



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES
CLAROS**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E
ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA
MICROPROPAGAÇÃO DE *Tectona grandis***

GLAUCIA BETHÂNIA ROCHA MOREIRA

2012

GLAUCIA BETHÂNIA ROCHA MOREIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTABELECIMENTO DE
PROTOCOLO PARA MICROPROPAGAÇÃO DE *Tectona grandis***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de “*Magister Science*”.

Orientadora
Prof^a. DSc. Márcia Regina Costa

JANAÚBA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

M838d Moreira, Gláucia Bethânia Rocha.
Diversidade genética e estabelecimento de protocolo para
micropropagação de *Tectona grandis* [manuscrito] / Gláucia
Bethânia Rocha Moreira. – Janaúba, 2012.
96 p. : il.

Bibliografia: f. 64-72.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes
Claros -Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Produção
Vegetal no Semiárido/PPGPVSA, 2012.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Costa.

1. Madeira - *Tectona grandis*. 2. Plantas – Propagação “*in-
vitro*”. 3. Agentes oxidantes. I. Costa, Márcia Regina. II.
Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

Catálogo: Biblioteca Central Professor Antônio Jorge

GLAUCIA BETHÂNIA ROCHA MOREIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO
PARA MICROPROPAGAÇÃO DE *Tectona grandis***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de “*Magister Science*”.

APROVADA em 09 de Julho de 2012.

Profª D.Sc. Márcia Regina Costa
UNIMONTES (Orientadora)

Profª PhD. Sílvia Nietsche
UNIMONTES (Co-orientadora)

Pesq. D.Sc. Luciana Nogueira
Londe
EPAMIG/URENM

Profº D. Sc. Márcio Antônio Silva
Pimenta
UNIMONTES

**JANAÚBA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

*Aos meus pais, Márcia e Moacir;
Ao meu irmão, Glauber.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por sempre guiar os meus passos;

Aos meus pais, Márcia e Moacir, pessoas iluminadas, que nunca pouparam esforços para realização dos meus sonhos. Obrigada por sempre estarem ao meu lado me conduzindo para o melhor caminho.

Ao meu irmão, Glauber, pela torcida;

À minha amiga Carina, pela enorme ajuda na realização deste trabalho, pela amizade, pelos conselhos e por sempre me ouvir quando precisei;

À minha amiga Flávia pela amizade, se mostrando sempre disponível para me escutar e aconselhar.

À professora Márcia pela orientação, confiança, amizade e grande ajuda para que este trabalho pudesse se concretizar;

Aos professores Sílvia Nietzsche e Marlon Pereira, pela confiança e orientação durante toda a graduação e pós-graduação;

A Ciene e Adílio, pela contribuição nas análises;

A Liu, Jose, Dona Ana, Leandro, Mara, João Alison, Gleika, Rayka, Irton, Edson e demais amigos e colegas que me acompanharam nessa jornada;

A Antônio Fábio e Gilson, pela colaboração na realização das análises estatísticas. Aos proprietários das áreas de plantio da teca, pela concessão do material;

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de Bolsa de Mestrado.

À Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), por oferecer o curso e pela concessão de infraestrutura para execução dos experimentos;

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho;

Muito obrigada a todos!!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Características gerais da teca e importância econômica.....	3
2.2 Micropropagação.....	5
2.3 Oxidação fenólica.....	6
2.4 Reguladores de crescimento.....	8
2.5 Diversidade genética.....	9
2.6 Marcadores RAPD.....	10
2.7 Marcadores ISSR.....	11
3.1 Caracterização do plantio.....	13
3.2 Avaliação de idades e tipos de explantes.....	13
3.2.1 Seleção das plantas e coleta do material vegetal.....	13
3.2.2 Estabelecimento da cultura.....	14
3.3 Doses de citocininas para a fase de multiplicação da teca.....	15
3.3.1 Coleta dos explantes.....	15
3.3.2 Estabelecimento da cultura.....	15
3.3.3 Multiplicação.....	16
3.4 Delineamento experimental.....	17
3.5 Análise estatística.....	17
3.3. Diversidade Genética.....	19
3.3.1 Coleta do material vegetal para estudos de diversidade genética.....	19
3.3.2 Extração do DNA.....	20

3.3.3 Análise de RAPD.....	22
3.3.4 Análise ISSR.....	24
3.3.5 Análise dos dados	26
4 RESULTADOS	28
4.1 Avaliação de idades e tipos de explantes.....	28
4.2 Doses de citocininas para a fase de multiplicação da teca.....	29
4.3 RAPD.....	38
4.3.1 <i>Primers</i> RAPD.....	38
4.3.2 <i>Primers</i> ISSR.....	45
4.3.3 Otimização dos <i>primers</i>	45
5 DISCUSSÃO	52
5.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> de teca	52
5.2 Doses de citocininas para a fase de multiplicação da teca.....	53
5.3 Marcadores moleculares	59
5 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	64
ANEXOS	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sequências dos <i>primers</i> RAPD utilizados nas ampliações de DNA de 50 genótipos de Teca (<i>Tectona grandis</i>).	23
TABELA 2. Identificação, sequência, número de nucleotídeos e faixa de temperatura de anelamento testada nos <i>primers</i> ISSR avaliados em ampliações de DNA de 50 genótipos de teça.	25
TABELA 3. Médias referentes à sobrevivência dos explantes de teça em função da idade e tipo de explante.....	28
TABELA 4. Médias do Número de Brotos (NBrot) de explantes de teça submetidos a quatro doses de 6-BAP em quatro subcultivos.	29
TABELA 5. Médias do Número de Folhas (NFolhas) de explantes de teça submetidas a quatro doses de 6-BAP em quatro subcultivos.....	30
TABELA 6. Médias do Número de Brotos (NBrot.) de explantes de teça submetidos a quatro doses de cinetina em quatro subcultivos.....	30
TABELA 7. Médias do Número de Folhas (NFolhas) de explantes de teça submetidos a quatro doses de cinetina em quatro subcultivos.....	31
TABELA 8. Análise de variância para a variável comprimento (COMP.) de explantes de teça submetidos a diferentes doses de BAP ao final de 120 dias de subcultivo.....	32
TABELA 9. Análise de variância para a variável comprimento (COMP.) de explantes de teça submetidos a diferentes doses de cinetina ao final de 120 dias de subcultivo.....	35
TABELA 10. Frequência de calos em explantes de teça submetidos a diferentes doses de 6-BAP, considerando 1 ausência e 2 presença de calos.....	37
TABELA 11. Frequência de calos em explantes de teça submetidos a diferentes doses de cinetina, considerando 1 ausência e 2 presença de calos.	38
TABELA 12. Valores de número de locos por <i>primer</i> (\hat{A}), número de locos polimórficos por <i>primer</i> (LP), porcentagem de locos polimórficos (P), heterozigidade média esperada (H_e) e PIC em cada <i>primer</i> RAPD, testado em acessos e clones de teça.	39

TABELA 13. Alelos encontrados em cada <i>primer</i> RAPD e suas frequências em acessos e clones de teca.	40
TABELA 14. Distância genética média de cada acesso e clone de teca em relação aos demais.	42
TABELA 15. Valores de número de alelos por <i>primer</i> (\hat{A}), número de locos polimórficos por <i>primer</i> (LP); porcentagem de locos polimórficos (P), heterozigiosidade média esperada (H_e) e <i>PIC</i> em cada <i>primer</i> ISSR testado em teca.	46
TABELA 16. Alelos encontrados em cada <i>primer</i> ISSR e suas frequências em teca.	47
TABELA 17. Distância genética média de cada acesso e clone de teca em relação aos demais com a utilização dos <i>primers</i> ISSR.	48

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** A) Meristema apical de teca na fase de estabelecimento *in vitro*. B) Aspecto geral dos meristemas de teca na fase de multiplicação..... 17
- FIGURA 2.** Comprimento (cm) dos explantes de teca em quatro subcultivos. . 33
- FIGURA 3.** Comprimento (cm) dos explantes de teca submetidos a diferentes doses de 6-BAP..... 34
- FIGURA 4.** Comprimento dos explantes de teca submetidos a diferentes doses de cinetina. 36
- FIGURA 5.** Comprimento (cm) dos explantes de teca em função dos subcultivos em dias..... 37
- FIGURA 6.** Análise de agrupamento pelo método UPGMA baseado na similaridade de Jaccard, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas, utilizando-se 10 *primers* RAPD em genótipos de teca. A consistência dos nós foi obtida através de 1.000 reamostragens de *bootstrap*. 44
- FIGURA 7.** Análise de agrupamento pelo método UPGMA baseado na similaridade de Jaccard, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas, utilizando-se 11 *primers* ISSR em acessos e clones de teca. A consistência dos nós foi obtida através de 1.000 reamostragens de *bootstrap*. 50

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1** - Matriz de dissimilaridade genética obtida pelo coeficiente de Jaccard a partir dos marcadores moleculares de RAPD. 73
- QUADRO 2** – Matriz de dissimilaridade genética obtida pelo coeficiente de Jaccard a partir dos dados moleculares de ISSR. 77

RESUMO

MOREIRA, Glaucia Bethânia Rocha. **Diversidade genética e estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Tectona grandis***. 2012. 80 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido)-Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.¹

Como estratégia do melhoramento, a propagação “*in vitro*” permite a obtenção de um grande número de plântulas em um curto período de tempo e estudos de diversidade genética também devem ser praticados na população a ser melhorada com a utilização de marcadores moleculares. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo para o estabelecimento “*in vitro*” de explantes de teca, bem como avaliar a diversidade genética de acessos por meio do uso de marcadores moleculares ISSR e RAPD. Meristemas apicais e gemas laterais foram coletados a partir de plantas de teca com 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 anos de idade. Os explantes foram submetidos à assepsia com lavagem em água e detergente neutro, seguida de lavagem em hipoclorito de sódio 2,5%. Após a etapa de assepsia os meristemas apicais e gemas laterais foram retirados com o auxílio de bisturi e introduzidos em frascos contendo meio MS, suplementado e colocados em câmara escura por dez dias, posteriormente foram transferidos para sala de cultivo na presença de luz. Após trinta dias os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de sobrevivência. Após a etapa de seleção do tipo e idade do explante, meristemas apicais de 2,5 anos de idade foram cultivados em meio MS adicionado de 6-BAP (1,25; 1,75; 2,25 e 2,75 ml.L⁻¹) e cinetina 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 ml. L⁻¹. O intervalo de repicagens foi de 30 dias. As características avaliadas foram: comprimento de brotos, número de folhas, tamanho e presença de calos. O delineamento foi o inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância. Para os trabalhos analisando a diversidade genética, foram coletados genótipos de dois plantios comerciais de teca no Norte de Minas Gerais. Para amplificação foram utilizados 10 *primers* RAPD e 11 *primers* ISSR. Um total de 71 e 36 locos polimórficos foram gerados respectivamente e com heterozigosidade média esperada de 0,75 com o RAPD e 0,57 com ISSR e distância genética de 0,27 e 0,15 respectivamente. Apesar da elevada heterozigosidade média esperada, observou-se baixa distância genética entre os indivíduos avaliados. Pela análise do dendrograma obtido com o índice de Jaccard, observa-se a formação de cinco grupos com a utilização dos

