**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”**

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE TECA (*Tectona grandis*) DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS USANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

BERENICE KUSSUMOTO DE ALCÂNTARA

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas**

**PIRACICABA
2009**

**Berenice Kussumoto de Alcântara
Engenheira Florestal**

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE TECA (*Tectona grandis*) DE
DIFERENTES PROCEDÊNCIAS USANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES**

**Orientadora:
Prof^a. Dra. ELIZABETH ANN VEASEY**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas**

**PIRACICABA
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Alcântara, Berenice Kussumoto de

Caracterização da diversidade genética de Teca (*Tectona grandis*) de diferentes procedências usando marcadores microssatélites / Berenice Kussumoto de Alcântara . - - Piracicaba, 2009.
92 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Marcador molecular 2. Melhoramento genético 3. Proteção de plantas 4. Teca
variação genética I. Título

CDD 634.97338
A347c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original"

Albert Einstein

Porque só uma nova idéia faz a gente crescer

Berenice K. de Alcântara

À André Gracioso, com todo o meu amor.

OFEREÇO

Aos meus pais, Benedito e Lioko.

À minha querida irmã, Brígida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e a empresa PROTECA pelo apoio financeiro para este projeto.

À professora Elizabeth Ann Veasey, pela orientação, dedicação, confiança e amizade. Muito obrigada!!!

Ao Fernando Scognamiglio Torres, diretor da empresa PROTECA, que me concedeu todo o auxílio financeiro para a compra de materiais de laboratório e para a participação em congressos, pelo fornecimento dos materiais genéticos para a realização do projeto, pela paciência, pela confiança e amizade.

Ao professor Giancarlo Conde Xavier Oliveira pelos ensinamentos transmitidos, pelo apoio, paciência e sugestões para a melhoria do trabalho.

Ao doutor Marcelo Cavallari por me ajudar com a discussão dos resultados do Structure e pelas boas idéias.

Ao Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, a todos os seus professores pelo ensino de alta qualidade.

Aos funcionários do Departamento de Genética, em especial: Fernandinho, Berdan, Amaral, Márcio e Léia.

À todos os funcionários da empresa PROTECA que de alguma forma contribuíram com este trabalho, em especial à Irivan.

Ao meu companheiro, André, por todo o apoio e amor, pela grande paciência, conselhos e ajuda em todos os momentos.

Ao meu pai Benedito e minha mãe Lioko, por todo amor, pelo apoio incondicional aos meus estudos e por sempre acreditarem em meu potencial.

À Cris e Chico, meus sogros, por todo o apoio e pensamentos positivos.

Aos meus tios que sempre me apoiaram em meus estudos, em especial a minha madrinha Taeko, pelo grande incentivo.

À minha grande amiga e irmã, Brígida, por todo carinho e força em todos os momentos de minha vida. Te amo minha irmã!

À todos os amigos do curso de Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos meus amigos do Laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada, Lidinalva, Thiago, Marcos, Dani, Carol, Wellington e Patrícia. Obrigada, pelos ensinamentos, pelas sugestões e ouvidos!

Aos meus amigos do CENA, Aline e Gustavo que também contribuíram para enriquecer este trabalho, obrigada pelos ensinamentos nas práticas laboratoriais e pela grande amizade.

Às minhas amigas desde o início da graduação, Fernanda, Janaina e Aline, pelos ouvidos, conversas e amizade.

Às minhas amigas Alcione Cícera, Camila Reinert, Paula Martins, Ana Paula Cutolo, Flávia Lima, Adriana Doimo, Érika Mendonça, Daiane Pequeno, Cristiane Pequeno e Flávia Bisnoto, moradoras e ex-moradoras da casa 2 da Vila Estudantil, pelos bons momentos, conversas e amizade.

Aos meus amigos da Associação dos Pós-Graduandos: Gabi, Celso, Paulinha, Moisés, Gisele, Lú, Anderson e todos os membros atuais da APG, que compartilharam comigo o desejo e a luta por uma Pós-Graduação de qualidade.

À todos os meus amigos dos diversos Programas da Pós-Graduação da ESALQ.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Objetivos	22
1.2 Hipóteses	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 <i>Tectona grandis</i> L.F.	25
2.1.1 Classificação, origem e aspectos botânicos da espécie.....	25
2.1.2 Uso da espécie.....	29
2.1.3 Aspectos silviculturais	30
2.1.4 Importância comercial	31
2.1.5 Diversidade genética.....	32
2.2 Marcadores moleculares	34
2.2.1 Histórico e utilização.....	34
2.2.2 Uso como descritores.....	35
2.2.3 Marcadores microssatélites.....	36
2.2.4 Marcadores microssatélites em espécies arbóreas.....	37
2.3 Análises estatísticas para a diversidade genética	38
2.3.1 Importância no melhoramento e tipos de análises	38
2.3.2 Análise de agrupamento.....	39
2.3.3 Análise por coordenadas principais.....	40

3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Genótipos de teca	43
3.2 Análise dos microssatélites	47
3.2.1 Extração de DNA total de teca	47
3.2.2 Amplificação do DNA genômico utilizando microssatélite	48
3.2.3 Separação dos produtos de amplificação.....	49
3.3. Análise estatística	51
4 RESULTADOS	53
4.1 Extração de DNA total de teca	53
4.2 Otimização de <i>primers</i>	53
4.3 Caracterização molecular.....	54
4.3.1 Diversidade e estrutura genética.....	54
4.3.2 Agrupamento dos genótipos.....	59
4.4 Aferição da origem dos genótipos de Cáceres.....	64
5 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO.....	85

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE TECA (*Tectona grandis*) DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS USANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

A teca (*Tectona grandis*) é uma das principais espécies madeireiras do mundo, com alto valor econômico, muito famosa por sua beleza, resistência e durabilidade. A espécie ocorre naturalmente na Índia, Mianmar, Tailândia, Laos e Indonésia, onde estudos de diversidade têm sido realizados no que tange à conservação de recursos genéticos. Entretanto, existe a necessidade de estudos de diversidade genética de teca no Brasil que poderiam ser utilizados, principalmente, para a proteção de cultivares e para o melhoramento genético. Visto isso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética de genótipos de teca utilizados nos plantios brasileiros. Para tanto foram testados 10 *primers* de microssatélites, obtidos na literatura, para a avaliação de 60 genótipos, 33 provenientes de sementes de plantios de teca em Cáceres, 14 correspondentes a clones obtidos em Cáceres e 13 genótipos referentes a clones de procedências fora do Brasil, sendo estas, Honduras, Malásia, Índia, Indonésia, Costa do Marfim e Ilhas Salomão. Os genótipos foram divididos em oito grupos, de acordo com sua procedência, para a análise da diversidade genética. Foram realizadas análises multivariadas pelo método bayesiano no programa STRUCTURE, análises de agrupamento e coordenadas principais. Dos 10 *primers* testados, nove se mostraram polimórficos, sendo então utilizados para as análises estatísticas. Elevada variabilidade genética para os genótipos de teca foi detectada, sendo o número médio de alelos por loco igual a 5,22. Os genótipos de Cáceres apresentaram 100% de polimorfismo, seguido pelos clones da Índia com 90% de polimorfismo. A heterozigosidade média observada ($H_o = 0,352$) foi menor que a heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,443$). Coerentemente com outros estudos em teca, a maior parte da variabilidade genética concentrou-se dentro dos grupos ($H_s = 0,436$). Com as análises do programa STRUCTURE foi possível definir a divisão dos genótipos em três grupos, sendo 73,4% dispostos em um único grupo (vermelho) representado pela maioria dos genótipos de Cáceres, 13,3% alocados no grupo verde compostos por alguns clones da Índia, Ilhas Salomão, um clone da Malásia, um de Honduras e os clones da Costa do Marfim e os 13,3% dos genótipos restantes possuíram uma mistura dos dois grupos (vermelho e verde). A análise de agrupamento, utilizando índice de Jaccard, indicou a separação dos genótipos em seis grupos distintos: grupo I pertencente ao clone da Indonésia, grupo II possuindo dois clones da Índia, grupo III com os genótipos de Cáceres e dois clones de fora (um da Índia e outro da Malásia), grupo IV possuindo os genótipos de Honduras e Malásia, grupo V com clones da Índia e grupo VI pertencente aos clones da Costa do Marfim e das Ilhas Salomão, sendo coerente com a análise de coordenadas principais. Através do agrupamento utilizando distância de Nei, foi possível inferir duas possíveis origens da teca implantada no Brasil: Malásia e Índia. Após a avaliação das divergências genéticas, sugestões são feitas no que tange a utilização de genótipos contrastantes para o uso como parentais em programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: Diversidade genética; *Tectona grandis*; Microssatélites; Proteção de cultivares; Melhoramento genético

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF GENETIC DIVERSITY OF TEAK (*Tectona grandis*) FROM DIFFERENT PROVENANCES USING MICROSATELLITE MARKERS

Teak (*Tectona grandis*) is one of the main timber species in the world with high economic value, famous for its beauty, strength and durability. The species occurs naturally in India, Myanmar, Thailand, Laos and Indonesia, where diversity studies have been conducted with regard to the conservation of genetic resources. However, there is a need for studies of genetic diversity of teak in Brazil that could be used mainly for the protection of plant varieties and for breeding. Therefore, the objective of this study was to characterize the genetic diversity of teak genotypes used in Brazilian plantations. We tested 10 microsatellite primers, obtained in the literature, to assess 60 teak genotypes, 33 genotypes from seeds of plantations in Caceres, 14 clones obtained in Caceres and 13 clones originated from Honduras, Malaysia, India, Indonesia, Ivory Coast and Solomon Islands. The genotypes were divided in eight groups, in accordance to its origin, for the genetic diversity analysis. Multivariate analysis were conducted using the Bayesian method implemented in the program STRUCTURE, as well as cluster and principal coordinates analysis. Of the 10 primers tested, 9 showed polymorphism, and were then used for statistical analysis. High genetic variability for the teak genotypes was detected, with the average number of alleles per locus equal to 5.22. Caceres genotypes showed 100% polymorphism, followed by the clones from India with 90% polymorphism. The average observed heterozygosity ($\bar{H}_o = 0.352$) was lower than the average expected heterozygosity ($\bar{H}_e = 0.443$). Consistent with other studies in teak, most of the genetic variability was concentrated within groups ($H_s = 0.436$). With the analysis of the STRUCTURE software it was possible to define the division of the genotypes into three groups, 73.4% placed in one group (red) represented the majority of the genotypes of Caceres, and 13.3% allocated in the green group composed of some clones from India, a clone from Solomon Islands, Malaysia and Honduras and the clones of the Ivory Coast. The 13.3% of the remaining genotypes possessed a mixture of the two groups (red and green). Cluster analysis using Jaccard index indicated the separation of the genotypes into six distinct groups: group I belonging to the clone from Indonesia, group II having two clones from India, group III with genotypes from Caceres and two clones from India and Malaysia, group IV having the Honduras and Malaysia genotypes, group V with clones from India and group VI with clones belonging to the Ivory Coast and the Solomon Islands. This result was consistent with the principal coordinate analysis. From the results described above, together with the cluster analysis using Nei's distance, it was possible to infer two probable origins of teak implemented in Brazil: India and Malaysia. After assessing the genetic divergences, suggestions were made concerning the use of contrasting genotypes as parents in breeding programs.

Keywords: Genetic diversity; *Tectona grandis*; Microsatellites; Protection of plant varieties; Plant breeding

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 - Distribuição da área de ocorrência natural da teca (<i>Tectona grandis</i> L.f.) (Fonte: GRADUAL et al., 1999)	25
Figura 2 - Muda de teca (<i>Tectona grandis</i>) ideal para plantio (A) e plantio de teca com nove anos de idade (B)	28
Figura 3 - Produção de clones de teca (<i>Tectona grandis</i>) por enxertia (A) e por estaquia (B)	29
Figura 4 - Estruturas químicas da tectoquinona (A), lapachol (B) e tectograndona (C) observadas em teca (<i>Tectona grandis</i>)	30
Figura 5 - Plantios de teca da empresa FLORESTECA, localizados próximo à cidade de Cáceres, Mato Grosso, Brasil.....	44
Figura 6 - (A) Mudanças de clones de teca (<i>Tectona grandis</i>) mantidas em casa de vegetação do Departamento de Genética, ESALQ/ USP, para o teste de extração de DNA de material fresco; (B) tecas em casa de vegetação com oito meses de idade.....	45
Figura 7 - (A) Clones de teca pertencentes à empresa PROTECA enviados em tubos Falcon contendo sílica; (B) comparação da extração de DNA usando material seco apropriado (tubo 1) e usando material não apropriado (tubo 2)	45
Figura 8 - Quantificação em gel de agarose das extrações de DNA de teca (<i>Tectona grandis</i>)	48
Figura 9 - Quantificação em gel de agarose das soluções de DNA diluído de teca (<i>Tectona grandis</i>)	48

- Figura 10 - Gel de poliacrilamida comparando os métodos de extração de DNA de teca. O método 1 corresponde à Doyle; Doyle (1990); método 2, Borges et al. (2009) modificado e método 3, Saghai-Marooof et al. (1984).....53
- Figura 11 - Gel de poliacrilamida para otimização do *primer* 1 (CIRAD1TeakF05). R1, R2, R3 e R4 são repetições de quatro clones de teca.....54
- Figura 12 - (A) Teste de magnésio utilizando o *primer* 1 (CIRAD1TeakF05) e (B) *primer* 8 (CIRAD4TeakDa12). C2, C1 e A3 são clones de teca fornecidas pela empresa PROTECA54
- Figura 13 - Alelos encontrados para cada loco microssatélite e suas frequências em teca (*Tectona grandis*). Setas vermelhas indicam alelos raros (frequência menor que 0,05)56
- Figura 14 - Valores de ΔK para cada valor de K, calculado de acordo com Evanno et al. (2005). O maior valor de ΔK corresponde ao K ótimo.....60
- Figura 15 - Teste de atribuição para os genótipos de teca avaliados (K=2). A mesma cor para genótipos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo. A identificação dos genótipos são os números fora dos parênteses (tabela 1). Q = coeficiente de participação do indivíduo em cada grupo. Linha tracejada delimitando $0,5 < Q < 0,9$61
- Figura 16 - Dendrograma baseado na similaridade de Jaccard e agrupamento pelo método UPGMA para os 60 genótipos de teca. A consistência dos nós foi obtida através de 1.000 reamostragens *bootstrap*. As cores correspondem aos grupos obtidos na análise do Structure, sendo a cor roxa correspondente ao grupo misto. A linha tracejada corresponde à linha imaginária para a separação dos agrupamentos. Algarismos romanos indicam os seis principais agrupamentos encontrados.....63

- Figura 17 - Gráfico de dispersão por coordenadas principais obtido por marcadores SSR e similaridade genética dos 60 genótipos de teca estudados65
- Figura 18 - Dendrograma utilizando a distância de Nei (1978) e o método de agrupamento UPGMA, para a aferição da origem dos materiais introduzidos em Cáceres, MT, Brasil.....66
- Figura 19 - Géis de poliacrilamida no sistema não desnaturante para a avaliação do polimorfismo de microssatélites em teca (*Tectona grandis*)87

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Oito grupos de genótipos de teca (<i>Tectona grandis</i>) utilizados para caracterização genética	46
Tabela 2 - Relação das seqüências (F: <i>forward</i> ; R: <i>reverse</i>) dos 10 <i>primers</i> testados e respectivas amplitudes de tamanho das bandas esperadas para os microssatélites analisados em teca (<i>Tectona grandis</i>) (VERHAEGEN et al., 2005)	50
Tabela 3 - Alelos privados encontrados nos genótipos de teca avaliados	57
Tabela 4 - Valores de heterozigosidade média observada ($\bar{H}_o$) e esperada ($\bar{H}_e$), índice de fixação (F) e polimorfismo PIC para cada loco que se mostrou polimórfico para os genótipos de teca	57
Tabela 5 - Parâmetros da diversidade genética (P – frequência de locos polimórficos, $\bar{A}$ - número médio de alelos por loco, $\bar{H}_o$ = heterozigosidade média observada; $\bar{H}_e$ = heterozigosidade média esperada; F = índice de fixação) para os oito grupos de genótipos estudados	58
Tabela 6 - Diversidade dentro dos grupos (H_s), diversidade genética total (H_T), diversidade genética entre os grupos (D_{st}) e proporção da diversidade genética entre os grupos de genótipos estudados (G_{st}), em nove locos de teca (<i>Tectona grandis</i>)	59
Tabela 7 - DNA fingerprinting dos clones de teca (<i>Tectona grandis</i>) pertencentes à empresa PROTECA	88

1 INTRODUÇÃO

A implantação de teca (*Tectona grandis*) no Brasil tem se mostrado crescente nos últimos anos devido ao seu valor econômico que chega a ser mais alto que o mogno da Amazônia (IPEF, 2003). A madeira da teca é usada para a construção de navios, madeiramento de casas e fabricação de móveis por sua leveza, durabilidade e resistência (RONDON NETO et al., 1998). No entanto, os materiais de teca introduzidos no Brasil e utilizados no plantio em larga escala não foram ainda caracterizados molecularmente, sabendo-se pouco sobre sua diversidade genética e sua origem natural. Os estudos referentes à variabilidade genética em teca concentram-se, principalmente, nos países onde a cultura apresenta maior importância econômica.

