

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE
PLANTAS
LUANA DELLA GIUSTINA

Avaliação da variabilidade genética de genótipos de teca
(*Tectona grandis* Linn. F.) por meio de marcadores moleculares

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO - BRASIL
FEVEREIRO - 2014

LUANA DELLA GIUSTINA

**Avaliação da variabilidade genética de genótipos de teca
(*Tectona grandis* Linn. F.) por meio de marcadores moleculares**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Prof^a. Ph. D. Telma Nair
Santana Pereira

Co-Orientadora: Prof^a. D. Sc. Ana
Aparecida Bandini Rossi

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO - BRASIL
FEVEREIRO – 2014

Giustina, Luana Della.

G538a Avaliação da variabilidade genética de genótipos de teca (*tectona grandis* Linn. F.) por meio de marcadores moleculares / Luana Della Giustina. – Alta Floresta , 2014 69 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade do Estado de Mato Grosso.

Bibliografia: f. 55-57

Orientador: Telma Nair Santana Pereira

Coorientador: Ana Aparecida Bandini Rossi

1. Teca. 2. Diversidade genética. 3. Marcador molecular.

I. Autor. II. Título.

CDU 674.031.929.3

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE
TECA (*Tectona grandis* Linn F.) POR MEIO DE MARCADORES
MOLECULARES**

LUANA DELLA GIUSTINA

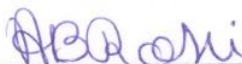
Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO
ESTADO DE MATO GROSSO, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento de Plantas, para
obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 05 de fevereiro de 2014.

Comissão Examinadora:



Flávio Dessaune Tardin (D. Sc., Produção Vegetal) – EMBRAPA/Agrossilvipastoril



Ana Aparecida Bandini Rossi (D. Sc., Genética e Melhoramento) – UNEMAT



Telma Nair Santana Pereira (Ph. D., Plant Breeding) – UENF
(Orientadora)

Aos meus pais Sergio e Ana Maria, aos
meus irmãos Luciano e Mariana e ao meu
noivo Anderson da Guarda pelo apoio
incondicional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, em quem sempre confio.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À Universidade do Estado de Mato Grosso/UNEMAT, juntamente com o Programa de Pós-Graduação de Genética e Melhoramento de Plantas pelos ensinamentos fornecidos por intermédio de seus professores.

À Prof^a. D. Sc. Ana Aparecida Bandini Rossi por todo seu apoio e incentivo, por acreditar no meu trabalho, por todos seus ensinamentos durante estes quatro anos de convívio.

À Prof^a. Ph. D. Telma Nair Santana Pereira por ser minha orientadora, sendo que a distância em nada interferiu, por incentivar minha carreira profissional com seus exemplos, por todo auxílio nas publicações e também pelos eventos participados.

Aos meus pais, que estiveram sempre ao meu lado me apoiando e incentivando e pelos valores e educação oferecidos.

Aos meus irmãos Luciano e Mariana que mesmo à distância sempre me confortaram com palavras de apoio.

Ao meu noivo Anderson, pela sua paciência, compressão e carinho, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e colaborando efetivamente no meu trabalho.

Ao Sr. Augusto Francisco dos Passos, não somente pelo material fornecido, mas pelo apoio durante as coletas, por toda sua amizade.

À turma do mestrado, amigos que fiz para vida toda, pessoas as quais jamais esquecerei, por todo companheirismo, por todas as risadas, pelo carinho de família que construímos.

Aos colegas de laboratório não apenas pela colaboração durante a execução da pesquisa, mas pelos bons momentos de risadas e confraternização.

Aos funcionários do *Campus* que por muitas vezes participaram ativamente da minha pesquisa.

Ao Viveiro Verde Novo pelo material fornecido juntamente com seus parceiros, Fazenda Bacaerí, Fazenda APASA e Teca do Brasil. E a todos que, de certa forma, contribuíram para a realização desta pesquisa ao longo deste mestrado;

Obrigada!

BIOGRAFIA

Luana Della Giustina, filha de Sergio e Ana Maria Della Giustina, nasceu dia 02 de junho de 1990 em Alta Floresta, MT, Brasil. Concluiu o segundo grau na Escola Cenecista Fraternidade Francisco de Assis (CNEC) em 2007. O grau de Licenciada em Ciências Biológicas foi conferido em fevereiro de 2012, pela Universidade do Estado de Mato Grosso/UNEMAT, *campus* de Alta Floresta. Bolsista de Iniciação Científica por 17 meses pelo projeto de pesquisa intitulado “Diversidade, Conservação e Uso de Recursos Genéticos de Quatro Espécies Amazônicas de *Theobroma* com Potencial Econômico para a Região”. Durante a execução do projeto foram desenvolvidas pesquisas com as espécies *Theobroma speciosum* e *Theobroma grandiflorum*. Especialista em Avaliação de Impacto Ambiental e Recuperação de Áreas Degradadas pelo Instituto Superior de Pesquisa e Pós-Graduação (ISUPP) na cidade de Alta Floresta, MT. Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas pela UNEMAT no período de fevereiro de 2012 a fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Aspectos gerais da Teca.....	3
2.2 Aspectos botânicos da espécie.....	4
2.3 Melhoramento Genético da Teca.....	5
2.4 Caracterização morfológica	6
2.5 Caracterização Molecular	7
2.6 Marcadores SSR.....	7
2.7 Marcadores ISSR.....	9
2.8 Biometria em análises moleculares para o estudo da diversidade genética ..	10
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
4. CAPÍTULOS	17
4.1 CAPÍTULO 1 - VARIABILIDADE GENÉTICA DE ÁRVORES DE TECA (<i>Tectona grandis</i> Linn. F.) BASEADA EM MARCADORES MOLECULARES ISSR E CARACTERES MORFOLÓGICOS	17
RESUMO	17
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
Material Vegetal	22
Extração e Quantificação de DNA	23
Seleção de <i>Primers</i> ISSR e Reações de Amplificação	23
Caracterização Fenotípica	24
Análise estatística	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
4.2. CAPÍTULO 2 - DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE TECA (<i>Tectona grandis</i> Linn. F.) COM BASE EM MARCADORES ISSR E MICROSSATÉLITES.....	40

RESUMO	40
ABSTRACT	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
Material vegetal.....	44
Extração e quantificação de DNA	45
Amplificação e genotipagem de locos ISSR	45
Amplificação e genotipagem de locos microssatélites	46
Análise estatística com base nos marcadores ISSR.....	47
Análise estatística com base nos marcadores SSR.....	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
Resultados obtidos a partir dos marcadores SSR	49
Resultados obtidos a partir dos marcadores ISSR	51
CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	59

RESUMO

GIUSTINA, LUANA DELLA, M. Sc., Universidade do Estado de Mato Grosso, fevereiro de 2014, AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE TECA (*Tectona grandis* Linn. F. LAMIACEAE) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES. Orientadora: Telma Nair Santana Pereira. Conselheiros: Ana Aparecida Bandini Rossi e Willian Krause.

A teca (*Tectona grandis* Linn. F.) pertence à família Lamiaceae, é natural da Índia Peninsular, Myanmar, Laos e Tailândia. É apreciada pelas características de sua madeira, a qual possui resistência às águas da chuva e mar. Desenvolveu-se de forma exemplar no estado de Mato Grosso onde o clima, solo e traços silviculturais reduziram seu ciclo de produção de 50 para 25 anos. No entanto, pouco se sabe da diversidade genética da teca no Brasil. Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar a diversidade genética de 72 genótipos de teca utilizando marcadores moleculares ISSR e microssatélites de distintas localidades. Para alcançar os objetivos propostos foram coletadas folhas de cada um dos genótipos selecionados para que, no laboratório, o DNA genômico total fosse extraído, utilizando-se o método CTAB. A qualidade e a concentração do DNA extraído foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Assim, puderam ser selecionados 12 *primers* de ISSR e oito *primers* de microssatélites com base em padrões de bandejamento para intensidade, polimorfismo e repetitividade e as reações de amplificação foram realizadas via PCR. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,5% para os produtos amplificados com base nos marcadores ISSR e 2,5% para SSR) em tampão de corrida TBE 1X, com voltagem constante de 85 V por aproximadamente quatro (ISSR) ou seis horas (SSR). Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados, por comparação, com o marcador molecular de 100 pb DNA Ladder. A coloração do gel foi realizada com brometo de etídeo ($0,6 \text{ ng mL}^{-1}$). Em seguida os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados. Os dados referentes aos parâmetros de diversidade foram estimados utilizando-se o programa POPGENE 1.31. As análises de dissimilaridade foram estimadas pelo Índice de Jaccard e após confeccionados os dendrogramas com base no Agrupamento de Ligação Média entre Grupos (UPGMA). Foi também realizado o agrupamento com base no método hierárquico de Tocher. Quanto aos dados fenotípicos foram realizadas análises multicategórica em 50 dos genótipos

avaliados. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do Programa Genes. Para os marcadores SSR, os tamanhos dos fragmentos foram quantificados com auxílio do programa GelQuant Pro® e os demais parâmetros como diversidade gênica, PIC, maior frequência alélica, número de alelos e heterozigosidade foram estimados com o programa Power Marker. Com base somente nos marcadores ISSR, foram avaliados 50 genótipos, sendo 12 árvores candidatas (que se destacaram fenotipicamente), mais 36 vizinhas e duas árvores superiores com altos valores de fenótipo. Foi observada uma baixa diversidade genética entre os 50 genótipos e os agrupamentos gerados por meio dos métodos UPGMA e Tocher alocaram os genótipos em 10 e 15 grupos respectivamente. A média do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foi de 0,204 e uma média de 4,66 bandas por *primer*. A variável fenotípica que mais contribui para a distribuição da diversidade dos genótipos foi a formação de catana com 21,28%. Os índices de diversidade de Shannon (H) e Nei (I) foram baixos, variando entre H=0,1601 e I=0,2301 para o grupo das candidatas e H=0,1507 e I=0,2178 para o grupo das árvores vizinhas. Os dois grupos apresentaram a mesma porcentagem de polimorfismo, 37,50%, e maior distância entre genótipos ficou entre BAC 54 e BAC 59 ($D_{ij} = 0,268$). Ainda com os 12 *primers* de ISSR foi avaliada a diversidade genética de 32 genótipos mantidos no viveiro Verde Novo do município de Colíder, MT, entre eles 12 da empresa BAC, 12 da GUA e 08 da TBR. A média de bandas por iniciador foi de 4,66 e a média do PIC foi de 0,164. Os agrupamentos gerados pelo método UPGMA separaram os genótipos em 12 grupos, enquanto que para o método de agrupamento de Tocher os genótipos formaram 14 grupos. Com base em oito marcadores SSR procederam as análises para os 32 genótipos de teca do material contido no viveiro, a média do número de alelos por loco foi de 10,84, a média do PIC de 0,82 e a média para a heterozigosidade foi de 0,16. Ainda para os microssatélites, o dendrograma gerado a partir do método UPGMA distribuiu os genótipos em 12 grupos. Os resultados obtidos por Tocher corroboram ao encontrados pelo método UPGMA, tanto para as análises dos 50 genótipos de teca da empresa BAC quanto para os 32 genótipos mantidos no viveiro das três empresas (BAC, GUA, TBR). Entre as candidatas do viveiro não ocorreu incidência de duplicatas entre os materiais ($D_{ij}=0$), sendo estes genótipos promissores para a produção de mudas em larga escala. Porém, sugere-se aos produtores e pesquisadores das três empresas que aumentem a variabilidade genética entre os genótipos selecionados com novas árvores de

distintas localidades e incluíam a análise molecular à seleção fenotípica para um melhor procedimento de escolha de candidatas para a produção de mudas.

Palavras-Chave: Diversidade Genética, Marcador Molecular, Teca.

ABSTRACT

GIUSTINA, LUANA DELLA, M. Sc., Universidade do Estado de Mato Grosso, February, 2014. GENETIC VARIABILITY OF GENOTYPES OF TEAK (*Tectona grandis* Linn f. LAMIACEAE) BASED ON MOLECULAR MARKERS. Adviser: Telma Nair Santana Pereira. Counselors: Ana Aparecida Bandini Rossi e Willian Krause.

Teak (*Tectona grandis* Linn. F.) belongs to the Lamiaceae family, originally from the Indian peninsula, Myanmar, Laos and Thailand. It is appreciated by its wood characteristics, resistant to rain and sea water. It had good development in Mato Grosso State, where the climate, soil and silviculture traits reduced its production cycle from 50 to 25 years. However, little is known about teak genetic diversity in Brazil. Thus, the aim of this work was to evaluate the genetic diversity of 72 genotypes of teak using molecular markers ISSR and microsatellite from of different locations. It was collected leaves from each genotype selected and, in the laboratory, it was extracted their total genomic DNA using the CTAB method. The quality and concentration of the extracted DNA was confirmed by electrophoresis on agarose gel at 0.8%. So that, it was selected 12 ISSR *primers* and eight microsatellite *primers* based on banding patterns for intensity, polymorphism and repetitiveness. The amplification reactions were performed via PCR. The amplification products were separated by electrophoresis in agarose gel (1.5% to amplified products based on ISSR markers and 2.5% to SSR) in a TBE 1X buffer, at constant voltage of 85V for about four (ISSR) or six hours (SSR). The amplified fragments sizes were estimated by comparison with the molecular marker 100 bp DNA Ladder. The gel coloring was performed with ethidium bromide (0.6 mg mL^{-1}). Then the gels were visualized under UV transilluminator and photodocumented. The data relating to diversity parameters were estimated using the POPGENE 1.31 program. Dissimilarity analyses were estimated using the Jaccard index and dendrograms were made based on Average Connection Between Groups Grouping (UPGMA). Also it was performed grouping based on Tocher hierarchical method. For the phenotypic data it was performed multicategorical analyzes on 50 of the genotypes. All analyzes were performed using the Genes Program. For SSR markers, the fragments sizes were quantified with the GelQuant Pro® program and the other parameters such as gene diversity, PIC, greater allele frequency, number of alleles and heterozygosity were estimated with the Power Marker program. Fifth genotypes were evaluated based only on ISSR, 12

candidate trees (which stood out phenotypically) with their 36 neighbors and two superior trees with high phenotype values. It was noticed a low genetic diversity among the 50 genotypes and the groups generated by the UPGMA and Tocher allocated genotypes on 10 and 15 groups respectively. The polymorphic information content (PIC) average was 0.204 and 4.66 average for bands per primer. The phenotypic variable that most contributes to the diversity distribution of genotypes was the machete formation with 21.28%. The Shannon diversity index (H) and Nei (I) were low ranging from $H=0.1601$ and $I=0.2301$ for the candidates group $H=0.1507$ and $I=0.2178$ for the group of neighboring trees. Both groups had the same polymorphism percentage, 37.50%, and the greater distance between genotypes was between BAC 54 and BAC 59 ($D_{ij}=0.268$). The 12 ISSR *primers* was assessed for genetic diversity of 32 genotypes kept in the Verde Novo plant nursery in Colider MT, among them, 12 from the BAC, 12 from the GUA and 08 from the TBR company. The average bands per indicator was 4.66 and the average PIC was 0.164. The groups generated by the UPGMA method separated the genotypes into 12 groups, while for the Tocher grouping method formed 14 groups. Based on eight SSR markers it was performed analyzes for the 32 genotypes of teak material kept in the nursery. The average of alleles per locus was 10.84, the average PIC was 0.82 and the average heterozygosity was 0.16. The microsatellite and dendrogram generated from UPGMA genotypes was distributed into 12 groups. The results found by Tocher corroborate the UPGMA method, both for the analysis of the 50 genotypes of teak from the BAC company as for the 32 genotypes from the three companies (BAC , GUA , TBR) kept in the nursery. There were no incidence of duplicates between materials ($D_{ij}=0$) among the candidates in the nursery, so the genotypes are promising for seedlings production in large scale. However, it is suggested to producers and researchers from the three companies that increase the genetic variability among the selected genotypes with new trees from different locations and to include the molecular analysis and the phenotypic selection for a better choice procedure of candidates for the seedlings production.

Key Words: Genetic Diversity, Molecular Marker, Teak.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Teca (*Tectona grandis* Linn. F.), da família Lamiaceae, possui alto valor econômico devido às características de sua madeira (Rondon-Neto et al., 1998). Ocorre naturalmente na Índia Peninsular, Myanmar, Laos e Tailândia (Troup, 2006). Dentre as espécies arbóreas e exóticas plantadas no Brasil a teca se destaca como a mais promissora para o plantio nas regiões sudeste e centro-oeste (ABRAF, 2009).

Por ser uma espécie introduzida tem um comportamento agrônômico melhor do que algumas espécies nativas, já que as últimas por estarem em seu *habitat* natural podem sofrer severos ataques de pragas e fitomoléstias (Figueiredo, 2001). Além disso, esta espécie representa uma nova alternativa florestal atrativa para as regiões mato-grossense e sudeste.