¹ **Comitê de Orientação:** Prof^ª. D. Sc Márcia Regina Costa – UNIMONTES (Orientadora); Prof^ª. D. Sc Sílvia Nietzsche (Co-orientadora); D. Sc Luciana Nogueira Londe EPAMIG; Prof. D. Sc Márcio Antônio Silva Pimenta- UNIMONTES

primers RAPD. Dois grupos com um genótipo cada um, outro grupo com 4 genótipos, outro com 26 genótipos e o quinto com 32 genótipos. Oito grupos foram gerados com a utilização dos *primers* ISSR (Grupo I e II com um genótipo cada um; Grupo III com cinco genótipos; Grupo IV com quatro genótipos; Grupo V com 1 genótipo; Grupo VI com sete genótipos; Grupo VII com doze genótipos e Grupo VIII com 20 genótipos). Observou-se que o acesso S 27 foi o mais distante com a utilização do RAPD e o acesso S 44 com a utilização do ISSR. O valor cofenético calculado para o RAPD foi de 0,93 e para o ISSR 0,71 refletindo uma boa concordância com os valores de similaridade genética. O tipo de explante mais apropriado para estabelecimento da teca é do tipo apical e a idade variando de um ano e meio a dois anos e meio. Os reguladores de crescimento utilizados não foram eficientes para a multiplicação de teca. Os *primers* RAPD e ISSR são eficientes para condução de estudos sobre diversidade genética em teca e os indivíduos avaliados apresentam baixa diversidade genética entre si.

Palavras-Chave: Citocininas; Oxidação; Variabilidade genética; RAPD; ISSR.

ABSTRACT

MOREIRA, Glaucia Bethânia Rocha. **Genetic diversity and protocol establishment for micropropagation of *Tectona grandis***. 2012. 80 p. Dissertation (Master's degree in Plant Production in the Semi-arid) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.²

As breeding strategy, "in vitro" propagation allows obtaining a large number of plantlets in a short period of time, and studies on genetic diversity also should be practiced in the population to be enhanced by the use of molecular markers. The aim of this study was to develop a protocol for the establishment "in vitro" of teak explants, as well to assess the genetic diversity of accessions by means of ISSR and RAPD molecular markers. Apical meristems and lateral buds were collected from teak plant with 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 years old. The explants were subjected to cleaning with sterile water and neutral detergent, followed by cleaning in 2.5% sodium hypochlorite. After the sterilization, the lateral buds and apical meristems were removed with the aid of a scalpel and placed in vials containing MS medium, supplemented and placed in a dark chamber for ten days, later they were transferred to culture room in the presence of light. After thirty days the explants were evaluated as for percentage of survival. After selecting the type and age of the explants, apical meristems of 2.5 years old were cultivated in MS medium with 6-BAP (1.25, 1.75, 2.25 and 2.75 ml. L⁻¹) and Kinetin 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 ml.L⁻¹. The interval of subculture was every 30 days. The evaluated characteristics were: shoots length, leaf number, size and presence of callus. The experimental design was completely randomized. The data were subjected to analysis of variance. For works analyzing the genetic diversity, genotypes were collected from two commercial plantations of teak in the North of Minas Gerais. For amplification 10 RAPD primers and 11 ISSR primers were used. A total of 71 and 36 polymorphic loci was generated respectively, and average heterozygosity of 0.75 with RAPD and 0.57 with ISSR and genetic distance of 0.27 and 0.15 respectively. Despite the high average heterozygosity expected, it was observed a low genetic distance between individuals evaluated. By analysis of dendrogram obtained with the Jaccard index, it was observed the formation of five groups using the RAPD primer. Two groups with one genotype each one, another group with 4 genotypes, another one with 26 genotypes and the fifth with 32 genotypes).

² Guidance Committee: Márcia Regina Costa - ASD/UNIMONTES (Adviser); Sílvia Nietsche (Co-adviser) - ASD/UNIMONTES; Luciana Nogueira Londe - Epamig; Márcio Antônio Silva Pimenta - BD/UNIMONTES .

Eight groups were generated using the ISSR primers (Group I and II with one genotype each one, Group III with five genotypes; Group IV with four genotypes; Group V with 1 genotype; Group VI with seven genotypes; Group VII with twelve genotypes and group VIII with 20 genotypes). It was noticed that the S-27 accession was further one using the RAPD and the S 44 accession using the ISSR. The co-phenetic value calculated for RAPD was 0.93 and 0.71 for ISSR reflecting a good agreement with the values of genetic similarity. The most suitable type of explant for micropropagation of teak is the apical one and the age ranging from one and a half to two and a half years. The growth regulators used in this work were not effective for the multiplication of teak. The RAPD and ISSR primers are effective for conducting studies on genetic diversity in teak and the evaluated individuals show low genetic diversity among themselves.

Keywords: Cytokinins; Oxidation; Genetic variability, RAPD; ISSR. .

1 INTRODUÇÃO

A teca (*Tectona grandis*) é originária do continente asiático e possui uma das madeiras mais conhecidas no mundo. Goh e Galiana (2000) afirmam que sua madeira possui durabilidade, leveza, resistência ao ataque de térmitas, é fácil de ser trabalhada e com ausência de rachaduras. Sendo muito utilizada na construção naval e fabricação de móveis finos (LORENZI, 2003). As plantações da espécie no Brasil tiveram início em 1971, na região de Cáceres estado do Mato Grosso, após trabalho desenvolvido pela empresa Cáceres Florestal. Essa empresa constatou que a região oferecia excelentes condições para o seu cultivo (CACERES FLORESTAL, 2007).

O plantio da teca tradicionalmente é realizado pelo uso de mudas obtidas mediante propagação sexuada, por intermédio de sementes, porém, a baixa percentagem de germinação devido à proteção das sementes por um tecido duro (endocarpo) afeta a viabilidade da propagação (PALANISAMY e SUBRAMANIAN, 2001). Visando a reduzir as limitações da propagação sexuada, laboratórios na Índia, Indonésia e Tailândia relataram grande sucesso na cultura de tecidos de teca. No Brasil, em Cáceres, Mato Grosso, a empresa Cáceres Florestal em parceria com o laboratório BioTeca desenvolvem pesquisas com a micropropagação de teca, buscando reduzir o tempo para o estabelecimento de populações melhoradas.

Apesar dos avanços, a micropropagação de espécies lenhosas apresenta alguns problemas em função de suas características peculiares, tais como oxidação, contaminação microbiana e baixa resposta morfológica (THOMAS e RAVINDRA, 1997).

Devido à importância da técnica de micropropagação e às dificuldades para o estabelecimento de espécies lenhosas, buscam-se alternativas para otimizar a produção de mudas, visando à melhoria do processo.

A identificação de genótipos de plantas cultivadas constitui-se numa etapa importante nos programas de melhoramento, uma vez que as características morfológicas usadas na identificação destes genótipos são bastante limitadas, devido ao baixo número de marcas/caracteres disponíveis (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o advento de métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA e o desenvolvimento da técnica PCR, marcadores moleculares começaram a ser utilizados como descritores moleculares para identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, e também em estudos de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento e parentesco, construção de mapas genéticos e seleção assistida por marcadores (BORÉM e CAIXETA, 2006). Estudos de diversidade genética com marcadores RAPD e ISSR têm sido amplamente realizados em espécies florestais (FOFANA, 2009; NARAYANAN, 2007; ANSARI 2012).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo para micropropagação da teca e avaliar a diversidade genética dos acessos por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD e ISSR.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais da teca e importância econômica

A teca (*Tectona grandis*) é uma espécie arbórea decídua de floresta tropical, pertencente à família Verbenaceae (PANDEY e BROWN, 1999). A espécie é originária da Birmânia, Tailândia e de algumas partes da Índia, nas latitudes entre os 12° e 25°N. Está presente também ao sul do Equador, em Java e em algumas ilhas do arquipélago indonésio. De acordo com sua distribuição, é uma espécie que se encontra nos trópicos e subtropicais da Ásia (SANCHEZ, 2002). Esta espécie em sua região de origem pode desenvolver indivíduos de até 60 metros de altura, dotados ou não de raízes tabulares (KRISHNAPILLAY, 1999).

Os indivíduos adultos possuem folhas, em média, com comprimento de 30 a 40 cm por 25 cm de largura. Nos indivíduos mais jovens, com até 3 anos de idade, as folhas podem atingir o dobro dessas dimensões (ANGELI e STAPE, 2012). Possui flores brancas e pequenas dotadas de pecíolos curtos, dispostas em grandes e eretas inflorescências do tipo panícula. Seus frutos consistem de drupas subglobosas de mais ou menos 1,2 cm de diâmetro. As sementes são protegidas por um tecido duro (endocarpo) envolvido por uma compacta e densa cobertura feltrosa (mesocarpo). Esse conjunto está incluso em um invólucro vesicular inflável de consistência membranosa (exocarpo) (VIEIRA *et al.*, 2002).

A teca tem seu melhor desenvolvimento com precipitações anuais de 1250 a 3750 mm e temperaturas que oscilam entre os 13 °C e 37 °C, todavia a espécie é capaz de suportar precipitações anuais tão baixas como 500 mm por ano e tão altas como 5100 mm ao ano. Em relação à temperatura, seu desenvolvimento ótimo se dá aos 25 °C. O bom crescimento e a alta qualidade

da madeira estão associados à profundidade do solo, boa capacidade de retenção de água, solos aluviais com boa drenagem, ricos em cálcio, fertilidade mediana e relevo suave; desenvolvem-se bem em altitudes menores de 1000 m (ROQUE, 2002), ainda que tenha sido observada sua ocorrência até os 1300 m de altitude na Índia Central (SETH e KAUL, 1978).