A identificação de genótipos de plantas cultivadas constitui-se numa etapa importante nos programas de melhoramento e é essencial nos processos de proteção de cultivares, uma vez que as características morfológicas usadas na identificação destes genótipos são bastante limitadas, devido ao baixo número de marcas/caracteres disponíveis (BORÉM, 2005).

Em teca, variações entre clones têm sido observadas através de caracteres morfológicos (ALCÂNTARA; SOUZA, 2007). Sendo assim, existe a necessidade de caracterizações genéticas, uma vez que existe o interesse econômico na proteção dos cultivares de teca desenvolvidos. Entretanto, a proteção de cultivares de teca não é possível atualmente. Para agravar a situação, variedades que já são comercializadas a mais de um ano não podem ser mais protegidas (BRASIL, 2008). Diante dessa problemática, uma empresa de biotecnologia que desenvolve clones de teca (PROTECA), vende seus materiais genéticos para fins de experimentação em diversos locais, tendo o suporte de contratos de venda, garantindo assim a proteção futura de seus materiais. Deste modo, análises genéticas teriam mais uma importância no que tange a segurança dos contratos.

Com o advento de métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA e o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase (PCR), marcadores moleculares, tais como os microssatélites (FERREIRA et al., 1996) começaram a ser utilizados como descritores moleculares para identificação de clones, linhagens, híbridos e cultivares, e também em estudos de

diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento e parentesco, construção de mapas genéticos e seleção assistida por marcadores (BUSO et al., 2003).

Caracterizações moleculares com marcadores do tipo microssatélites têm sido amplamente realizadas em espécies arbóreas (DOW et al., 1995; BRONDANI et al., 1998; RAPOSO et al., 2007). Ademais, a utilização de marcadores microssatélites tem sido altamente indicada em estudos de diversidade genética, principalmente devido à sua reprodutibilidade, por serem mais informativos, possuírem ocorrência elevada e por serem amplamente distribuídos no genoma (GRATTAPAGLIA, 2001). Por outro lado, esta técnica requer amplo conhecimento das seqüências de DNA o que significa um substancial investimento financeiro e de mão-de-obra para o desenvolvimento destes marcadores (OLIVEIRA et al., 2006). Entretanto, uma vez desenvolvidos os *primers* para a espécie, a técnica se torna menos onerosa, o que aumenta sua acessibilidade. Em teca, 15 marcadores microssatélites já foram desenvolvidos a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas por Verhaegen et al. (2005), facilitando portanto a utilização destes marcadores em estudos de diversidade genética para fins de melhoramento e para a proteção de cultivares.

1.1 Objetivos

Buscando atender a necessidade de caracterizações genéticas de teca para informações a respeito da diversidade dos genótipos utilizados em plantios brasileiros, considerando a escassez de informações genéticas sobre os materiais introduzidos no Mato Grosso e visto que os marcadores microssatélites possuem inúmeras vantagens para o levantamento dessas informações, os objetivos deste trabalho foram:

- a) Caracterizar a diversidade genética de 33 indivíduos originários de sementes plantados na região de Cáceres;
- b) Caracterizar a diversidade genética de 27 clones de teca de diferentes procedências que foram fornecidos pela empresa PROTECA;
- c) Concluir, baseado nos dados obtidos nos itens a e b, sobre a origem do material genético inserido na Região de Cáceres;
- d) Caracterizar geneticamente os clones da empresa PROTECA para serem anexados aos contratos de venda para teste clonal, assegurando a proteção dos materiais genéticos obtidos pela empresa;

- e) Propor a utilização dos marcadores obtidos como descritores moleculares de teca no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

1.2 Hipóteses

Com base nas informações prévias a respeito da biologia da espécie e estudos morfológicos anteriores, algumas hipóteses puderam ser formuladas:

- a) Existe diversidade genética entre as diferentes procedências de teca, em função da distância geográfica destas procedências;
- b) Os materiais obtidos na cidade de Cáceres (MT) devem ser bastante divergentes dos materiais da procedência Ilhas Salomão, uma vez que em estudos morfológicos anteriores, os materiais desta procedência pouco se assemelharam aos materiais de Cáceres;
- c) Existe diversidade entre os genótipos plantados em Cáceres (diversidade dentro da população de Cáceres), devido ao sistema reprodutivo da teca que se caracteriza por ser uma espécie alógama;
- d) Existe mistura de materiais de procedências diferentes dentro da população plantada em Cáceres, uma vez que em estudos anteriores, características morfológicas de diferentes procedências foram encontradas nestes materiais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Tectona grandis* L.F.

2.1.1 Classificação, origem e aspectos botânicos da espécie

Tectona grandis L.f., popularmente conhecida como teca, é uma espécie arbórea diplóide com $2n=36$ cromossomos (HEDEGART; EIGAARD, 1965 apud SHRESTHA et al., 2005), classificada como sendo da Família Lamiaceae de acordo com o sistema APG II (SOUZA; LORENZI, 2008).

A distribuição da teca (Figura 1) é controversa, porém a maioria dos estudiosos acredita que sua ocorrência natural se dê apenas na Índia, Mianmar (ex-Birmânia), Tailândia, Laos e Índonésia com distribuição descontínua entre 10 e 25° N e entre 0 e 10° S, em 0 a 1300 m de altitude (GRADUAL, 1999).

Figura 1 - Distribuição da área de ocorrência natural da teca (*Tectona grandis* L.f.). (Fonte: GRADUAL et al., 1999)

Em virtude dessa gama de regiões, os intervalos de condições climáticas são muito amplos, com precipitações de 500 a 5000 mm anuais. O crescimento da espécie é máximo em regiões com precipitação entre 1270 e 3800 mm, requerendo um período de seca de 3 a 5 meses (MATRICARDI, 1989).

A teca foi introduzida em muitos países do sudeste asiático e alguns da África e das Américas. No Brasil, os plantios comerciais de teca iniciaram-se no final da década de 60, implantados pela empresa Cáceres Florestal S.A., na região do município de Cáceres – Mato Grosso, onde as condições climáticas são semelhantes às dos países de origem da espécie (MATRICARDI, 1989). Além das condições climáticas favoráveis, o solo de melhor fertilidade e tratos silviculturais mais adequados e intensos contribuíram para reduzir o ciclo de produção de 60 anos, na região de origem da teca (UGALDE; PÉREZ, 2001), para apenas 25 anos, na região de Cáceres-MT (IPEF, 2003).

A origem dos materiais de teca introduzidos no Brasil ainda é desconhecida. Somente têm-se registro de materiais provenientes da Índia que foram utilizados em plantios de teca realizados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro e no Horto Florestal de Rio Claro (MATRICARDI, 1989). De acordo com informações obtidas pela empresa PROTECA, em 1971, a empresa Cáceres Florestal S.A. plantou seus primeiros 4,8 hectares de teca com sementes obtidas em um pequeno plantio da Fazenda Morgante em Araraquara, SP, pertencente à usina Tamoio. Entre 1972 e 1975, foram plantados mais 91,3 hectares a partir de sementes importadas da ilha de Trinidad (América Central). Trinidad, por sua vez, chegou a ter aproximadamente 9.000 hectares de teca plantados pelos colonizadores ingleses, sendo que a principal procedência utilizada na introdução da teca em Trinidad foi Tenasserim, uma cidade portuária de Mianmar que não possui ocorrência natural de teca (STREETS apud WHITE, 1991). Com isso, a origem exata das sementes de Trinidad ou de Cáceres é desconhecida.

Atualmente, os reflorestamentos de teca têm se estendido em direção à Amazônia, sendo também encontrados nos estados do Acre, Pará e Rondônia (FIGUEIREDO, 2001; VIEIRA et al., 2001), e vêm substituindo a matéria-prima nativa originária de explorações irracionais. A Embrapa Acre e a EMBRAPA Amazônia Oriental (FIGUEIREDO, 2001) têm comprovado que o desempenho de algumas

espécies nativas às condições de plantio condensado não é satisfatória, pois muitas delas sofrem de severos ataques de pragas e fitomoléstias, como por exemplo, em reflorestamentos com mogno (*Swietenia macrophylla* King.) e cedro (*Cedrella odorata* L.), ambos fortemente atacados pela broca *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) que destrói o meristema apical, promovendo um crescimento irregular do tronco e impedindo o aproveitamento comercial. Por outro lado, espécies exóticas, como a teca, se adaptaram muito bem, provavelmente por causa da inexistência de inimigos naturais e rusticidade. Além disso, plantios de teca geralmente são implantados em pequenas áreas de pastagens ou em florestas secundárias em fase inicial de sucessão.

De acordo com Keiding (1985), a teca (Figura 2) em condições favoráveis pode chegar a uma altura de 30-40 m e diâmetro à altura do peito (DAP) maior que 100 cm. Sua madeira possui densidade que pode variar de 0,55 a 0,68 g/cm³, sendo acinzentada ou levemente marrom. As folhas são decíduas, opostas, com 25-50 cm de comprimento e 15-35 cm de largura, elípticas ou ovais, com face adaxial áspera, verde a verde-escura e face abaxial ligeiramente acinzentada. Possui flores bissexuais e idade de florescimento muito variável, dependendo da área, do clima, dos tratamentos silviculturais e da genética. Em climas em que a teca tem um rápido crescimento juvenil (oeste da África), o florescimento e a produção de sementes podem ocorrer dois anos após o plantio. No habitat natural da teca (Índia e Tailândia, por exemplo) o florescimento começa aos 6-8 anos, às vezes até mais tarde. O florescimento é anual, aproximadamente um mês após o período de chuvas. Os agentes polinizadores são insetos e o florescimento perdura por duas a quatro semanas.

A espécie se reproduz principalmente por fecundação cruzada. Kjaer et al. (1996) encontraram valores entre 89% e 95% para a taxa de alogamia em diferentes populações de teca. Changtragoon et al. (2000) observaram taxas de cruzamento semelhante (82% a 97%) em populações de teca na Tailândia utilizando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), indicando, também, a alogamia da espécie.

A propagação da espécie é realizada principalmente via sementes. Todavia, iniciativas têm sido realizadas para o desenvolvimento de técnicas de propagação vegetativa com a finalidade de produzir mudas clonais de maior qualidade. Protocolos

para micropropagação de teca via organogênese direta, mediante o enraizamento de brotos axilares e gemas apicais, foram desenvolvidos por Monteuiis et al. (1999), e têm sido aprimorados por Gradaille et al. (2000), Tiwari et al. (2002), Daquinta et al. (2002) dentre outros. Além da micropropagação, algumas empresas também têm utilizado técnicas de macropropagação (Figura 3).

Considerando estes aspectos, o melhoramento genético desta espécie arbórea usualmente tem sido realizado por meio de seleção clonal (GANGOPADHYAY et al., 2002). Ademais, a cultura de tecidos parece ser uma alternativa promissora para incremento da variabilidade genética em teca, tais como variantes somaclonais (GANGOPADHYAY et al., 2002), e para obtenção de variedades transgênicas via *Agrobacterium* (ALCÂNTARA; CARRER, 2006).

Figura 2 - Muda de teca (*Tectona grandis*) ideal para plantio (A) e plantio de teca com nove anos de idade (B)

Figura 3 - Produção de clones de teca (*Tectona grandis*) por enxertia (A) e por estaquia (B)

2.1.2 Uso da espécie

A teca possui grande importância econômica e corresponde a 4% da área total das espécies florestais plantadas no mundo (KRISHNAPILLAY, 2000), principalmente pela qualidade de sua madeira para a produção de peças de usos nobres e de móveis finos, para a utilização na carpintaria, marcenaria e indústria naval, onde é praticamente insubstituível, pelo fato de resistir ao sol, ao calor, ao frio e à água das chuvas e do mar (RONDON NETO et al., 1998).

Ademais, estudos químicos de teca têm registrado a presença de uma substância pertencente à classe das antraquinonas, a tectoquinona (Figura 4A), à qual são atribuídas propriedades antifúngicas, bactericidas e repelentes a ataques de alguns insetos, sendo por isso responsabilizada pela durabilidade da madeira quando exposta aos rigores do tempo (RUDMAN, 1958; THULASIDAS; BHAT, 2007). Além da tectoquinona, outras substâncias foram encontradas na espécie *Tectona grandis*, como o lapachol (Figura 4B) e uma naftoquinona-antraquinona, a tectograndona (Figura 4C), que é um corante natural (AGUINALDO et al., 1993).

Figura 4 - Estruturas químicas da tectoquinona (A), lapachol (B) e tectograndona (C) observadas em teca (*Tectona grandis*)

Assim sendo, além dos usos madeireiros, alguns estudos têm sido realizados para a utilização de produtos não madeireiros como em Santos et al. (2009) que utilizaram extratos de folhas de teca para obtenção de inseticida com a finalidade de controlar cupins da espécie *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae) obtendo 95% de mortalidade, e em Ponnusami et al. (2009) que utilizaram folhas de teca em pó como adsorventes de resíduos de tintura para tratamento de efluentes industriais. Ademais, o uso não madeireiro da teca em povos de culturas tradicionais também tem sido observado por Sacchetti (2009) que descreve a utilização dos extratos das folhas para tintura de tecidos.

2.1.3 Aspectos silviculturais

A teca é uma cultura perene com ciclo que varia de 25 a 80 anos (FIGUEIREDO, 2001; UGALDE; PÉREZ, 2001). No Brasil, o ciclo de 25 anos nas plantações de teca se deve principalmente ao elevado incremento médio anual (IMA), que tem variado de 15 a 25 m³.ha⁻¹.ano⁻¹ (FIGUEIREDO, 2001), sendo bem maior que de outros países, como por exemplo, Índia e Java, com IMA de aproximadamente 8 m³.ha⁻¹.ano⁻¹ e ciclo de 60 a 80 anos (UGALDE; PÉREZ, 2001).