Segundo Schuhli e Filho (2010), o desenvolvimento de estratégias para o aumento da produção de sementes e mudas com qualidade e em quantidade suficientes para garantir a demanda do mercado crescente para teca no Brasil é importante até mesmo para futuros programas de melhoramento da espécie. De forma geral, a seleção de genótipos em teca se dá com base em suas características fenotípicas. Assim, produtores e pesquisadores do Estado de Mato Grosso (Bacaeri Florestal Ltda e Teca do Brasil Florestal) e do estado de São Paulo (APASA Agropecuária Ltda) selecionaram genótipos de teca que se destacaram em populações cultivadas, com base em características fenotípicas, porém sabe-se que o ambiente tem um efeito sobre o fenótipo desses indivíduos. Estes genótipos ainda não foram caracterizados com o emprego de marcadores moleculares, uma vez que segundo Fonseca e Ribeiro (1992) a caracterização morfológica juntamente à molecular propiciam um melhor conhecimento dos recursos genéticos e auxiliam para a seleção de populações e/ou plantas com características desejáveis para o cultivo.

Além disso, a caracterização molecular permite melhor estimar a variabilidade genética das populações já que ela atua no DNA e assim permite uma melhor indicação de genótipos que podem ser utilizados em um programa de melhoramento.

Com o advento de métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA e o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia através de uma DNA polimerase (PCR), marcadores moleculares, tais como

os microssatélites (*Simple sequence repeat*) e os ISSR (*Inter simple sequence repeat*) (Ferreira e Grattapaglia, 1996) são 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).

Assim, no sentido de integrar avaliações moleculares às avaliações fenotípicas nos genótipos de teca previamente selecionados pelos produtores do Estado de Mato Grosso (Bacaeri Florestal Ltda e Teca do Brasil Florestal) e do estado de São Paulo (APASA Agropecuária Ltda), os objetivos deste trabalho foram:

- a) Avaliar a diversidade genética de 50 genótipos de teca (árvores) da Fazenda Bacaerí, por meio de marcadores ISSR e características fenotípicas;
- b) Verificar a diversidade genética por meio dos marcadores ISSR e SSR de 32 genótipos de teca selecionados com base em avaliações fenotípicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da Teca

Teca (*Tectona grandis* Linn. F.) ocorre naturalmente entre 10° e 25° norte, em uma área que compreende a maior parte da Índia Peninsular, Myanmar, Laos e Tailândia (Troup, 2006).

Basicamente, existem duas procedências de sementes de teca no Brasil. A primeira e mais importante (em decorrência da maior área plantada) é a da variedade *Tennasserim* de origem Birmânica (Myanmar), plantada inicialmente no Jardim Botânico em Trinidad. A segunda procedência é do Sri Lanka e foi inicialmente plantada no Jardim Botânico de Summit, no Panamá. Estas duas procedências de teca são amplamente distribuídas na América Latina (Figueiredo, 2005).

A primeira experiência brasileira com plantios de teca ocorreu no início do século 20 pelo Engenheiro Agrônomo Edmundo Navarro de Andrade, nas cidades de Rio Claro, SP e Rio de Janeiro, RJ, com o objetivo de escolher uma madeira para a construção das estradas de ferro, contudo, essas plantações ocorreram juntamente com outras espécies florestais (Sampaio, 1930; Coutinho, 2004).

No entanto, em se tratando de plantios comerciais de teca no Brasil, iniciaram-se no final da década de 60 na região de Cáceres, MT através da empresa Cáceres Florestal S.A., neste local as condições climáticas assemelham-se ao país de origem da espécie (Matricard, 1989). Porém, condições favoráveis como clima, solo, traços silviculturais, contribuíram para reduzir o ciclo de produção da teca de 80 para 25 anos comparados com sua região de origem (Tsukamoto-Filho et al., 2003). Em âmbito mundial, a área plantada com teca excede a dois milhões de hectares. Na Ásia, o seu ciclo de rotação é variável de 60 a 100 anos (Ugalde e Pérez, 2001).

Áreas de plantios comerciais de teca no Brasil ocupam 67.693 ha, sua madeira é destinada principalmente para construção civil (portas, janelas, lambris, painéis, forros), assoalhos e decks, móveis, embarcações e lâminas decorativas (ABRAF, 2012).

Os reflorestamentos de teca atualmente abrangem regiões como o Amazonas, Acre, Pará e Rondônia (Figueiredo, 2001; Vieira et al., 2001). Por ser uma espécie exótica, a falta de inimigos naturais provavelmente é motivo de sua boa

adaptação e se destaca entre espécies nativas como o mogno (*Swietenia macrophylla* King.) e o cedro (*Cedrella odorata* L.), que são susceptíveis a doenças, portanto é utilizada com sucesso em áreas de pastagens ou florestas secundárias em fase inicial de sucessão ecológica (Figueiredo, 2001).

Saha (2001) estudou áreas abandonadas de plantação de teca e analisou o crescimento e regeneração da mata nativa sob o reflorestamento. Seu crescimento não apresentou efeito negativo (alelopatia) nas espécies nativas quando comparadas com outras composições.

De uma forma geral, 4% das espécies florestais plantadas em todo mundo é representada pela teca (Krishnapillay, 2000). Devido à sua resistência ao sol, calor, frio e à água da chuva e do mar, a comercialização de sua madeira para as indústrias navais se tornou indispensável, além de ser útil à carpintaria, marcenaria, produção de peças de uso nobre e para móveis finos (Rondon-Neto et al., 1998).

Na Índia o aumento da demanda por teca cresceu de forma acelerada, resultando em extração de árvores de plantações antigas e de populações naturais (Fofana et al., 2009). A maior parte das florestas naturais foi convertida em monoculturas de teca, causando, dentre outros problemas, a perda dos genótipos superiores, a drástica redução da diversidade genética (com a propagação vegetativa baseada nas árvores existentes nos plantios ou com sementes provenientes destas), deterioração dos sítios por incêndios consecutivos, erosão e intemperismo de matéria orgânica, deterioração da qualidade da madeira, ataque de pragas e maior vulnerabilidade a estes ataques (Fofana et al., 2009).

2.2 Aspectos botânicos da espécie

A teca é uma árvore decídua com folhas elípticas, coriáceas, opostas e em plantas jovens verticeladas. Apresenta coloração verde escura na parte adaxial e verde mais clara na parte abaxial, com dimensões de 60 cm de largura por 80 cm de comprimento (Weaver, 1993). As inflorescências são do tipo panícula terminais eretas com flores pequenas e numerosas e floração intensa com início após as primeiras chuvas (Weaver, 1993).

Estudos citogenéticos caracterizam a teca como diplóide ($2n=2x=36$ cromossomos) (Gill et al., 1983; Kertadikara e Prat, 1995), monóica e de polinização por insetos (Bryndum e Hedegart, 1969; Hedegart, 1973; Mathew et al., 1987). Frutos do tipo drupas de coloração castanho-clara, tetraloculares, envoltos em cálice

membranoso e persistente, sementes pequenas e oleaginosas (Barroso, 1983). Aos seis anos inicia-se a frutificação, mas já foram registrados casos precoces com plantas florescendo aos dois ou três anos de idade (Josébio et al., 2007).

A teca apresenta raiz pivotante sendo indicado para o plantio em solos profundos, bem drenados, arejados e razoavelmente férteis (a disponibilidade de oxigênio deve ser alta; indica-se 65% a 80% nos primeiros 30 cm de solo) (Figueiredo et al., 2005; Kiehl, 1979). Apresenta crescimento rápido, pode atingir até 3 metros de altura durante o primeiro ano e cinco no segundo, característica apreciada para produção de madeira (Nair, 1997). Além de ser resistente ao ataque de cupins devido à presença de um inseticida natural (ANON, 1996).

Estudos químicos indicam a presença de substâncias que pertencem à classe das antraquinonas, denominada tectoquinona com propriedades antifúngicas, bactericidas e repelentes naturais, características que explicam a durabilidade de sua madeira aos rigores do tempo. Possui também um corante natural (lapachol e uma naftoquinona-antraquinona), a tectograndona (Aguinaldo et al., 1993).

De acordo com Keiding (1985), a teca 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 varia de 0,55 a 0,68 g/cm³ de cor acinzentada ou levemente marrom.

2.3 Melhoramento Genético da Teca

A maior parte dos empreendimentos de plantio depende de sua própria capacidade de produção de sementes e estratégias de propagação em curto prazo. Associadas a programas de melhoramento em longo prazo são propostas que aumentam o fornecimento de material genético em escala suficientemente grande para suprir os programas de florestamento (Schuhli e Filho, 2010). Projetos de melhoramento com teca já estão disponíveis em países como Tailândia, Malásia, Tanzânia, Índia, Indonésia e Costa Rica (Schuhli e Filho, 2010).

Os custos do melhoramento florestal em teca são, infelizmente, elevados pela baixa capacidade de frutificação e pela baixa taxa de germinação das sementes (Kjaer e Foster, 1996; Kaosa-Ard et al., 1998), pois são protegidas envoltas em um fruto que apresenta endocarpo e mesocarpo duros (Keiding, 1985).

A PROTECA é uma empresa situada em Cuiabá/MT, especializada em biotecnologia florestal, que vem aplicando técnicas de reprodução vegetativa em

laboratório na produção de mudas clonais de teca. A utilização de árvores matrizes selecionadas permite à PROTECA produzir mudas de alta qualidade genética, garantindo plantios mais uniformes e produtivos, com menor custo de manutenção e uma relação custo-benefício muito mais atraente ao silvicultor. O método utilizado pela empresa para a produção de mudas a partir de indivíduos selecionados foi a micropropagação (REMADE, 2009).

A teca é uma espécie predominantemente alógama, com taxa de cruzamento da ordem de 95% a 98% (Kjaer e Suangtho, 1995; Kertadikara e Prat, 1995). Assim, as estratégias de melhoramento empregadas costumeiramente no melhoramento de outras espécies florestais alógamas (Resende, 1999) podem ser aplicadas à espécie.

2.4 Caracterização morfológica

A caracterização das espécies acontece há muitos anos, como forma de sistematizar e classificar os seres vivos. Os vegetais, principalmente pela sua importância na alimentação e utilização como condimentos fitoterápicos e estéticos, foram descritos e caracterizados ao longo da história (Borém, 2005).

Os descritores morfológicos, baseados em características fenotípicas, aliados aos de DNA, são utilizados como alternativas e complementação de informações para descrição de cultivares, possibilitando a distinção de genótipos morfológicamente similares, mas geneticamente diferentes (Costa, 2010).

Os caracteres morfológicos podem ser classificados em dois tipos, os quantitativos e os qualitativos, que são definidos de acordo com a interação com o ambiente. Os qualitativos são de pouca interação com o ambiente, assim não sofrem tanta influência ambiental e por terem alta herdabilidade não sofrem modificações expressivas, refletindo as características da planta como a coloração dos frutos e flores, padrão foliar, hábito de crescimento, formato do fruto, entre outros. Já os quantitativos sofrem muito efeito do ambiente, são de baixa herdabilidade e podem vir a alterar os caracteres dependendo das respostas da planta ao ambiente, tratando, por exemplo, de altura da planta, diâmetro do caule e do fruto, comprimento do fruto, produção, entre outros (Milach, 1998).

2.5 Caracterização Molecular

A seleção assistida por marcadores moleculares é uma ferramenta de refinamento na seleção de indivíduos. Isto pode ser extremamente útil para a seleção de características de difícil mensuração e também para aquelas que exibem baixa herdabilidade (Ribaut e Hoisington, 1998). As técnicas moleculares geram resultados que podem ser úteis na seleção de indivíduos superiores, independentemente do ambiente e de seu ciclo de vida. A essência deste progresso está em quanto o fenótipo de um indivíduo expressa o seu genótipo (Milach, 1998a).

Marcadores moleculares permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética e relacionamentos filogenéticos no germoplasma utilizado pelo melhorista (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

São disponíveis distintos tipos de marcadores moleculares devido à tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA, que variam de acordo com a sua habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (Milach, 1998a).

Dentre os mais variados métodos de detecção de polimorfismos a técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) surgiu inicialmente e utilizava enzimas de restrição que permitia a análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de DNA. Com o advento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), o processo de amplificação em cadeia através da utilização de uma enzima polimerase, outras técnicas para a detecção do polimorfismo foram reveladas, tais como RAPD, ISSR, SSR e AFLP (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

2.6 Marcadores SSR

Marcadores do tipo microsatélite são amplamente utilizados em estudos ecológicos e genéticos. Os microsatélites, também denominados SSR (*Simple Sequence Repeats*), são formados por sequências de uma a seis bases de comprimento repetidas em tandem (Jacob et al., 1991), encontrados em alta frequência e com ampla distribuição nos genomas de eucariotos (Tóth et al., 2000). A análise de locos microsatélites é realizada por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando-se iniciadores (*primers*) complementares (18 a 25 bases) às regiões que os flanqueiam (Hoshino et al., 2002).

Entre as vantagens destes marcadores para avaliação de germoplasma vale ressaltar características como: codominância; elevado número de alelos, isto é, alto

polimorfismo intraespecífico em cada loco, o que torna este loco informativo em populações diferentes permitindo a caracterização de diferentes acessos em uma coleção; praticidade na integração e comparação dos dados obtidos, pois são analisados por PCR utilizando-se *primers* específicos que permitem a amplificação de locos individuais; possibilidade de utilização em espécies relacionadas de *primers* (transferabilidade ou amplificação cruzada) (Hoshino et al., 2002).

Por outro lado, esta técnica requer amplo conhecimento das sequências 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 iniciadores (*primers*) para a espécie, a técnica se torna menos onerosa, o que aumenta sua acessibilidade. Para teca já foram desenvolvidos 15 marcadores microssatélites por Verhaegen et al. (2005).

Fofana et al. (2009) ressaltam a necessidade de se estudar formas de conservação de teca devido às prováveis mudanças climáticas que poderão ocorrer ao longo dos anos e pela escassez de estudos de diversidade com a espécie. Os autores investigaram a diversidade geográfica e a dinâmica populacional de teca na Índia e na Tailândia com marcadores SSR, visando o manejo sustentável das florestas de teca e a conservação *in situ* da espécie. Os autores concluíram que a teca em sua área natural apresenta níveis aceitáveis de variabilidade genética, porém há riscos para a espécie uma vez que é super explorada e sofre uma forte pressão antrópica. Concluíram também que os marcadores SSR são de grande utilidade na definição de métodos de conservação e acompanhamento da variabilidade genética.

Fofana et al. (2008) objetivaram avaliar a variabilidade genética dentro e entre populações de teca na Costa do Marfim, visando elucidar as prováveis origens das populações africanas. Foram realizadas as amplificações com base em marcadores de microssatélites em 229 árvores de 26 populações, sendo 133 árvores provenientes da área natural e 96 árvores das populações africanas. Os autores constataram uma estruturação regional da teca introduzida na Costa do Marfim.

Alcântara (2009) analisou por meio de marcadores SSR, genótipos de teca fornecidos pelas empresas PROTECA e FLORESTECA de diferentes procedências. O estudo revelou uma alta diversidade genética no material, os genótipos mais dissimilares foram os clones da Costa do Marfim e das Ilhas Salomão e a maior

diversidade genética foi encontrada dentro dos grupos. A autora ainda sugere que os possíveis locais de origem da teca introduzida no Brasil são da Índia e Malásia, porém sugere mais estudos com maior quantidade de amostras, para afirmar tal hipótese.

2.7 Marcadores ISSR

O marcador molecular ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) é uma técnica baseada em PCR e tem se destacado como uma alternativa eficiente para caracterização de genomas complexos. Foi desenvolvido a partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA (Zietkiewicz et al., 1994).

A reação de PCR-ISSR é uma técnica simples, rápida, de baixo custo, eficiente e que não requer informação prévia da sequência de DNA do organismo em estudo. O tamanho dos fragmentos amplificados varia de 200 a 2000 pb e apresentam alta reprodutibilidade, devido, possivelmente, ao uso de iniciadores longos (16 a 25 pares de bases) que são capazes de, em uma única reação de PCR, reconhecer *loci* múltiplos no genoma para amplificar principalmente as sequências inter – microssatélites de diferentes tamanhos (Zietkiewicz et al., 1994).

Os ISSR comportam-se como marcadores dominantes e seguem o padrão de herança mendeliana simples (Gupta et al.1994). Possibilitam a determinação da diversidade inter e intraespecífica, mapeamento de genes e estudos de filogenia em uma ampla variedade de espécies, além de caracterização e avaliação do germoplasma (Zietkiewicz et al., 1994).