Segundo a FAO (2003), a área total com plantações de teca é de aproximadamente 2.252,54 milhões de hectares, sendo 94,71% na Ásia, 0,12% na Oceania, 3,63% na África e 1,55% nas Américas. Não há levantamento atual da área reflorestada mundial, mas somente no Brasil a área já passa dos 60.000 hectares. A produção mundial é de, aproximadamente, três milhões de metros cúbicos por ano, sendo que a maior parcela é consumida pelo mercado interno dos países produtores. O mercado internacional consome cerca de 500 mil metros cúbicos (VIEIRA *et al.*, 2002).

A grande expansão de teca atualmente no Brasil ocorre na região Centro-Oeste e Norte, sendo o principal produto dessa espécie a madeira de alta qualidade, muito utilizada em móveis finos e na construção naval (LORENZI, 2003). O valor de mercado para a madeira madura, livre de nós e com diâmetro para serraria, chega a superar os valores da espécie Mogno (*Swietenia macrophylla*), cujo metro cúbico serrado é comercializado por valores que chegam a US\$ 1500,00 como produto final, já o produto do desbaste inicial é comercializado entre 60 e 80 dólares o metro cúbico (EMBRAPA, 2007). A grande diferença da teca para o mogno é a sua rusticidade, rápido crescimento em altura, e excelente forma, sendo o tronco retilíneo e pouco sujeito à bifurcação (LORENZI, 2003). Empresas brasileiras têm vendido lotes de toras de 25 centímetros de diâmetro a preços de até 850 dólares o metro cúbico.

Apesar da potencialidade de mercado para a teca, no Brasil ainda são escassos os trabalhos que avaliam o potencial econômico dessa espécie, considerando as várias formas de manejo (CACERES FLORESTAL, 2007).

Contudo, pode-se tirar um exemplo do ciclo dessa planta, enquanto na Ásia a teca leva até 80 anos para chegar ao ponto de corte, no Brasil esse ciclo pode ficar em 25 anos e, segundo projeções pode-se ter um rendimento de até US\$ 50 mil por hectare (FIGUEIREDO, 2005). A quantidade de mudas por hectare varia de 1100 a 1700, dependendo do espaçamento do plantio, sendo que o custo de implantação de um hectare em média R\$ 1700,00 sendo inclusos os gastos com preparo da área, mão de obra e aquisição de mudas, etc. (FLORESTECA, 2007).

2.2 Micropropagação

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e de maior impacto (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Compreende um conjunto de procedimentos nos quais um explante, que pode ser constituído de uma célula, um tecido ou um órgão, é isolado e cultivado em condições assépticas sobre um meio nutritivo artificial. É uma técnica desenvolvida há mais de 30 anos e tem sido amplamente usada em nível comercial, por laboratórios, com finalidades de multiplicação em larga escala de clones selecionados, em menor espaço de tempo e a preços competitivos (TORRES *et al.*, 1998).

Baseado no fenômeno da totipotência das células somáticas vegetais, qualquer célula vegetal viva possui suficiente informação genética para produzir uma planta normal, desde que lhe sejam propiciadas condições nutricionais e ambientais adequadas. A cultura de tecidos, dessa forma, propicia a regeneração de uma planta a partir de fragmentos de outra (TORRES *et al.*, 1998).

A propagação vegetativa é de fundamental importância nos programas de melhoramento florestal (GERA *et al.*, 2000), pois permite produção massal das

árvores selecionadas em tempo e espaço reduzido conservando as características desejáveis. Entretanto, o uso da propagação vegetativa de *Tectona grandis* é altamente dependente do grau de maturidade fisiológica e do estado nutricional do material vegetal. Esse é o principal entrave para o sucesso da propagação clonal dessa espécie (PALANISAMY e SUBRAMANIAN, 2001).

Várias publicações discutem o potencial da micropropagação da teca, principalmente utilizando material juvenil como propágulos, porém poucas são as informações utilizando material adulto e na maioria dos casos não se aplicam à produção em larga escala (ABDELNOUR e MUNOZ, 2005). No Brasil, informações científicas, tecnológicas sobre os sistemas de propagação vegetativa são escassas com relação à silvicultura da *Tectona grandis* ou estão sob domínio de algumas empresas privadas, mesmo com o crescimento das áreas plantadas do Centro-Oeste e Norte do Brasil que chega a alcançar aproximadamente 100 mil hectares.

2.3 Oxidação fenólica

No estabelecimento *in vitro* dos explantes, é comum deparar-se com outros problemas que podem prejudicar o sucesso da técnica, dentre eles a ocorrência da oxidação. A oxidação “*in vitro*” é caracterizada quando ocorre a liberação de compostos fenólicos, que são precursores da síntese de lignina que ocorre por injúrias causadas no tecido ou pela senescência do mesmo, especialmente nas espécies tropicais, que contêm alta concentração desses componentes (ANDRADE *et al.* 2000).

As plantas perenes lenhosas são consideradas ricas em substâncias derivadas do metabolismo secundário como os polifenóis, os quais exercem importante papel no metabolismo dessas espécies, bem como na defesa contra predadores e micro-organismos. *In vitro*, a oxidação fenólica constitui um dos

principais problemas enfrentados no início do estabelecimento e durante o cultivo de explantes dessas espécies. A oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo e da idade do explante utilizado, visto que alguns gêneros de plantas são mais suscetíveis a ela e, em geral, explantes mais jovens oxidam menos (FREITAS, 2009).

A época do ano é um outro fator importante que influencia o teor de polifenóis e conseqüentemente a oxidação (TEIXEIRA, 2001). Em regra geral, naqueles períodos do ano mais favoráveis ao crescimento, a concentração de polifenóis nos tecidos é menor e, por conseguinte, menor a oxidação fenólica dos explantes *in vitro*. A remoção dos polifenóis oxidados imediatamente após a desinfestação contribui para redução da oxidação em fases posteriores de cultivo. A lavagem do explante por 2 a 3 horas pode contribuir para reduzir a exudação e oxidação posterior durante o cultivo (FREITAS, 2009).

Diversos fatores afetam o teor de compostos fenólicos e, por conseqüência, o grau de oxidação e inibição do estabelecimento e crescimento de explantes. A adição de carvão ativado evita o acúmulo de inibidores fenólicos, mas pode também adsorver reguladores de crescimento e outros componentes do meio e pode ser tóxico a alguns tecidos. O escurecimento de explantes tem sido evitado em inúmeras culturas em concentrações que variam desde 0,2 até 5g/L. A atividade de enzimas relacionadas com a biossíntese e oxidação de fenóis é aumentada pela luz. O escurecimento é menor em explantes retiradas de plantas cultivadas no escuro ou em baixa intensidade luminosa. As culturas são, em geral, iniciadas mais rapidamente se explantes forem mantidos no escuro por algumas semanas (PASCAL, 2001).

Tiwari *et al.* (2002), estudando um protocolo para micropropagação da teca, constataram que os explantes que permaneceram no mesmo meio de cultura por 24 horas oxidaram mais do que aqueles que foram submetidos a

cinco transferências, e os explantes que não foram submetidos à série de transferências não tiveram sucesso *in vitro*.

2.4 Reguladores de crescimento

Segundo Pierik (1990), no cultivo *in vitro* de plantas superiores, os reguladores de crescimento, especialmente auxinas e citocininas, apresentam papel muito importante. Pode-se dizer que o cultivo *in vitro* é praticamente impossível sem reguladores. São adicionados ao meio e têm a função de suprir as possíveis deficiências endógenas de hormônios nos explantes, estimulando respostas no crescimento, alongamento e multiplicação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Os fito-hormônios são compostos orgânicos sintetizados em uma parte da planta e translocados para outra, na qual, em pequenas concentrações, causam resposta fisiológica, que pode ser de promoção ou inibição dos processos de crescimento e diferenciação (TOMBOLATO e COSTA, 1998).

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que, quando aplicadas nas plantas, apresentam propriedades químicas semelhantes à dos hormônios. Os mais utilizados no estabelecimento e multiplicação *in vitro* são as auxinas ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolacético (AIA), e as citocininas 6- benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) e tiadizuron (TDZ) (CALDAS *et al.*, 1998).

Caracterizam-se por promover a quebra da dominância apical, aumentando a taxa de multiplicação por meio de brotações laterais relacionadas à atividade promovida nos meristemas. Conforme George e Sherrington (1984), o crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos fito-hormônios existentes no meio de cultura, principalmente citocininas e auxinas. Assim, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de

protocolos *in vitro* quanto aos fito-hormônios podem implicar melhores níveis de desenvolvimento dos explantes cultivados.

Dentre as citocininas, o BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina mais adequada para a multiplicação de parte aérea e indução de gemas adventícias (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

De acordo com a literatura, o BAP é a citocinina mais comumente utilizada na micropropagação de *Tectona grandis*, tanto isolada quanto em combinação com outros reguladores, podendo ser utilizada em doses que variam de 0,5 a 5,0 mg.L⁻¹ (SHIRIN *et al.*, 2005; ABDELNOUR e MUNOZ, 2005).

As citocininas, embora sejam importantes aliadas da cultura de tecidos, podem apresentar também alguns problemas, como hiper-hidricidade e a dificuldade de enraizamento. A hiper-hidricidade (vitrificação) é a anormalidade anatômica e fisiológica dos brotos *in vitro* quando em presença de citocininas. Na vitrificação observa-se uma atrofia dos brotos consistindo em pouca lignificação do tecido condutor, necrose do meristema apical, deficiência e clorofila e folhas quebradiças. A dificuldade de enraizamento surge quando os brotos são deixados por muito tempo em meio suplementado com BAP para regeneração das plantas (CID, 2005).

2.5 Diversidade genética

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).

Estudos referentes à variabilidade genética de teca são escassos no Brasil, concentrando-se em países onde a cultura apresenta maior importância econômica. Esses estudos são empregados no melhoramento da espécie, sendo

que a maioria busca avaliar a diversidade genética por meio de marcadores moleculares.

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

2.6 Marcadores RAPD

Os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), que apresentam herança dominante, utilizam *primers* de composição arbitrária com 10 nucleotídeos e amplificam regiões aleatórias no genoma (MILACH, 1998). Esses marcadores têm vantagens por permitir a análise de marcas polimórficas de um número ilimitado de amostras sem a influência do ambiente, em um curto espaço de tempo, utilizando pouca quantidade de DNA, além de não necessitar de informações prévias da sequência do DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998).