A densidade de plantio pode variar de 1666 a 2173 árvores.ha⁻¹, equivalentes a espaçamentos de 3,0 x 2,0 m a 2,3 x 2,0 m, sendo recomendado o uso dos menores com desbastes mais freqüentes, pois estes apresentam o melhor desempenho silvicultural (FIGUEIREDO, 2001). A idade de aplicação do primeiro desbaste depende da qualidade de sítio, existindo algumas indicações, quanto à idade e à intensidade:

aos quatro anos e desbaste seletivo de 40% das árvores ou remoção de 25% das árvores seguida de nova retirada ao quinto ano do mesmo número de árvores (CORDERO; KANNINEN, 2003). A aplicação do primeiro desbaste também pode ser efetuada quando as árvores alcançam uma altura média de 9,0 a 9,5 m (KRISHNAPILLAY, 2000). Outro indicador para a época de aplicação do primeiro desbaste, segundo Galloway et al. (2001), é o fechamento do dossel, que tem sido muito utilizado devido à alta correlação com a redução do crescimento em diâmetro.

Para que os plantios de teca tornem-se mais produtivos, além do manejo e local apropriados, a qualidade das mudas também é de fundamental importância. Entretanto, a principal dificuldade para a produção de mudas dessa espécie é a germinação lenta e irregular das sementes. Comercialmente, o que é chamado de semente, na realidade, trata-se do fruto (IPEF, 2003), que é duro, possui alta resistência e é tetralocular, podendo conter até quatro sementes, com uma semente por lóculo (DABRAL, 1967). Entretanto, raramente as sementes se desenvolvem em todos os lóculos, sendo encontradas em geral 1-2 sementes por fruto (KEIDING, 1985).

A emergência em campo é relativamente baixa (25 a 35%) e desuniforme (de 10 a 90 dias) (KAOSA-ARD, 1986). Os primeiros procedimentos para superação da dormência de sementes de teca foram descritos há mais de 40 anos (DABRAL, 1967). Ngulube (1989) observou 15% de germinação com imersão prévia em água por 48 horas combinada com remoção do exocarpo e alternância entre secagem e imersão por 12 horas, durante 21 dias. Algumas empresas no Mato Grosso recomendam mergulhar os frutos em água corrente por 24 horas antes da sementeira ou maceração dos frutos em água, secagem durante três dias e repetição desse procedimento seis vezes, antes da sementeira (CALDEIRA et al., 2000; BRASIL, 1992).

2.1.4 Importância comercial

De acordo com IPEF (2003), o preço FOB do metro cúbico da madeira de teca pode chegar a US\$ 3000. Atrelando seu alto valor econômico com suas qualidades de resistência e durabilidade (RONDON NETO et al., 1998), a teca tem um grande potencial de ser um substituto no mercado do mogno (*Swietenia macrophylla* King.), cujo metro cúbico serrado alcançou preços de US\$ 1200 (ANGELO et al. 2001). No

período de 1980 a 1998, a participação do mogno representou 33,6% do valor das exportações de madeira serrada tropical, o que refletiu em uma super exploração da espécie levando a uma preocupação com a extinção da mesma e, conseqüentemente, uma maior restrição na sua extração (ANGELO et al., 2001).

Assim sendo, o decréscimo da oferta das madeiras tropicais que ocorrem em áreas naturais, como o mogno, e a conscientização ambiental dos consumidores, são fatores decisivos para o aumento da demanda da madeira de teca.

Os maiores produtores mundiais da madeira de teca são Indonésia, Mianmar e Sri Lanka e os principais importadores são Alemanha, Arábia Saudita, Austrália, Dinamarca e Estados Unidos, além dos centros que manufaturam e reexportam como Hong Kong e Cingapura (FAO, 2005). Entretanto, segundo Finger et al. (2001), a produção mundial ainda é extremamente baixa (3 milhões de m³/ano) quando comparada com a demanda dessa espécie. Veit (2000) afirmou que o desequilíbrio entre a oferta e a procura determinou a continuada valorização da madeira de teca, cujo preço registrou um ganho médio de 8,32% a.a., em dólar norte-americano, entre 1970 e 1999. Visto isso, o aumento da demanda devido à conscientização ambiental e às restrições de extração de madeira nativa atrelados com o desequilíbrio entre oferta e procura, vêm ainda mais contribuir para a valorização da madeira de teca.

2.1.5 Diversidade genética

O sistema reprodutivo por alogamia observado em teca (KJAER et al., 1996; CHANGTRAGOON et al., 2000) possibilita que altas taxas de diversidade sejam encontradas dentro das populações de teca, uma vez que a alogamia favorece a recombinação (HARTL, 2008).

Estudos referentes à variabilidade genética de *T. grandis* são escassos no Brasil, concentrando-se em países onde a cultura apresenta maior importância econômica. A maioria destes estudos buscou avaliar a diversidade genética por meio de marcadores moleculares.

Alguns exemplos de estudos de diversidade genética em teca podem ser citados como em Watanabe et al. (2004), que usaram marcadores RAPD para discriminação e identificação de 24 clones de teca. No primeiro *screening* foram usados

120 *primers* arbitrários, mas somente 24 *primers* geraram 26 fragmentos claros e não ambíguos que foram selecionados. No segundo *screening*, a reprodutibilidade para cada fragmento foi investigada por seis repetições de PCR, e 13 fragmentos encontrados foram os mais reprodutíveis sendo finalmente selecionados. Desta forma, os autores mostraram o poder discriminatório dos marcadores RAPD sugerindo o uso destes para a caracterização de clones de teca.

Shrestha et al. (2005) estudaram 28 genótipos de teca provenientes da Índia, Indonésia e Tailândia usando marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e observaram que 57% da variância genética ocorreu dentro de populações, enquanto que 43% ocorreu entre populações. Na análise de coordenadas principais e de agrupamento, foi verificado que as populações da Índia são claramente separadas das procedências Tailândia e Indonésia. No entanto, as populações da costa nordeste da Índia são exceção, o que mostra haver associações com ambas as populações. Alcântara; Souza (2007) analisando morfologicamente materiais provenientes de quatro procedências (Tailândia, Indonésia, Ilhas Salomão e Cáceres) observaram resultados coesivos com a análise genética de Shrestha et al. (2005), visto que as características morfológicas entre as procedências Tailândia e Indonésia foram as mais semelhantes entre si. A procedência Ilhas Salomão foi a mais divergente morfologicamente entre as três procedências e a população de Cáceres teve algumas semelhanças com Tailândia e Indonésia. Nicodemus et al. (2003), utilizando marcadores RAPD, notaram que populações da Índia têm maior diversidade genética que as populações da Tailândia.

O estudo de diversidade também tem sua importância no que tange a conservação dos recursos genéticos de teca, pois garante a manutenção dos mais divergentes genótipos dentro de um banco de germoplasma. Assim sendo, Fofana et al. (2009) utilizaram 15 marcadores microssatélites desenvolvidos por Verhaegen et al. (2005) para avaliar 166 árvores de teca distribuídas nas áreas naturais da espécie, com a finalidade de auxiliar nas estratégias de conservação. Foi observado neste trabalho que a Índia é o principal centro de diversidade de teca, o que foi coerente com trabalhos anteriores utilizando outros marcadores. Populações da Tailândia e Laos tiveram

metade da diversidade intra-populacional quando comparados com a Índia, entretanto eles se mostraram geneticamente distintos da população da Índia.

Os trabalhos acima referidos mostram, portanto, a importância de se desenvolver um trabalho utilizando marcadores moleculares em estudos de diversidade genética de teca no Brasil, visto que não se conhece ao certo a origem e a diversidade dos genótipos que foram introduzidos no Mato Grosso, estado pioneiro no plantio comercial da espécie.

2.2 Marcadores moleculares

2.2.1 Histórico e utilização

Até a década de 60 os marcadores utilizados em estudos de melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, com fenótipo de fácil identificação visual. Todavia, o baixo número de marcadores morfológicos diminuía a probabilidade de encontrar associações significativas entre estes marcadores e genes de importância econômica. Portanto, só ocasionalmente se encontravam marcadores morfológicos ligados a estes genes, reduzindo a possibilidade do uso destes marcadores em programas de melhoramento (BORÉM et al., 2005).

A evolução deste processo surgiu com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos, aumentando assim, significativamente, o número de marcadores genéticos, sendo que essa técnica passou a ser aplicada a todas as espécies de plantas. Posteriormente, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA. Inicialmente surgiu a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que utilizava enzimas de restrição permitindo a análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de DNA. Em seguida, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase (PCR), levou ao surgimento de outras classes de marcadores moleculares, tais como o RAPD, marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*), ou microssatélites, minissatélites, e marcadores AFLP (FERREIRA et al., 1996).

Atualmente, os marcadores moleculares têm sido utilizados com as mais diversas finalidades, tais como: identificação de clones, linhagens, híbridos e cultivares

(onde servem como descritores moleculares); estudos de fluxo gênico e estimativas de taxa de cruzamento e parentesco (BUSO et al., 2003). No melhoramento de plantas, as aplicações dos marcadores podem ser classificadas em três grupos: análise da diversidade genética entre indivíduos; construção de mapas genéticos; e seleção assistida por marcadores (SOUZA, 2001).

Para teca, alguns trabalhos de análise de diversidade genética podem ser citados (CHANGTRAGOON et al., 2000; NICODEMUS et al., 2003; WATANABE et al., 2004; SHRESTHA et al., 2005; FOFANA et al., 2009) e quanto ao melhoramento genético assistido, foi encontrado o trabalho de Araya et al. (2004) que utilizaram marcadores AFLP para análise da performance de famílias de teca em um teste de progênie com a finalidade de auxiliar a seleção de árvores de melhor qualidade. Os autores conseguiram agrupar as famílias de melhor desempenho quanto à qualidade da madeira, sendo que estas dividiam 61,6% de seus elementos genéticos.

2.2.2 Uso como descritores

Na Lei de Proteção de Cultivares do Brasil (lei Nº 9.456, de 25 de abril de 1997) define-se que um descritor é toda característica morfológica, fisiológica, bioquímica e/ou molecular que seja herdada geneticamente, utilizada na identificação de um cultivar.

Cultivar é a variedade de qualquer gênero ou espécie vegetal superior que seja claramente distinguível de outras cultivares conhecidas por margem mínima de descritores, por sua denominação própria, que seja homogênea e estável quanto aos descritores através de gerações sucessivas e seja de espécie passível de uso pelo complexo agroflorestal, descrita em publicação especializada disponível e acessível ao público, bem como a linhagem componente de híbridos.

Para eucalipto, a espécie florestal mais plantada comercialmente no Brasil, as instruções para execução de ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares são encontradas no site do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002). Nestas instruções, as características morfológicas são os principais descritores utilizados, e os marcadores moleculares são incluídos como informações adicionais. Outras culturas perenes, como por exemplo, tangerina e

laranja, também já possuem descritores para proteção de cultivares (BRASIL, 2006; 2007).

Para a teca, não existem descritores registrados (até o momento) no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no entanto variações de Teste de Procedências têm sido observadas através de caracteres morfológicos, tais como tamanho de folha, tamanho de flores e tipo de tricomas (ALCÂNTARA; SOUZA, 2007).

2.2.3 Marcadores microsatélites

De acordo com Hartl (2008), os marcadores microsatélites e minissatélites detectam polimorfismos baseados em seqüências que se repetem em tandem em um ou mais lugares no genoma.

A diferença entre os dois é que no polimorfismo dos microsatélites o núcleo de repetição (ou motivo) é muito curto variando de 2 a 9 pb. Um exemplo é a repetição:

5'- CATCATCATCATCATCAT... CATCATCATCATCATCAT - 3'
3'-GTAGTAGTAGTAGTAGTA...GTAGTAGTAGTAGTAGTA - 5'

Esta repetição também pode ser denotada como $(5'-CAT-3')_n$, onde n é o número de repetições no microsatélite. Um minissatélite tem a mesma estrutura de repetição, entretanto o motivo de repetição é maior, tipicamente variando de 10 a 60 pares de bases (HARTL, 2008).

De acordo com Oliveira et al. (2006), os microsatélites podem ser classificados em: i) Perfeitos: quando a seqüência repetida não é interrompida por qualquer base que pertença ao motivo, por exemplo: TATATATATA; ii) Imperfeitos: quando existem entre os motivos pares de bases que não correspondem ao mesmo, por exemplo: TATATATAcTATATATA e iii) Compostos: quando a seqüência contém duas seqüências repetidas distintas adjacentes, por exemplo: TATATATAGTGTGTGT, podendo estar presentes em muitos locais diferentes no genoma. Os núcleos de repetição podem conter um número diferente (n) de cópias de repetição, o que significa que em qualquer localização particular, uma repetição microsatélite tem alelos múltiplos na população, onde cada alelo difere em seu valor n . Repetições com di-, tri- e

tetranucleotídeos são as mais comuns (exemplos: $(CA)_n$, $(AAT)_n$, $(GATA)_n$) e são largamente distribuídas tanto nos genomas de animais como também no genoma de plantas (HANLON et al., 1999).

Além da ampla distribuição pelo genoma, outra vantagem da utilização de marcadores microssatélites sobre os demais marcadores baseados em PCR é a característica da co-dominância (OLIVEIRA et al., 2006). A co-dominância torna-os mais informativos, refletindo em maior valor do “PIC” (*Polymorphism Information Content*) em estudos de diversidade (GRATTAPAGLIA, 2001; ZUCCHI et al., 2002), *fingerprinting* (WRIGHT; BENTZEN, 1994), proteção de cultivares (PRIOLLI et al., 2002) e caracterização para conservação de germoplasma (MASONA et al., 2005).

Assim, em virtude da abundância e distribuição uniforme no genoma de eucariotos, associadas ao multialelismo e alto nível de polimorfismo com padrão de segregação co-dominante, os microssatélites têm tido ampla aplicação em estudos de mapeamento genético, genética de populações e identificação individual em humanos, animais e plantas (GLOWATZI-MULLIS et al., 1995; EVETT et al., 1997; GOLDSTEIN; SCHÖTTERER, 2003; PINTO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005; RAPOSO et al., 2007; KARASAWA et al., 2007; GANDARA, 2009).

As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, permitindo a seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (OLIVEIRA et al., 2006). Entretanto, esta técnica requer amplo conhecimento das seqüências de DNA o que significa um substancial investimento de tempo e dinheiro para o desenvolvimento destes marcadores. Por outro lado, uma vez desenvolvidos os *primers* específicos, há a compensação desse investimento, devido à simplicidade (pequena quantidade de DNA é requerida), eficiência (altos níveis de polimorfismo) e reprodutibilidade (devido à utilização de *primers* específicos) (OLIVEIRA et al., 2006).

2.2.4 Marcadores microssatélites em espécies arbóreas

Em plantas, um dos primeiros trabalhos publicados descrevendo marcadores microssatélites foi com espécies tropicais arbóreas (CONDIT; HUBBELL, 1991). Os

autores detectaram grande abundância de dinucleotídeos repetidos do tipo AG e AC no genoma de plantas, sendo que esta quantidade varia de espécie para espécie. Em *Pinus* a quantidade de AC é duas vezes maior que de AG (ECHT; MAY-MARQUARDT, 1997).

Atualmente, muitos locos SSR estão descritos para espécies arbóreas como *Eucalyptus* (BRONDANI et al., 1998), *Swietenia humilis* ou mogno da costa do Pacífico (WHITE; POWELL, 1997), *Pithecellobium elegans* (CHASE et al., 1996), *Caryocar brasiliense* ou piqui (COLLEVATTI et al., 1999), entre outras. Um exemplo do uso de SSRs para melhoramento de espécies arbóreas encontra-se em Santos et al. (2007) que relacionou marcadores microssatélites com a resistência à vassoura-de-bruxa no cacauzeiro (*Theobroma cacao*).

Em teca, marcadores baseados em microssatélites foram desenvolvidos a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas por Verhaegen et al. (2005). Os autores desenvolveram 15 seqüências de *primers* e encontraram principalmente repetições microssatélites GA e TC. Estes foram testados em 265 árvores individuais providas de diferentes populações (Índia, Tailândia-Laos, Indonésia e África). Os resultados mostraram uma média de 14,7 alelos por loco e uma heterozigosidade de 0,223 a 0,879, mostrando que estes locos constituem uma ótima ferramenta para estudos de fluxo gênico, análises de paternidade, dinâmica de populações e estudos de diversidade.