Ansari et al. (2012), realizaram um estudo de diversidade genética com teca, empregando cinco marcadores moleculares ISSR em 29 populações, coletadas em diferentes estados da Índia, sendo eles: Andhra Pradesh, Karnataka, Kerala, Madhya Pradesh, Maharashtra, Orissa, Rajasthan e Tamil Nadu. Em relação à diferenciação gênica dentro e entre as populações, 91% desta diferença foi encontrada dentro de cada população e apenas 9% entre as populações analisadas. O melhoramento genético na Índia se concentra na seleção de árvores com genótipos superiores a partir de populações naturais. Este estudo defende a ideia da seleção de grandes números de árvores além de uma população, devido à alta variabilidade intra-populacional.

Watanabe et al. (2004) ao analisarem 24 árvores selecionadas da Ilha de Java na Indonésia, por meio de um marcador dominante (RAPD), assim como o ISSR, observaram uma alta diferenciação entre os materiais, exceto para dois indivíduos que apresentaram o mesmo padrão de bandas com base nos marcadores RAPD.

2.8 Biometria em análises moleculares para o estudo da diversidade genética

Na caracterização da diversidade genética das espécies vegetais, os pesquisadores têm o interesse de agrupar genótipos similares, de maneira que as maiores diferenças ocorram entre os grupos formados. Técnicas multivariadas, como análise discriminante, componentes principais, análise de coordenadas principais e de agrupamento, podem ser aplicadas nesse tipo de estudo. A adoção de uma dentre as técnicas citadas varia de acordo com o padrão de resultado desejado e com a informação disponível, seja ela característica morfológica, fisiológica, ecológica ou genético-molecular (Diniz Filho, 2000).

Com base em informações geradas pelos dados moleculares, análises de agrupamento podem ser empregadas de acordo com o marcador utilizado, seja ele de caráter dominante (ISSR) ou codominante (SSR).

A partir das matrizes geradas pelos coeficientes de similaridade e dissimilaridade é possível aplicar métodos de agrupamento como o método da ligação média entre grupos, o UPGMA e o método de Tocher.

Para o UPGMA utiliza-se médias aritméticas (não-ponderadas) das medidas de dissimilaridade por valores extremos (mínimo e máximo) entre os genótipos considerados (Borém e Fitsche-Neto, 2013).

O método de agrupamento de otimização de Tocher identifica os pares de indivíduos mais similares. Esses indivíduos formarão o grupo inicial. A partir daí é avaliada a possibilidade de inclusão de novos indivíduos, adotando-se o critério de que a distância média intragrupo deve ser menor que a distância média intergrupo (Borém e Fitsche-Neto, 2013).

A diversidade genética de uma população ou de um grupo de genótipo pode ser estimada pelos Índices de Shannon-Wiener e Nei. O índice de Shannon é empregado para medir a diversidade e a riqueza de espécies em estudos de ecologia e também pode ser empregado para medir a diversidade fenotípica ou genotípica dentro de uma população. O índice de Nei é baseado na

heterozigosidade gênica ou alélica, sua participação hierárquica permite estimar um componente de diversidade entre o outro componente de diversidade dentro das unidades experimentais (populações, subpopulações, etc.) (Cruz et al., 2008).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAF. **Anuário estatístico da Associação Brasileira dos produtos das florestas plantadas: Ano Base 2009**. ABRAF: Brasília, 87p, 2009.
- ABRAF. **Anuário estatístico da Associação Brasileira dos produtos das florestas plantadas: Ano Base 2011**. ABRAF: Brasília, 149p, 2012.
- AGUINALDO, A. M.; OCAMPO, O. P. M.; BOWDEN, B. F.; WATERMAN, P. G. Tectograndone, an anthraquinone-naphthoquinone pigment from the leaves of *Tectonagrandis*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.33, p.933-935, 1993.
- ALCÂNTARA, B. K de. **Caracterização da diversidade genética de teca (*Tectona grandis*) de diferentes procedências usando marcadores microssatélites**. Piracicaba:, 93p. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2009. 93p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- ANON. **The Wealth of India**. New Delhi, India: CSIR, v.10, 1996.
- ANSARI S. A., NARAYANAN C., WALI S. A., KUMAR R., SHUKLA N., RAHANGDALE S. K. ISSR markers for analysis of molecular diversity and genetic structure of Indian teak (*Tectona grandis* L.f.) populations. **Annals Forest Research**. 55(1): 11-23, 2012.
- BARROSO, A. B. **Silvicultura especial de árboles maderables tropicales**. La Habana: Ministério da Cultura.: Editorial Científico Técnico. p. 342-356, 1983.
- BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO. **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013, 336p.
- BRYNDUM, K.; HEDEGART, T. **Pollination of teak (*Tectona grandis* Linn. F.)** *Silvae Genetica*, v. 28, p.77-80, 1969.
- 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.
- COSTA, J.L.; OLIVEIRA, E.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, G.A.F.; NEVES, C.G. **Marcadores moleculares como ferramenta para estruturação da diversidade genética em genótipos de maracujazeiro**. Jornada Científica – Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2010.

COUTINHO, S. A. Disponível em: <http://www.itto.int/en/tfu/ind=6660000>. Acesso em: 16, janeiro, 2014.

CRUZ, C. D. **Programa GENES – Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV. 2008.

DINIZ FILHO, J. A. **Métodos filogenéticos comparativos**. Ribeirão Preto: Holos. 2000. 120p.

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

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

FIGUEIREDO, E. O. **Avaliação de povoamentos de teca (*Tectona grandis* L.f.) na microrregião do Baixo Rio Acre**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. 301p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia Florestal).

FIGUEIREDO, E. O.; OLIVEIRA, A. D. de.; SCOLFORO, J. R. S. Análise econômica de povoamentos não desbastados de *Tectona grandis* Linn. f., na microrregião do baixo Rio Acre. **Cerne**, Lavras, v. 11, n. 4, p. 342-353, out./dez. 2005.

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.

FOFANA, I. J.; LIDAH, Y. J.; DIARRASSOUBA, N.; N'GUETTA, S. P. A.; SANGARE, A.; VERHAEGEN, D. Genetic structure and conservation of Teak (*Tectona grandis*) plantations in Côte d'Ivoire, revealed by site specific recombinase (SSR) Mongabay.com Open Access Journal - **Tropical Conservation Science** Vol.1(3):279-292, 2008.

FONSECA, C. E. L. da; RIBEIRO, J. F. Fruteiras do cerrado: estágio atual e perspectivas futuras. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1., 1992, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa/CNPMP/SBF, 1992. p. 63-75.

GILL, B. S.; BEDI, Y. S.; BIR, S. S. Cytopalynological studies in woody members of family Verbenaceae from north-west and central India. **Journal of the Indian Botanical Society**, v. 62, v. 1, p. 235-244, 1983.

GRATTAPAGLIA, D. **Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo**. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.;

VALADARES-ILGLIS, M. C. Recursos genéticos e melhoramento: plantas. Rondonópolis: Fundação MT, p.967-1010, 2001.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J.L. Amplification of DNA from evolution arily diverse use Simple primers of simple-sequence repeats. **Teor. Appl. Gen.** 89: 998-1006, 1994.

HEDEGART, T. Pollination of teak (*Tectona grandis* Linn. f.). **Silvae Genetica**, v. 22, n. 4, p. 124-128, 1973.

HOSHINO, A. A.; PALMIERI, D. A.; BRAVO, J. P.; PEREIRA, T.E.B.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Marcador microssatélites na conservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p. 146-150, 2002.

JACOB, H. J.; LINDPAINTNER, K.; LINCOLN, S.E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R.K.; MAO, Y.P.; GANTEN, D.; DZAU, V. J.; LANDER, E.S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hyper-tensive rat. **Cell** 67: 213-24, 1991.

JOSÉBIO, R. L. G. M.; VENTURIM, N.; GOMES, B. G. S. E. Desenvolvimento em diferentes espaçamentos. **Revista da Madeira**, Curitiba-PR, n.106, p.104-105, 2007.

KAOSA-ARD, A. SUANGTHO, V.; KJAER. E. D. **Experience from the improvement of teak in Thailand**. Dinamarca: Danida Forest Seed Centre, 1998. 14p.

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

KERTADIKARA, A. W. S.; PRAT, D. Genetic structure and mating system in teak (*Tectona grandis* L.f.) provenances. **Silvae Genetica**, v. 44, n. 1, p. 2-3, 1995.

KIEHL, E. J. **Manual de edafologia: relação solo-planta**. São Paulo. Agronômica: Ceres, 1979. 262 p. il.

KJAER, E. D.; FOSTER, G. S. **The economics of tree improvement of teak**. Humlebeak: Danida Forest Seed Centre, 1996. 17p.

KJAER, E. D.; SUANGTHO, V. A review of the tree improvement plan for teak in Thailand. Thailand: Report, Royal Forest Department Humlebeak: **Danida Forest Seed Centre**. 1996. 17p.

KRISHNAPILLAY, B. **Silviculture and management of teakplantations**. Unasylla, Rome, v.51, n.201, p.14-21, 2000.

- MATHEW, G.; MATHEW, P. K.; MOHANADAS, K. Preliminary studies on insects visitors to teak (*Tectona grandis* L.f.) inflorescence in Kerala. India. **Indian Forest**, v. 113, n. 1, p. 61-64, 1987.
- MATRICARDI, W. A. T. **Efeito dos fatores do solo sobre o desenvolvimento da teca (*Tectona grandis* L. F.) cultivada em Grande Cárceres – Mato Grosso**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1989. 135p. (Dissertação – Mestrado em Ciências Florestais).
- MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, p. 14-17, 1998.
- MILACH, S.C.K. **Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares**. In: BORÉM, A. et al. Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária.. Viçosa: Ed. UFV, 1998a. 43- 58p.
- NAIR, V. R. K. Utilizations aspects of Teak. **Proceedings of the Institute Teak Symposium**. Thiruvananthapuram, Índia, p. 179-184, 1997.
- OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G., ZUCCHI, M. I.; VENCOVISK, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Origin evolution and genome distribution of microsatellite. **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto, v.29, n.2, p.294-307, 2006.
- REMADE. **Revista da Madeira**. Edição Nº. 118 – Fevereiro de 2009. Disponível em: http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=1367&subject=E%20mais&title=Melhoramento%20Gen%20e%20Clonagem%20da%20Tec. Acesso em: 24, julho, 2012.
- RESENDE, M. D. V. de. Melhoramento de essências florestais. In Borém, (Ed.) **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Editora UFV. Viçosa, 1999, p. 589-648.
- RIBAUT, J. M.; HOISINGTON, D. A. Marker assisted selection: new tools and strategies. **Trends in Plant Sciences**, v. 3, n. 6, p. 236-239, 1998.
- 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, v. 7, n. 33, p. 1-29, 1998
- SAHA, S. Vegetation composition and structure of *Tectona grandis* (teak family Verbenaceae) plantations and dry deciduous forest in central India. **Forest Ecology and Management**, v. 148, n. 1, p. 159-167, 2001.
- SAMPAIO, A. J. A teca na Índia e no Brasil. **Revista Florestal**. Rio de Janeiro, v. 1, n 9, p.7-10, 1930.

SCHUHLLI, G. S. e FILHO, E. P. **O cenário da silvicultura de teca e perspectivas para o melhoramento genético.** Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo: Embrapa Florestas, v. 30, n. 63, p. 217-230, ago./out. 2010.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in diferente eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Res.** 10: 967-81.2000.

TROUP, R. S. **The silviculture of India trees.** Dehradun: v.2, 2006, 1996p.

TSUKAMOTO-FILHO, A. DE A.; SILVA, M. L. DA; COUTO, L.; MÜLLER, M. D. Análise econômica de um plantio de teca submetido a desbastes. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.27, n.4, p.487-494, 2003.

UGALDE, L.; PÉREZ, O. (2001) **Mean anual volume increment of selected industrial forest.** FAO, working paper FP/1.Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 20, dezembro, 2013.

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.; RIMBAWANTO A.; SHIRAISHIS. Discrimination of teak (*Tectona grandis*) plus trees using selected random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Journal of Tropical Forest Science** 16(1): 17-24 2004.

WEAVER, P.L.**Tectona grandis L.f. Teak.** New Orleans, LA: US. Departament of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 18p.1993.

ZIETKIEWICZ, E; RAJALSKI, A; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20:176–183, 1994.

4. CAPÍTULOS

4.1 CAPÍTULO 1 -

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ÁRVORES DE TECA (*Tectona grandis* Linn. F.) BASEADA EM MARCADORES MOLECULARES ISSR E CARACTERES MORFOLÓGICOS

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar 50 genótipos de teca com base em marcadores moleculares ISSR. Dentre os genótipos estudados, 12 eram árvores candidatas, 36 vizinhas às candidatas e 02 árvores consideradas superiores com base no fenótipo, segundo a avaliação dos produtores. Esses genótipos foram propagados via seminal e possuem de 10 a 12 anos em campo. Para tal estudo foram coletadas em campo folhas jovens e expandidas de cada genótipo. O DNA total de cada genótipo foi extraído e as amplificações foram feitas via PCR com o emprego de 12 *primers* de ISSR, previamente selecionados. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% e submetidas à corrida de eletroforese. Para visualização dos produtos amplificados o gel foi corado com auxílio de brometo de etídeo e fotodocumentados em transiluminador UV. Os dados foram analisados utilizando-se o programa POPGENE 1.31 e os parâmetros de diversidade foram estimados. As análises de dissimilaridade foram estimadas pelo Índice de *Jaccard* e a confecção do dendrograma foi feita com base no Agrupamento de Ligação Média entre Grupos (UPGMA). Paralelamente, foi realizada a análise fenotípica de dados referentes às árvores candidatas pela análise multicategórica. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do Programa Genes. Os resultados permitiram observar que os 12 *primers* amplificaram 56 fragmentos e que os *primers* UBC 861 (75%) e UBC 834 (50%) se destacaram entre os demais. No entanto, para o índice de conteúdos polimórfico os iniciadores UBC 841, UBC 857 e UBC 807 proporcionaram maiores valores, 0,329, 0,327 e 0,303 respectivamente. A diversidade genética das árvores candidatas ($H=0,1601$ e $I=0,2301$) foi similar às das vizinhas ($H=0,1507$; $I=0,2178$). Nos dendrogramas, tanto para o método UPGMA quanto para Tocher, 15 grupos foram formados. Quanto à análise fenotípica a variável que mais contribui para a diversidade foi a formação de catana. Esses resultados refletem que há pouca variabilidade entre os genótipos, embora as árvores candidatas tenham ficado agrupadas em grupos diferentes. Nota-se, portanto, a necessidade da ampliação da

variabilidade do material, através da introdução de genótipos de diferentes procedências e não relacionados geneticamente.

PALAVRAS-CHAVE: Amplificação do DNA, Fenótipo, Produção de Madeira.

GENETIC VARIABILITY OF TEAK (*Tectona grandis* Linn. F.) BASED ON ISSR MOLECULAR MARKERS AND MORPHOLOGICAL CHARACTERS

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate 50 teak genotypes based on ISSR molecular markers. Among the genotypes studied, 12 were candidate trees, 36 candidate neighbors and 02 trees considered superior based on phenotype, as assessed by producers. These genotypes were propagated via seminal and have from 10 to 12 years in the field. It was collected in the field expanded young leaves of each genotype. Total DNA was extracted from each genotype and performed amplification via PCR using 12 ISSR primers previously selected. Samples were loaded on agarose gel at 1.5% and subjected to electrophoresis run. For visualization of the amplified products the gel was colored with ethidium bromide and photo documented with UV transilluminator. Data were analyzed and diversity parameters were estimated using the POPGENE 1.31 program. Dissimilarity analyses were estimated using the Jaccard index and the dendrogram was based on Average Connection Between Groups Grouping (UPGMA). In parallel, it was performed the phenotypic analysis of data relating to the candidates trees by multicategorical analysis. All analyzes were performed using the Genes Program. Results showed that the 12 primers amplified 56 fragments and that the UBC 861 (75 %) and UBC 834 (50 %) primers stood out among them. However, for polymorphic content index the indicators UBC 841, UBC 857 and UBC 807 had higher values 0.329, 0.327 and 0.303 respectively. The genetic diversity of candidate trees ($H=0.1601$ and $I=0.2301$) was similar to the neighboring ($H=0.1507$ and $I=0.2178$). The dendrograms formed for both the UPGMA and Tocher method had 15 groups. For phenotypic analysis, the variable that contributes most to the diversity was the machete formation. These results show that there is little variability among genotypes, although the candidate trees have been grouped into different groups. It is noticed, therefore, the need to expand the material variability by introduction of genotypes from different origins and genetically unrelated.

KEYWORDS: DNA amplification, Phenotype, Wood Production.