Os marcadores RAPD apresentam como característica básica a dominância, ou seja, este tipo de marcador não permite distinguir indivíduos homocigotos dominantes de heterocigotos em uma população. A presença de determinada banda no gel pode ser devida à amplificação dos dois alelos de um

loco, no caso de um indivíduo diploide homozigoto, ou de apenas um alelo, quando a banda é originada da amplificação de um indivíduo heterozigoto. A sensibilidade da técnica não permite discriminar quantitativamente os dois casos. Portanto, ausência de banda no gel é atribuída ao genótipo homozigoto recessivo, enquanto a presença de banda é denotada pelos genótipos homozigoto dominante e heterozigoto (BORÉM e CAIXETA, 2006).

Watanabe *et al.* (2004) usaram marcadores RAPD para discriminação e identificação de 24 clones de teca. No primeiro *screening* foram usados 120 *primers* arbitrários, mas somente 24 *primers* geraram 26 fragmentos claros e não ambíguos que foram selecionados. No segundo *screening*, a reprodutibilidade para cada fragmento foi investigada por seis repetições de PCR e 13 fragmentos encontrados foram os mais reprodutíveis sendo finalmente selecionados. Dessa forma, os autores mostraram o poder discriminatório dos marcadores RAPD sugerindo o uso desses para a caracterização de clones de teca.

2.7 Marcadores ISSR

Segundo Reddy *et al.* (2002), o ISSR é um método baseado em microssatélite, que não necessita o conhecimento prévio do genoma, desenho do *primer* clonado. Enquanto os SSR são baseados na amplificação da região repetida usando dois *primers* loco-específicos, em ISSR, um único *primer* composto por uma sequência do microssatélite usualmente de 16-25bp de comprimento é utilizado para amplificar principalmente as sequências Inter-SSR de diferentes tamanhos. Esses *primers* podem estar desancorados ou usualmente ancorados na extremidade 5' ou 3' por 1 a 4 bases degeneradas. Os alelos polimórficos ocorrem sempre que em um genoma esteja faltando a sequência repetida ou têm uma deleção ou uma inserção que modifica a distância entre as repetições. Para os *primers* ancorados na posição 5', polimorfismos ocorrem

também devido às diferenças no comprimento do microssatélite. As sequências de repetições e de nucleotídeos ancorados são selecionadas aleatoriamente. Embora ISSR sejam marcadores dominantes, têm a vantagem de analisar *loci* múltiplos em uma única reação (GOULÃO e OLIVEIRA, 2001).

O método fornece resultados altamente reprodutíveis e gera abundante polimorfismo em muitos sistemas. *Primers* de ISSR têm sido usados para caracterização e manutenção de germoplasma de cacau (CHARTERS e WILKINSON, 2000), para distinguir entre várias cultivares de crisântemo (WOLFF *et al.*, 1995), e também para distinguir plantas derivadas de micrósporos daquelas oriundas de tecidos somáticos em cultura de anteras em linha no estágio de plântulas (CHEN *et al.*, 1998).

Ansari *et al.* (2012) utilizaram cinco *primers* ISSR para análise da diversidade e estrutura genética de populações de teca da Índia. Narayanan *et al.* (2007) também estudaram a diversidade de teca utilizando marcadores RAPD e ISSR. Alcântara (2009) realizou pesquisas sobre diversidade genética em teca de diferentes procedências por meio de marcadores microssatélites. Nesse estudo procurava-se avaliar as divergências entre os genótipos plantados em Mato Grosso e genótipos da Índia, Malásia, Indonésia, Costa do Marfim e Honduras.

3 METODOLOGIA

3.1 Caracterização do plantio

O plantio está localizado na fazenda Bom Sucesso, no distrito de Quem-Quem município de Janaúba, Minas Gerais. O local possui as coordenadas geográficas 44°15'18,2" W e 16°49'55,7" S, com altitude de aproximadamente 530 m. A pluviosidade média da região é de aproximadamente 800 mm, temperatura média anual de 24 °C, insolação de 2.600 horas anuais, umidade relativa média de 65% e clima Aw segundo a classificação de Köpen. O sistema de irrigação adotado é o gotejamento e os tratos culturais são realizados de acordo com recomendações propostas por Figueiredo (2005). A área do plantio é composta por mudas provenientes de sementes e clones fornecidos pela empresa Bioteca Ltda, localizada no estado do Mato Grosso.

3.2 Avaliação de idades e tipos de explantes

3.2.1 Seleção das plantas e coleta do material vegetal

Foram selecionadas as árvores que se apresentavam mais vigorosas e livres do ataque de pragas e patógenos. Para o primeiro experimento foram utilizados, como fonte de material vegetal, ramos de matrizes de teca com diferentes idades: Um ano e meio; dois anos; dois anos e meio e três anos, e dois tipos de explantes, gemas laterais e meristemas apicais. Todo o material vegetal utilizado foi coletado a partir de plantas provenientes de sementes.

Os ramos com comprimento médio de 15 cm foram retirados com o auxílio de tesoura de poda previamente desinfestada com hipoclorito de sódio e álcool 70%. Os ramos foram acondicionados em caixa de isopor com água, para evitar ressecamento e levados ao laboratório de Biotecnologia da Unimontes

campus Janaúba, MG. Foram mantidos dois pares de folhas para evitar maiores danos ao meristema e às gemas laterais.

Para desinfestação, os ramos foram lavados previamente com água e detergente neutro e submetidos à tríplex lavagem. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestados com hipoclorito de sódio comercial contendo 2% de cloro ativo, por um período de cinco minutos e submetidos a três lavagens sucessivas com água destilada estéril. Após a desinfestação, os ramos foram dissecados com o auxílio de bisturi e pinça cirúrgica por meio do estereomicroscópio Lupa 80x (Série SQF-F Tecnival). Foram obtidos meristemas apicais e laterais com aproximadamente 1-2 mm de diâmetro. Apenas nos meristemas apicais foram mantidos alguns primórdios foliares para evitar morte dos explantes.

3.2.2 Estabelecimento da cultura

Após a etapa de desinfestação, os explantes (meristemas apicais e gemas laterais) foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura MS (MURASHIGUE e SKOOG, 1962) suplementado com sacarose (30 g.L⁻¹), Vitaminas de White (10 mL.L⁻¹), Cloreto de Cálcio (10 mL.L⁻¹), Mio inositol (0,1 g.L⁻¹), Ágar (7 g. L⁻¹) e 3,0 g. L⁻¹ de carvão ativado e pH ajustado para 5,8 antes do processo de autoclavagem à temperatura de 121 °C sob pressão de 1,05 kg.cm⁻² durante 20 minutos. Os tubos de ensaio foram mantidos em câmara escura por dez dias. Posteriormente foram transferidos para sala de cultivo com lâmpadas fluorescentes do tipo super luz de 40 Watts, intensidade luminosa de 25 W. m², temperatura de 25 ± 3 °C e fotoperíodo de dias longos (dezesesseis horas de luz e oito horas no escuro), por mais 20 dias. Trinta dias após a inoculação os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de sobrevivência. Foram considerados mortos todos os explantes que apresentaram

sinal de oxidação ou contaminação. A avaliação foi feita visualmente realizando-se a contagem dos explantes oxidados ou contaminados.

3.3 Doses de citocininas para a fase de multiplicação da teca

3.3.1 Coleta dos explantes

Os explantes utilizados no segundo experimento foram selecionados com base nos resultados obtidos no primeiro experimento. Foram utilizados ramos de matrizes de teca com 2,5 anos de idade. Optou-se por utilizar ramos com essa idade pela maior disponibilidade de material adequado na época de instalação do experimento. Todas as etapas de coleta dos ramos, desinfestação e obtenção dos meristemas apicais foram conduzidas da mesma maneira descrita no experimento 1.

3.3.2 Estabelecimento da cultura

Os meristemas apicais de 1-2 mm foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura MS (MURASHIGUE e SKOOG, 1962) suplementado com sacarose (30 g.L⁻¹), Vitaminas de White (10 mL.L⁻¹), Cloreto de Cálcio (10 mL.L⁻¹), Mio inositol (0,1 g.L⁻¹), Ágar (7 g. L⁻¹) e 3,0 g. L⁻¹ de carvão ativado e pH ajustado para 5,8 antes do processo de autoclavagem à temperatura de 121 °C sob pressão de 1,05 kg.cm⁻² durante 20 minutos. Os tubos de ensaio foram mantidos em câmara escura por dez dias. Posteriormente foram transferidos para sala de cultivo com lâmpadas fluorescentes do tipo super luz de 40 Watts, intensidade luminosa de 25 W. m², temperatura de 25 ± 3 °C e fotoperíodo de dias longos (dezesesseis horas de luz e oito horas no escuro), por mais 20 dias (Figura 1). Trinta dias após a inoculação os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de sobrevivência, sendo considerados mortos

todos os explantes que apresentaram sinal de oxidação ou contaminação. A avaliação foi realizada visualmente efetuando-se a contagem dos explantes oxidados ou contaminados.

3.3.3 Multiplicação

Após vinte dias na presença de luz, os meristemas foram distribuídos em frascos de cultivo contendo meio de cultura MS (MURASHIGUE e SKOOG, 1962) suplementado com sacarose (30 g.L^{-1}), Vitaminas de White (10 mL.L^{-1}), Cloreto de Cálcio (10 mL.L^{-1}), Mio inositol ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), Ágar (7 g. L^{-1}), acrescido de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA (Ácido naftalenoacético). Foram utilizados dois reguladores de crescimento 6-BAP e cinetina, com quatro concentrações diferentes de cada regulador, nas doses de: 1,25; 1,75; 2,25 e 2,75 ml. L^{-1} de BAP e 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 ml. L^{-1} Cinetina. Cada regulador de crescimento foi avaliado separadamente.

O tempo de subcultivo foi de 30 dias, sendo que após os primeiros 30 dias os meristemas foram transferidos para frascos de cultivo volume de 500 ml e dimensões de 14,5 cm de altura e 7,9 cm de diâmetro contendo 30 ml de meio de cultura, com as mesmas concentrações dos reguladores de crescimento que haviam nos tubos de ensaio. Foram avaliadas as seguintes características: número de brotos produzidos em cada subcultivo, comprimento de brotos (cm), número de folhas, e presença ou ausência de calos. Após a avaliação de um subcultivo, as brotações que apresentavam duas folhas eram cortadas e os explantes transferidos para o meio de cultura fresco. As que apresentavam quatro folhas eram seccionadas na sua porção mediana e as duas metades colocadas em contato com o meio de cultura fresco. E quando apresentavam seis folhas eram separadas e cada par de folhas era colocado em meio de cultura fresco (Figura 1).