2.3 Análises estatísticas para a diversidade genética

2.3.1 Importância no melhoramento e tipos de análises

A diversidade genética entre um grupo de progenitores tem sido avaliada com o objetivo de identificar as combinações híbridas de maior efeito heterótico e maior heterozigose de tal forma que, em suas gerações segregantes, se tenha maior possibilidade de recuperação de genótipos superiores (CRUZ; REGAZZI, 2001).

Os melhoristas têm utilizado diversos métodos para acessar a diversidade genética e estabelecer relações entre acessos, sobretudo com a finalidade de promover seu uso em programas de melhoramento. Tais informações são usualmente obtidas a

partir de estudos genealógicos, avaliações de desempenho em cruzamentos dialélicos ou via delineamentos experimentais para estudos genéticos (DIAS, 1994). No caso dos cruzamentos dialélicos, a necessidade de avaliação dos genitores e suas combinações híbridas tornam a atividade demasiadamente onerosa, principalmente quando se procura avaliar um grande número de acessos.

Por dispensarem a obtenção prévia das combinações híbridas, os métodos preditivos de divergência entre genitores têm merecido considerável ênfase. São métodos preditivos aqueles que tomam por base as diferenças morfológicas, fisiológicas ou genéticas para a determinação da diversidade (MIRANDA et al., 2003).

Os métodos preditivos utilizam-se da análise multivariada para estimar a diversidade genética entre genótipos. Análises multivariadas têm por objetivo avaliar um conjunto de variáveis aleatórias relacionadas entre si, onde cada uma possui o mesmo grau de importância. A análise multivariada fornece índices e coeficientes de similaridade (ou distância genética), proporcionando grande contribuição ao melhoramento genético, uma vez que quanto maior a distância genética entre dois genótipos, maiores serão as chances de obtenção de combinações promissoras. Vários métodos multivariados podem ser empregados na predição da diversidade genética. Dentre eles, citam-se a análise por métodos aglomerativos (ou agrupamento), por variáveis canônicas, componentes principais e coordenadas principais (CRUZ; REGAZZI, 2001). A escolha do método multivariado mais adequado tem sido determinada pela precisão desejada pelo pesquisador, pela facilidade da análise e pelo tipo de dados obtidos, sejam eles moleculares ou fenotípicos (DIAS, 1994).

2.3.2 Análise de agrupamento

A análise de agrupamento tem por finalidade reunir, empregando algum critério de classificação, os acessos em grupos de tal forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos. Alternativamente, as técnicas de análise de agrupamento têm por objetivo dividir um grupo original de observações em vários grupos, segundo algum critério de similaridade ou de dissimilaridade (CRUZ, 1990).

A primeira etapa do processo de agrupamento consiste na estimação de uma medida de similaridade (ou dissimilaridade) entre os acessos. A escolha entre medidas

de similaridade ou dissimilaridade é subjetiva, considera diversos fatores como a natureza das variáveis ou as escalas das medidas (FERREIRA, 1993). Uma medida de similaridade muito empregada é o índice de Jaccard que utiliza dados binários, e para marcadores co-dominantes, as distâncias de Nei e de Rogers são muito utilizadas. As medidas de similaridade utilizando o índice de Jaccard são de grande importância em estudos de diversidade genética, em que se procura identificar genitores contrastantes para programas de hibridação (CRUZ; REGAZZI, 2001).

Os métodos de agrupamento mais empregados no melhoramento genético são os hierárquicos e os não-hierárquicos. Nos métodos hierárquicos, os genótipos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido um dendrograma, não havendo preocupação com o número ótimo de grupos, e sim, com a topologia do dendrograma examinado visualmente (CRUZ; REGAZZI, 2001; FERREIRA et al., 2007). Nos métodos não-hierárquicos, como o método Bayesiano, são atribuídas distribuições de probabilidade a um determinado parâmetro de modo a representar o grau de credibilidade nos diferentes valores que o parâmetro de interesse pode assumir (COELHO, 2002).

Uma vez que os métodos de agrupamento realizam transformações na matriz de similaridade ou dissimilaridade, pode ocorrer a formação de estruturas biológicas inexistentes (FERREIRA et al., 2007). Porém, o grau de concordância entre o dendrograma e a matriz pode ser posteriormente avaliado pelo coeficiente de correlação cofenética. Ainda, para melhor corroboração dos grupos formados, usualmente realizam-se procedimentos de reamostragem (*bootstrap*).

A análise de agrupamento por conglomeração geralmente tem sido complementada com outros métodos de análise multivariada com base nas dispersões em relação a eixos cartesianos, como no caso da análise da diversidade genética por componentes principais e coordenadas principais (CRUZ, 1990).

2.3.3 Análise por coordenadas principais

A técnica de análise da diversidade genética por coordenadas principais (PCoA) foi originalmente descrita por Gower (1966) e identificada por Rohlf (1972) como sendo a técnica mais satisfatória quando comparada com a de componentes principais (PCA),

visto que quando existem dados perdidos, estes não são considerados na análise. Na PCA, cada valor perdido é simplesmente substituído pelo valor médio do caráter ou marcador correspondente, fazendo com que indivíduos com muitos dados perdidos se agrupem mais proximamente ao centróide do grupo. Assim, a técnica da PCoA é mais recomendada que a técnica PCA quando há grande número de dados perdidos, pois estes são desconsiderados na análise (ROHLF, 1972). No caso da utilização de marcadores moleculares, a existência de dados perdidos pode estar associada a problemas na amplificação ou a presença de alelos nulos que são resultado de mutações, tais como substituição, inserção e deleção em uma ou em ambas as regiões de flanking dos *primers* no DNA, fenômeno que já foi descrito em diversos sistemas microssatélites (CALLEN et al. 1993).

Pode-se enumerar o uso da PCoA para os seguintes propósitos: a) construir índices que possibilitem o agrupamento de indivíduos; e b) permitir o agrupamento de indivíduos com mais alto grau de similaridade, mediante exames visuais em dispersões gráficas no espaço bi ou tridimensional (DIAS, 1998).

A utilização da técnica de coordenadas principais para estudos de divergência genética vem sendo aplicada em várias espécies de plantas (BALDONI et al., 2006; COCHARD et al., 2009). Esses estudos têm sido de grande utilidade na identificação de progenitores para cruzamentos, na manipulação de bancos de germoplasma, no estabelecimento da relação entre diversidade genética e geográfica, na avaliação da variabilidade total disponível em grupos geneticamente relacionados, etc. (DIAS, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Genótipos de teca

Clones de teca de diferentes procedências foram fornecidos pela empresa PROTECA e genótipos provenientes de sementes de plantios em Cáceres - Mato Grosso, Brasil (Figura 5) foram obtidos junto à empresa FLORESTECA.

A empresa PROTECA forneceu 27 clones de diferentes procedências (Tabela 1). Sete clones foram enviados em forma de mudas para o Laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada do Departamento de Genética da ESALQ/USP, Piracicaba, SP e foram acondicionados em casa de vegetação (Figura 6) para o teste de extração de DNA de material fresco.

A empresa FLORESTECA forneceu 50 indivíduos provenientes de plantios realizados em Cáceres e que foram originários de semente, entretanto somente 33 indivíduos foram utilizados no estudo genético devido a problemas de envio de material apropriado. Folhas secas em estufa à 30°C foram enviadas para a extração de DNA pelo método de Borges et al. (2009) modificado. Os 20 clones restantes, que não haviam sido enviados em forma de muda, foram trazidos posteriormente em forma de folhas secas em sílica, o que resultou em melhores resultados para a extração de DNA (Figura 7).

Para facilitar a análise dos parâmetros de diversidade genética entre os genótipos analisados, estes foram divididos em oito grupos, de acordo com a sua procedência: 1 - sementes de Cáceres, com 33 genótipos; 2 – Ilhas Salomão, com um genótipo; 3 – clones de Cáceres, com 14 genótipos; 4 – Malásia, com dois genótipos; 5 – Índia, com seis genótipos; 6 – Indonésia, com um genótipo; 7 – Costa do Marfim, com dois genótipos; e 8 – Honduras, com um genótipo (Tabela 1).

Figura 5 - Plantios de teca da empresa FLORESTECA, localizados próximo à cidade de Cáceres, Mato Grosso, Brasil

Figura 6 - (A) Mudas de clones de teca (*Tectona grandis*) mantidas em casa de vegetação do Departamento de Genética, ESALQ/ USP, para o teste de extração de DNA de material fresco; (B) tecas em casa de vegetação com oito meses de idade

Figura 7 - (A) Clones de teca pertencentes à empresa PROTECA enviados em tubos Falcon contendo sílica; (B) comparação da extração de DNA usando material seco apropriado (tubo 1) e usando material não apropriado (tubo 2)

Tabela 1 - Oito grupos de genótipos de teca (*Tectona grandis*) utilizados para caracterização genética

Grupo	Identificação	Genótipo	Procedência
1	1 a 33	S1 a S33	Brasil, Sementes de Cáceres
2	34	A3	Clone das Ilhas Salomão
	35	B1	
	36	B2	
	37	B3	
	38	B5	
	39	B6	
	40	B7	
3	41	B8	Brasil, Clones de Cáceres
	42	B9	
	43	B11	
	44	B12	
	45	B13	
	46	B14	
	47	B16	
	48	B17	
	49	C1	Clone da Malásia, Perlis
4	50	C2	Clone da Malásia, Kota Marudu
	51	D1	Clone do noroeste da Índia
	52	D2	Clone da Índia, região desconhecida
5	53	D3	Clone do leste da Índia
	54	D4	Clone do nordeste da Índia
	55	D5	Clone da Índia, região desconhecida
	56	D6	Clone do centro oeste da Índia
6	57	E2	Clone da Indonésia
7	58	G1	Clones da Costa do Marfim
	59	G2	
8	60	H1	Clone de Honduras

3.2 Análise dos microssatélites

3.2.1 Extração de DNA total de teca

Foram testados três métodos de extração de DNA a partir de folhas jovens de teca: Doyle; Doyle (1990), Borges et al. (2009) modificado e Saghai-Marooft et al. (1984). No primeiro método foram utilizadas folhas frescas maceradas em nitrogênio líquido, CTAB 3% e β -mercaptoetanol 1%; o segundo método foi baseado na extração de DNA utilizando folhas secas à 30°C em estufa, por 48 horas, sendo maceradas até obtenção de pó e colocadas em CTAB 3% e β -mercaptoetanol 1%; o último método baseou-se na extração de DNA de folhas frescas de teca maceradas em nitrogênio líquido, β -mercaptoetanol 0,1% e CTAB 1%.

A quantificação de DNA extraído a partir dos três testes acima citados foi realizada em géis de poliacrilamida 4%, em cubas de 40 cm x 15 cm contendo tampão de corrida (10% de TBE 10X e 90% de água destilada). A voltagem empregada foi de 60 Volts por 30 minutos e 120 Volts por 2 horas. A coloração foi feita com nitrato de prata (BASSAN et al., 1991), sendo que as bandas no gel foram fixadas com 0,25 g de nitrato de prata diluído em 125 ml de solução fixadora (100 ml de etanol absoluto, 5 ml de ácido acético e 895 ml de água destilada) por 5 minutos. Em seguida, o gel foi lavado com 125 ml de água destilada duas vezes durante 1 min. Após a retirada da água de lavagem, a revelação foi feita utilizando 400 μ l de formaldeído diluídos em 125 ml de solução reveladora (30 g de hidróxido de sódio e água destilada com volume completando 1000 ml). Após a revelação, os géis foram fotografados com máquina digital para arquivo, sendo utilizado, como referencial, DNA padrão (*lambda*) com amplitude de variação de 20, 40, 60 e 80 ng.

Após a comprovação da aplicabilidade do método de Borges et al. (2009) modificado utilizando folhas secas em estufa, o mesmo foi empregado para os genótipos da FLORESTECA (33 indivíduos de sementes) e os clones da PROTECA, visto que neste método as folhas podiam ser secas no local da coleta e enviadas sem grandes problemas para o local da análise viabilizando economicamente o transporte. Nos métodos em que folhas frescas são utilizadas na extração de DNA, existe a

necessidade da rapidez no transporte e da eficiência na manutenção de folhas verdes e frescas.

Após a extração de DNA dos materiais para o estudo do polimorfismo, este foi quantificado em géis de agarose a 1% (p/v) utilizando na aplicação 3 µl da solução de DNA misturados com 1 µl do corante *Blue-Green* e 4 µl de azul de bromofenol (0,1%). O tampão de corrida utilizado foi o TBE (1X) (10% de TBE 10X e 90% de água destilada) e o tempo de corrida foi de 40 minutos a 110 V. Os géis foram visualizados em transluminador UV (BioGlow, modelo ZT-21) pela intensidade de fluorescência emitida pelo *Blue-Green* e fotografados com máquina digital para arquivo (Figura 8). Essa intensidade foi comparada à de padrões com pesos moleculares de DNA padrão (*lambda*) com amplitude de variação de 10, 20, 50, 80 e 100 ng. O DNA quantificado foi diluído em água Milli-Q a 5 ng/µl para a obtenção das soluções de trabalho. A confirmação da concentração do DNA diluído também foi realizada em géis de agarose 1% usando o mesmo procedimento acima descrito (Figura 9).

Figura 8 - Quantificação em gel de agarose das extrações de DNA de teca (*Tectona grandis*)

Figura 9 - Quantificação em gel de agarose das soluções de DNA diluído de teca (*Tectona grandis*)

3.2.2 Amplificação do DNA genômico utilizando microssatélite

Foram testados 10 *primers* (Tabela 2) já estabelecidos para a espécie *T. grandis* (VERHAEGEN et al., 2005).

Para a otimização das temperaturas de anelamento, as amplificações por PCR (reação em cadeia de polimerase) foram conduzidas num volume final de 10,2 µL, contendo: 0,2 µL de TAQ-Polimerase (5U/µL); 1,0 µL de Tampão (10X); 1,0 µL MgCl₂ (50 mM); 0,5 µL de *Primer F* (5pmoles/µL); 0,5 µL de *Primer R* (5pmoles/µl); 1,0 µL de dNTP's (2,5 mM de cada), 3 µL de H₂O MilliQ e 3 µl de DNA da solução de trabalho (5

ng/ μ L). As amplificações por PCR foram realizadas inicialmente em gradiente para testar qual a melhor temperatura de anelamento, em termociclador da marca BioRad, modelo Mycycler, nas seguintes condições de amplificação: desnaturação a 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos a 94°C por 30 s, 51°C e demais temperaturas de anelamento testadas (52°C, 53°C, 55°C, 58°C, 60°C, 61°C e 62°C) por 45 s, e 72°C por 45 s, com uma extensão final de 72°C por 5 min (VERHAEGEN et al., 2005).

Após determinada a temperatura ótima de anelamento para cada *primer*, foram testadas quatro concentrações de MgCl₂ (5 mM; 2,5 mM; 2 mM e 1,5 mM) com a finalidade de melhorar a qualidade da visualização dos produtos da amplificação. Para isso, nas reações de PCR, foram utilizadas 1,0 μ l de MgCl₂ de soluções de trabalho com quatro concentrações diferentes, sendo estas: 50 mM, 25 mM, 20 mM e 15 mM de MgCl₂.

Após a otimização dos *primers*, as amplificações para as análises do polimorfismo genético foram conduzidas nas mesmas condições de amplificação citadas anteriormente, entretanto, para cada *primer* foi utilizada uma temperatura de anelamento ótima e a melhor concentração de MgCl₂ obtida no teste de concentração.