INTRODUÇÃO

Teca (*Tectona grandis* Linn. F.; Lamiaceae) possui uma madeira muito utilizada para construções navais, madeiramento de casas e fabricação de móveis, por sua leveza, durabilidade e resistência (Rondon-Neto et al., 1998). A área natural da espécie se estende à Índia Peninsular, Myanmar, Laos e Tailândia (Troup, 2006).

A produtividade da teca pode ser substancialmente aumentada através de cuidadosa seleção de árvores superiores (Goh e Monteuuis 2005), utilizando metodologias clássicas de melhoramento; entretanto, esses procedimentos levam vários anos em plantas anuais, e em espécies florestais como a teca, nas quais o tempo será muito mais longo, uma vez que a espécie apresenta crescimento lento (Kaosa-Ard et al., 1998).

Para que um programa de melhoramento seja iniciado é necessário que haja variabilidade genética visando à seleção de genótipos. Essa variabilidade deve ser avaliada para que se conheçam melhor os genótipos. Em espécies perenes, esse conhecimento é mais importante considerando que a manutenção da diversidade genética será reduzida se os plantios florestais forem estabelecidos com um ou com poucos clones vegetativamente propagados. Este fator será especialmente representativo se todo o programa de melhoramento for baseado em um pequeno número de árvores selecionadas (Kjaer et al., 1999). A variabilidade genética só pode ser utilizada com eficiência se for avaliada e quantificada devidamente, e tal caracterização pode ser realizada por meio de descritores morfológicos e/ou moleculares (Singh, 2001).

A caracterização com base em descritores morfológicos é uma ferramenta útil ao melhoramento genético, pois é baseada no fenótipo, portanto, são utilizadas apenas regiões do DNA que são expressas. É uma atividade de baixo custo e de fácil estudo, no entanto, a variabilidade conhecida é limitada e pode sofrer influência ambiental se a característica for de herança quantitativa (Vieira, 2007).

A caracterização baseada em marcadores moleculares auxilia o melhoramento genético, uma vez que é baseada no DNA e independe do estágio de vida da planta. Dentre os muitos marcadores existentes, o ISSR (*Inter Simple sequence repeat*) se destaca por ser um marcador simples, permite a detecção de polimorfismo, usando um *primer* de repetições simples de dois a três nucleotídeos. Possui a vantagem de ter estabilidade, reprodutibilidade, alto polimorfismo, e custos

relativamente baixos (Ziekiewicz et al., 1994; Gupta et al., 1994) além de ser muito importante para o estudo da diversidade genética (Rodrigues, 2010).

Produtores da Fazenda Bacaerí Florestal (Ltda), Alta Floresta, MT, cultivam a teca desde 1996 e nestes cultivos selecionaram algumas árvores de teca em suas plantações, denominadas de “candidatas” e “vizinhas” das árvores candidatas, as quais vêm sendo avaliadas com base em características fenotípicas desejáveis para a produção de madeira como diâmetro à altura do peito e altura total, visando à seleção de árvores superiores para produção de mudas em viveiros, por meio de propagação vegetativa.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a variabilidade genética das árvores de teca selecionadas (candidatas e vizinhas) pelos produtores da Fazenda Bacaerí Florestal (Ltda), MT, por meio de marcadores ISSR e por meio de características morfológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Neste estudo foram caracterizados 50 genótipos de teca provenientes de um plantio comercial na Fazenda Bacaeri Florestal Ltda (BAC) localizada no município de Alta Floresta, MT. Este plantio foi iniciado a partir de sementes. Dentre esses 50 genótipos selecionados pelos produtores e utilizados neste estudo, 12 são árvores designadas como candidatas (melhores genótipos segundo a avaliação dos produtores) e 36 árvores vizinhas das candidatas. Foram incluídas na avaliação duas plantas chamadas de Namorada e Solteirona, também avaliadas pelos produtores (Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos 50 genótipos de teca selecionados pelos produtores da Fazenda Bacaeri Florestal Ltda de Alta Floresta, MT, avaliados neste estudo. “T” = Talhão; “C” = Candidata; “V” = Vizinha da candidata e BAC = Bacaeri

Genótipo	Sigla	Genótipo	Sigla
Solteirona	BAC 1	T9 C1	BAC 49
Namorada	BAC 2	T2 C2	BAC 50
T1 C1	BAC 26	T2 C2 V1	BAC 51
T1 C1 V1	BAC 27	T2 C2 V2	BAC 52
T1 C1 V2	BAC 28	T2 C2 V3	BAC 53
T1 C1 V3	BAC 29	T2 C2 V4	BAC 54
T1 C1 V4	BAC 30	T2 C3	BAC 55
T1 C2	BAC 31	T2 C3 V1	BAC 56
T1 C2 V1	BAC 32	T2 C3 V2	BAC 57
T1 C2 V4	BAC 33	T2 C3 V3	BAC 58
T1 C3	BAC 34	T2 C3 V4	BAC 59
T1 C3 V1	BAC 35	T4 C3	BAC 60
T1 C3 V2	BAC 36	T4 C3 V1	BAC 61
T1 C3 V3	BAC 37	T4 C3 V2	BAC 62
T1 C3 V4	BAC 38	T4 C3 V3	BAC 63
T1 C4	BAC 39	T4 C4	BAC 65
T1 C4 V1	BAC 40	T4 C4 V1	BAC 66
T1 C4 V2	BAC 41	T4 C4 V2	BAC 67
T1 C4 V3	BAC 42	T4 C4 V3	BAC 68
T1 C4 V4	BAC 43	T4 C4 V4	BAC 69
T2 C1	BAC 44	T6 C1	BAC 70
T2 C1 V1	BAC 45	T6 C1 V1	BAC 71
T2 C1 V2	BAC 46	T6 C1 V3	BAC 72
T2 C1 V3	BAC 47	T6 C1 V4	BAC 73
T2 C1 V4	BAC 48	T13 C1	BAC 74

As plantas foram propagadas via seminal, sendo que o plantio do talhão 9 foi realizado em dezembro de 1996 com espaçamento de 2x3 (m). O plantio dos talhões 1 e 2 foi efetuado em janeiro de 1998 com espaçamento de 4x4 (m). As plantas dos talhões 6, 13 e 4 foram plantadas em espaçamento de 3x3 (m), em fevereiro de 1998 no talhão 6, em novembro de 1999 no talhão 13 e em janeiro de 2000 no talhão 4.

Em relação aos tratos culturais são realizadas as podas de condução, formação e correção, e os desbastes sanitário, espacial e de forma, em um período de 3 a 5 anos. No desbaste são retiradas aquelas plantas que apresentam características indesejáveis.

Extração e Quantificação de DNA

Foram coletadas folhas jovens, expandidas e sadias de cada um dos genótipos selecionados. Cada folha, isoladamente, foi envolta em papel alumínio e congelada para o transporte da Fazenda ao Laboratório de Genética do *Campus* Universitário de Alta Floresta - UNEMAT, até uso posterior.

No Laboratório, o DNA genômico foi extraído de aproximadamente 100 mg de folhas segundo o método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1990), modificado com base em Alcântara et al. (2008). A qualidade e a concentração do DNA extraído foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%. A concentração foi comparada através de pesos moleculares de DNA padrão (*lambda*) com amplitude de variação de 10, 20, 50 e 100 ng. O DNA quantificado foi diluído para a obtenção das soluções de trabalho.

Seleção de *Primers* ISSR e Reações de Amplificação

Inicialmente foram realizados testes de amplificação em três genótipos de teca com 34 *primers* ISSR desenvolvidos pela *University of British Columbia* (UBC). Com base nos padrões de bandejamento para intensidade, polimorfismo e repetitividade, foram selecionados 12 dos 34 *primers* testados (Tabela 2). As reações de amplificação via PCR, foram realizadas em termociclador Biocycler com um volume final de 20 µL, sendo 1 µL de DNA ($\pm$ 20 ng), 2 µL de tampão 10x (1M KCl; 1M Tris pH 8.3; 1M MgCl₂; 10% Tween 20), 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 3 µL de *primer* (0,2 mM), 4 µL dNTP (0,1 mM de cada dNTP), 1 µL DMSO e 0,2 µL de Taq polimerase (5U/µl). O programa de amplificação foi proposto por Narayanan et al.

(2006), sendo: um ciclo de desnaturação de 94°C por 3 min; 30 ciclos de 94°C por 30 s, 45-53°C (dependendo da temperatura do *primer*) por 30 s e 72°C 1 min; um ciclo de extensão final de 72°C por 10 min.

Tabela 2. *Primers* utilizados na caracterização molecular dos 50 genótipos de teca provenientes do plantio da Fazenda Bacaeri Florestal Ltda (BAC) no município de Alta Floresta, MT. TM = Temperatura de anelamento referente ao *primer*

Nome do <i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i> (5' – 3')	TM (°C)
UBC 807 – DiAG(T)	AGAGAGAGAGAGAGAGT*	47
UBC 810 – DiGA(T)	GAGAGAGAGAGAGAGAT*	45,4
UBC 826 – DiAC(C)	ACACACACACACACACC	53
UBC 827 – DiAC(G)	ACACACACACACACACG	53
UBC 828 – DiTG(A)	TGTGTGTGTGTGTGTGA	52
UBC 830 – DiTG(G)	TGTGTG TGT GTG TGT GG	52
UBC 834 – DiAG(YT)	AGAGAGAGAGAGAGAGYT*	49
UBC 835 – DiAG(YC)	AGAGAGAGAGAGAGAGYC*	50,2
UBC 840 – DiGA(YC)	GAGAGAGAGAGAGAGAYT*	50
UBC 841 – DiGA(YC)	GAGAGAGAGAGAGAGAYC*	50
UBC 857 – DiAC(YG)	ACACACACACACACACYG*	50
UBC 861 – TriACC	ACCACCACCACCACCACC	60,6

*Y = C ou T; R = A ou G; V = A, C ou G; H = A, C ou T.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida TBE 1X, com voltagem constante de 85 V por aproximadamente quatro horas. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados, por comparação, com o marcador molecular de 100 pb DNA Ladder. A coloração do gel foi realizada com brometo de etídeo (0,6 ng mL⁻¹). Em seguida os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados com câmera digital.

Caracterização Fenotípica

A caracterização fenotípica dos 50 genótipos em estudo foi realizada de acordo com as características avaliadas pelos produtores. As variáveis analisadas foram:

1. Altura total da planta (m) (AT),
2. Altura até a primeira bifurcação (m) (AB),
3. Diâmetro à altura do peito (cm) (DAP),

4. Qualidade dos ramos (QR). Os ramos foram avaliados com notas de 1-6 conforme sua espessura, o ângulo de inserção, grossura e quantidade. Nota 1 pior ramo e nota 6 melhor ramo.
5. Qualidade das toras 1, 2 e 3 (QT1; QT2; QT3). As toras foram nomeadas de 1-3 a cada 2,5 m a partir do solo. Foram atribuídas notas de 1-6 as toras de acordo com a presença de envaginamento, nós e tronco cilíndrico. Nota 1 pior tora e nota 6 melhor tora.
6. Formação de catana (FC). Foram atribuídas notas de 1-6. Quanto maior a altura (cm) da catana menor a sua nota. Nota 1 pior e nota 6 melhor.

Análise estatística

Os fragmentos de ISSR (produtos de amplificação) foram analisados e codificados como caracteres binários: presença (1) ou ausência (0) de bandas.

Para obtenção da matriz de dissimilaridade foi utilizado o complemento aritmético do Índice de Jaccard. Este coeficiente é definido pela expressão:

$$D_{ij} = 1 - S_{ij}$$

onde:

$$S_{ij} = \frac{a}{a+b+c}$$

a = número de bandas presentes nos acessos i, j;

b = número de bandas presentes no acesso i e ausentes no acesso j;

c = número de bandas presentes no acesso j e ausentes no acesso i.

O dendrograma gerado pelo Método de Agrupamento de Ligação Média (UPGMA) segue a fórmula:

$$d(ij)k = \text{média } \{d_{ik} + d_{jk}\} = \frac{(d_{ik} + d_{jk})}{2}$$

$d(ij)k$ = distância média entre o grupo ij e o indivíduo k;

d_{ik} = distância entre os indivíduos i e k;

d_{jk} = distância entre os indivíduos j e k.

A matriz de distâncias geradas pelo coeficiente aritmético do Índice de Jaccard também foi utilizada para o agrupamento dos genótipos pelo método de

otimização de Tocher. As matrizes de dissimilaridade geradas e os agrupamentos (UPGMA e Tocher) foram computados com o auxílio do programa GENES (Cruz, 2008).

O programa POPGENE 1.31 (Yeh et al., 1999) foi utilizado para estimar os parâmetros de diversidade através dos índices de Shannon (I) e de Nei (H), os quais variam de 0 a 1, sendo que quanto mais próximos de zero (0) menor será a diversidade genética.

A diversidade genética do loco foi estimada com base no Índice de Conteúdo Polimórfico (PIC), que é uma estimativa utilizada para a avaliação do poder discriminatório de um loco. A informatividade do loco p_i é a frequência do alelo p no loco p_i , calculado pela equação: $PIC = 1 - \sum_i p_i^2$, e a informatividade do *primer* p_{ij} é a frequência do alelo p do loco i , no *primer* j , sendo calculada pela equação: $PIC_{primer} = 1 - \sum_i \cdot \sum_j p_{ij}^2$ (Rezende et al., 2009).

Os dados fenotípicos foram analisados através da matriz de dissimilaridade pelas variáveis multicategóricas as quais agregaram dados quantitativos e qualitativos e também pelas análises de componentes principais com o auxílio do programa Genes® (Cruz, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 12 *primers* ISSR amplificaram um total de 56 fragmentos nos 50 genótipos de teca analisados, sendo 22 bandas polimórficas (39,3%) e 34 monomórficas (60,7%). A média de bandas amplificadas por *primer* foi de 4,66. Os *primers* que revelaram maior percentual de polimorfismo foram UBC 861 e UBC 834, com 75% e 50% respectivamente (Tabela 3).

Ansari et al. (2012) ao estudarem 29 populações naturais de teca com base em marcadores ISSR, encontraram uma média de 8,6 bandas por *primer*, em contraste ao encontrado no presente estudo, que foi de 4,66 bandas por *primer*. Porém, Ansari et al. (2012) utilizaram 5 marcadores em suas análises em contraste ao presente estudo com a utilização de 12 marcadores.

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) para cada marcador apresentou variação de 0,057 (UBC 827) a 0,329 (UBC 841), com média de 0,204. Os *primers* UBC 841, UBC 857 e UBC 807 demonstraram maiores valores de PIC com 0,329, 0,327 e 0,303, respectivamente (Tabela 3).

Segundo a classificação de Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, valores entre 0,25 e 0,50 mediantemente informativos, e valores inferiores a 0,25, pouco informativos. O PIC representa a existência de variabilidade, a qual será maior com valores mais altos de PIC. Assim, marcadores ISSR que apresentam essa característica são os mais indicados para estudos de variabilidade (Ribeiro, 2011). Dos 12 marcadores utilizados, quatro apresentaram o PIC acima de 0,25 [UBC 807 (PIC= 0,303), UBC 841(PIC= 0,329), UBC 857 (PIC= 0,327) e UBC 861 (PIC= 0,266)], sendo, portanto os mais recomendados para análise da diversidade em teca.

Tabela 3. Código do *primer*, número total de bandas, percentual de polimorfismo e valor do PIC, a partir dos 50 genótipos de teca analisados.

Primer	Nº de Bandas	% de Polimorfismo	PIC*
UBC 807	3	33,33	0,303
UBC 810	3	33,33	0,246
UBC 826	7	42,86	0,243
UBC 827	7	28,57	0,057
UBC 828	7	42,86	0,153
UBC 830	5	20,00	0,060
UBC 834	4	50,00	0,118
UBC 835	3	33,33	0,192
UBC 840	5	40,00	0,154
UBC 841	3	33,33	0,329
UBC 857	5	40,00	0,327
UBC 861	4	75,00	0,266
Média	4,66	39,38	0,204

* Índice de conteúdo polimórfico.

Os índices de diversidade estimados a partir de Nei (H) e de Shannon (I), das plantas candidatas, foram de $H=0,1601$ e $I=0,2301$, muito próximos dos valores encontrados para as árvores vizinhas das candidatas ($H=0,1507$; $I=0,2178$), revelando assim que os dois grupos selecionados pelos produtores em suas plantações apresentaram índices de diversidade próximos e a mesma porcentagem de polimorfismo (37,5%) (Tabela 4).

Os marcadores moleculares ISSR revelaram variabilidade genética entre os genótipos de teca cultivados e selecionados pelos produtores do norte do estado de MT. Porém, observou-se que a diversidade dos genótipos não foi tão elevada. Como esses indivíduos são originários de plantas oriundas de sementes, e a teca é uma espécie alógama, seria esperado uma maior diversidade genética entre eles.