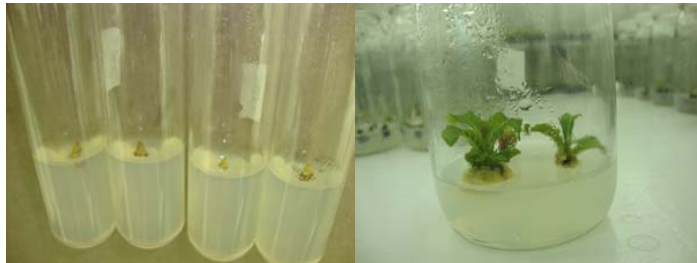


FIGURA 1. A) Meristema apical de teca na fase de estabelecimento *in vitro*.
B) Aspecto geral dos meristemas de teca na fase de multiplicação.

3.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental do primeiro experimento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4, sendo 2 tipos de explantes (meristema apical ou gema lateral), quatro idades (1 ano e meio; dois anos; dois anos e meio e três anos) e nove repetições.

No segundo experimento foram instalados dois delineamentos inteiramente casualizado. O primeiro consistindo do uso de 6-BAP com quatro doses (1,25; 1,75; 2,25 e 2,75 ml. L⁻¹) e seis repetições. No segundo experimento foi avaliado o uso da cinetina em quatro doses (1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 ml. L⁻¹) com seis repetições. Ambos os reguladores foram avaliados durante quatro subcultivos.

3.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, submetidos aos testes estatísticos. As características porcentagem de sobrevivência, número de brotos e folhas, por serem classificadas como variáveis quantitativas discretas, resultante de dados de contagem, testou-se a

aditividade, através da análise de covariância dos valores preditos ao quadrado, obtendo-se $P=0,897204$; a normalidade através do procedimento univariate, com a estatística W (Shapiro-Wilk), $P=0,0002$; e a homogeneidade de variância pelo teste de BARTLETT ($P=0,7100$). Uma vez confirmada a significância para o teste de normalidade, indicando que a pressuposição de normalidade do resíduo não foi aceita mesmo sendo submetidas às transformações pertinentes, as características avaliadas foram submetidas à análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis.

Da mesma forma, procedeu-se para as características número de brotos e número de folhas no segundo experimento. Testou-se a aditividade, através da análise de covariância dos valores preditos ao quadrado, obtendo-se para número de folhas, utilizando o regulador de crescimento 6-BAP ($P=0,7126$) e ($P=0,9504$) para número de brotos; a normalidade através do procedimento univariate, com a estatística W (Shapiro-Wilk), ($P=0,0001$) para número de brotos e ($P=0,0001$) para número de folhas; e a homogeneidade de variância pelo teste de BARTLETT ($P=1,0000$) para número de brotos e ($P=1,0000$) para número de folhas.

Da mesma maneira, utilizando-se o regulador de crescimento cinetina testou-se através do procedimento GLM (General Linear Models), a aditividade, através da análise de covariância dos valores preditos ao quadrado obteve ($P=0,0001$) e ($P=0,0001$) para número de brotos e número de folhas respectivamente; a normalidade através do procedimento univariate, com a estatística W (Shapiro-Wilk), ($P=0,0001$) para número de brotos e ($P=0,0001$) para número de folhas; e a homogeneidade de variância pelo teste de BARTLETT ($P=1,0000$) para número de brotos e ($P=1,0000$) para número de folhas. Uma vez confirmada a significância para o teste de normalidade, indicando que a pressuposição de normalidade do resíduo não foi aceita mesmo sendo submetidas às transformações pertinentes, as características avaliadas

foram submetidas à análise de variância não paramétrica Kruskal- Wallis. E significância da normalidade e aditividade para as variáveis submetidas ao tratamento com cinetina, mesmo realizando todas as transformações possíveis, as características avaliadas foram submetidas à análise de variância não paramétrica Kruskal- Wallis.

Observou-se significância para esta estatística e as médias de tratamentos foram comparadas pelo teste P. Para verificar a influência das doses de reguladores de crescimento em diferentes subcultivos no comprimento dos explantes, foi realizada a análise de variância, em que as variáveis dependentes foram submetidas ao teste F, e, quando necessário, à análise de regressão.

E para verificar a influência das doses de reguladores em diferentes subcultivos na formação de calos, foi realizada a análise por meio da distribuição de frequência.

3.3. Diversidade Genética

3.3.1 Coleta do material vegetal para estudos de diversidade genética

Foram coletadas folhas jovens de teca, provindas do mesmo local do experimento anterior selecionadas durante a primeira etapa do trabalho. O material vegetal consta de 37 genótipos (S 1 a S 37), coletados de uma área cultivada por mudas de plantio provenientes de sementes e 3 genótipos oriundos de clones (Bioteca-61 (C 01); Bioteca-62 (C 02) e Bioteca-68 (C 03)), todos adquiridos da empresa Cáceres Florestal Ltda em parceria com o laboratório Bioteca, localizados no estado de Mato Grosso. Outros 10 genótipos (S 41 a S 50) foram coletados de um plantio localizado no município de Jaíba-MG, sendo todas as plantas provenientes de sementes, também adquiridas da Cáceres Florestal Ltda. Durante o processo de coleta, a nervura central da folha foi imediatamente retirada e descartada, sendo o material de interesse

imediatamente acondicionado em papel alumínio resfriado até o momento da extração do DNA, efetuada no Laboratório de Biotecnologia da Unimontes, *campus* Janaúba.

3.3.2 Extração do DNA

Inicialmente foi realizado um teste com três métodos de extração para verificar o mais indicado para extração de DNA da teca, sendo eles: Doyle; Doyle (1990) modificado com folha fresca e folha armazenada por 72 horas, e Borges *et al.* (2009) modificado. No primeiro método foram utilizadas folhas frescas maceradas, CTAB 3% e β -mercaptoetanol 1%. O segundo método foi baseado na extração de DNA utilizando-se folhas armazenadas por 72 horas em *freezer* (-20 °C), CTAB 3% e β -mercaptoetanol 1%. No último método foram utilizadas folhas secas a 30 °C em estufa por 72 horas, NaCl 1,2 M e EDTA 30 μ M, com as mesmas concentrações de CTAB e β -mercaptoetanol, dos demais métodos. Nos três métodos as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido.

A quantificação e a qualidade do DNA extraído a partir dos três métodos testados foram realizadas em gel de agarose 0,8%. A voltagem empregada foi de 80 volts e as amostras coradas em solução de Brometo de etídeo a 5 mg. ml⁻¹. Os DNAs foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de Fotodocumentação UVP® *Life Science Software*.

Após a comprovação da aplicabilidade do método de Doyle; Doyle (1990) modificado, com a utilização de folhas frescas, o mesmo foi empregado para os genótipos coletados.

Dessa forma procedeu-se a extração do DNA dos genótipos selecionados. Cerca de 200 a 300 mg de tecido fresco foi triturado com nitrogênio líquido em um cadinho com ajuda de um pistilo e incubado a 65 °C por 30 minutos em

microtubos de 2 ml com 800 µL de tampão de extração (3% CTAB; 1,4M NaCl, 20mM EDTA pH8; 100mM Tris-HCl pH 8,0; 2% PVP; 1% mercaptoetanol).

O extrato foi submetido a duas extrações com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente, com posterior transferência do sobrenadante para novos microtubos de 1,5 ml. Os ácidos nucleicos na fase aquosa foram precipitados com isopropanol na proporção de 1:1 do volume recuperado e incubados a -20 °C, por 2 horas e posteriormente centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante foi removido e o precipitado branco formado no fundo do tubo foi lavado uma vez em etanol 70% e uma vez com etanol 95%. O precipitado foi novamente dissolvido com 200 µL de TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA), contendo RNase na concentração final de 4 µg/ml. A solução ficou incubada em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, adicionou-se NaCl 5M na proporção de 1:10 e 2/3 do volume de isopropanol gelado para precipitar o DNA, que foi incubado novamente a -20 °C, durante 2 horas. Após esse período, centrifugou-se por 10 minutos e lavou-se o precipitado com etanol 70% e 95%, deixando secar à temperatura ambiente por 20 minutos. O mesmo precipitado foi ressuspenso em 300 µL de TE.

A quantificação do DNA ocorreu em espectrofotômetro e para isso diluíram-se 50µl da amostra em 1450µl de água, e realizou-se a leitura na absorbância de luz UV 260 e 280. O espectrofotômetro foi calibrado com uma amostra branca que continha 50 µL de TE e 1450 µL de água. A concentração do DNA foi realizada com base na seguinte equação:

$$[\text{DNA}] \text{ ng}/\mu\text{L} = (\text{A}260 * f * 50) / 1000$$

Em que f é o fator de diluição e A260, a absorbância da amostra. Após a estimativa da quantidade de DNA, todas as amostras foram ajustadas para 10

ng/ μ L de DNA. Verificou-se a qualidade do DNA em um mingel de agarose a 0,8%, em que se aplicou uma amostra de cada DNA e as submeteu à eletroforese a 80 volts, após isso verificou-se a existência de bandas únicas e bem definidas que indicavam DNA de boa qualidade, bandas múltiplas corresponderiam a contaminação com RNA e arraste indicaria a degradação do DNA. Verificou-se também a relação A260/A280, onde as relações entre 0,2 a 1,2 são consideradas as absorvâncias confiáveis. A relação ideal é 1,8, indicando que não há contaminação significativa por proteínas.

3.3.3 Análise de RAPD

Para análise de RAPD, utilizaram-se 12 *primers* e as reações de amplificação seguiram a metodologia proposta por Williams *et al.* (1990) com as concentrações de DNA genômico (30 ng/ μ l), Tris-HCl/KCl (10mM/50mM), MgCl (2mM), dNTPs (2,5mM de cada base), *primer* (5pmol), Taq DNA polimerase (1 unidade) e água ultrapura para completar 25 μ l. As amplificações seguiram as seguintes etapas: um ciclo a 94 °C por 3 minutos, um ciclo de 94 °C por 10 segundos, 35 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, que foi repetido 40 vezes, seguido por um ciclo a 72 °C por 7 minutos e, logo após, a temperatura foi reduzida a 4 °C. Os *primers* foram provenientes do *Kit Operon Life*® (TABELA 1).