3.2.3 Separação dos produtos de amplificação

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% em sistema não desnaturante. A corrida eletroforética foi realizada em cubas médias com dimensões de 41 cm de largura por 19,5 cm de altura contendo tampão de corrida (10% de TBE 10X e 90% de água destilada) a uma voltagem inicial de 60 Volts (30 minutos) e final de 120 Volts (5 horas). A coloração foi feita com nitrato de prata (BASSAM et al., 1991), sendo que as bandas de microsstélites no gel foram fixadas com 0,25 g de nitrato de prata diluído em 125 ml de solução fixadora por 5 minutos. Em seguida, o gel foi lavado com 125 ml de água destilada duas vezes durante 1 min. Após a retirada da água de lavagem, a revelação foi feita utilizando 400 μ l de formaldeído diluídos em 125 ml de solução reveladora. Após a revelação, os géis foram fotografados com máquina digital para arquivo. Para a avaliação do tamanho das bandas foram utilizados como padrões os *ladders* de 10 pb e 100 pb (40 ng/ μ l). As

bandas de microssatélites resultantes foram avaliadas em transluminador de luz branca logo após o término da revelação.

Tabela 2 - Relação das seqüências (F: *forward*; R: *reverse*) dos 10 *primers* testados e respectivas amplitudes de tamanho das bandas esperadas para os microssatélites analisados em teca (*Tectona grandis*) (VERHAEGEN et al., 2005)

Nomes dos Locos	Seqüências dos <i>Primers</i>	Amplitude de tamanho das bandas (pb)
1. CIRAD1TeakF05	F: 5'- CTTCTGCAACCCTTTTTCAC - 3' R: 5'- AGCCATATCTTCCTTTCTCT - 3'	249-279
2. CIRAD1TeakG02	F: 5'- TTAACGCCAAATCCCAAAG - 3' R: 5'- CACAAAGAGAACCGACGAG - 3'	166-170
3. CIRAD1TeakH10	F: 5'- CGATACCTGCGATGCGAAGC - 3' R: 5'- CGTTGAATACCCGATGGAGA - 3'	225-273
4. CIRAD2TeakB07	F: 5'- GGGTGCTGATGATTTTGAGTT - 3' R: 5'- CTAAGGAGTGAGTGGAGTTTT - 3'	129-157
5. CIRAD2TeakC03	F: 5'- AGGTGGGATGTGGTTAGAAGC - 3' R: 5'- AAATGGTCATCAGTGTCAGAA - 3'	269-313
6. CIRAD3TeakDa09	F: 5'- CTCGCTTCTTTCCACATT - 3' R: 5'- ATCATCGCGCATCGTCAA - 3'	198-222
7. CIRAD3TeakF01	F: 5'- GCTCTCCACCAACCTAAACAA - 3' R: 5'- AAAACGTCTCACCTTCTCACT - 3'	198-234
8. CIRAD4TeakDa12	F: 5'- CGCACACCAGTAGCAGTAGCC - 3' R: 5'- GCCGGAAAAAGAAAAACCAAA - 3'	129-171
9. CIRAD4TeakF02	F: 5'- CCGGTAAAAAGGTGTGTCA - 3' R: 5'- GAGTGGAAGTGCTAATGGA - 3'	217-243
10. CIRAD4TeakH09	F: 5'- GCAAACCAACCTTACT - 3' R: 5'- CCGTTAGCACTCCATT - 3'	149-175

3.3. Análise estatística

Após a avaliação do polimorfismo nos géis de poliacrilamida, foram calculados os parâmetros de diversidade genética, tais como: número de alelos por loco (A), porcentagem de locos polimórficos (P), bem como a heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e), e o índice de fixação (f) para os oito grupos de genótipos estudados, os quais foram obtidos pelo programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001). Já as frequências alélicas e os parâmetros de diversidade genética de Nei (1973), tais como a diversidade genética total (H_T), a diversidade genética entre grupos (D_{ST}), a proporção da diversidade genética entre os grupos de genótipos (G_{ST}) e a diversidade genética dentro dos grupos (H_S) foram estimadas por meio do programa FSTAT (GOUDET, 1995). O valor do “PIC” foi calculado no site AGL Pic Calculator de acordo com a seguinte fórmula:

$$PIC = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

Onde:

P_{ij} = frequência do alelo j no marcador i

Foi utilizada a classificação de Botstein et al. (1980), sendo os marcadores com valores de “PIC” superiores a 0,5 considerados muito informativos, valores entre 0,25 e 0,5 considerados medianamente informativos e valores inferiores a 0,25, pouco informativos.

Para a discriminação entre os 33 genótipos de sementes e 27 clones amostrados, foi empregado o método bayesiano através do programa STRUCTURE versão 2,1 (PRITCHARD et al., 2000) para definir o número de grupos (K) mais provável não necessitando de informações hierárquicas, *a priori*. Foi utilizado o modelo de não mistura (*no admixture model*) e frequências alélicas independentes, usando *burn-in* de 200.000 seguido de uma extensão (*run length*) de 500.000. Foram realizadas cinco interações independentes com valores de K variando de 1 a 8, sendo que o número ótimo de grupos (K) foi estimado pelo método proposto por Evanno et al. (2005). A partir do valor de K ótimo, o gráfico correspondente a este valor foi

selecionado, considerando a menor variância entre as cinco interações independentes realizadas.

A separação dos grupos, utilizando o gráfico não-hierarquizado do STRUCTURE, foi realizada com base no valor do coeficiente de participação do indivíduo (Q) (PRITCHARD et al., 2000).

Em seguida, foram realizadas análises multivariadas de agrupamento através do índice de similaridade de Jaccard (1908), de acordo com a expressão:

$$S_{xy} = 100 \frac{a}{a + b + c}$$

Sendo:

a = número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos indivíduos;

b = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo x;

c = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo y.

A partir da matriz de similaridade de Jaccard, foi construído um dendrograma pelo método aglomerativo UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) (SNEATH; SOKAL, 1973) e realizada a análise multivariada por coordenadas principais (GOWER, 1966), utilizando o software PAST (HAMMER et al., 2001). Para a construção do dendrograma, o valor cofenético foi calculado visando informar o quanto da matriz original foi explicado pelo agrupamento e a consistência deste foi testada pelo procedimento de reamostragem utilizando 1.000 *bootstraps*.

Realizou-se também uma análise de agrupamento para os oito grupos de genótipos estudados (sementes de Cáceres, clones de Cáceres, clones das Ilhas Salomão, Indonésia, Índia, Malásia, Costa do Marfim e Honduras), utilizando as frequências alélicas obtidas para cada grupo para o cálculo da distância genética de Nei (1978) e método de agrupamento UPGMA. Para esta análise, foi utilizado o programa TFGA (MÜLLER, 1997). Reamostragens *bootstrap* foram realizadas no programa GDA (Genetic Data Analysis) (LEWIS; ZAYKIN, 2001).

4 RESULTADOS

4.1 Extração de DNA total de teca

Dentre os três métodos de extração de DNA que foram testados (método 1: DOYLE; DOYLE, 1990; método 2: BORGES et al., 2009 e método 3: SAGHAI-MAROOF et al., 1984), o método 1 foi o método que obteve melhores resultados quanto à quantidade do DNA com média de 65 ng/ μ l. No método 2, obteve-se uma média de 20 ng/ μ l. O método 3 não foi eficiente para a extração (Figura 10).

Embora o método 1 tenha sido mais eficiente na quantidade de extração de DNA, não houve diferença quanto a qualidade do DNA entre este e o método 2 no que tange a obtenção de DNA amplificado. O método 2 foi o mais apropriado para o estudo, pois este viabilizou a obtenção de materiais vegetais para o trabalho, visto que no método de Borges et al. (2009), não há a preocupação de manter folhas frescas durante o transporte, principalmente em se tratando de grandes distâncias entre o local de plantio e o local de condução das análises genéticas.

Figura 10 - Gel de poliacrilamida comparando os métodos de extração de DNA de teca. O método 1 corresponde à Doyle; Doyle (1990); método 2, Borges et al. (2009) modificado e método 3, Saghai-Marooof et al. (1984)

4.2 Otimização de *primers*

As temperaturas ótimas de anelamento foram 51°C para o *primer* CIRAD4TeakH09; 55°C para CIRAD1TeakG02, CIRAD2TeakB07 e CIRAD4TeakF02; 58°C para CIRAD1TeakH10; 60°C para os *primers* CIRAD1TeakF05 e CIRAD3TeakF01; 61°C para CIRAD3TeakDa09 e 62°C para os *primers* CIRAD2TeakC03 e CIRAD4TeakDa12. A Figura 11 mostra a otimização do *primer* 1 (CIRAD1TeakF05), como exemplo.

No teste realizado para diferentes concentrações de $MgCl_2$, observou-se melhor nitidez das bandas com a utilização da concentração de 1,5 mM de $MgCl_2$ (Figura 12), a

qual difere da concentração observada na literatura (VERHAEGEN et al., 2005), que foi de 2,5 mM.

Figura 11 - Gel de poliacrilamida para otimização do *primer* 1 (CIRAD1TeakF05). R1, R2, R3 e R4 são repetições de quatro clones de teca

Figura 12 - (A) Teste de magnésio utilizando o *primer* 1 (CIRAD1TeakF05) e (B) *primer* 8 (CIRAD4TeakDa12). C2, C1 e A3 são clones de teca fornecidas pela empresa PROTECA

4.3 Caracterização molecular

4.3.1 Diversidade e estrutura genética

Pela avaliação dos 10 locos microssatélites para os 60 genótipos estudados (33 de sementes e 27 clones), somente um loco (CIRAD1TeakG02, correspondente ao *primer* 2) não foi polimórfico. Considera-se um loco polimórfico quando o alelo mais

comum tem frequência inferior a 0,95 (ALFENAS, 1998). Os demais locos apresentaram porcentagem de polimorfismo igual a 100%. Em relação ao número de alelos por loco, o loco 3 (CIRAD1TeakH10) apresentou o maior valor (7,0), e o loco 6 (CIRAD3TeakDa09) o menor valor (3,0) (Figura 13). A média do número de alelos por loco foi de 5,22.

Do total dos alelos encontrados, 11 alelos apresentaram frequência menor que 0,05 (dois alelos nos locos 1, 7 e 8, e um alelo nos locos 3, 4, 5, 6 e 10), sendo estes denominados alelos raros (Figura 13). Ademais, foram observados três alelos privados nos materiais de Cáceres, dois alelos no clone das Ilhas Salomão, dois alelos nos clones da Índia e dois alelos se mostraram exclusivos nas procedências de Honduras e Indonésia (Tabela 3). Do total de alelos privados, apenas um (loco 1, alelo 235pb) foi um alelo raro.

Os valores da heterozigosidade média observada ($\bar{H}_o$) e esperada ($\bar{H}_e$) por loco, o índice de fixação (F) e o PIC podem ser observados na Tabela 4. O maior valor de F (0,734) foi encontrado para o loco 8 (CIRAD4TeakDa12) e o menor valor (0,108) foi encontrado para o loco 1 (CIRAD1TeakF05). A heterozigosidade média esperada variou de 0,298 para o loco 1 (CIRAD1TeakF05) até 0,751 para o loco 3 (CIRAD1TeakH10). Nota-se que quanto maior a heterozigosidade média esperada, maior o valor do PIC. Os locos 3 (CIRAD1TeakH10), 5 (CIRAD2TeakC03) e 9 (CIRAD4TeakF02) foram considerados muitos informativos de acordo com a classificação de Botstein et al. (1980). Por outro lado, a heterozigosidade média observada foi menor que a esperada, variando de 0,1 para os locos 2 (CIRAD1TeakG02) e 8 (CIRAD4TeakDa12) até 0,5 para o loco 3 (CIRAD1TeakH10).

Figura 13 - Alelos encontrados para cada loco microssatélite e suas frequências em teca (*Tectona grandis*). Setas vermelhas indicam alelos raros (frequência menor que 0,05)

Tabela 3 - Alelos privados encontrados nos genótipos de teca avaliados

Loco	Alelo (pb)	Frequência	Encontrado em
1	235	0,015	Cáceres
3	220	0,071	Cáceres
5	240	1,000	Indonésia
7	185	0,167	Índia
7	210	0,500	Ilhas Salomão
8	135	0,500	Honduras
8	140	0,500	Ilhas Salomão
9	190	0,321	Cáceres
10	155	0,250	Índia

Tabela 4 – Valores de heterozigosidade média observada ($\bar{H}_o$) e esperada ($\bar{H}_e$), índice de fixação (F) e polimorfismo PIC para cada loco que se mostrou polimórfico para os genótipos de teca

Loco	N	($\bar{H}_e$)	($\bar{H}_o$)	$F(IC_{95\%})$	PIC
1	60	0,298	0,267	0,108	0,394
3	60	0,751	0,500	0,337	0,730
4	60	0,328	0,200	0,392	0,406
5	60	0,632	0,350	0,448*	0,612
6	60	0,326	0,100	0,696*	0,387
7	60	0,425	0,367	0,140	0,460
8	60	0,374	0,100	0,734*	0,410
9	60	0,575	0,300	0,480*	0,546
10	60	0,432	0,300	0,307	0,469
Média	-	0,460	0,276	0,405	0,490

N = Número de indivíduos analisados

*significância a 95% de probabilidade usando 1.000 reamostragens “bootstrap” sobre locos

Pode-se observar na Tabela 5 que o número médio de alelos por loco, por procedência (A), variou de 1,3 para a procedência Honduras a 3,3 para os clones de Cáceres. A porcentagem de locos polimórficos (P) variou de 30 a 100%, sendo a

procedência de Cáceres (indivíduos de sementes e clones) representante da maior porcentagem de polimorfismo. Para a heterozigosidade média observada ($\bar{H}_o$), o valor mais baixo foi registrado para os clones de Cáceres (0,206) e o valor mais alto foi apresentado pelos clones das Ilhas Salomão e da Indonésia (0,444), sendo o valor médio desse índice igual a 0,276. A heterosigozidade média esperada ($\bar{H}_e$), ou diversidade gênica, variou de 0,333 até 0,574, com média de 0,460. O índice de fixação (F) calculado a partir desses valores variou de 0,0 (para três grupos compostos por somente um indivíduo - Ilhas Salomão, Indonésia e Honduras) a 0,481 (para os clones de Cáceres), sendo este valor significativamente distinto de zero a nível de 95% de probabilidade.

Tabela 5 - Parâmetros da diversidade genética (P – frequência de locos polimórficos, $\bar{A}$ - número médio de alelos por loco, $\bar{H}_o$ = heterozigosidade média observada; $\bar{H}_e$ = heterozigosidade média esperada; F = índice de fixação) para os oito grupos de genótipos estudados

Procedência	N [†]	P	$\bar{A}$	$\bar{H}_e$	$\bar{H}_o$	F (IC _{95%})
Sementes de Cáceres	33	1,0	3,1	0,333	0,259	0,222
Ilhas Salomão	1	0,4	1,4	0,444	0,444	0,000
Clones de Cáceres	14	1,0	3,3	0,397	0,206	0,481*
Malásia	2	0,9	2,2	0,574	0,389	0,322
Índia	6	0,8	3,0	0,538	0,407	0,243
Indonésia	1	0,4	1,4	0,444	0,444	0,000
Costa do Marfim	2	0,8	1,8	0,481	0,333	0,308
Honduras	1	0,3	1,3	0,333	0,333	0,000
Média	-	0,7	2,2	0,443	0,352	0,315

[†] Número de indivíduos avaliados

*significância a 95% de probabilidade usando 1.000 reamostragens "bootstrap"

A variabilidade genética total (H_T), pelo índice de Nei (1973), atingiu uma média de 0,591 (59,1%), mostrando alta diversidade genética. No entanto, a maior parte da diversidade genética está concentrada dentro dos grupos de genótipos ($H_S = 0,436$), considerando os nove locos avaliados (Tabela 6). Os valores de diversidade dentro dos grupos de genótipos (H_S) variaram de 0,177 (17,7%) a 0,619 (61,9%) para os locos 6 (CIRAD3TeakDa09) e 3 (CIRAD1TeakH10), respectivamente. A diversidade genética

entre os grupos de genótipos (Dst') registrou um valor mínimo de 0,023 (2,3%) para o loco 9 (CIRAD4TeakF02) e máximo de 0,378 (37,8%) para o loco 4 (CIRAD2TeakB07). A média deste índice foi de 0,177 (17,7%). Os valores da proporção da variação entre os grupos (Gst') variaram de 0,054 (5,4%) a 0,480 (48%) para os locos 9 e 4, respectivamente.