Como o sistema reprodutivo por alogamia observado em teca possibilita que altas taxas de diversidade sejam encontradas dentro de populações, uma vez que a alogamia favorece a recombinação (Hartl, 2008), uma explicação para a baixa variabilidade encontrada entre os genótipos avaliados pode ser a procedência do material cultivado (material já selecionado), pois com os ciclos seletivos a variabilidade vai decrescendo pela diminuição da frequência de indivíduos heterozigotos. Ansari et al. (2012), avaliando 29 populações naturais de teca de diferentes regiões da Índia, com ISSR, encontraram maiores índices de diversidade do que os encontrados no presente estudo, reforçando assim que a variabilidade genética de materiais naturais de teca são maiores.

A caracterização da variabilidade genética de uma espécie é essencial para o sucesso de um programa de melhoramento genético. Segundo Schulli e Filho (2010), estudos de diversidade genética em teca no Brasil são bastante restritos, esta carência de conhecimento sobre a variabilidade genética em genótipos de teca pode estar limitando seu cultivo e dificultando o avanço em programas de melhoramento.

Tabela 4. Diversidade genética dos genótipos de teca estimados via índice diversidade gênica de Nei (H) e Índice de diversidade gênica de Shannon (I) e porcentagem de polimorfismo (%P)

Grupos	H	I	%P
Árvores Vizinhas	0,1507	0,2178	37,50
Árvores Candidatas	0,1601	0,2301	37,50
Vizinhas/Candidatas	0,1575	0,2288	39,29

O complemento aritmético do Índice de Jaccard foi empregado na matriz de dados binários, formada a partir dos 60 fragmentos gerados. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,61. A máxima distância observada foi entre os genótipos BAC 54 e BAC 59 ($D_{ij}=0,268$) sendo, portanto, os materiais mais divergentes neste estudo. A mínima distância foi entre os genótipos BAC 51 com BAC 68 e BAC 52 com BAC 53 ($D_{ij}=0$), sendo assim os mais similares, não podendo ser distinguidos geneticamente com os marcadores utilizados nesta análise. A distância média entre os genótipos foi de 0,139.

O dendrograma gerado com base no UPGMA entre os 50 genótipos analisados formou 15 grupos, considerando o ponto de corte 0,58 (Figura 1).

O grupo I alocou 9 genótipos (51, 68, 67, 66, 69, 70, 63, 47, 48), o grupo II quatro genótipos (1, 2, 71 e 72), o grupo III foi formado por três genótipos (41, 42 e 34), o grupo IV também com três genótipos (29, 35 e 38), o grupo V com 10 genótipos (26, 36, 28, 44, 40, 43, 39, 73, 27 e 37), o grupo VI composto por três genótipos (54, 55 e 56), o grupo VII foi formado por dois genótipos (49 e 74), o grupo VIII agrupou quatro genótipos (52, 53, 60 e 50), no grupo IX estão agrupados dois genótipos (45 e 46), o grupo XI com dois genótipos (31 e 32), o grupo XIII com quatro (61, 62, 65 e 59) e os grupos X, XII, XIV e XV foram representados por um genótipo cada (30, 33, 58 e 57 respectivamente).

Os doze genótipos que foram selecionados como árvores candidatas pelos produtores não ficaram distribuídos um em cada grupo, o que era esperado, uma

vez que há uma origem em comum das sementes que foram utilizadas para compor o plantio. Houve a formação dos 15 grupos distintos porque, mesmo os materiais apresentando baixa variabilidade e advirem provavelmente de seleções recorrentes, não são indivíduos idênticos, visto que são originários de sementes e por isso já possuem uma diversidade entre eles.

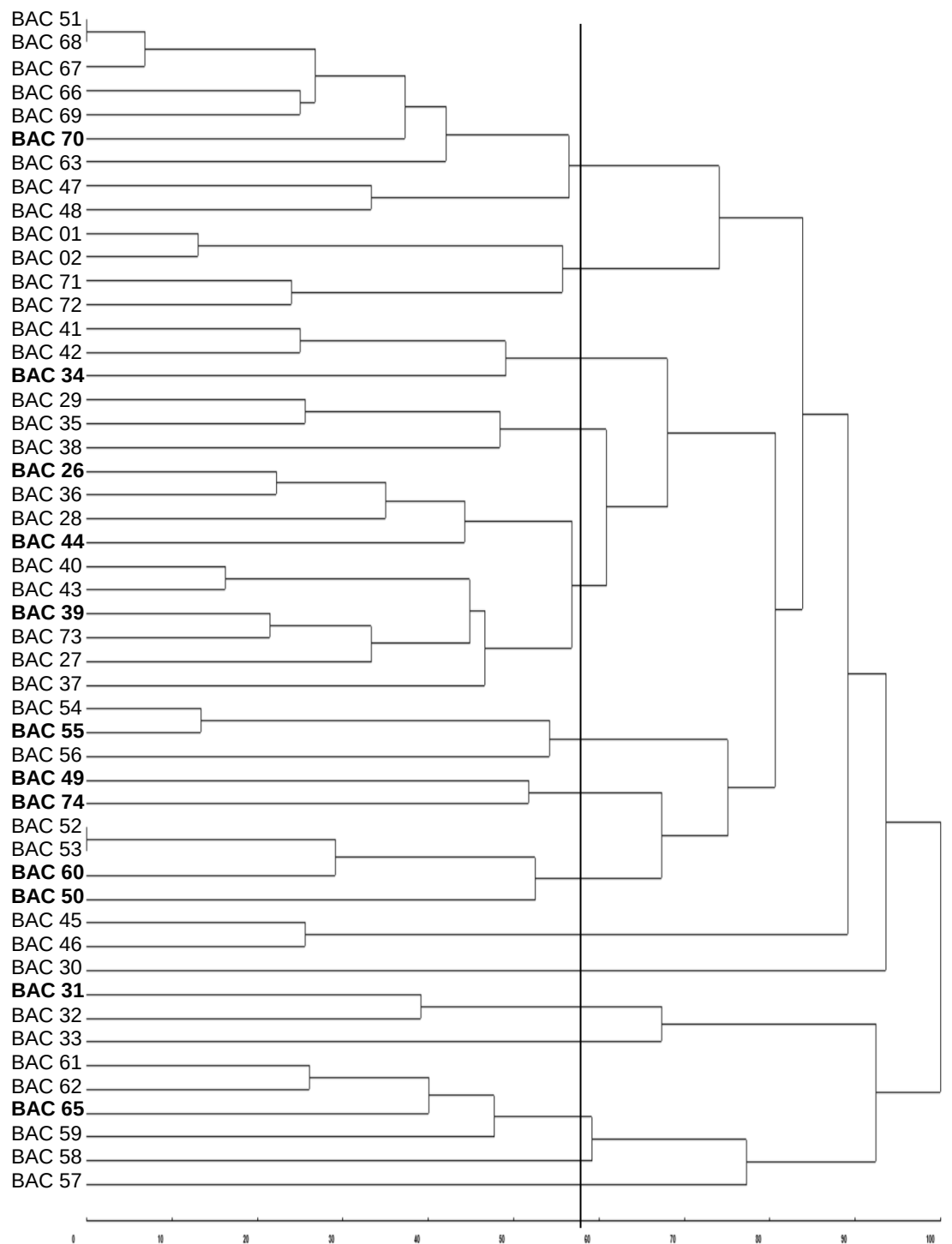


Figura 1. Dendrograma gerado usando o método UPGMA mostrando as relações entre os 50 genótipos de teca com base nos marcadores ISSR.

O método de agrupamento de Tocher possibilitou a formação de 15 grupos (Tabela 5) a partir das bandas geradas pelo marcador ISSR. Os genótipos selecionados como árvores candidatas alocaram-se em grupos distintos, com exceção dos genótipos BAC 39 e BAC 60, que permaneceram no mesmo grupo. A formação de grupos individuais ocorreu com frequência (seis grupos).

Quanto aos dados fenotípicos, os genótipos BAC 56, BAC 57 e BAC 72 apresentam altos valores de diâmetro à altura do peito (DAP= 120, 120 e 115 respectivamente), característica muito interessante para a produção de madeira. Como estes genótipos formaram grupos isolados, são genótipos promissores para serem incluídos na avaliação a fim de serem futuras árvores candidatas.

Ambos os métodos de agrupamento, Tocher e UPGMA, proporcionaram a formação de grupos semelhantes com base nos 50 genótipos de teca avaliados.

Tabela 5. Agrupamento dos 50 genótipos de teca pelo método Tocher, a partir da análise molecular por meio dos marcadores ISSR.

Grupos	Genótipos
I	BAC 51;BAC 67;BAC 68;BAC 66;BAC 69; BAC 70 ;BAC 73;BAC 63; BAC 71; BAC 60 ; BAC 39 ;BAC 53
II	BAC 01;BAC 02;BAC 37; BAC 26 ;BAC 35;BAC 38;BAC 36;BAC 28; BAC 44 ;BAC 27;BAC 40
III	BAC 54; BAC 55 ;BAC 43
IV	BAC 41;BAC 42; BAC 34 ; BAC 49
V	BAC 45; BAC 46; BAC 47; BAC 48
VI	BAC 61; BAC 62; BAC 65 ; BAC 59
VII	BAC 31 ; BAC 32
VIII	BAC 50 ; BAC 52
IX	BAC 29; BAC 33
X	BAC 30
XI	BAC 56
XII	BAC 57
XIII	BAC 58
XIV	BAC 74
XV	BAC 72

* Em destaque, árvores candidatas selecionadas pelos produtores.

Na Tabela 06 estão descritos os valores das variáveis fenotípicas avaliadas nos 50 genótipos de teca. As árvores candidatas apresentam uma média de 133 cm para a variável diâmetro à altura do peito (DAP) e 22 m para altura total (AT). As árvores vizinhas das candidatas obtiveram como médias, DAP=117 cm e AT=21 m. Os genótipos mais promissores com base nas características fenotípicas foram BAC

01 e BAC 02, que apresentam DAP de 176 cm e 173 cm respectivamente e AT de 26 metros.

Tabela 6. Descrição dos valores fenotípicos de 50 genótipos selecionados de teca.

Genótipo	DAP (cm)	AT (m)	AB (m)	QR	QT1	QT2	QT3	FC (cm)	FC Nota
BAC 1	176	26	9	5	5	4	3	70	3
BAC 2	173	26	12	5	6	5	4	60	3
BAC 26	124	22	18	5	5	5	5	0	6
BAC 27	104	22	14	3	4	4	3	40	3
BAC 28	121	22	6	3	5	5	4	0	6
BAC 29	138	22	8	3	2	3	2	60	3
BAC 30	104	22	12	4	2	3	2	0	6
BAC 31	138	25	15	6	4	6	6	60	3
BAC 32	148	22	7	2	4	6	1	60	3
BAC 33	110	23	11	5	6	6	6	0	6
BAC 34	140	24	8	3	4	6	2	0	6
BAC 35	137	23	8	3	4	6	2	70	2
BAC 36	123	20	7	0	4	5	1	0	6
BAC 37	130	22	7	2	4	6	1	80	2
BAC 38	146	22	6	1	4	5	1	100	1
BAC 39	124	22	12	6	5	5	4	0	6
BAC 40	115	21	12	3	3	3	2	70	2
BAC 41	105	22	9	2	3	2	2	50	3
BAC 42	114	22	7	2	4	2	2	40	3
BAC 43	121	21	7	3	3	2	3	130	1
BAC 44	153	21	9	4	6	6	5	0	6
BAC 45	116	21	9	2	5	4	1	0	6
BAC 46	122	21	9	4	6	4	2	0	6
BAC 47	118	21	8	5	3	3	2	30	4
BAC 48	118	21	8	2	3	2	1	0	6
BAC 49	131	24	10	5	6	6	4	0	6
BAC 50	133	22	12	3	5	5	4	0	6
BAC 51	123	22	10	3	3	3	2	40	3
BAC 52	107	22	11	5	4	3	2	40	3
BAC 53	111	22	8	4	5	3	2	0	6
BAC 54	124	22	10	3	4	3	3	0	6
BAC 55	135	22	15	5	5	5	4	0	6
BAC 56	134	22	12	5	4	5	3	70	2
BAC 57	120	22	15	4	4	3	2	0	6
BAC 58	111	22	11	3	3	2	1	0	6
BAC 59	124	22	9	2	5	2	3	0	6
BAC 60	128	22	7	3	5	4	3	0	6
BAC 61	102	20	7	2	2	4	1	50	3
BAC 62	125	20	6	3	4	5	2	0	6
BAC 63	98	19	6	2	3	3	2	0	6
BAC 65	144	20	8	3	6	6	4	0	6

continua...

Continuação Tabela 6...

BAC 66	103	20	10	4	4	4	3	0	6
BAC 67	105	20	10	2	3	3	2	0	6
BAC 68	120	20	8	3	2	4	2	140	1
BAC 69	101	20	9	1	3	2	1	40	3
BAC 70	136	24	9	4	4	6	4	0	6
BAC 71	112	24	10	2	5	3	1	0	6
BAC 72	115	24	11	6	5	4	4	0	6
BAC 73	101	24	8	4	4	3	2	0	6
BAC 74	116	24	10	5	6	6	4	0	6

DAP: Diâmetro à altura do peito; AT: Altura Total; AB: Altura até a primeira bifurcação; QR: Qualidade dos Ramos; QT1, QT2, QT3: Qualidade das Toras 1, 2 e 3; FC: Formação de Catana.

Na tabela 7 estão discriminados os valores e os coeficientes de ponderação das oito características fenotípicas analisadas. Considerando que a importância relativa dos caracteres na divergência genética é determinada pelas variáveis com maiores pesos nos últimos auto vetores são considerados de menor importância para o estudo da diversidade genética por componentes principais, os caracteres de qualidade da tora 3 (QT3) e DAP.

A variável, a partir dos dados fenotípicos, que mais contribuiu na representação da diversidade dos acessos de teca, foi a formação de catana (FC) com 21,28% seguido das demais variáveis, qualidade da tora 2 (QT2), qualidade da tora 3 (QT3), qualidade da tora 1 (QT1), qualidade dos ramos (QR), altura total (AT), altura até a primeira bifurcação (AB) e DAP (tabela 8).

A formação de catana tem influência principalmente sob a qualidade da tora 1. A tora 1 possui maior valor comercial devido aos valores do volume da madeira. Os genótipos BAC 01 e BAC 02, que apresentam altos valores de DAP e AT, ambos possuem a formação de catana. Este fato pode explicar a importância desta característica (FC) em relação à sua contribuição para a representação dos dados.

A candidata BAC 44 não apresenta formação de catana e suas notas para QT1, QT2, QT3 e FC são 4; 6; 6; 5 e 6 respectivamente, além 153 cm de DAP, sendo a candidata com maiores valores depois de BAC 01 e BAC 02.

Com base nas análises fenotípicas e moleculares dos genótipos BAC 01 e BAC 02, sugere-se a escolha de apenas um para compor o quadro de candidatas, uma vez que ambos se agruparam no mesmo subgrupo do grupo II e há uma baixa distância genética entre estes genótipos ($D_{ij}=0,022$).

Tabela 7. Autovalores (λ_i), correspondentes às porcentagens de variação explicadas por Componentes Principais (CPI) e coeficientes de ponderação (autovetores) de 08 características fenotípicas, avaliadas em 50 genótipos de teca (Alta Floresta-MT, 2013) (Singh, 1981)

Autovalores			Coeficiente de ponderação associada a							
CPI	λ_i	% Acumulado	DAP	AT	AB	QR	QT1	QT2	QT3	FC
CP1	3,42	42,81	0,30	0,36	0,28	0,42	0,40	0,35	0,45	0,13
CP2	1,45	60,92	-0,60	-0,20	0,42	0,24	0,00	-0,29	0,16	0,51
CP3	1,22	76,21	0,00	-0,28	-0,44	-0,30	0,42	0,33	-0,04	0,59
CP4	0,64	84,21	0,02	0,69	-0,16	-0,01	0,22	-0,48	-0,36	0,28
CP5	0,41	89,39	0,33	-0,06	0,71	-0,47	0,08	0,07	-0,35	0,15
CP6	0,36	93,86	-0,19	0,31	0,00	0,17	-0,54	0,60	-0,35	0,26
CP7	0,28	97,41	0,63	-0,30	-0,09	0,40	-0,35	-0,28	-0,06	0,38
CP8	0,21	100,0	0,09	0,27	-0,04	-0,51	-0,44	-0,09	0,62	0,24

DAP – Diâmetro à altura do peito; AT – Altura total; AB – Altura até a primeira bifurcação; QR – Qualidade dos ramos; QT1, QT2, QT3 – Qualidade das toras 1, 2 e 3; FC - Formação de catana;

Tabela 8. Contribuição relativa das diversas características avaliadas para a divergência genética, em 50 genótipos de teca (Alta Floresta-MT, 2013) (Singh, 1981)

Característica	Contribuição (%)
Diâmetro à altura do peito	8,01
Altura total	8,20
Altura até a primeira bifurcação	8,11
Qualidade dos ramos	8,98
Qualidade da tora 1	13,66
Qualidade da tora 2	19,94
Qualidade da tora 3	11,82
Formação de catana	21,28
TOTAL	100,00

A candidata BAC 49 é a árvore mais velha entre as outras candidatas, porém não é a que apresenta maior valor de DAP. No entanto, BAC 44, plantada dois anos após BAC 49, apresenta um DAP de 153 cm.

