap. 2, p. 29-55.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**. v.89, 1978.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**. v. 41, 1977.

- NEWTON, A.C.; LEAKEY, R.R.B.; MESÉN, J. F. Genetic variation in mahoganies: its importance, capture and utilization. **Biodiversity and Conservation**. v. 2, 1993.
- NIKLES, D. G., et al. Developing african mahogany (*Khaya senegalensis*) germplasm and its management for a sustainable forest plantation industry in northern Australia: progress and needs. **Australian Forestry**. Australia, v. 71, n. 1, 2008.
- NOVICK, R. R. et al. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Molecular Ecology**. v. 12, 2003.
- ODA, S. et al. Melhoramento florestal. In: BORÉM, A. **Biociências Florestal**. Visoça: UFV, 2007. cap. 6, p. 51-71.
- OLIVEIRA, A. C. B. et al. Avaliação da divergência genética em batata-doce por procedimentos multivariados. **Acta Scientiarum**. v. 22, n. 4, 2000.
- PAETKAU, D. C., W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. . Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**. v. 4, n. 3, 1995.
- PEREIRA, D. et al. **Fatos florestais da amazônia**. Belém: Imazon. 2010. p. 124.
- PINHEIRO, A. L. et al. Ecologia, silvicultura e tecnologia de utilização dos mogno-africanos (*Khaya* spp.). Viçosa: Sociedade Brasileira de Agrossilvicultura, 2011. 102 p.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**. v. 155, 2000.
- RIBEIRO, N. D.; MELLO, R. M.; DALLA COSTA, R.; SLUSSZ, T. Correlações genéticas de caracteres agromorfológicos e suas implicações na seleção de genótipos de feijão carioca. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 7, 2001.
- ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998, cap. 7, p. 329-380.
- ROGERS, J. S. Measures of genetic similarity and genetic distance. **University of Texas Publication**. v. 7, 1972.
- ROJAS, S.; CLEMENTCH, Y. K.; NAGAO, E. O. Diversidade genética em acessos do banco de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia* [H.B.K.] McVaugh) do INPA usando marcadores microssatélites (EST-SSR). **Revista Corpoica - Ciência y Tecnología Agropecuaria**. v. 12, n. 1, 2011.
- SANTOS, P. E. T. dos; FERREIRA, M.; KAGEYAMA, P. Y. Programa cooperativo do ipef “produção de híbridos”. **Circular técnica**. n. 156, 1988.
- SCAPIM, C. A. et al. Avaliação da diversidade genética em *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, por meio da análise multivariada. **Revista Ceres**. v. 6, 1999.

SEMENTES mogno africano *Khaya ivorensis* – sementes. Disponível em: <<http://ibflorestas.org.br/loja/mogno-africano-111/sementes-de-mogno-africano/semente-mogno-ivorensis.html>>. Acesso em: 12 jan. 2014.

SERRANO, A. L. M. ; GONÇALVES, R. S. ; GONÇALVES, A. O. Avaliação do impacto de políticas públicas federais no processo de desmatamento na Amazônia. **Revista de Administração e Negócios da Amazônia**. v. 5, n. 1, 2013.

SEXTON G. J. et al. Development and characterization of microsatellite loci for *Khaya senegalensis* (Meliaceae). **American Journal Botany**. v. 97, n. 11, 2010.

SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO E INSTITUTO DE PESQUISA AMBIENTAL DA AMAZÔNIA. **Florestas nativas de produção brasileiras**. Brasília (DF): SFB; IPAM, 2011, 24 p.

SIGRIST, M. S. Divergência genética em *Curcuma longa* L. utilizando marcadores microsatélites e agromorfológicos. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado em Área de Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia.) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2009.

SILVA, C. M. et al. Elevada diversidade genética interpopulacional em *Oryza glumaepatula* Steud. (Poaceae) avaliada com microsatélites. **Biota Neotropica**. v. 7, n. 2, 2007.

SILVA, L. V. M. S. da. **Propriedades físicas e mecânicas da madeira de mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev)**. 2013. 27 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Florestal) – Instituto Floresta, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

SOBRAL, L. et al. **Acertando o alvo 2**: consumo de madeira amazônica e certificação florestal no Estado de São Paulo. Belém: Imazon, 2002. 72 p.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**. v. 11, n. 1, 1962.

SOLDATI, M. C. et al. An assessment of the genetic diversity of *Cedrela balansae* C. DC. (Meliaceae) in Northwestern Argentina by means of combined use of SSR and AFLP molecular markers. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 47, 2013.

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

STEANE, D. A. et al. Development and characterization of microsatellite loci in *Eucalyptus globules* (Myrtaceae). **Silvae Genetica**. v. 50, n. 2, 2001.

SUTEU, D. et al. Romanian Maize (*Zea mays*) inbred lines as a source of genetic diversity in SE Europe, and their potential in future breeding efforts. **PLOS ONE**. v. 8, n. 12, 2013.

TARNOWSKI, C. G. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microsatélites (SSRS) para *Cedrela lilloi* c. de Candolle. 2010. 80 f. Dissertação (Programa de Pós-

Graduação em Recursos Genéticos Vegetais) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**. v. 12, n. 10, 1984.

TEMPLETON, A. R. **Population genetics and microevolutionary theory**. Wiley-Liss: USA, 2006. 716 p.

TREMACOLDI, C. R. et al. Cancro em mogno africano no estado do Pará. **Pesquisa florestal brasileiro**. v. 33, n. 74, 2013.

VERZIGNASSI, J. R.; POLTRONIERI, L. S.; BENCHIMOL, R. L. Mancha-alvo em mogno-africano no Brasil. **Summa Phytopathol**. v. 35, n. 1, 2009.

WAGNER, H. W.; SEFC, K. M. **IDENTITY 4.0 - Freeware program for the analysis of microsatellite data**, Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences Vienna, 5p., 1999.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**. v. 38, 1984.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Sunderland. 1996. 376 p.

WHITE, G.; W. POWELL, W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**. v. 6, 1997.

WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**. v. 8, 1999.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating. **Evolution**. v. 19, 1965.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Chicago: University of Chicago Press. v. 4, 590 p., 1978.

WRIGTH, S. **Variability within and among natural populations**. Chicago: University of Chicago Press. 580 p., 1951.

WWF. **Mogno: a poucos passos da extinção**. 2010. Disponível em: <http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/especiais/biodiversidade/especie_do_mes/julho_mogno.cfm>. Acesso em: 25 out. 2012.

XAVIER, A. et al. Aplicação da análise multivariada da divergência genética no melhoramento de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**. v. 20, n. 4, 1996.

YU, J. H. et al. Isolation and characterization of 13 novel polymorphic microsatellite markers for *Pinus koraiensis* (pinaceae). **American Journal of Botany**. v. 10, 2012.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR.** 2002. 130 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.