Tabela 6 – Diversidade dentro dos grupos (H_S), diversidade genética total (H_T), diversidade genética entre os grupos (Dst') e proporção da diversidade genética entre os grupos de genótipos estudados (Gst'), em nove locos de teca (*Tectona grandis*)

Locos	H_S	H_T	Dst'	Gst'
1	0,317	0,557	0,274	0,492
3	0,619	0,806	0,213	0,264
4	0,410	0,742	0,378	0,509
5	0,555	0,624	0,079	0,127
6	0,177	0,302	0,143	0,474
7	0,408	0,622	0,245	0,394
8	0,520	0,681	0,185	0,272
9	0,409	0,429	0,023	0,054
10	0,510	0,560	0,057	0,102
Média	0,436	0,591	0,177	0,299

4.3.2 Agrupamento dos genótipos

Para a análise da diversidade sem hierarquização, empregando a abordagem bayesiana realizada pelo programa STRUCTURE, foram testados os valores de K variando de 1 a 8, sendo o número ótimo de K escolhido a partir dos valores de ΔK (EVANNO et al., 2005). Por essa metodologia verificou-se o valor ótimo de K = 2 (Figura 14).

Figura 14 - Valores de ΔK para cada valor de K, calculado de acordo com Evanno et al. (2005). O maior valor de ΔK corresponde ao K ótimo

O gráfico não-hierarquizado foi escolhido de acordo com o teste de atribuição considerando $K = 2$ (Figura 15). Do total de 60 genótipos de teca analisados, 73,4% foram dispostos em um único grupo (vermelho), com $Q > 0,9$ (valor atribuído pela autora com base nos fundamentos de Ramalho et al., 2004), sendo Q = coeficiente de participação do indivíduo em cada grupo. Este grupo encontra-se representado pelos genótipos provenientes de sementes de Cáceres e pela maioria dos clones de Cáceres. Considerando $0,1 \leq Q \leq 0,9$, é possível observar um grupo misto, correspondendo a 13,3% dos genótipos, sendo estes: B3, B13 e B14 (clones de Cáceres), C2 (Malásia), D4, D5 e D6 (Índia) e E2 (Indonésia). Os 13,3% restantes foram alocados no grupo verde compostos por: clones D1, D2 e D3 (Índia), clone A3 (Ilhas Salomão), clone C1 (Malásia), clone H1 (Honduras) e clones G1 e G2 (Costa do Marfim). É interessante observar que parte dos clones de Cáceres possui similaridade de alelos provenientes do grupo verde, numa proporção em torno de 50% para dois dos clones de Cáceres (B13 e B14), o que provavelmente indica sua origem a partir das demais regiões. Por outro lado, os grupos 4 (Malásia) e 5 (Índia) apresentam maior proporção de alelos do grupo vermelho, ou seja, dos materiais de Cáceres, indicando desta forma que os materiais de Cáceres devem ter se originado dessas regiões.

Figura 15 - Teste de atribuição para os genótipos de teca avaliados (K=2). A mesma cor para genótipos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo. A identificação dos genótipos são os números fora dos parênteses (tabela 1). Q = coeficiente de participação do indivíduo em cada grupo. Linha tracejada delimitando $0,5 < Q < 0,9$

Foi também realizada uma análise de agrupamento, obtida a partir das medidas de similaridade baseadas no índice de Jaccard e pelo método aglomerativo UPGMA. A Figura 16 apresenta o dendrograma obtido nesta análise a partir dos dados moleculares bem como a correspondência desta com o teste de atribuição (Structure). O resultado demonstra uma alta similaridade entre os genótipos brasileiros. O valor cofenético calculado foi de 0,857, sugerindo que o dendrograma explica praticamente a totalidade da matriz de similaridade original.

De acordo com o resultado obtido, foi possível definir seis grupos divergentes dos genótipos de teca estudados:

- I. Clone E2 da Indonésia;
- II. Clones D4 e D5 da Índia;
- III. Materiais de Cáceres (clones e sementes), clone C2 (Malásia) e clone D6 (Índia);
- IV. Clones C1 e H1 (Malásia e Honduras);
- V. Clones D1, D2 e D3 (Índia);
- VI. Clones G1, G2 e A3 (Costa do Marfim e Ilhas Salomã)

Figura 16 - Dendrograma baseado na similaridade de Jaccard e agrupamento pelo método UPGMA para os 60 genótipos de teca. A consistência dos nós foi obtida através de 1.000 reamostragens *bootstrap*. As cores correspondem aos grupos obtidos na análise do Structure, sendo a cor roxa correspondente ao grupo misto. A linha tracejada corresponde à linha imaginária para a separação dos agrupamentos. Algarismos romanos indicam os seis principais agrupamentos encontrados

A representação da similaridade também pode ser observada na análise do gráfico de dispersão referente às coordenadas principais (Figura 17), sendo que as duas primeiras explicaram 20% e 8 % da variação total do material.

4.4 Aferição da origem dos genótipos de Cáceres

Para a obtenção da resposta do local de origem da teca que foi introduzida na região de Cáceres, foi realizada a análise que considera os grupos de genótipos estudados. Para esta análise, foi utilizado o índice de Nei (NEI, 1978) que utiliza as freqüências alélicas dos oito grupos de genótipos para a montagem do dendrograma (Figura 18). Observa-se que os materiais provenientes de Cáceres se agruparam mais proximamente com as procedências Malásia e Índia, sugerindo que estes materiais tenham se originado dessas duas regiões, o que é coerente com o dendrograma obtido pelo coeficiente de Jaccard, pois um clone da Índia (D6) e um clone da Malásia (C2) agrupou juntamente com os materiais de Cáceres. As procedências que foram mais divergentes dos materiais de Cáceres foram Honduras, Indonésia, Costa do Marfim e Ilhas Salomão.

Figura 17 - Gráfico de dispersão por coordenadas principais obtido por marcadores SSR e similaridade genética dos 60 genótipos de teca estudados

Figura 18 - Dendrograma utilizando a distância de Nei (1978) e o método de agrupamento UPGMA, para a aferição da origem dos materiais introduzidos em Cáceres, MT, Brasil

5 DISCUSSÃO

Os genótipos avaliados apresentaram elevados índices de diversidade genética ($\bar{A} = 5,2$; $\bar{H}_e = 0,33 - 0,57$) sendo coerentes quando comparados com os dados da literatura para teca ($\bar{A} = 5,0$; $\bar{H}_e = 0,32 - 0,78$) (FOFANA et al., 2009), maiores quando comparados com outras espécies arbóreas como *Vitellaria paradoxa* ($\bar{A} = 3,8$; $\bar{H}_e = 0,38 - 0,44$) (KELLY et al., 2004) e *Grevillea macleayana* ($\bar{A} = 3,7$; $\bar{H}_e = 0,42 - 0,53$) (ENGLAND et al., 2002), e menores quando comparados com *Eucalyptus globulus* ($\bar{A} = 9,0$; $\bar{H}_e = 0,70 - 0,83$) (MIMURA et al., 2009), *Carapa guianensis* ($\bar{A} = 12,0$; $\bar{H}_e = 0,35 - 0,83$) (RAPOSO et al., 2007) e *Melaleuca alternifolia* ($A = 23$, $H_e = 0,13 - 0,92$) (ROSSETTO et al., 1999).

Foram encontrados dois alelos privados no material das Ilhas Salomão localizados nos locos 7 (CIRAD3TeakF01) e 8 (CIRAD4TeakDa12), dois alelos privados nos materiais da Índia localizados nos locos 7 e 10 (CIRAD4TeakH09), um alelo privado no clone de Honduras localizado no loco 8 e um alelo privado no clone da Indonésia encontrado no loco 5 (CIRAD2TeakC03), ou seja, estes alelos se encontram exclusivamente nestes materiais podendo ser utilizados para diferenciar estes genótipos dos clones de Cáceres. O mesmo não se pode dizer dos três alelos privados encontrados nos materiais de Cáceres, visto que a amostra dos genótipos das outras regiões foi muito pequena. Assim sendo, os alelos que neste trabalho foram exclusivos dos materiais de Cáceres podem não ser quando outras populações da Índia ou da Malásia, por exemplo, forem amostradas.

O número de alelos por grupo variou de 1,3 a 3,3, sendo menores quando comparados com os dados encontrados por Fofana et al. (2009) que utilizaram marcadores microssatélites de teca em populações da Índia, Tailândia, Mianmar e Laos, e obtiveram o número de alelos por população variando de 2 a 7. Isso pode ser explicado devido à baixa amostragem de genótipos utilizado no presente estudo. Por outro lado, os dados do número absoluto de alelos por loco foram coerentes. No presente trabalho o loco 2 (CIRAD1TeakG02) não foi polimórfico e, portanto, não informativo para a diferenciação dos genótipos estudados. O mesmo loco foi o menos polimórfico em Fofana et al. (2009). O loco com maior conteúdo polimórfico informativo

encontrado neste trabalho foi o loco 3 (CIRAD1TeakH10) que também foi um dos que tiveram maior “PIC” no trabalho de Fofana et al. (2009). Também foi consistente o valor da heterozigosidade observada, visto que o loco CIRAD1TeakH10 obteve o maior valor nos dois trabalhos.

Considerando-se a estruturação genética do material avaliado, observou-se elevada diversidade total ($H_T = 0,591$), sendo que 70,1% desta diversidade corresponde à diversidade dentro dos grupos estudados, confirmando a hipótese da existência de alta diversidade genética dentro da população de Cáceres. Estes dados são coerentes com os dados encontrados na literatura (HALL et al., 1994; KAGEYAMA et al., 2004; FOFANA et al., 2009), pois a troca de material genético que ocorre pelo mecanismo da alogamia favorece a recombinação. Entretanto, foi possível observar um alto e significativo valor do índice de fixação ($F = 0,481$) para os clones de Cáceres, sugerindo que a fixação dos alelos seja consequência da obtenção de clones a partir de poucos genótipos de sementes de Cáceres que se mostram superiores, ocorrendo, assim, o efeito da deriva (fixação de alelos devido ao acaso) (HARTL, 2008). O índice de fixação poderia ser negativo caso os clones obtidos fossem originários de hibridações controladas utilizando genótipos contrastantes, visto que esta técnica aumenta a heterozigosidade da população (RAMALHO et al., 2004). Por outro lado, o índice de fixação dos materiais de sementes não foi significativo, refletindo que esta população se encontra em panmixia (HARTL, 2008).

A diversidade genética existente entre as procedências de teca ($D_{st}' = 0,177$) pode ser explicada pela distância geográfica. Quanto à elevada diversidade entre os genótipos de Cáceres e os outros grupos de genótipos (possível de ser observada no Structure), sugere-se que esta ocorre devido ao efeito fundador que é definido como o estabelecimento de uma nova população por meio de alguns poucos indivíduos que carregam consigo somente uma pequena fração da variação genética total da população parental (RIDLEY, 2003). Devido ao surgimento dos plantios de teca em Cáceres ser decorrente de uma amostra de algumas poucas populações, pode ter ocorrido que os poucos indivíduos considerados no presente estudo não foram suficientes para representar as populações que deram origem aos plantios de teca no Brasil. Na análise do Structure, os genótipos foram considerados como sendo de

grupos diferentes quando $Q > 0,9$, isso porque no melhoramento quando se utiliza a técnica do retrocruzamento para a recuperação do genoma de um parental, espera-se que se obtenha mais que 90% do genoma do parental desejado (RAMALHO et al., 2004). Assim sendo, foi considerado que os genótipos com $Q > 0,9$ para a coloração vermelha pertenciam ao grupo vermelho (sementes de Cáceres e maioria dos clones de Cáceres), enquanto que os genótipos com $Q > 0,9$ para a coloração verde pertenciam ao grupo verde (clones A3, G1, G2, D1, D2, D3, C1 e H1, todos originários de outros países) e os genótipos com ambas as cores, mas com Q variando entre 0,1 e 0,9 foram considerados pertencentes ao grupo misto (E2, C2, D4, D5, D6, B3, B13 e B14). Foi possível observar que dentre os 13,3% dos genótipos pertencentes ao grupo misto somente o clone E2 (Indonésia) se alocou no grupo basal (grupo I) do agrupamento de Jaccard. Ademais, alguns genótipos que no Structure ficaram definidos no grupo misto (B3, B13, B14, D6 e C2), no dendrograma se agruparam no grupo III, juntamente com os genótipos de Cáceres. Assim, sugere-se que a mistura dos genomas representados em vermelho e verde ocorre não devido a migração dos alelos do grupo vermelho para o grupo misto ou do grupo verde para o grupo misto (como tem sido observado em outros trabalhos como em Baldoni et al., 1999; Garriss et al., 2005; Cochard et al., 2009), mas o que é mais plausível para este caso é a identidade por descendência de alelos decorrente da amostragem aleatória em uma população finita.

Pelos resultados obtidos nos dendrogramas, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard e na distância genética de Nei, bem como no gráfico não-hierarquizado obtido pelo programa Structure, sugere-se que os genótipos de teca introduzidos na região de Cáceres tenham se originado de materiais da Índia e da Malásia. Analisando o dendrograma obtido pelo índice de Jaccard, é possível notar que o clone D6 da Índia agrupou-se juntamente com um grupo de genótipos de Cáceres e o clone C2 da Malásia agrupou-se juntamente com outro grupo de genótipos de Cáceres. Além disso, o grupo II, correspondente aos clones D4 e D5 da Índia, ficou alocado mais proximamente ao grupo III correspondente aos materiais de Cáceres. Da mesma forma, no dendrograma baseado na distância genética de Nei, os grupos referentes aos genótipos da Índia e Malásia foram os mais próximos geneticamente dos grupos de

sementes e clones de Cáceres, indicando assim a provável origem dos materiais de Cáceres a partir de genótipos desses dois países.

Embora sejam conhecidas as origens dos clones D1 (noroeste), D3 (leste), D4 (nordeste) e D6 (centro oeste da Índia), é arriscado fazer uma inferência de qual região da Índia veio a teca plantada no Brasil, visto que somente um indivíduo de cada região foi utilizado no estudo. Analisando o dendrograma pelo índice de Jaccard, foi possível observar que os seis clones da Índia se agruparam separadamente, sendo os clones D4 e D5 pertencentes ao grupo II, D6 pertencente ao grupo III e D1, D2 e D3 pertencentes ao grupo V. Esta divergência pode ser explicada com base em diversos trabalhos de diversidade de teca (KERTADIKARA; PRAT, 1995; SHRESTHA et al., 2005; FOFANA et al., 2009) que mostram que a Índia é o centro de diversidade da teca.

A divergência genética encontrada para os clones da Malásia (C1 e C2) pode ser explicada devido à origem de cada clone, sendo C1 proveniente da província de Perlis (Norte da Malásia) e C2 proveniente de Kota Marudu (localizada em uma ilha da Malásia).

Visto que historicamente os plantios de teca estabelecidos em Cáceres foram originados das ilhas de Trinidad, na América Central, é coerente que o clone de Honduras (H1) seja um dos menos divergentes geneticamente quando comparado com os outros clones da Indonésia (E2), Costa do Marfim (G1 e G2) e Ilhas Salomão (A3).