O espaçamento do plantio adotado no talhão em que BAC 49 foi plantada é de 3x3 m, enquanto que para BAC 44 adotou-se um espaçamento de 4x4 m. Observa-se que a forma de plantio utilizando um espaçamento de 4x4 m em teca, neste estudo, acarretou em um melhor desenvolvimento das árvores em relação ao DAP.

O espaçamento tem implicações em diversos fatores do ponto de vista silvicultural, tecnológico e econômico, tendo influência na qualidade da madeira, no ciclo de rotação, no manejo e exploração florestal (Balloni, 1983). A teca é uma

espécie heliófila que apresenta um aumento na mortalidade de plantas jovens quando a densidade de plantio é muito alta (Passos et al., 2006).

Em média, segundo preceitos teóricos silviculturais, o espaçamento tem uma influência maior no desenvolvimento do DAP do que no desenvolvimento em altura das árvores (Evert, 1971).

CONCLUSÕES

As análises com base nos marcadores ISSR proporcionaram baixos valores de bandas por *primer*, além dos *primers* utilizados serem pouco informativos em relação aos valores de PIC.

A diversidade genética do grupo das candidatas e das árvores vizinhas às candidatas foi baixa e os grupos apresentaram a mesma porcentagem de polimorfismo.

O método de agrupamento de UPGMA e Tocher formaram a mesma quantidade de grupos e os genótipos mais distantes geneticamente foram BAC 54 e BAC 59.

Com base nos dados fenotípicos, a variável formação de catana apresentou maior significância na representação da diversidade nos 50 acessos de teca e o maior espaçamento utilizado para o plantio possibilitou maiores valores de DAP.

De forma geral, os genótipos avaliados apresentaram baixa diversidade genética entre si e visando o aumento da variabilidade genética sugere-se o acréscimo de novos genótipos de diferentes populações naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, B. K; SIQUEIRA, M. V. B. M; VEASEY, E. A. **Comparação de métodos de extração de DNA de teca (*Tectona grandis* L. f.) para estudos de caracterização genética usando SSR**. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 16 a 19 de setembro de 2008, p.35.
- ANSARI, S. A.; NARAYANAN, C.; WALI, S. A.; KUMAR, R.; SHUKLA, N.; RAHANGDALE, S. K. ISSR markers for analysis of molecular diversity and genetic structure of Indian teak (*Tectona grandis* L.f.) populations. **Annals Forest Research**. 55(1): 11-23, 2012.
- BALLONI, E.A. **Influência do espaçamento de plantio na produtividade florestal**. In: Simpósio IUFRO em melhoramento genético e produtividade de espécies florestais de rápido crescimento, 1983, São Paulo. Anais... São Paulo: Silvicultura, V.8, n.31, p.588-93, 1983.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, H. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES – Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV. 2008.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- EVERT, F. **Spacing studies: a review**. Information Report, Ottawa, V.37, p.1-95, dez.1971.
- GOH, D.; MONTEUUIS, O. Rationale for developing intensive teak clonal plantations, with special reference to sabah. **Bois et Forêt des Tropiques**, v. 28, n. 3, p. 5-15, 2005.
- GUPTA, M.; CHYI, Y. S; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J.L. Amplification of DNA from evolutionarily diverse use Simple primers of simple-sequence repeats. **Teor. Appl. Gen.** 89: 998-1006, 1994.
- HARTL, D. L. **Princípios da genética de população**. Ribeirão Preto: FUNPEC. 2008. 217 p.
- KAOSA-ARD, A.; SUANGTHO, V.; KJAER. E. D. **Experience from the improvement of teak in Thailand**. Dinamarca: Danida Forest Seed Centre, 14p,1998.

- KJAER, E. D.; KAOSA-ARD, A.; SUANGTHO, V. **Domestication of teak through tree improvement. Options, possible gains and critical factors.** Chiang Mai University, Thailand: Proceedings from 'Teak productivity, site selection and genetic improvement' Teak Net meeting, Jan. 1999. Disponível em: <http://130.225.42.200/dfsc/pdf/Publications/Domestication.pdf>. Acesso em: 20, outubro, 2012.
- 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** Vol. 5 (13), pp. 1220-1223, 3 July 2006.
- PASSOS, C. A. M.; BUFULIN, L.; GONÇALVES, M. R. Avaliação silvicultural de *Tectona grandis* L.f em Cáceres – MT. **Ciência Florestal**, V.16, n.2, p.225-232, 2006.
- REZENDE, R. K. PAIVA, L. V.; PAIVA, R.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; TORGA, P. P. Divergência genética entre cultivares de gérbera utilizando marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v.39, n.8, nov. 2009.
- RIBEIRO, I. C. N. S. **Análise da divergência genética em acessos de *Mangifera indica* com base em descritores agro-morfológicos e marcadores microssatélites.** Feira de Santana, Universidade Estadual de Feira de Santana 2011. 113p. (Dissertação – Mestrado em Recursos Genéticos Florestais).
- RODRIGUES, J. F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccínea* Lindl. e *C. Mantiqueirae* (Flowie) Van der Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2010. 81p. (Dissertação – Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)
- 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, v. 7, n. 33, p. 1-29, 1998
- SCHUHLLI, G. S. e; FILHO, E. P. **O cenário da silvicultura de teca e perspectivas para o melhoramento genético.** Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo: Embrapa Florestas, v. 30, n. 63, p. 217-230, ago./out. 2010.
- SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics e Plant Breeding**, v.41, p.237-245, 1981.
- TROUP, R. S. **The silviculture of India trees.** Dehradun: v.2, 2006, 1996p.

VIEIRA, J. **Caracterização morfológica e molecular do banco de germoplasma de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) da EPAGRI**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2007. 115p. (Dissertação – Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais).

YEAH, F. C; YANG, R.; BOYLE, T. **Popgene ver. 1.32: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis**. Quick User Guide, 1999.

ZIETKIEWICZ, E; RAJALSKI, A; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20:176–183, 1994.

4.2. CAPÍTULO 2 - DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE TECA (*Tectona grandis* Linn. F.) COM BASE EM MARCADORES ISSR E MICROSSATÉLITES

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a variabilidade genética por meio de marcadores moleculares (ISSR e SSR) de 32 genótipos de teca, selecionados em três localidades e mantidos em viveiro para produção de mudas. Esses genótipos foram propagados via seminal em campo e após escolhidos passaram a ser cultivados em viveiro. Para tal estudo, foram coletadas folhas jovens e expandidas e armazenadas em sacos plásticos contendo sílica gel para posterior transporte ao laboratório. Posteriormente, foi extraído o DNA total de cada genótipo e as amplificações foram feitas via PCR com o emprego de 12 e 08 iniciadores de ISSR e SSR, respectivamente. As amostras foram aplicadas em gel de agarose submetidas à corrida de eletroforese. Para visualização dos produtos amplificados os géis foram corados com auxílio de brometo de etídeo e fotodocumentados em transiluminador UV. As análises de dissimilaridade foram estimadas pelo Índice de *Jaccard* e a confecção do dendrograma foi feita com base no Agrupamento de Ligação Média entre Grupos (UPGMA). Foram ainda realizados os agrupamentos com base no método de Tocher. Os resultados com base nos marcadores SSR indicaram a presença de 87 alelos, valores de índice de conteúdo polimórfico (PIC) entre 0,76 a 0,87, heteroziosidade (H_T) variando de 0,00 a 0,34 e maior frequência alélica (MF_A) de 0,19 a 0,31. O dendrograma com base no método UPGMA permitiu a formação de 12 grupos. Para os marcadores ISSR foram obtidos 56 fragmentos e para as análises do PIC os valores variaram entre 0,052 e 0,324, a média da porcentagem de polimorfismo (%P) com base nos 12 marcadores de 39,38%. O agrupamento com base no método de UPGMA formou 10 grupos. Em relação ao método de Tocher nove grupos foram formados. Conclui-se que não há duplicatas no material mantido no viveiro, no entanto devido à baixa variabilidade sugere-se a busca de novos materiais de diferentes procedências para a coleção de trabalho.

Palavras Chave: Diversidade Genética, Produção de Muda, Teca.

GENETIC VARIABILITY OF TEAK (*Tectona grandis* Linn. F.) BASED ON ISSR MOLECULAR MARKERS AND MORPHOLOGICAL CHARACTERS

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate 50 teak genotypes based on ISSR molecular markers. Among the genotypes studied, 12 were candidate trees, 36 candidate neighbors and 02 trees considered superior based on phenotype, as assessed by producers. These genotypes were propagated via seminal and have from 10 to 12 years in the field. It was collected in the field expanded young leaves of each genotype. Total DNA was extracted from each genotype and performed amplification via PCR using 12 ISSR primers previously selected. Samples were loaded on agarose gel at 1.5% and subjected to electrophoresis run. For visualization of the amplified products the gel was colored with ethidium bromide and photodocumented with UV transilluminator. Data were analyzed and diversity parameters were estimated using the POPGENE 1.31 program. Dissimilarity analyses were estimated using the Jaccard index and the dendrogram was based on Average Connection Between Groups Grouping (UPGMA). In parallel, it was performed the phenotypic analysis of data relating to the candidates trees by multicategorical analysis. All analyzes were performed using the Genes Program. Results showed that the 12 primers amplified 56 fragments and that the UBC 861 (75 %) and UBC 834 (50 %) primers stood out among them. However, for polymorphic content index the indicators UBC 841, UBC 857 and UBC 807 had higher values 0.329, 0.327 and 0.303 respectively. The genetic diversity of candidate trees ($H=0.1601$ and $I=0.2301$) was similar to the neighboring ($H=0.1507$ and $I=0.2178$). The dendrogram formed for both the UPGMA and Tocher method had 15 groups. For phenotypic analysis, the variable that contributes most to the diversity was the machete formation. These results show that there is little variability among genotypes, although the candidate trees have been grouped into different groups. It is noticed, therefore, the need to expand the material variability by introduction of genotypes from different origins and genetically unrelated.

Keywords: DNA amplification, Phenotype, Wood Production.

INTRODUÇÃO

Teca (*Tectona grandis* Linn. F.; Lamiaceae), introduzida da Índia, se adaptou bem nas regiões tropicais brasileiras e hoje existem cerca de 100 mil ha de plantios com alta produtividade em vários locais. Sua madeira possui qualidade superior e um mercado estabelecido e cativo, particularmente na Ásia. O Brasil hoje exporta madeira de teca principalmente para a Índia, maior importador mundial. Os preços têm aumentado e o negócio é atrativo (Tomaselli, 2013).

No estado de Mato Grosso já existem vários plantios comerciais da espécie. Produtores e pesquisadores das empresas, Bacaerí Florestal Ltda, APASA Agropecuária Ltda e Teca do Brasil Florestal, com base em características fenotípicas, selecionaram genótipos promissores de teca para serem mantidos no viveiro Verde Novo do município de Colíder, MT, visando a produção de mudas.

Os genótipos de teca utilizados neste estudo, que foram avaliados e selecionados pelos produtores, para produção de mudas a serem utilizadas em plantios de larga escala, não foram ainda caracterizados por meio de marcadores moleculares, que é uma ferramenta muito utilizada na assistência ao melhoramento genético e seleção de genótipos promissores.

Dentre os marcadores mais utilizados nestes estudos estão os microsatélites (*Simple Sequence Repeat* – SSR), cuja natureza codominante é uma vantagem em sua utilização sobre os demais marcadores dominantes baseados em PCR (Oliveira et al., 2006). Desta forma tornam-se mais informativos, refletem em maior valor do “PIC” (*Polymorphism Information Content*) em estudos de diversidade (Grattapaglia, 2001; Zucchi et al., 2002), *fingerprinting* (Wright e Bentzen, 1994), proteção de cultivares (Priolli et al., 2002) e caracterização para conservação de germoplasma (Mason et al., 2005). Os produtos da amplificação podem ser observados em gel de poliacrilamida ou de agarose de alta resolução. As bandas são visualizadas no gel por meio de coloração com brometo de etídio ou nitrato de prata (Caixeta et al., 2006).

Uma das desvantagens dos marcadores SSR é a necessidade de informações prévias do genoma para sua utilização (Oliveira et al., 2006), porém, para a teca já foram desenhados 15 iniciadores por Verhaegen et al. (2005), os quais foram utilizados neste estudo.

Além dos microssatélites, os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), são também utilizados uma vez que não necessitam de informações prévias do genoma, independem da espécie trabalhada e os resultados quanto à reprodutibilidade, polimorfismo e qualidade de bandas são satisfatórios, sendo, portanto, desejáveis para estudos de diversidade genética (Rodrigues, 2010).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade genética por meio dos marcadores ISSR e SSR de 32 genótipos de teca selecionados com base em avaliações fenotípicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram utilizados 32 genótipos de teca de três distintas localidades, com base nas avaliações dos seguintes parâmetros fenotípicos: altura total da planta, altura até a primeira bifurcação, diâmetro à altura do peito, qualidade dos ramos, qualidade das toras e formação de catana. Esses genótipos foram gentilmente cedidos pelas Empresas para serem objeto desse estudo.

Dos 32 genótipos avaliados neste estudo, 12 foram cedidos pela Empresa Bacaerí Florestal Ltda (BAC) no município de Alta Floresta, MT; 12 pela Empresa APASA Agropecuária Ltda (Nome Fantasia Guavirá - GUA) no estado de SP em São José do Rio Claro e 08 (oito) pela Empresa Teca do Brasil Florestal (TBR) do município de Cuiabá, MT (Tabela 1). As plantações foram iniciadas a partir de sementes e estão mantidas no Viveiro Verde Novo no município de Colíder, MT.

De cada genótipo foi coletado folhas jovens, expandidas e sadias, armazenadas em sílica gel e transportadas ao laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular do *Campus* Universitário de Alta Floresta, MT – UNEMAT, para posterior extração de DNA.

Tabela 1. Relação dos 32 genótipos de teca das três distintas localidades e utilizados neste estudo

Nome do acesso	Código	Procedência
3B	GUA 3	São José do Rio Claro/SP
5B2/2º	GUA 4	São José do Rio Claro/SP
3C/2º	GUA 5	São José do Rio Claro/SP
SEDE	GUA 6	São José do Rio Claro/SP
4B1/1º	GUA 7	São José do Rio Claro/SP
4B2/3º	GUA 8	São José do Rio Claro/SP
2D/EX	GUA 9	São José do Rio Claro/SP
5B1/1º	GUA 10	São José do Rio Claro/SP
5A/1º	GUA 11	São José do Rio Claro/SP
3A/2º	GUA 12	São José do Rio Claro/SP
4D/2º	GUA 13	São José do Rio Claro/SP
5B2/1º	GUA 14	São José do Rio Claro/SP
48L/70	TBR 15	Cuiabá/MT
13L/170	TBR 16	Cuiabá/MT
24L/127	TBR 17	Cuiabá/MT
56L/54	TBR 18	Cuiabá/MT
7L/248	TBR 19	Cuiabá/MT

continua...

Continuação Tabela 1...

1L/153	TBR 20	Cuiabá/MT
44L/187	TBR 21	Cuiabá/MT
24L/185	TBR 22	Cuiabá/MT
T1C1	BAC 26	Alta Floresta/MT
T1C2	BAC 31	Alta Floresta/MT
T1C3	BAC 34	Alta Floresta/MT
T1C4	BAC 39	Alta Floresta/MT
T2C1	BAC 44	Alta Floresta/MT
T9C1	BAC 49	Alta Floresta/MT
T2C2	BAC 50	Alta Floresta/MT
T2C3	BAC 55	Alta Floresta/MT
T4C3	BAC 60	Alta Floresta/MT
T4C4	BAC 65	Alta Floresta/MT
T6C1	BAC 70	Alta Floresta/MT
T13C1	BAC 74	Alta Floresta/MT

Extração e quantificação de DNA

A extração total do DNA genômico a partir de folhas seguiu o método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1990), modificado com base em Alcântara et al., 2008.

A confirmação da qualidade e quantidade do DNA extraído foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose 0,8%. O DNA extraído foi comparado com DNA padrão (*lambda*), com amplitude de variação de 10, 20, 50 e 100 ng/μL. O DNA quantificado foi diluído para a obtenção das soluções de trabalho a 3 ng/μL.