TABELA 1. Sequências dos *primers* RAPD utilizados nas ampliações de DNA de 50 genótipos de Teca (*Tectona grandis*).

<i>Primer</i>	Sequência 5' _____ 3'
OPL 03	CCAGCAGCTT
OPK 03	CCAGCTTAGG
OPJ 01	CCCGGCATAA
OPI 09	TGGAGAGCAG
OPC 14	TGCGTGCTTG
OPF 19	CCTCTAGACC
OPC 18	TGAGTGGGTG
OPG 16	AGCGTCCTCC
OPL 05	ACGCAGGCAA
OPC 07	GTCCCGACGA

Os produtos obtidos das ampliações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, a 5V/cm, em tampão TBE 1X por três horas e corados em solução de Brometo de etídeo a 5 mg/ml. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de Fotodocumentação UVP® *Life Science software*.

3.3.4 Análise ISSR

Foram realizados testes preliminares de amplificação com 20 *primers* desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade da Columbia Britânica (Coleção n° 9) (TABELA 2). Onze *primers* produziram as melhores ampliações, estes foram pré-selecionados para determinação da melhor temperatura de anelamento e nível de polimorfismo produzido. Foram testadas temperaturas de anelamento entre 44 e 58 °C. Após a definição da melhor temperatura para cada *primer*, estes foram utilizados para amplificação de todas as amostras.

TABELA 2. Identificação, sequência, número de nucleotídeos e faixa de temperatura de anelamento testada nos *primers* ISSR avaliados em ampliações de DNA de 50 genótipos de teca.

<i>Primers</i> UBC	Sequência completa (5' ____ 3')	Nº de nucleotídeos	Ta (°C)
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	17	44-58
UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	17	44-58
UBC 812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	17	44-58
UBC 816	CACACACACACACACAT	17	44-58
UBC 817	CACACACACACACACAA	17	44-58
UBC 829	TGTGTGTGTGTGTGTGC	17	44-58
UBC 833	ATATATATATATATATYG	17	44-58
UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	17	44-58
UBC 847	CACACACACACACARC	17	44-58
UBC 850	GTGTGTGTGTGTGTGYC	17	44-58
UBC 852	TCTCTCTCTCTCTCRA	17	44-58
UBC 861	ACCACCACCACCACCACC	18	44-58
UBC 866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	18	44-58
UBC 867	GGCGGCGGCGGCGGCGGC	18	44-58
UBC 870	TGCTGCTGCTGCTGCTGC	18	44-58
UBC 873	GACAGACAGACAGACA	16	44-58
UBC 880	GGAGAGAGGAGA	12	44-58
UBC 881	GGGTGGGGTGGGGTG	15	44-58
UBC 889	DBDACACACACACACAC	14	44-58
UBC 891	HVHTGTTGTTGTTGTGTG	15	44-58

R = Purina (A ou G); Y = Pirimidina (C ou T); D = G, A ou T; B = G, T ou C; H = A, C ou T; V = G, C ou A.

As reações de amplificação foram preparadas com o volume final de 10 μL , sendo composto de 2,5 ng de DNA; 1 X de Tris-HCl/KCl pH 8,3; 25 mM de MgCl_2 ; 0,2 dNTP's; 0,4 μM do *primer*; 0,6 unidades de Taq DNA polimerase e água ultrapura para completar o volume. A reação de PCR consistiu de uma fase de desnaturação a 94 °C por três minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação (94 °C/30 segundos), temperatura de anelamento específica para cada *primer* em função dos testes de temperatura de amplificação realizados, por 1 minuto e extensão (72 °C/2 minutos) e uma fase de extensão final de 72 °C por 7 minutos. Logo após, reduziu-se a 4 °C até a retirada das amostras.

Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, a 5V/cm, em tampão TBE 1X por aproximadamente duas horas e trinta minutos, corados em solução de brometo de etídeo 0,5 mg/L por 15 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de Fotodocumentação UVP® *Life Science software*.

3.3.5 Análise dos dados

Os dados obtidos por meio da eletroforese dos *primers* RAPD e ISSR foram registrados na forma de presença (1) e ausência (0) de bandas nos géis fotografados. Foram realizadas análises para estimativa do número de locos por *primer* (\hat{A}), porcentagem de locos polimórficos (P), heterozigosidade média esperada (H_e) e avaliação da confiabilidade do *primer* pelo PIC. Estes dois últimos foram calculados no sítio AGL Pic Calculator, sendo a H_e estimada com base no Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o valor de PIC com a seguinte fórmula:

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{j=1} p_j^2,$$

Onde:

P_{ij} = a frequência do loco j no marcador i (WEILER, 2010).

Foi utilizada a classificação de Botstein *et al.* (1990), sendo os marcadores com valores de PIC acima de 0,5 classificados como muito informativos, valores entre 0,25 e 0,5, mediamente informativos e menores que 0,25, pouco informativos.

O cálculo de distância (dissimilaridade- D_{ij}) entre os genótipos foi com base no coeficiente de similaridade de Jaccard utilizando-se a matriz binária

$$D_{ij} = 1 - S_{ij} / (a+b+c)$$

Onde a é o número de locos comuns aos genótipos i e j , enquanto b e c são os números de locos presentes apenas em cada um dos genótipos. De acordo com as distâncias genéticas, elaborou-se, a partir da análise de agrupamento, um dendrograma utilizando-se do algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean*). O valor cofenético foi calculado para informar o quanto a matriz de distâncias original foi explicada pela matriz e o agrupamento, e a consistência desse foi testada pelo procedimento de reamostragem com o uso de 1.000 *bootstraps*. Para as análises de distância genética, agrupamento, valor cofenético e *bootstraps*, utilizou-se o programa estatístico Genes (CRUZ, 2006).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação de idades e tipos de explantes

Foram observadas diferenças significativas para a característica de porcentagem de sobrevivência entre os explantes provenientes de gemas laterais e meristemas apicais. Em média 66,66% dos meristemas apicais sobreviveram após 30 dias de estabelecimento *in vitro*.

Independente da idade do explante, 100% dos derivados das gemas laterais não sobreviveram em função da alta oxidação observada. Entretanto, ao avaliar o efeito da idade na sobrevivência dos explantes coletados a partir dos meristemas apicais foram observadas diferenças significativas. Explantes com 2,5 anos de idade apresentaram porcentagem de sobrevivência de 88,87%, sendo observada uma redução de 50% na sobrevivência dos explantes com 3 anos de idade (TABELA 3).

TABELA 3. Médias referentes à sobrevivência dos explantes de teca em função da idade e tipo de explante.

Idade (Anos)	Tipo de explante	
	Apical	Lateral
1,5	66,66	0,0
2,0	66,66	0,0
2,5	88,87	0,0
3,0	44,44	0,0

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na coluna e minúscula na linha, diferem entre si pelo teste P ($P < 0,05$).

4.2 Doses de citocininas para a fase de multiplicação da teca

Não foram observadas diferenças significativas para a variável número de brotos entre as diferentes doses de 6-BAP avaliadas. Em média o uso do 6-BAP produziu 1,19 brotos por explante. A dose de 1,75 mg.L⁻¹ de 6-BAP no terceiro subcultivo produziu o maior número médio de brotos 2,33, diferindo estatisticamente dos demais subcultivos (TABELA 4).

TABELA 4. Médias do Número de Brotos (NBrot) de explantes de teca submetidos a quatro doses de 6-BAP em quatro subcultivos.

Subcultivo	Doses			
	1,25 mg.L ⁻¹	1,75 mg.L ⁻¹	2,25 mg.L ⁻¹	2,75 mg.L ⁻¹
1	1,00 a A	1,00 a A	1,00 a A	1,00 a A
2	1,00 a A	1,00 a A	1,00 a A	1,00 a A
3	1,33 a A	2,33 b A	1,00 a A	1,33 a A
4	1,00 a A	1,67 a A	1,00 a A	1,33 a A

Médias seguidas de letras distintas, minúscula na coluna e maiúscula na linha, diferem entre si pelo teste P (P<0,05).

Para a variável número de folhas, observou-se diferença significativa tanto entre doses de 6-BAP, quanto entre os subcultivos. Houve a maior produção de folhas nos explantes submetidos à dose 1,25 mg.L⁻¹ nos 3° e 4° subcultivos. As doses 1,75 mg.L⁻¹ ; 2,25 mg.L⁻¹ e 2,75 mg.L⁻¹ de 6-BAP apresentaram maior número de folhas a partir do 2° subcultivo. Em média foram produzidas 3,58 folhas por broto, sendo que a dose de 1,75 mg.L⁻¹ de 6-BAP foi significativamente superior às demais doses avaliadas (Tabela 5).

TABELA 5. Médias do Número de Folhas (NFolhas) de explantes de teca submetidas a quatro doses de 6-BAP em quatro subcultivos.

Subcultivo	Doses			
	1,25 mg.L ⁻¹	1,75 mg.L ⁻¹	2,25 mg.L ⁻¹	2,75 mg.L ⁻¹
1	2,00 a A	2,00 a A	2,00 a A	2,00 a A
2	2,67 a A	4,66 b A	3,33 b A	4,00 b A
3	4,67 b A	6,00 b B	3,33 b A	4,00 b A
4	4,00 b A	5,33 b A	4,00 b A	3,33 b A

Médias seguidas de letras distintas, minúscula na coluna e maiúscula na linha, diferem entre si pelo teste P (P<0,05).

Na tabela 6 estão apresentadas as médias para número de brotos, de explantes de teca submetidos a diferentes doses de Cinetina em quatro subcultivos.

A partir dos dados apresentados, é possível observar que há diferença significativa apenas entre as diferentes doses do regulador de crescimento, não havendo efeito dos subcultivos. Os explantes submetidos à dose 1,50 mg.L⁻¹, apresentaram maior número de brotos no 4º subcultivo, com média de 1,67 número de brotos (Tabela 6).

TABELA 6. Médias do Número de Brotos (NBrot.) de explantes de teca submetidos a quatro doses de cinetina em quatro subcultivos.

Subcultivo	Doses			
	1,00 mg.L ⁻¹	1,50 mg.L ⁻¹	2,00 mg.L ⁻¹	2,50 mg.L ⁻¹
1	1,00 a A	1,00 a A	1,00 a A	1,00 a A
2	1,00 a A	1,00 a A	1,00 a A	1,00 a A
3	1,00 a A	1,00 a A	1,00 a A	1,00 a A
4	1,00 a A	1,67 b A	1,00 a A	1,00 a A

Médias seguidas de letras distintas, minúscula na coluna e maiúscula na linha, diferem entre si pelo teste P (P<0,05).