A divergência dos genótipos de Cáceres com relação aos genótipos da Indonésia e Ilhas Salomão é coerente com os dados obtidos em Alcântara; Souza (2007), que encontraram divergência de caracteres quantitativos e um caráter qualitativo (forma de tricoma) que diferenciou muito bem os três genótipos. Considerando o caráter qualitativo, os materiais das Ilhas Salomão apresentaram tricomas aracnóides e glandulares, enquanto que os genótipos de Cáceres apresentaram tricomas suberetos. A procedência Indonésia apresentou características intermediárias, possuindo tricomas suberetos, glandulares e tricomas eretos. Estes dados são consistentes com o estudo genético, visto que o dendrograma obtido com o índice de Nei (1978) apresentou um agrupamento que se ajusta com as informações morfológicas.

A divergência genética encontrada entre Indonésia e Malásia, que são próximas geograficamente, pode ser explicada baseado no trabalho de Kertadikara; Prat (1995)

que estudaram a variação isoenzimática de várias procedências de teca e discutem que a divergência encontrada nas populações de teca na Indonésia (mais especificamente na ilha Java) pode ser explicada devido à migração da teca possivelmente do leste de Mianmar ou Tailândia durante o período Pleistoceno. Assim, devido ao isolamento reprodutivo da teca nessa ilha, os 20.000 anos passados foram suficientes para a diversificação da teca nessa região.

Considerando a análise de cada genótipo individualmente, de acordo com o dendrograma obtido com o índice de Jaccard, os genótipos mais divergentes dos materiais de Cáceres foram os clones A3, G1, G2, D1, D2, D3, C1 e H1, sendo consistentes com a análise do Structure. É possível sugerir que esses clones possam ser utilizados em hibridações, visto que vários ensaios de híbridos têm sido realizados em outras espécies arbóreas (como o eucalipto) no intuito de explorar a expressão da heterose e também de conhecer o potencial que a mesma apresenta para o desenvolvimento de florestas a partir de clones híbridos (KAGEYAMA; KIKUTE, 1989; COTERILL, 1997). Os plantios clonais derivados de híbridos, produzidos por polinização controlada, apresentam ganhos realizados em produtividade da ordem de 100% em relação aos plantios feitos com sementes, justificando, assim, sua exploração comercial (ASSIS, 1996). Assim sendo, este estudo será de suma importância para a definição das escolhas de genótipos de teca que poderão ser utilizados em programas de melhoramento genético que visam a obtenção de híbridos de teca e aproveitamento da heterose.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir das hipóteses levantadas e dos objetivos deste trabalho geraram as seguintes conclusões:

Existe grande diversidade genética entre os genótipos de Cáceres e os genótipos de outras procedências.

Os materiais que apresentaram a maior divergência genética com relação aos genótipos de Cáceres foram os clones da Costa do Marfim e das Ilhas Salomão.

A maior parte da diversidade genética total encontra-se dentro dos grupos de genótipos estudados, que é condizente com o sistema reprodutivo por alogamia da espécie.

Os possíveis locais de origem da teca introduzida no Brasil são a Índia e a Malásia. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados utilizando tamanhos de amostragem mais significativos para se fazer tal afirmação.

Os dados genéticos obtidos por microssatélites são coerentes com dados morfológicos de teca obtidos em estudos anteriores.

Os dados de divergência obtidos serão úteis em programas de melhoramento de teca no Brasil.

Devido ao alto polimorfismo encontrado, será possível a utilização destes marcadores microssatélites no que tange à proteção de cultivares de teca no Brasil.

REFERÊNCIAS

- AGUINALDO, A.M.; OCAMPO, O.P.M.; BOWDEN, B.F.; WATERMAN, P.G. Tectograndone, an anthraquinone-naphthoquinone pigment from the leaves of *Tectona grandis*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.33, p.933-935, 1993.
- ALCÂNTARA, B.K.; CARRER, H. Construção de um vetor para a transformação genética de teca (*Tectona grandis*) com o gene cryIA(b). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 14., 2006, Piracicaba. **Resumos...** São Paulo: USP, 2006. 1 CD-ROM.
- ALCÂNTARA, B.K.; SOUZA, V.C. Identificação dos descritores morfológicos para teca (*Tectona grandis*). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 15., 2007, Pirassununga. **Resumos...** São Paulo: USP, 2007. 1 CD-ROM.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 574 p., 1998.
- ANGELO, H; BRASIL. A.A.; SANTOS, J. Madeiras tropicais: análise econômica das principais espécies florestais exportadas. **Acta Amazônica**, Manaus, v.31, n.2, p.224-237, 2001.
- ARAYA, E.; MURILLO, O.; GABRIEL, A.; ROCHA, O. **Possibilities of breeding teak (*Tectona grandis*) in Costa Rica assisted by AFLP markers**. Oxford: IUFRO, 451 p., 2004.
- ASSIS, T.F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, Brasília, v.18, n.185, p.32-51, 1996.
- BALDONI, L.; TOSTI, N.; RICCIOLINI, C.; BELAJ, A.; ARCIONI, S.; PANNELLI, G.; GERMANA, M.A.; MULAS, M.; PORCEDDU, A. Genetic Structure of Wild and Cultivated Olives in the Central Mediterranean Basin. **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, p. 935–942, 2006.
- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, Holanda, v.196, p.80, 1991.
- BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. 969p.
- BORGES, A.; ROSA, M. S.; RECCHIA, G. H.; SILVA, J. R. Q.; BRESSAN, E. A.; VEASEY, E. A. CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.66, n.4, 2009.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M; DAVIS, R.W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v.32, n.3, p.314-331, 1980.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de eucalipto, gênero: *Eucalyptus*, subgênero: *Symphyomyrtus*, seções: transversaria, exsertaria e maidenaria**. 2002. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 26 ago. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de tangerina (*Citrus* L.)**. 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 26 ago. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de laranja (*Citrus* L.)**. 2007. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 26 ago. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Legislação Brasileira sobre proteção de cultivares**. 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 26 ago. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei Nº 9.456, de 25 de abril de 1997**. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br>>. Acesso em: 28 maio 2007.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*. **Theoretical and Applied genetics**, New York, v.97, p.816-827, 1998.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZHON, M. C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R. V. marcadores microssatélites em espécies vegetais – desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento**, Brasília, n.30, p.46-50, 2003.

CALDEIRA, S.F.; CALDEIRA, S.A.F.; MENDONÇA, E.A.F.; DINIZ, N.N. Caracterização e avaliação da qualidade dos frutos de teca (*Tectona grandis* L.f.) produzidos no Mato Grosso. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.22, n.1, p.216-224, 2000.

CALLEN, D.F.; THOMPSON, A.D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H.A.; RICHARDS, H.I., MULLEY, J.C., AND SUTHERLAND, G.R. Incidence and origin of “null alleles” in the “AC” microsatellite markers. **The American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v.52, p.922-927. 1993.

CHANGTRAGOON, S.; SZMIDT, A. E. **Genetic diversity of Teak (*Tectona grandis* L.f.) in Thailand revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers.** Oxford: Forestry Institute, 83 p., 2001.

CHASE, M.R.; MOLLER, C.; KESSELI, R.; BAWA, K.S. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, New York, v.83, n.1, p.51-57, 1996.

COCHARD, B.; ADON, B.; REKIMA, S.; BILLOTE, N.; CHENON, D.R.; KOUTOU, A.; NOUY, B.; OMORÉ, A.; PURBA, A.R.; GLAZSMANN, J.C.; NOYER, J.L. Geographic and genetic structure of African oil palm diversity suggests new approaches to breeding. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 5, n. 3, p. 493-504, 2009.

COELHO, A.S.G. **Abordagem Bayesiana na análise genética de populações utilizando dados de marcadores moleculares.** 2002. 92 p. Tese (Doutorado – Genética e Melhoramento de Plantas) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2002.

COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATAPALIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, London, v.83, p.748-756, 1999.

CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, Ottawa, v.34, p.746-57, 1991.

CORDERO, L.D.F.; KANNINEN, M. Hacia el manejo intensivo de la teca (*Tectona grandis*) en Centroamérica. 2003. 10 p. Disponível em: <www.una.ac.cr/inis/docs/teca/temas/PerezyKanninen1.pdf>. Acesso em: 17 Abr. 2007.

COTERILL, P.P. **Nucleous breeding: Is it ok for *Pinus* and *Eucalyptus*?** Oxford: Forestry Institute, 284 p., 1997.

CRUZ, C.D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas.** 1990. 188 p. Tese (Doutorado – Genética e Melhoramento de Plantas) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1990.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** 2.ed. Viçosa: UFV, 2001. 390p.

DABRAL, S. L. Extraction of teak seeds from fruits, their storage and germination. **Indian Forester**, Dhera Dun, v.102, n.10, p.650-658, 1967.

DAQUINTA, M.; RAMOS, L.; CAPOTE, I.; LEZCANO, R. RODRÍGUEZ, R.; ESCALONA, M. Morfogénesis *in vitro* de Teca (*Tectona grandis* L.). **Investigación agrária: Sistemas y recursos forestales**, Madrid, v.11, n.1, p.137-144, 2002.

DIAS, L.A.S. **Divergência genética e fenética multivariada na predição de híbridos e preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 1994. 94 p. Tese (Doutorado – Genética e Melhoramento de Plantas) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. cap. 9, p.405-475.

DOW, B. D.; ASHLEY, M.V.; HOWE, H.F. Characterization of highly variable (GA/CT) microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.91, p.137-141, 1995.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of Plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, p.13-18, 1990.

ECHE, C.S.; MAY-MARQUARDT, P. Survey of microsatellite DNA in pine. **Genome**, Ottawa, v.40, p.9-17, 1997.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v.14, p.2611-2620, 2005.

EVETT, I.W.; GILL, P.D.; LAMBERT, J.A.; OLDROYD, N.; FRAZIER, R.; WATSON, S.; PANCHAL, S.; CONNOLLY, A.; KIMPTON, C. Statistical analysis of data for three British ethnic groups from a new STR multiplex. **International Journal of Legal Medicine**, Münster, v.110, n. 1, p.5-9, 1997.

ENGLAND, P.R.; USHER, A.V.; WHELAN, R.J. Microsatellite diversity and genetic structure of fragmented populations of the rare, fire-dependent shrub *Grevillea macleayana*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 967–977, 2002.

FAO. FAO Forestry databases. 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 22 ago. 2007.

FERREIRA, D.F. **Métodos de avaliação da divergência genética em milho e suas relações com os cruzamentos dialélicos**. 1993. 72 p. Dissertação (Mestrado – Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal Lavras, Lavras, 1993.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p.

FERREIRA, M.E.; MORETZSOHN, M.C.; BUSO, G.S.C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p.377- 420.

FIGUEIREDO, E. O. **Reflorestamento com teca (*Tectona grandis* L.F.) no estado do Acre**. Rio Branco: EMBRAPA, 2001. 28p. (Documento, 65).

FINGER, Z; FINGER, F. A.; DRESCHER, R. Teca (*Tectona grandis* L.f.): plante esta idéia. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL, , 2001, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2001. 1 CD-ROM.

FOFANA, I.J.; OFORI, D.; POITEL, M.; VERHAEGEN, D. Diversity and genetic structure of teak (*Tectona grandis* L. f.) in its natural range using DNA microsatellite markers. **New forests**, Oklahoma, v.37, p.175-195, 2009.

GALLOWAY, G.; UGALDE, L.; VÁSQUEZ, W. Importance of density reductions in tropical plantations: Experiences in Central America. **Forests, Trees and Livelihoods**, Aboyne, v.11, n.3, p.217-232, 2001.

GANGOPADHYAY, D.; GANGOPADHYAY, S.B.; PODDAR, R.; GUPTA, S.; MUKHERJEE, K.K. Micropropagation of *Tectona grandis*: assessment of genetic fidelity. **Biologia Plantarum**, Prague, v.46, n.3, p.459-461, 2003.

GARRIS, A.J.; TAI, T.H.; COBURN, J.; KRESOVICH, S.; MCCOUCH, S. Genetic Structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**, Pittsburgh, v. 169, p.1631-1638, 2005.

GLOWATZI-MULLIS, M.L.; GAILLARD, C.; WIGGER, G.; FRIES, R. Microsatellite-based parentage control in cattle. **Animal Genetics**, Maiden, v.26, p.7-12, 1995.

GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites**: evolution and applications. Oxford: Oxford University Press, 1999. 352 p.

GOUDET, J. FSTAT (Version1.2): a computer program to calculate F statistics. 1995. Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 20 ago. 2009.

GOWER, J.C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, Oxford, v.53, p. 325-338, 1966.

GRADAILLE, M. D.; RAMOS, L.; LEZCANO, Y.; RODRÍGUEZ, R.; SCALONA, M. Algunos elementos en la micropropagación de la Teca. **Biotecnología Vegetal**, Avila, v.1, p.39-43, 2000.

GRADUAL, L; KJAER, E.D.; SUANGTHO, V.; SAARDAVUT, P.; KAOSA-ARD, A. Conservation of genetic resources of teak (*Tectona grandis*) in Thailand. In: LINN, F. **DFSC Series of Technical Notes**. Humlebaek: Danida Forest Seed Centre, 1999. 38 p.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares para espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.de; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.967-993.

HALL, P.; CHASE, M.R.; BAWA, K. Low genetic variation but high population differentiation a common tropical forest tree species. **Conservation Biology**, Boston, v. 8, n. 2, p. 471-482, 1994.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 20 ago. 2009.

HANLON, P.C.O.; PEAKAL, L.; BRIESE, D.T. A review of new PCR-based genetic markers and their utility to weed ecology. **Weed Research**, Hoboken, v.40, p.239-254, 2000.

HARTL, D. L. **Princípios de genética de população**. Ribeirão Preto: FUNPEC. 2008. 217 p.

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS (IPEF) ***Tectona grandis***. 2003. Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/tectona.grandis.asp>> Acesso em: 27 maio 2007.

KAGEYAMA, P.Y.; CARON, D.; GANDARA, F.B.; MARTINS, K.; WADT, L.H.O.; LACERDA, C.M.B.; BOUFLEUER, N.T.; RIBAS, L.A.; MORENO, M.A.; FERRAZ, E.M. Genetic and ecological aspects of nonwood forest product exploitation in two western Amazonian settlements. In: VICENTI, B.; AMARAL, W.; MEILLEUR, B. (Orgs.). **Challenges in managing forest genetic resource for livelihoods: examples from Argentina and Brazil**. Roma: IPGRI, 2004, p. 149-217.

KAGEYAMA, P.Y.; KIKUTE, P. Comparison between open pollinated and clonal progenies originated from a population of *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden. **IUFRO Conference on Breeding Tropical Trees**. Oxford: Forestry Institute, p. 227-235, 1989.

KAOSA-ARD, A. Teak (*Tectona grandis* Linn. f.) nursery techniques with special reference to Thailand. In: LINN, F. **DFSC Series of Technical Notes**. Humlebaeck: Danida Forest Seed Centre, 1986. 42 p.

KARASAWA, M.M.G.; VENCOVSKY, R.; SILVA, C.M.; ZUCCHI, M.I.; OLIVEIRA, G.C.X.; VEASEY, E.A. Genetic structure of Brazilian *Oryza glumaepatula* Steud. (Poaceae) populations studied with microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, n.2, p.400-410, 2007.

KEIDING, H. Teak: *Tectona grandis* In: LINN, F. **DFSC Series of Technical Notes**. Humlebaeck: Danida Forest Seed Centre, 1985. 21 p.

KELLY B.A., HARDY O.J., BOUVET J.M. Temporal and spatial genetic structure in *Vitellaria paradoxa* (shea tree) in an agroforestry system in southern Mali. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 1231–1240, 2004.

KERTADIKARA, A.W.S.; PRAT, D. Isozyme variation among teak (*Tectona grandis* L.f.) provenances. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.90, p.803-810, 1995.