Amplificação e genotipagem de locos ISSR

A partir de 34 iniciadores de ISSR, inicialmente testados para a espécie, 12 foram selecionados com base em padrões de bandejamento para intensidade, polimorfismo e repetitividade (tabela 2). As reações de amplificação via PCR, foram realizadas em termociclador Biocycler com um volume final de 20 μL, sendo 1 μL de DNA ($\pm$ 20 ng), 2 μL de tampão 10x (1M KCl; 1M Tris pH 8.3; 1M MgCl₂; 10% Tween 20), 2 μL de MgCl₂ (25 mM), 3 μL de *primer* (0,2 mM), 4 μL dNTP (0,1 mM de cada dNTP), 1 μL DMSO e 0,2 μL de Taq polimerase (5U/μl). O programa de amplificação foi proposto por Narayanan et al. (2006) sendo: um ciclo de desnaturação de 94°C por 3 min; 30 ciclos de 94°C por 30 s, 45-53°C (temperatura do iniciador) por 30 s e 72°C 1 min; um ciclo de extensão final de 72°C por 10 min.

Tabela 2. Relação dos iniciadores ISSR utilizados na caracterização molecular dos 32 genótipos de teca. TM = Temperatura de anelamento

Iniciador	Sequência do <i>Primer</i> (5' – 3')	TM (°C)
UBC 807 – DiAG(T)	AGAGAGAGAGAGAGAGT*	47
UBC 810 – DiGA(T)	GAGAGAGAGAGAGAGAT*	45,4
UBC 826 – DiAC(C)	ACACACACACACACACC	53
UBC 827 – DiAC(G)	ACACACACACACACACG	53
UBC 828 – DiTG(A)	TGTGTGTGTGTGTGTGA	52
UBC 830 – DiTG(G)	TGTGTG TGT GTG TGT GG	52
UBC 834 – DiAG(YT)	AGAGAGAGAGAGAGAGYT*	49
UBC 835 – DiAG(YC)	AGAGAGAGAGAGAGAGYC*	50,2
UBC 840 – DiGA(YC)	GAGAGAGAGAGAGAGAYT*	50
UBC 841 – DiGA(YC)	GAGAGAGAGAGAGAGAYC*	50
UBC 857 – DiAC(YG)	ACACACACACACACACYG*	50
UBC 861 – TriACC	ACCACCACCACCACCACC	60,6

*Y = C ou T; R = A ou G; V = A, C ou G; H = A, C ou T.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida TBE 1X, com voltagem constante de 85 V por aproximadamente quatro horas. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados, por comparação, com o marcador molecular de 100 pb DNA Ladder. A coloração do gel foi realizada com brometo de etídeo ($0,6 \text{ ng mL}^{-1}$). Em seguida os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados com câmera digital.

Amplificação e genotipagem de locos microssatélites

Foram utilizados 15 iniciadores microssatélites (SSR), para as amplificações iniciais, desenvolvidos por Verhaegen et al. (2005). Destes, oito iniciadores (Tabela 3) foram selecionados com base em padrões de bandamento como: intensidade, polimorfismo e repetitividade.

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Biocycler com um volume final de 13 μL , sendo 2 μL de DNA ($\pm 3 \text{ ng}$), 1,5 μL de tampão 10x (1M KCl; 1M Tris pH 8.3; 1M MgCl_2 ; 10% Tween 20), 0,5 μL de MgCl_2 (50 mM), 2 μL de cada *primer* (0,2 mM), 3 μL dNTP (0,1 mM de cada dNTP), e 0,12 μL de Taq polimerase (5U/ μL). O programa de amplificação foi proposto por Verhaegen et al. (2005) sendo: um ciclo de desnaturação de 94°C por 4 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55-62°C (dependendo do iniciador) por 45 segundos e 72°C por 45 segundos; um ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Tabela 3. Relação das sequências (F: *forward*; R: *reverse*), temperatura de anelamento (TA) (°C) e amplitude do tamanho das bandas esperadas (TB) para os 08 iniciadores utilizados neste estudo

Loco	Sequência	TA (°C)*	TB (pb)**
CIRAD3TeakF01	F: 5' GCTCTCCACCAACCTAAACAA-3' R: 5'-AAAACGTCTCACCTTCTCACT-3'	60,6	198-234
CIRAD4TeakDa12	F: 5'-CGCACACCAGTAGCAGTAGCC-3' R: 5'-GCCGGAAAAAGAAAAACCAAA-3'	62	129-171
CIRAD4TeakF02	F: 5'-CCGGTAAAAAGGTGTGTCA-3' R: 5'-GAGTGGAAGTGCTAATGGA-3'	58	217-243
CIRAD1TeakA06	F: 5'-CAAAACAAAACCAATAGCCAGAC-3' R: 5'-TTTCATCATCATCATCAACATCC-3'	57,4	191-229
CIRAD1TeakB03	F: 5'-ACAACCCCTCCTCTCTTCACTA-3' R: 5'-CACTACCACTCATCATCAACACA-3'	62,8	236-266
CIRAD1TeakF05	F: 5'-CTTCTGCAACCCTTTTTCAC-3' R: 5'-AGCCATATCTTCCTTTCTCT-3'	58,4	249-279
CIRAD2TeakB07	F: 5'-GGGTGCTGATGATTTTGAGTT-3' R: 5'-CTAAGGAGTGAGTGAGTTTT-3'	55	129-157
CIRAD3TeakB02	F: 5'-ATGAAGACAAGCCTGGTAGCC-3' R: 5'-GGAAGACTGGGGAATAACACG-3'	62	216-252

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% p/v em tampão de corrida TB 1X, com voltagem constante de 85 V por aproximadamente cinco horas e os tamanhos dos fragmentos foram comparados com o auxílio do marcador molecular de 100 pb DNA Ladder.

A coloração do gel foi realizada com brometo de etídeo (0,6 ngmL⁻¹) para a visualização em transiluminador UV. Em seguida os géis foram fotodocumentados.

Análise estatística com base nos marcadores ISSR

Os produtos de amplificação foram analisados e codificados como caracteres binários: presença (1) ou ausência (0) de bandas.

O programa Genes foi utilizado para gerar a matriz de dissimilaridade pelo Índice de Jaccard. Este coeficiente é definido pela expressão:

$$D_{ij} = 1 - S_{ij}$$

onde:

$$S_{ij} = \frac{a}{a+b+c}$$

a = número de bandas presentes nos acessos i, j;

b = número de bandas presentes no acesso i e ausentes no acesso j;

c = número de bandas presentes no acesso j e ausentes no acesso i.

A partir da matriz foram gerados os dendrogramas utilizando o Método de Agrupamento de Ligação Média entre Grupos (UPGMA) e Tocher, no programa Genes[®] (Cruz, 2008). A adequação dos resultados é realizada por meio do coeficiente de correlação cofenético (CCC) proposto por Sokal e Rohlf (1962).

A diversidade genética do loco ou PIC (Índice de Conteúdo Polimórfico) é uma estimativa utilizada para a avaliação do poder discriminatório de um loco. A informatividade do loco p_i é a frequência do alelo p no loco p_i , calculado pela equação: $PIC = 1 - \sum_i p_i^2$, e a informatividade do *primer* p_{ij} é a frequência do alelo p do loco i , no *primer* j , sendo calculada pela equação: $PIC \text{ primer} = 1 - \sum_i \cdot \sum_j p_{ij}^2$ (Rezende et al., 2009).

Análise estatística com base nos marcadores SSR

Os fragmentos de SSR (produtos de amplificação) foram analisados no programa GelQuant Pro[®] (DNR, 2006) para a construção de uma matriz com base no tamanho dos fragmentos (alelos), para que desta forma fosse possível a determinação da frequência alélica, a diversidade gênica, a heterozigosidade e o PIC (Conteúdo de informação de polimorfismo) no programa Power Marker (Liu & Mouse, 2005). Ainda foi elaborada a construção do dendrograma com base no Método de Agrupamento de Ligação Média (UPGMA) a partir da distância de Nei (1981) com auxílio do programa Mega 6.05 (Kumar et al., 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados obtidos a partir dos marcadores SSR

Os oito locos de microssatélites avaliados geraram um total de 87 alelos com média de 10 alelos por iniciador, destacando-se o iniciador CIRAD3TeakF01 com 13 alelos (Tabela 4).

Os altos valores de alelos foram semelhantes aos encontrados por Fofana et al. (2009). O iniciador CIRAD1TeakA06 revelou 19 alelos, para CIRAD2TeakBO7 foram encontrados 11 alelos, para CIRAD1TeakBO3 obteve-se 09 alelos, CIRAD1TeakF05 foi representado por 15 alelos, CIRAD3TeakBO2 apresentou 16 alelos, CIRAD3TeakF01 com 18 alelos, CIRAD4TeakDa12 com 17 alelos e CIRAD4TeakF02 com 14 alelos. Para os 32 genótipos analisados neste estudo, os valores encontrados foram de 12, 10, 14, 11, 11, 13, 9 e 12 alelos para os respectivos marcadores.

Um alto número de alelos também foi encontrado em outras espécies perenes em estudos de diversidade com marcadores de microssatélites como cedro (*Cedrela fissilis*) que apresentou de 4 a 25 alelos (Gandara, 2009), cacau (*Theobroma cacao*) com 4 a 22 alelos (Lima, 2007) e café (*Coffea canephora*) com variação de 6 a 12 alelos (Aleckevetch, 2013).

O valor do PIC variou de 0,76 (CIRAD2TeakBO7) a 0,87 (CIRAD1TeakA06). Os altos valores encontrados para o PIC demonstram a boa qualidade dos iniciadores, uma vez que, segundo Botstein et al. (1980), valores superiores a 0,5 são considerados muito informativos, entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos, e inferiores a 0,25, pouco informativos.

Os valores de heterozigosidade variaram de 0,00 (CIRAD4TeakDa12) a 0,34 (CIRAD1TeakBO3), com média de 0,16, indicando um alto nível de indivíduos homozigotos.

As distribuições das frequências alélicas variaram entre os locos (Tabela 4). Os locos CIRAD2TeakBO7 e CIRAD4TeakDa12 tiveram uma distribuição menos uniforme, indicando maior frequência de uns poucos alelos. Os altos números de alelos encontrados podem influir nos altos valores da diversidade gênica para os locos. Em eucalipto as frequências alélicas foram menores que 0,30 com relativa homogeneidade, resultando também numa alta heterozigosidade (Brondani et al., 1998).

Em teca nota-se valores semelhantes para maiores frequências alélicas em um determinado loco, pois assim como o eucalipto a teca é uma espécie florestal exótica. Quanto aos valores de heterozigosidade muito inferiores podem ser devido à estreita base genética dos genótipos selecionados pelos produtores nas três localidades.

Tabela 4. Loco, maior frequência de alelos (MF_A) número de alelos (N_A), diversidade gênica (D_G), heterozigosidade (H_T) e valor do PIC, gerados a partir da amplificação dos 32 genótipos de *Tectona grandis* com oito iniciadores SSR

Loco	MF_A	N_A	D_G	H_T	PIC
CIRAD1TeakA06	0,22	12	0,88	0,19	0,87
CIRAD2TeakBO7	0,39	10	0,78	0,12	0,76
CIRAD1TeakBO3	0,22	09	0,84	0,34	0,82
CIRAD1TeakF05	0,26	11	0,85	0,19	0,83
CIRAD3TeakBO2	0,26	11	0,83	0,16	0,81
CIRAD3TeakF01	0,19	13	0,87	0,09	0,86
CIRAD4TeakDa12	0,31	09	0,80	0,00	0,77
CIRAD4TeakF02	0,22	12	0,86	0,19	0,84
Média		10,87	0,84	0,16	0,82

Conforme a estruturação visualizada no dendrograma (figura 1) pode-se observar a formação de 12 grupos.

Os grupos I, VIII e IX alocaram individualmente os genótipos BAC 34, BAC 26 e BAC 31, respectivamente. O grupo II foi formado pelos genótipos GUA 08 e GUA 09. No grupo III ficaram alocados o genótipos TBR 21, TBR 22, BAC 39 e BAC 44. No grupo IV os genótipos alocados foram TBR 15, TBR 17, TBR 18 e TBR 19. O grupo V foi formado por TBR 16 e TBR 20. O grupo VI formado pelos genótipos BAC 55, BAC 60, BAC 65 e BAC 70. O grupo VII agrupou os genótipos BAC 49, BAC 50 e BAC 74. O grupo X alocou os genótipos GUA 10, GUA 11, GUA 12 e GUA 13. O grupo XI alocou os acessos GUA 04 e GUA 06 e o grupo XII, GUA 03, GUA 05, GUA 14 e GUA 07.

Nota-se a partir do dendrograma gerado pelos marcadores SSR que as candidatas, em sua maioria, separam-se por localidade, com exceção das candidatas TBR 21, TBR 22 com BAC 39 e BAC 44. Isto demonstra que a escolha por genótipos de distintas localidades contribuiu de forma positiva para a variabilidade genética das mudas contidas no viveiro.

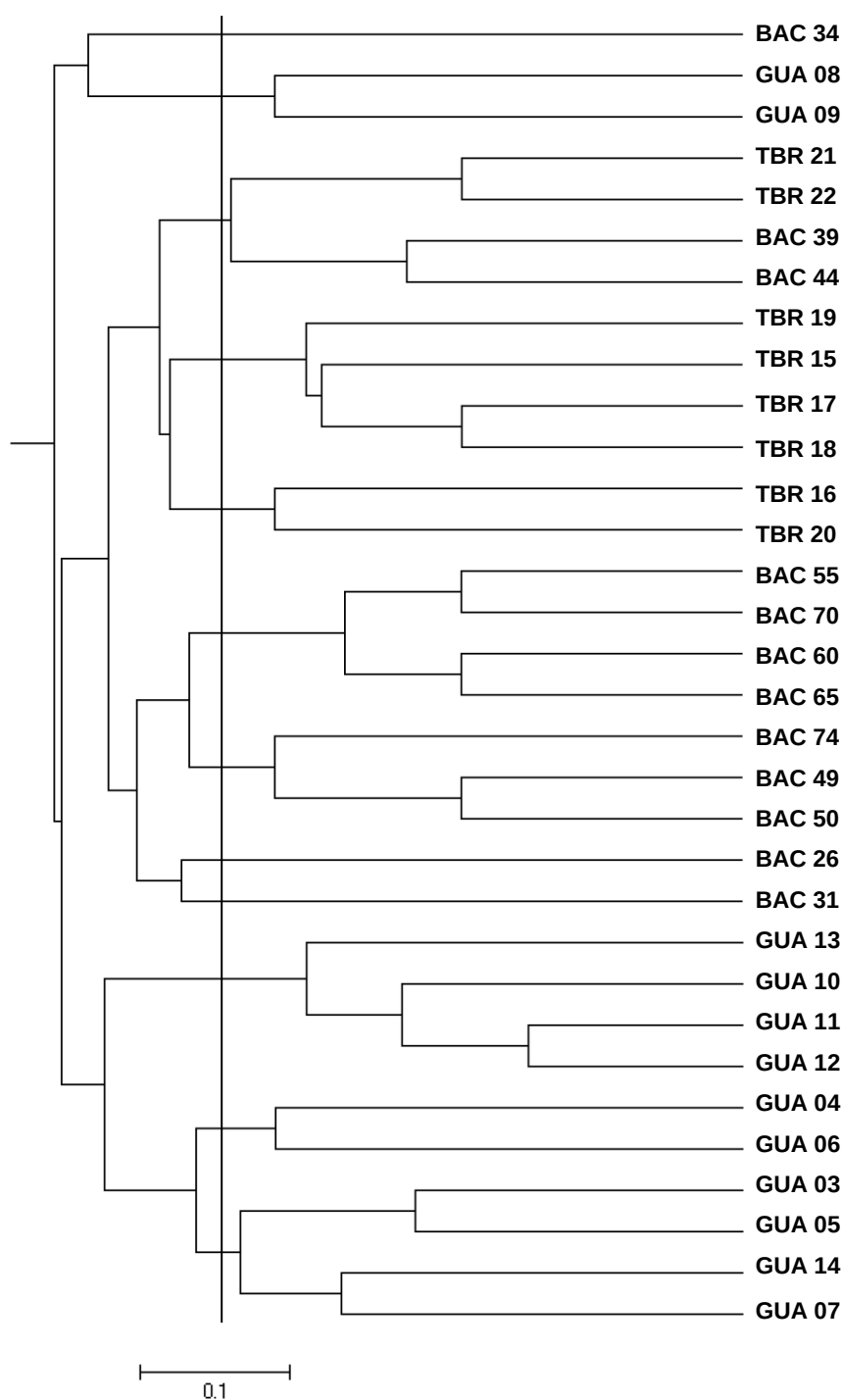


Figura 1. Dendrograma representativo da divergência genética dos 32 genótipos de *Tectona grandis* das três distintas localidades, com base nos marcadores SSR, obtido pelo Método de Agrupamento de Ligação Média (UPGMA).