A característica número de folhas apresentou comportamento similar à característica de número de brotos. Efeitos significativos das doses e subcultivos não foram observados. Em média 2,20 folhas foram emitidas por meio do uso da cinetina (Tabela 7).

TABELA 7. Médias do Número de Folhas (NFolhas) de explantes de teca submetidos a quatro doses de cinetina em quatro subcultivos.

Subcultivo	Doses			
	1,00 mg.L ⁻¹	1,50 mg.L ⁻¹	2,00 mg.L ⁻¹	2,50 mg.L ⁻¹
1	2,00 a A	2,00 a A	2,00 a A	2,00 a A
2	2,00 a A	2,00 a A	2,66 a A	2,00 a A
3	2,00 a A	2,67 a A	2,00 a A	2,00 a A
4	2,00 a A	2,67 a A	2,00 a A	3,33 a A

Médias seguidas de letras distintas, minúscula na coluna e maiúscula na linha, diferem entre si pelo teste P (P<0,05).

A Tabela 8 mostra a análise da variância entre os diferentes tratamentos, com indicações de diferenças significativas. A análise de variância indicou que não houve interação entre subcultivos e doses de 6-BAP.

TABELA 8. Análise de variância para a variável comprimento (COMP.) de explantes de teca submetidos a diferentes doses de BAP ao final de 120 dias de subcultivo.

FV	GL	SQ	QM	F
Subcultivos	3	15.312292	5,104097	0.0000***
Doses	3	0.362292	0.120764	0.0001***
Subcultivos*Doses	9	0.043542	0.004838	0.9358 ^{ns}
Erro	32	0.406667	0.012708	
Total	47	16.124792		
CV (%)	7,15			

* Há diferença significativa pelo Teste F ao nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

** Há diferença significativa pelo Teste F ao nível de 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$).

*** Há diferença significativa pelo Teste F ao nível de 0,1% de probabilidade ($P \leq 0,001$).

^{ns} Não há diferença significativa pelo Teste F ao nível de 5% de probabilidade ($P \geq 0,05$).

O comportamento do comprimento dos explantes à medida que se aumentava os subcultivos pode ser observado na figura a seguir (Figura 2). Verifica-se que à medida que se aumenta os subcultivos, há também um incremento no comprimento dos explantes, visto que aos 104 dias foi constatado o maior comprimento dos explantes.

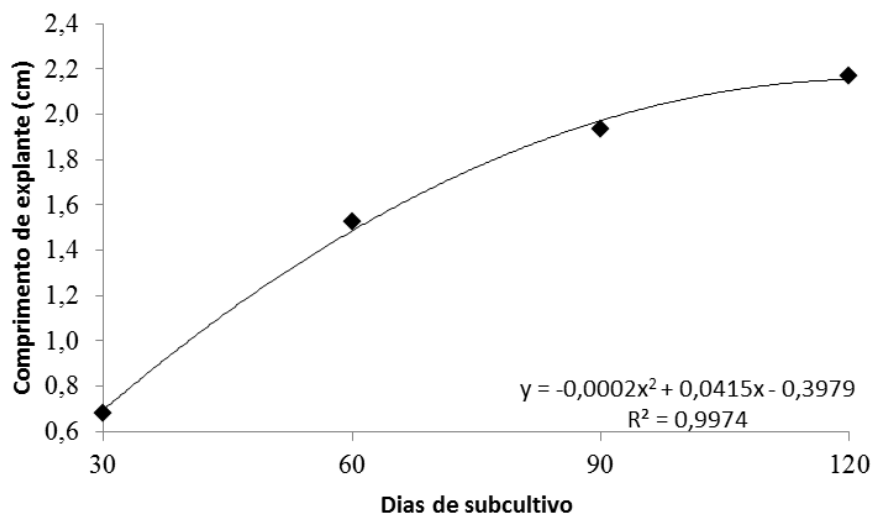


FIGURA 2. Comprimento (cm) dos explantes de teca em quatro subcultivos.

O comportamento do comprimento dos explantes em função da dose do regulador de crescimento 6-BAP pode ser observado na figura 3. Foi verificado incremento no comprimento dos explantes até a dose estimada de $1,96 \text{ mg.L}^{-1}$, a partir dessa dose observou-se decréscimo na característica avaliada.

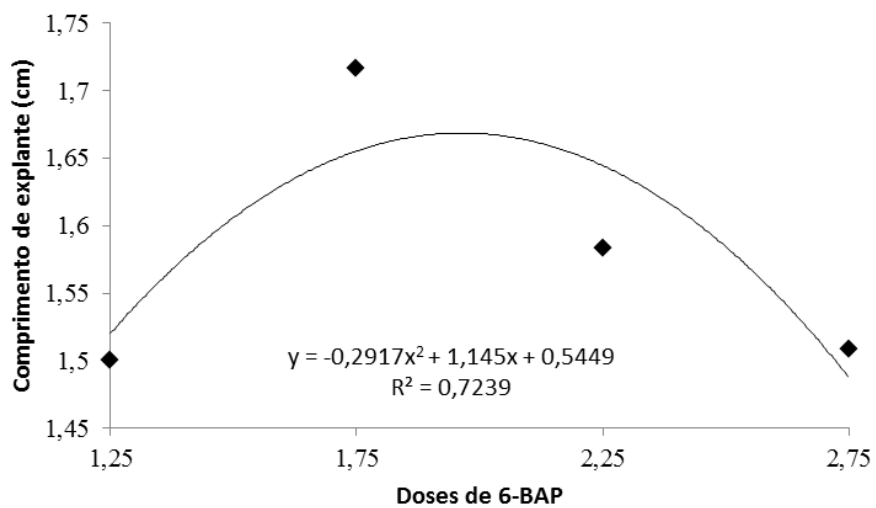


FIGURA 3. Comprimento (cm) dos explantes de teca submetidos a diferentes doses de 6-BAP

A tabela 9 mostra a análise da variância entre os diferentes tratamentos, com indicações de diferenças significativas. A análise de variância indicou que não houve interação entre subcultivos e doses de cinetina.

TABELA 9. Análise de variância para a variável comprimento (COMP.) de explantes de teca submetidos a diferentes doses de cinetina ao final de 120 dias de subcultivo.

FV	GL	SQ	QM	F
Subcultivos	3	7.362292	2.454097	0.0000***
Doses	3	0.118958	0.039653	0.0001*
Subcultivos*Doses	9	0.031875	0.003542	0.5409 ^{ns}
Erro	32	0.126667	0.003958	
Total	47	7.639792		
CV (%)	4.89			

* Há diferença significativa pelo Teste F ao nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

** Há diferença significativa pelo Teste F ao nível de 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$).

***Há diferença significativa pelo Teste F ao nível de 0,1% de probabilidade ($P \leq 0,001$).

^{ns} Não há diferença significativa pelo Teste F ao nível de 5% de probabilidade ($P \geq 0,05$).

Na figura 4 pode-se observar o comportamento do comprimento dos explantes em relação às doses de cinetina. Foi registrado incremento linear de 0,088 cm no comprimento dos explantes quando se aumentava 0,5 mg.L⁻¹ na dose do regulador cuja melhor dose estimada de cinetina para comprimento dos explantes foi de 2,5 mg.L⁻¹.

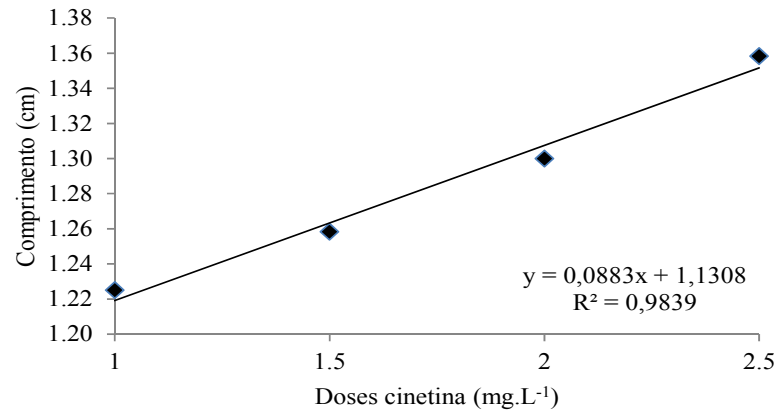


FIGURA 4. Comprimento dos explantes de teca submetidos a diferentes doses de cinetina.

Na figura 5, verifica-se o comportamento no comprimento dos explantes em função dos dias de subcultivo. O comprimento dos explantes apresentou comportamento logarítmico crescente, à medida que se aumentava os dias de subcultivos, havia um aumento no comprimento dos explantes. Foi observado maior comprimento dos explantes na dose de 2,5 mg.L⁻¹

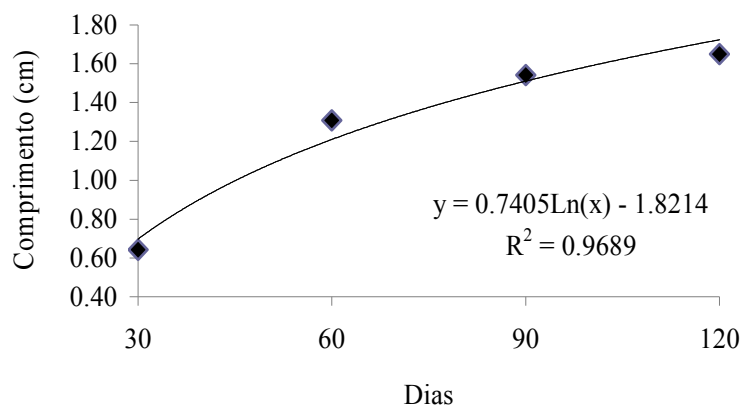


FIGURA 5. Comprimento (cm) dos explantes de teca em função dos subcultivos em dias.

Houve formação de calos na base dos explantes submetidos a todas as doses de 6-BAP (Tabela 10). Também foram observadas calosidades na base de todos os explantes submetidos às doses de cinetina (Tabela 11).

TABELA 10. Frequência de calos em explantes de teca submetidos a diferentes doses de 6-BAP, considerando 1 ausência e 2 presença de calos.

Doses	Frequência	
	1 Ausência	2 Presença
1,25 mg.L ⁻¹	0	100,00
1,75 mg.L ⁻¹	0	100,00
2,25 mg.L ⁻¹	0	100,00
2,75 mg.L ⁻¹	0	100,00

TABELA 11. Frequência de calos em explantes de teca submetidos a diferentes doses de cinetina, considerando 1 ausência e 2 presença de calos.