KJAER, E.D.; SIEGISMUND, H.R.; SUANGTHO, V. A multivariate study on genetic variation in teak (*Tectona grandis*). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.45, n.5-6, p.361-368, 1996.

KRISHNAPILLAY, B. Silviculture and management of teak plantations. **Unasyilva**, Rome, v.51, n.201, p.14-21, 2000.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data (software). Version 1.1. Disponível em: <<http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>>. Acesso em: 20 ago. 2009.

MASONA, S.L.; STEVENSA, M.R.; JELLENA, E.N.; BONIFACIOB, A.; FAIRBANKSA, D.J.; COLEMANA, C.E.; MCCARTIA, R.R.; RASMUSENA, A.G.; MAUGHANA, P.J. Development and use of microsatellite markers for germplasm characterization in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Crop Science**. Madison, v.45, p.1618-1630, 2005.

MATRICARDI, W.A.T. **Efeito dos fatores do solo sobre o desenvolvimento da teca (*Tectona grandis* L.F.) cultivada em Grande Cárceres – Mato Grosso**. 1989, 135p. Dissertação (Mestrado - Ciências Florestais) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1989.

MIMURA, M.; BARBOUR, R.C.; POTTS, B.M.; VAILLANCOURT, R.E.; WATANABE, K.N. Comparison of contemporary mating patterns in continuous and fragmented *Eucalyptus globulus* native forests. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 18, p.4180-4192, 2009.

MIRANDA, G. V.; COIMBRA, R. R.; GOGOY, C. L.; SOUZA, L. V.; GUIMARAES, L. J. M.; MELO, A. V. Potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.6, p.681-688, 2003.

MONTEUUIS, O.; BON, M.C.; GOH, D. K. S. **Teak propagation by in vitro culture**. Montpellier : CIRAD-Forêt, 1999. 5p. (Technical note n, 225).

NARAYANAN, C.; DUBEY, S.; WALI, S.A.; SHUKLA, N.; KUMAR, R.; MANDAL, A.K.; ANSARI, S.A. Optimization of DNA extraction for ISSR studies in *Tectona grandis* L.f. an important forest tree species. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.5, n.13, p. 1220-1223, 2006.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Pittsburgh, v.89, n.3, p.583-590, 1978.

NGULUBE, R. M. Seed germination, seedling growth and biomass production of eight central American multipurpose trees under nursery condition in Zomba, Malawi. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.27, p.21-27, 1989.

NICODEMUS, A.; NAGARAJAN, C.; NARAYANAN, M. RAPD variation in Indian Teak populations and its implications for breeding and conservation. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON QUALITY TIMBER PRODUCTS OF TEAK FROM SUSTAINABLE FOREST MANAGEMENT. 2003, Peechi. **Anais...** Peechi: Kerala Forest Research Institute, 2003. p. 321- 330.

OLIVEIRA, E.J. ; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I. ; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes**, Nottingham, v.5, p.331-333, 2005.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.2, p.294-307, 2006.

PINTO, L.R. ; VIEIRA, M.L.C. ; SOUZA JUNIOR, C.L. ; SOUZA, A.P. Genetic-diversity assessed by microsatellites in tropical maize populations submitted to a high-intensity reciprocal recurrent selection. **Euphytica**, Dordrecht, v.134, p.277-286, 2003.

PONNUSAMI, V.; SRIVASTAVA, S.N. Studies on application of teak leaf powders for the removal of color from synthetic and industrial effluents. **Journal of Hazardous Materials**, Pohang, v.169, p.1159-1162, 2009.

PRIOLLI, R.H.G.; MENDES-JUNIOR, C.T.; ARANTES, N.E.; CONTEL, E.P.B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.25, p.185-193, 2002.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Pittsburgh, v.55, p.945-959, 2000.

RAMALHO, M.A.P; SANTOS, B.J.; PINTO, C.A.B. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2004. 472 p.

RAO, C.R. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York: John Wiley, 1952. 390 p.

RAPOSO, A.; MARTINS, K.; CIAMPI, A.Y.; WADT, L.H.O.; VEASEY, E.A. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio Branco, v.42, n.9, p.1291-1298, 2007.

RIDLEY, M. **Evolution**. Oxford: Blackwell, 2003. 768 p.

ROHLF, F.J. An empirical comparison of three ordination techniques in numerical taxonomy. **Systematic Zoology**, Oxford, v.21, p.271–280, 1972.

RONDON NETO, R.M.; MACEDO, R.L.G.; TSUKAMOTO FILHO, A.A. Formação de povoamentos florestais com *Tectona grandis* L.f. (Teca). **Boletim Técnico – Série Extensão**, Lavras, v.7, n.33, p.1-29, 1998.

ROSSETTO, M.; SLADE, R.W.; BAVERSTOCK, P.R. Microsatellite variation and assessment of genetic structure in tea tree (*Melaleuca alternifolia*—Myrtaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 633–643, 1999.

RUDMAN, P.; DA COSTA, E.W.B. Relationship of tectoquinone to durability in *Tectona grandis*. **Nature**, Philadelphia, v.181, p.721-722, 1958.

SACCHETTI, M. J. Tais: Os Têxteis de Timor-Leste. Disponível em: <<http://www.turismotimorleste.com/pt/sobre/tais/>> Acesso em: 05 ago. 2009.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Stanford, v.81, p.8014-8018, 1984.

SANTOS, M.N.; TEIXEIRA, M.L.F.; PEREIRA, M.B. MENEZES, E.B. Potential insecticidal effects of aqueous tree leaf extracts against the subterranean termite *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Sociobiology**, California, v.53, n.3, p.719-728, 2009.

SANTOS, R.M.F.; LOPES, U.V.; BAHIA, R.C.; MACHADO, R.C.R.; AHNERT, D.; CORRÊA, R.X. Marcadores microssatélites relacionados com a resistência à vassoura-de-bruxa do cacaueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n.8, 2007.

SHRESTHA, M.K.; VOLKAERT, H.; STRAETEN, D.V.D. Assessment of genetic diversity in *Tectona grandis* using amplified fragment length polymorphism markers. **Canadian Journal Forest Research**, Westminster, v.35, p.1017-1022, 2005.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco, 1973.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: fundação MT, 2001. p. 939-965.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa : Instituto Plantarum. 2008. 703 p.

THULASIDAS, P.K.; BHAT, K.M. Chemical extractive compounds determining the brown-rot decay resistance of teakwood. **Holz Roh Werkst**, Berlin, v.65, p.121-124, 2007.

TIWARI, S.K.; TIWARI, K.P.; SIRIL, E.A. An improved micropropagation protocol for teak. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, p. 1-6, 2002.

UGALDE, L.; PÉREZ, O. Mean annual volume increment of selected industrial forest. FAO, working paper FP/1. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 22 ago. 2007.

VEIT, L. F. Dinheiro não cresce em árvores. **Revista Silvicultura**, São Paulo, n.83, p.38-39, 2000.

VERHAEGEN, D.; OFORI, D.; FOFANA, I.; POITEL, M.; VAILLANT, A. Development and characterization of microsatellite markers in *Tectona grandis* (Linn. f). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.5, p.945–947, 2005.

VIEIRA, A.H.; MARTINS, E.P.; PEQUENOS, P.L.L.; LOCATELLI, M.; SOUZA, M.G. **Técnicas de produção de sementes florestais**. Rio Branco: EMBRAPA, 2001, p.1-4. (Documento nº 205).

WATANABE, A.; WIDYATMOKO, A. Discrimination of teak (*Tectona grandis*) plus trees using selected Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. **Journal of Tropical Forest Science**, Malaysia, v. 16, n.1, p.17-24, 2004.

WHITE, K. Teak, Some Aspects of Research and Development. **FAO Regional Office for Asia and the Pacific**, publication 1991/17, Bangkok, 1991, 53 p.

WHITE, G.; POWELL, W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**, Vancouver, v.6, p. 851-860, 1997.

WRIGHT, J.M.; BENTZEN, P. Microsatellites, genetic markers of the future. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v.4, p.384-388, 1994.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. V.; PINHEIRO, J. B.; BRONDANI, C.; VENKOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae Family). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.2, p. 512-514, 2002.

ANEXO

Figura 19 - Géis de poliacrilamida no sistema não desnaturante para a avaliação do polimorfismo de microssatélites em teca (*Tectona grandis*)

Tabela 7 – DNA fingerprinting dos clones de teca (*Tectona grandis*) pertencentes à empresa PROTECA

<i>Primer</i>	Acesso	Clone A3	Clone B1	Clone B2
		Alelos (pb)		
CIRAD1TeakF05	AJ968931	245-245	245-245	245-245
CIRAD1TeakH10	AJ968933	210-210	215-220	205-205
CIRAD2TeakB07	AJ968934	130-130	135-135	135-135
CIRAD2TeakC03	AJ968935	250-250	250-250	250-250
CIRAD3TeakDa09	AJ968938	175-185	185-185	185-185
CIRAD3TeakF01	AJ968940	200-210	190-180	190-180
CIRAD4TeakDa12	AJ968941	130-140	130-130	130-130
CIRAD4TeakF02	AJ968942	195-195	195-195	-
CIRAD4TeakH09	AJ968943	140-140	145-145	145-145
<i>Primer</i>	Acesso	Clone B3	Clone B5	Clone B6
		Alelos (pb)		
CIRAD1TeakF05	AJ968931	245-245	245-245	240-245
CIRAD1TeakH10	AJ968933	200-195	200-215	190-205
CIRAD2TeakB07	AJ968934	135-135	135-135	135-135
CIRAD2TeakC03	AJ968935	250-250	250-250	250-250
CIRAD3TeakDa09	AJ968938	185-185	180-185	185-185
CIRAD3TeakF01	AJ968940	180-190	190-190	190-190
CIRAD4TeakDa12	AJ968941	130-130	130-130	125-130
CIRAD4TeakF02	AJ968942	195-200	185-185	190-190
CIRAD4TeakH09	AJ968943	145-145	145-145	145-145

(continuação)

Tabela 7 – DNA fingerprinting dos clones de teca (*Tectona grandis*) pertencentes à empresa PROTECA

<i>Primer</i>	Acesso	Clone B7	Clone B8	Clone B9
		Alelos (pb)		
CIRAD1TeakF05	AJ968931	240-245	240-245	245-245
CIRAD1TeakH10	AJ968933	195-195	210-215	205-210
CIRAD2TeakB07	AJ968934	135-135	135-135	135-135
CIRAD2TeakC03	AJ968935	250-250	250-250	250-260
CIRAD3TeakDa09	AJ968938	180-185	185-185	185-185
CIRAD3TeakF01	AJ968940	190-190	190-190	190-190
CIRAD4TeakDa12	AJ968941	130-130	125-125	130-130
CIRAD4TeakF02	AJ968942	195-195	185-190	195-195
CIRAD4TeakH09	AJ968943	145-145	140-145	145-145
<i>Primer</i>	Acesso	Clone B11	Clone B12	Clone B13
		Alelos (pb)		
CIRAD1TeakF05	AJ968931	245-245	245-245	245-245
CIRAD1TeakH10	AJ968933	200-200	200-200	190-210
CIRAD2TeakB07	AJ968934	135-135	135-135	135-140
CIRAD2TeakC03	AJ968935	250-260	255-255	245-245
CIRAD3TeakDa09	AJ968938	185-185	185-185	185-185
CIRAD3TeakF01	AJ968940	190-190	190-190	190-190
CIRAD4TeakDa12	AJ968941	130-130	130-130	130-130
CIRAD4TeakF02	AJ968942	195-195	190-190	200-200
CIRAD4TeakH09	AJ968943	140-140	145-145	145-145

(continuação)

Tabela 7 – DNA fingerprinting dos clones de teca (*Tectona grandis*) pertencentes à empresa PROTECA

<i>Primer</i>	<i>Acesso</i>	Clone B14	Clone B16	Clone B17
		Alelos (pb)		
CIRAD1TeakF05	AJ968931	245-245	245-245	245-245
CIRAD1TeakH10	AJ968933	200-200	210-210	215-220
CIRAD2TeakB07	AJ968934	135-140	135-135	135-135
CIRAD2TeakC03	AJ968935	255-255	250-250	250-255
CIRAD3TeakDa09	AJ968938	185-185	185-185	185-185
CIRAD3TeakF01	AJ968940	190-190	190-200	190-190
CIRAD4TeakDa12	AJ968941	125-125	130-130	130-130
CIRAD4TeakF02	AJ968942	195-195	190-190	190-190
CIRAD4TeakH09	AJ968943	150-150	145-150	145-145
<i>Primer</i>	<i>Acesso</i>	Clone C1	Clone C2	Clone D1
		Alelos (pb)		
CIRAD1TeakF05	AJ968931	245-245	245-230	245-245
CIRAD1TeakH10	AJ968933	210-210	205-205	195-195
CIRAD2TeakB07	AJ968934	120-130	125-135	130-130
CIRAD2TeakC03	AJ968935	245-245	250-250	250-250
CIRAD3TeakDa09	AJ968938	185-185	185-185	185-185
CIRAD3TeakF01	AJ968940	200-200	190-200	190-200
CIRAD4TeakDa12	AJ968941	120-120	115-130	130-130
CIRAD4TeakF02	AJ968942	185-195	195-195	200-200
CIRAD4TeakH09	AJ968943	140-145	145-145	150-155

(continuação)

Tabela 7 – DNA fingerprinting dos clones de teca (*Tectona grandis*) pertencentes à empresa PROTECA

<i>Primer</i>	Acesso	Clone D2	Clone D3	Clone D4
		Alelos (pb)		
CIRAD1TeakF05	AJ968931	245-245	245-245	245-245
CIRAD1TeakH10	AJ968933	195-195	195-200	190-210
CIRAD2TeakB07	AJ968934	120-135	130-130	125-135
CIRAD2TeakC03	AJ968935	250-255	250-250	250-260
CIRAD3TeakDa09	AJ968938	185-185	185-185	185-185
CIRAD3TeakF01	AJ968940	190-200	190-200	185-185
CIRAD4TeakDa12	AJ968941	120-120	120-120	120-115
CIRAD4TeakF02	AJ968942	200-200	200-200	195-195
CIRAD4TeakH09	AJ968943	150-155	150-155	145-150
<i>Primer</i>	Acesso	Clone D5	Clone D6	Clone E2
		Alelos (pb)		
CIRAD1TeakF05	AJ968931	245-245	245-245	240-240
CIRAD1TeakH10	AJ968933	190-210	190-210	200-215
CIRAD2TeakB07	AJ968934	125-135	125-130	125-133
CIRAD2TeakC03	AJ968935	250-260	245-245	240-240
CIRAD3TeakDa09	AJ968938	185-185	185-185	185-185
CIRAD3TeakF01	AJ968940	180-180	190-190	190-190
CIRAD4TeakDa12	AJ968941	115-120	130-130	120-120
CIRAD4TeakF02	AJ968942	195-195	195-200	190-190
CIRAD4TeakH09	AJ968943	145-150	145-150	145-150

(continuação)

Tabela 7 – DNA fingerprinting dos clones de teca (*Tectona grandis*) pertencentes à empresa PROTECA

<i>Primer</i>	Acesso	Clone G1	Clone G2	Clone H1
		Alelos (pb)		
CIRAD1TeakF05	AJ968931	240-250	250-250	240-250
CIRAD1TeakH10	AJ968933	200-200	200-200	205-215
CIRAD2TeakB07	AJ968934	130-135	135-135	133-133
CIRAD2TeakC03	AJ968935	250-250	245-245	250-250
CIRAD3TeakDa09	AJ968938	185-185	185-185	185-185
CIRAD3TeakF01	AJ968940	190-200	190-200	200-200
CIRAD4TeakDa12	AJ968941	125-125	130-130	130-130
CIRAD4TeakF02	AJ968942	115-130	130-130	130-135
CIRAD4TeakH09	AJ968943	190-190	-	-

(conclusão)