Resultados obtidos a partir dos marcadores ISSR

Os 12 iniciadores ISSR utilizados geraram um total de 56 fragmentos a partir dos 32 genótipos avaliados. O total de polimorfismo revelado pelos ISSR foi de 39,38%.

O iniciador 861 apresentou 75% de polimorfismo, porém não foi o mais informativo quanto ao índice de conteúdo polimórfico (PIC). Os iniciadores mais informativos foram: 841, 835 e 807, com valores de PIC de 0,324, 0,255 e 0,294, respectivamente (Tabela 6). Os valores do (PIC) variaram de 0,052 a 0,324, com média de 0,164 (Tabela 6). As análises do PIC levam em consideração o número total de fragmentos detectados para cada loco de um determinado iniciador e a frequência destes alelos no conjunto de genótipos investigados (Varshney et al., 2007).

Tabela 6. Relação dos iniciadores, número de bandas, porcentagem de polimorfismo e valor do PIC por iniciador, a partir da genotipagem de 32 genótipos de *Tectona grandis* advindos das três localidades

Iniciador	Nº de Bandas	% de Polimorfismo	PIC*
UBC 807	3	33,33	0,294
UBC 810	3	33,33	0,113
UBC 826	7	42,86	0,223
UBC 827	7	28,57	0,061
UBC 828	7	42,86	0,052
UBC 830	5	20,00	0,060
UBC 834	4	50,00	0,182
UBC 835	3	33,33	0,255
UBC 840	5	40,00	0,073
UBC 841	3	33,33	0,324
UBC 857	5	40,00	0,203
UBC 861	4	75,00	0,124
Média	4,66	39,38	0,164

* Índice de conteúdo polimórfico.

A análise da diversidade genética para o conhecimento da variabilidade entre materiais de interesse torna-se muito vantajosa no processo de identificação de novas fontes de genes (Amaral Junior e Thiébaud, 1999). Para o melhoramento, que busca a variabilidade genética na progênie, com o objetivo da seleção de cultivares superiores, os acessos mais dissimilares são os mais apropriados (Cruz et al., 2004).

O dendrograma gerado pelo método UPGMA, a partir do ponto de corte de 0,60, apresentado na figura 2, formou 10 grupos assim distribuídos: grupo I alocou os genótipos GUA 03, GUA 04, GUA 05, GUA 06, GUA 07, GUA 11, GUA 13, GUA 14, TBR 15, BAC 39 e BAC 60; o grupo II foi formado pelos genótipos GUA 08, GUA 12, TBR 16, TBR 17, TBR 18, TBR 19, TBR 20, TBR 21 e TBR 22; o grupo III alocou

os acessos BAC 49 e BAC 74; grupo IV com os acessos GUA 09 e GUA 10; grupo V com BAC 26 e BAC 44; os grupos VI, VII, VIII e X alocaram individualmente os genótipos BAC 65, BAC 70, BAC 50 e BAC 55, respectivamente; e o grupo IX foi formado pelos acessos BAC 31 e BAC 34. Nenhum dos genótipos apresentou valores de distância genética igual a zero, sendo assim, não há a incidência de duplicatas entre os materiais avaliados.

O valor do coeficiente de correlação cofenética do dendrograma gerado foi de $r = 0,77$, maior que o apresentado com base nos marcadores SSR.

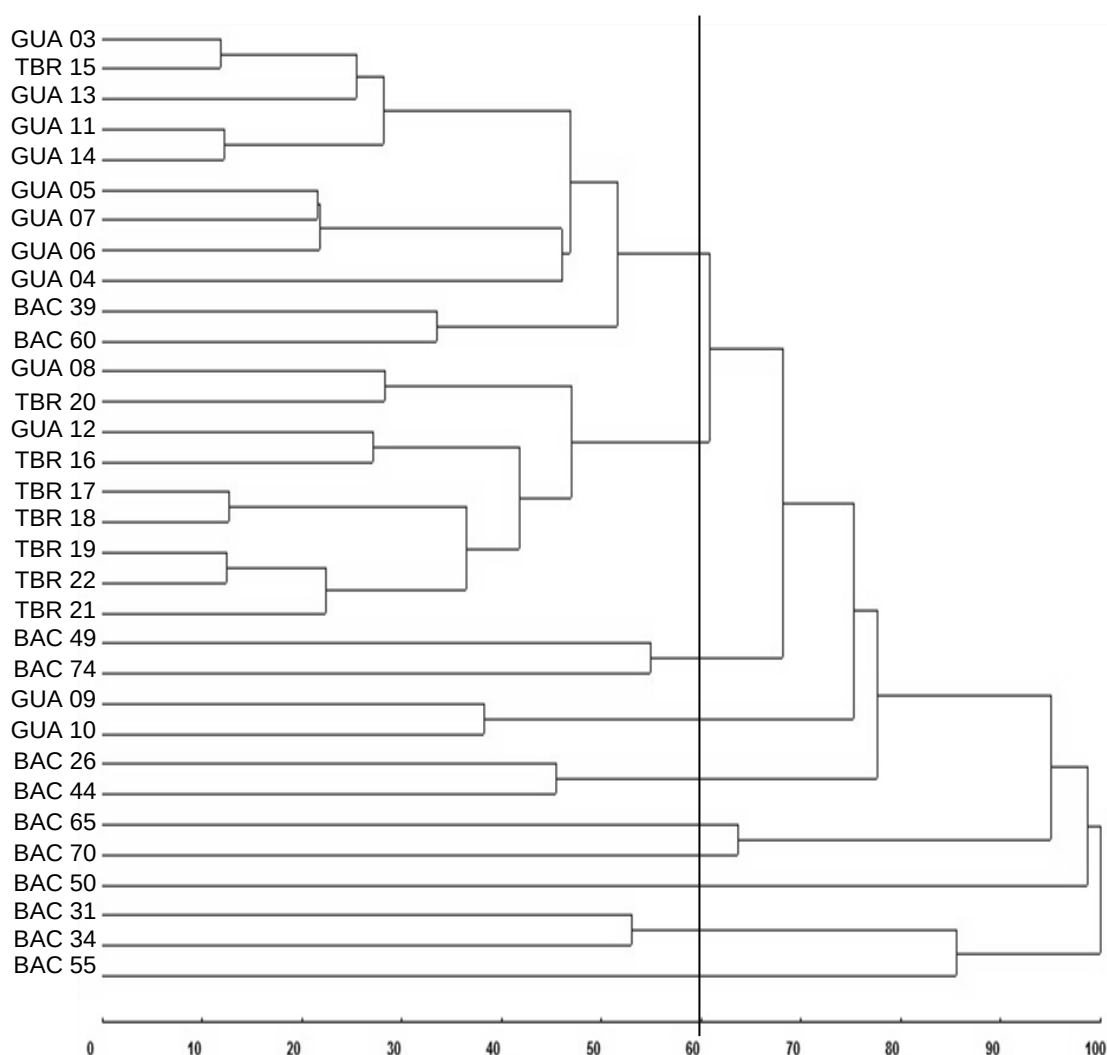


Figura 2. Dendrograma representativo da divergência genética dos 32 genótipos de *Tectona grandis* das três distintas localidades, com base nos marcadores ISSR, obtido pelo Método de Agrupamento de Ligação Média (UPGMA).

O agrupamento formado pelo método de Tocher gerou 09 grupos (tabela 8). Os grupos III, IV, V, VII e VIII foram iguais aos grupos IV, V, VIII, IX e X do método UPGMA representado pelo dendrograma (figura 2). O grupo I alocou os genótipos GUA 03, GUA 04, GUA 05, GUA 06, GUA 07, GUA 11, GUA 12, GUA 13, GUA 14,

TBR 15, TBR 16, TBR 17, TBR 18, TBR 19, TBR 21, TBR 22, BAC 39 e BAC 60. O grupo II foi representado por GUA 08, TBR 20 e BAC 49, o grupo VII alocou os acessos BAC 65 e BAC 70 e o grupo IX representado por BAC 74.

Tabela 8. Agrupamento pelo método Tocher, a partir da análise molecular por meio dos marcadores ISSR dos 32 genótipos de teca das três distintas localidades

Grupos	Genótipos
I	GUA 03 GUA 04 GUA 05 GUA 06 GUA 07 GUA 11 GUA 12 GUA 13 GUA 14 TBR 15 TBR 16 TBR 17 TBR 18 TBR 19 TBR 21 TBR 22 BAC 39 BAC 60
II	GUA 08 TBR 20 BAC 49
III	GUA 09 GUA 10
IV	BAC 26 BAC 44
V	BAC 31 BAC 34
VI	BAC 65 BAC 70
VII	BAC 55
VIII	BAC 50
IX	BAC 74

Em análise comparativa entre os dois agrupamentos (Tocher e UPGMA) nota-se uma semelhança entre ambos com apenas alguns genótipos diferenciados. O agrupamento de Tocher é normalmente utilizado juntamente com o UPGMA, que revelam correspondência na alocação dos elementos nos grupos (Arriel et al., 2006).

Tanto para os marcadores ISSR, quanto para os marcadores SSR, e independente da metodologia utilizada (Tocher ou UPGMA), a alocação dos genótipos das três distintas localidades agruparam-se, em sua maioria, em grupos distintos.

Quando se trata da produção de mudas em larga escala, é de fundamental importância que as plantas matrizes, apresentem variabilidade genética. A utilização de diferentes metodologias para averiguar a diversidade genética destas matrizes, contribui para uma melhor escolha.

Relacionar dados fenótipos aos moleculares segundo Fonseca e Ribeiro (1992) auxilia no conhecimento dos recursos genéticos para a seleção de populações e/ou plantas com características desejáveis para o cultivo.

CONCLUSÕES

Com base nos marcadores SSR, a média do número de alelos por loco foi alta e os valores do PIC demonstraram que os iniciadores são altamente informativos.

Os marcadores ISSR revelaram poucas bandas por iniciador e valores de PIC mediantemente informativos. Demonstraram também correspondência nas alocações dos grupos em relação aos métodos de agrupamento UPGMA e Tocher.

A partir dos grupos formados, nota-se que não há a incidência de duplicatas ($D_{ij}=0$) entre as candidatas contidas no viveiro, ou seja, não há clones, o que reflete em uma boa escolha dos materiais.

No entanto, a variabilidade encontrada com base nos dados revelados é baixa entre os genótipos e indica a necessidade da ampliação desta variabilidade através da introdução de genótipos de diferentes procedências e não relacionados geneticamente para a produção de mudas em larga escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, B. K.; SIQUEIRA, M. V. B. M.; VEASEY, E. A. **Comparação de métodos de extração de DNA de teca (*Tectona grandis* L. f.) para estudos de caracterização genética usando SSR**. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 16 a 19 de setembro de 2008, p.35.
- ALEKCEVETCH, J. C. **Estudo da diversidade genética, por meio de marcadores moleculares de uma população de *Coffea canéfora* var. Conilon**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2013. 93p. (Dissertação – Mestrado em Biotecnologia Vegetal).
- AMARAL JUNIOR, A. T.; THIÉBAUT, J. T. L. **Análise multivariada na avaliação da diversidade em recursos genéticos vegetais**. Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF/CCTA, Campos dos Goytacazes – RJ, 55p., 1999.
- ARRIEL, N.H.C.; MAURO, A.O.D.; MAURO, S.M.Z.D.; BAKKE, O.A.; UNÊDA-TREVISOLI, S.H.; COSTA, M.M.; CAPELOTO, A.; CORRADO, A.R. Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.5, p.801-809, 2006.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, H.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BRONDANI, R.P.V.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theor Appl Gen** 97:816-827, 1998.
- CAIXETA, T. E.; OLIVEIRA A. C. B.; BRITO, G. C.; SAKIYANA, N. S. **Tipos de marcadores moleculares**. In: BORÉM, A.; CAIXETA, T. E. (Eds.) Marcadores moleculares. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, cap. 1, p. 9-78, 2006.CDB. Convenção sobre Diversidade Biológica. 1992.
- CRUZ, C.D. et al. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético II**. Viçosa: UFV, 2004. 480p.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES – Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV. 2008.
- DNR Bio-Imaging Systems, **GelQuant Pro**. 2006. Disponível em: <http://www.dnr-is.com/Product.asp?Par=3.19&id=81>. Acesso em: 10, dezembro, 2013.

- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- 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.
- FONSECA, C. E. L. da; RIBEIRO, J. F. Fruteiras do cerrado: estágio atual e perspectivas futuras. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1., 1992, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa/CNPMP/SBF, 1992. p. 63-75.
- GANDARA, F. B. **Diversidade genética de populações de cedro (*Cedrella fissilis* Vell. (Maliaceae)) no centro sul do Brasil**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2009. 87p. (Tese – Doutorado em Ciências).
- GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-ILGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p.967-1010, 2001.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.
- LIMA, E. M. **Caracterização da produção, resistência à vassoura-de-bruxa e diversidade genética molecular de cacaueiros em Itagibá, BA**. Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz, 2007. 54p. (Dissertação – Mestrado em Produção Vegetal)
- LIU K., MUSE S. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics** 21:2128–2129, 2005.
- MASON, S. L.; STEVENS, M. R.; JELLEN, E. N.; BONIFACIO, A.; FAIRBANKS, D. J.; COLEMAN, C. E.; MCCARTY, R. R.; RASMUSSEN, A. G.; MAUGHAN, P. J. Development and use of microsatellite for germplasm characterization in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Crop Science**. Madison, v.45, p.1618-1630, 2005.
- 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 importante forest tree species. **African Journal of Biotechnology** Vol. 5 (13), pp. 1220-1223, 3 July 2006.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G., ZUCCHI, M. I.; VENCOVISK, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Origin evolution and genome distribution of microsatellite. **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto, v.29, n.2, p.294-307, 2006.

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

REZENDE, R.K. PAIVA, L. V.; PAIVA, R.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; TORGA, P. P. Divergência genética entre cultivares de gérbera utilizando marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v.39, n.8, nov. 2009.

RODRIGUES, J.F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccínea* Lindl. e *C. Mantiqueirae* (Flowie) Van der Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2010. 81p. (Dissertação – Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective meyhods. **Taxonomy**, *Berlin*, 11 (1): 30-40, 1962.

TOMASELLI, I. A teca e o Mercado nacional de produtos de madeira. **Revista Referência**. Disponível em: <http://www.revistareferencia.com.br/flip/134/bin/index.html> Acessado em 12, dezembro, 2012.

VARSHNEY, R.K.; THIEL, T.; SRETENOVIC-RAJICIC, T.; BAUM, M.; VALKOUN, J.; GUO, P.; GRANDO, S.; CECCARELLI, S.; GRANER, A. Identification and validation of a core set of informative genic SSR and SNP markers for assaying functional diversity in barley, **Molecular Breeding**. Vol. 22, pag.1–13. 2009.

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.

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

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P.; PINHEIRO, J. B.; BRONDANI C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Mol. Ecol. Notes** 2: 512-513, 2002.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os 50 genótipos selecionados pelos produtores da Empresa Bacaerí Florestal Ltda a partir das análises com base nos marcadores ISSR apresentaram baixos valores de PIC e de diversidade genética pelos índices de Shannon e Nei. Os métodos de agrupamento de UPGMA e Tocher formaram 15 grupos. Os dados fenotípicos indicaram a variável formação de catana como a mais importante para a representação da diversidade entre os acessos e um maior espaçamento de plantio proporcionou melhor desenvolvimento do DAP.

A avaliação dos 32 genótipos das três distintas localidades (Bacaerí, APASA e Teca do Brasil) com base nos marcadores SSR e ISSR, geraram os seguintes resultados:

- Para os marcadores de SSR, a média do número de alelos por loco foi de 10,84; foram encontrados altos valores de PIC e baixos valores de heterozigosidade; o dendrograma gerado a partir do método UPGMA distribuiu os genótipos em 12 grupos.
- Os iniciadores ISSR revelaram uma média de 4,66 bandas por iniciador e baixos valores de PIC. Os agrupamentos gerados pelo método UPGMA separou os genótipos em 10 grupos, enquanto que para o método de agrupamento de Tocher os genótipos ficaram distribuídos em 09 grupos. Ocorreu uma alta similaridade nos grupos formados por ambos os agrupamentos.

A partir dos resultados nota-se a estreita base genética dos genótipos avaliados, indicando assim a necessidade da busca para a ampliação desta diversidade entre os materiais analisados. Sugere-se a introdução de genótipos geneticamente distintos e de diferentes procedências. Para que esta escolha seja completa, indica-se a utilização de diferentes metodologias.