Doses	Frequência	
	1 Ausência	2 Presença
1,00 mg.L ⁻¹	0	100,00
1,50 mg.L ⁻¹	0	100,00
2,00 mg.L ⁻¹	0	100,00
2,50 mg.L ⁻¹	0	100,00

4.3 RAPD

Dentre os três métodos de extração de DNA que foram avaliados, o método Doyle e Doyle (1990) modificado, com a utilização de folhas frescas, foi o que produziu DNA de melhor qualidade após avaliação via espectrofotometria.

4.3.1 Primers RAPD

A partir da amplificação dos 10 *primers* RAPD gerou-se um total de 105 locos, sendo que desse total, 71 eram polimórficos e 34 monomórficos. Os valores de número de locos por *primer* (\hat{A}); número de locos polimórficos por *primer* (LP); Porcentagem de locos polimórficos (P); Heterozigosidade esperada por loco (He) e avaliação da confiabilidade do *primer* (PIC) estão descritos da Tabela 12.

TABELA 12. Valores de número de locos por *primer* (\hat{A}), número de locos polimórficos por *primer* (LP), porcentagem de locos polimórficos (P), heterozigidade média esperada (H_e) e PIC em cada *primer* RAPD, testado em acessos e clones de teca.

<i>Primer</i>	\hat{A}	LP	P	H_e	PIC
OPC07	7	6	86	0,74	0,70
OPC14	12	10	83	0,88	0,86
OPC18	7	3	43	0,47	0,37
OPF19	9	9	100	0,84	0,82
OPG16	8	2	25	0,45	0,35
OPI 09	12	8	67	0,84	0,82
OPJ01	8	8	100	0,81	0,79
OPK03	13	11	85	0,88	0,87
OPL03	10	5	50	0,71	0,66
OPL05	11	9	82	0,86	0,84
Média	9,7	7,1	72	0,75	0,71

Nota-se que o número de locos por *primer* variou de 7 (OPC 07 e OPC 18) a 13 (OPK 03), com média de 9,7. A porcentagem de locos polimórficos variou de 25 a 100, exibindo média de 72% cujos *primers* OPF19 e OPJ01 apresentaram 100% de locos polimórficos. Porém o maior número de locos polimórficos (11) foi observado no *primer* OPK 03 e o menor (2) no OPG 16 (Tabela 12).

Do total de 71 locos polimórficos, 19 revelaram frequência menor que 0,05 sendo estes denominados locos raros. Um loco nos *primers* OPC 18, OPL 03, OPL05; dois locos nos *primers* OPC 07, OPC 14, OPI 09, OPF 19; e quatro nos *primers* OPJ 01 e OPK 03 (Tabela 13).

A heterozigidade média esperada foi maior no *primer* OPC 14 e OPK 03 (0,88) e menor no *primer* OPG 16 (0,45) cujo valor médio para todos os *primers* foi de 0,75. O PIC variou de 0,35 (*primer* OPG 16) a 0,87 (*primer* OPK 03), notando-se que quanto maior a heterozigidade média esperada maior o valor de PIC .

TABELA 13. Alelos encontrados em cada *primer* RAPD e suas frequências em acessos e clones de teca.

<i>Primer</i>	<i>Alelo</i>	<i>Frequência</i>	<i>Primer</i>	<i>Alelo</i>	<i>Frequência</i>
OPC07	a	0,22	OPJ01	a	0,12
	b	0,24		b	0,01
	c	0,30		c	0,26
	d	0,01		d	0,28
	e	0,21		e	0,03
	f	0,01		f	0,11
OPC14	a	0,18	OPK03	g	0,04
	b	0,10		h	0,03
	c	0,09		a	0,14
	d	0,05		b	0,19
	e	0,19		c	0,08
	f	0,14		d	0,04
	g	0,14		e	0,15
	h	0,09		f	0,06
	i	0,009		g	0,19
	j	0,018		h	0,02
OPC18	a	0,62	OPL03	i	0,06
	b	0,01		j	0,04
	c	0,36		k	0,04
OPF19	a	0,14	OPL05	a	0,23
	b	0,18		b	0,02
	c	0,13		c	0,34
	d	0,16		d	0,31
	e	0,05		e	0,09
	f	0,14		a	0,12
	g	0,004		b	0,15
	h	0,18		c	0,16
	i	0,009		d	0,01
OPI 09	a	0,16	OPG16	e	0,06
	b	0,20		f	0,13
	c	0,04		g	0,16
	d	0,11		h	0,11
	e	0,14		i	0,10
	f	0,01		a	0,35
	g	0,21		b	0,65
	h	0,13			

A partir da matriz binária obtida pela análise dos locos polimórficos, foram calculadas as distâncias genéticas entre os 50 acessos e clones de teca. As distâncias variaram de 0,10 a 0,54 (Matriz completa em anexo), com distância genética média de 0,272, o que indica uma baixa variabilidade entre os acessos. Os maiores valores constatados referem-se à distância entre os acessos S 27 e S 45 e à menor distância entre os genótipos S 19 e S 20; S 28 e S 46; S 37 e S 39; S 40 e S 45. Foram calculadas também as distâncias de cada acesso em relação aos demais da população (Tabela 14).

TABELA 14. Distância genética média de cada acesso e clone de teca em relação aos demais.

Genótipo	Distância Média	Genótipo	Distância Média
S 1	0,32	S 26	0,34
S 2	0,28	S 27	0,35
S 3	0,31	S 28	0,27
S 4	0,27	S 29	0,28
S 5	0,28	S 30	0,28
S 6	0,29	S 31	0,26
S 7	0,25	S 32	0,28
S 8	0,26	S 33	0,35
S 9	0,27	S 34	0,29
S 10	0,35	S 35	0,23
S 11	0,29	S 36	0,26
S 12	0,29	S 37	0,24
S 13	0,27	S 38	0,25
S 14	0,26	S 39	0,25
S 15	0,27	S 40	0,26
S 16	0,25	S 41	0,25
S 17	0,25	S 42	0,25
S 18	0,25	S 43	0,26
S 19	0,24	S 44	0,25
S 20	0,24	S 45	0,24
S 21	0,25	S 46	0,25
S 22	0,27	S 47	0,29
S 23	0,26	C 1	0,31
S 24	0,25	C 2	0,36
S 25	0,27	C 3	0,28

Pelos resultados apresentados nessa tabela, pode-se visualizar que o genótipo mais semelhante aos demais é o S 35 com distância média de 0,23; em contrapartida o genótipo mais distante dos demais é o Clone 2 que apresentou distância média de 0,36.

A partir das distâncias genéticas entre os pares de acessos, construiu-se um dendrograma para melhor observação dos mesmos nos grupos de dissimilaridade (Figura 6).

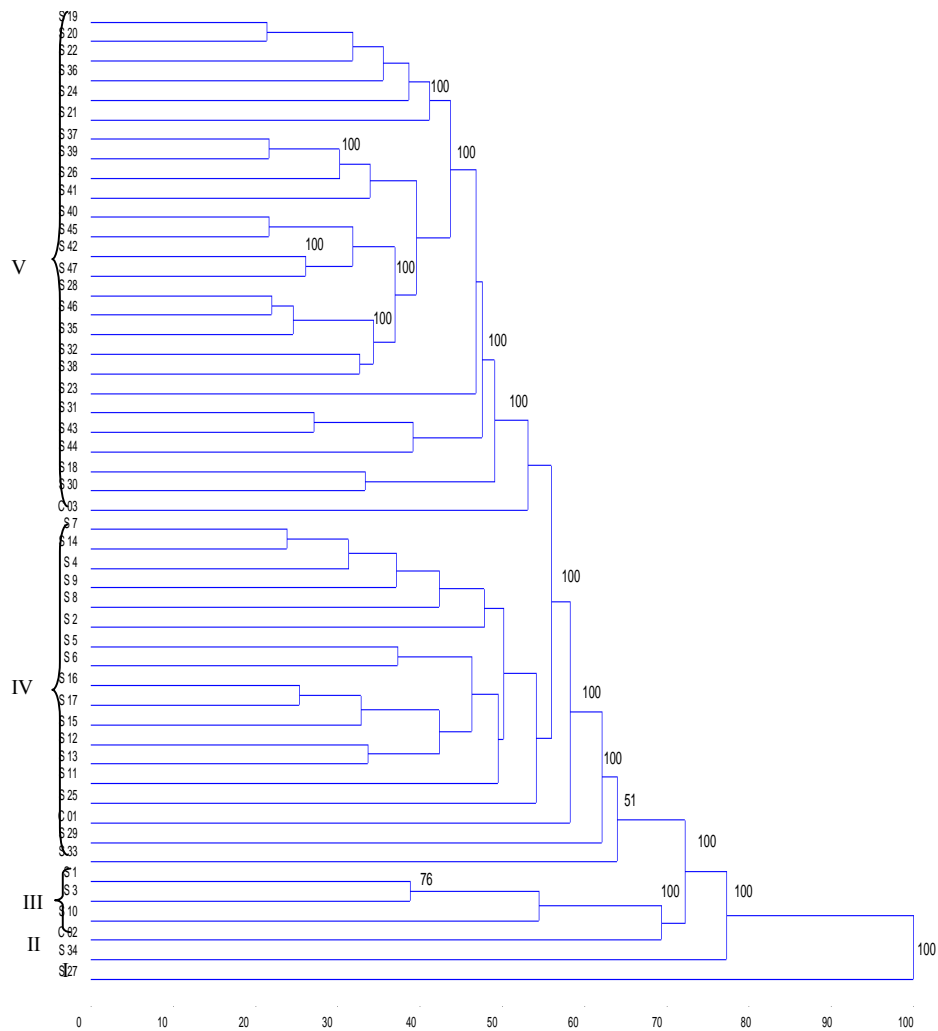


FIGURA 6. Análise de agrupamento pelo método UPGMA baseado na similaridade de Jaccard, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas, utilizando-se 10 *primers* RAPD em genótipos de teca. A consistência dos nós foi obtida através de 1.000 reamostragens de *bootstrap*.

Cinco grupos foram formados por meio da análise de agrupamento. O grupo I foi formado pelo o genótipo S 27, que é o mais distante; um grupo formado pelo genótipo S 34 (II) e outro com os genótipos C02; S 10; S 3 e S 1

(III). Dois grandes grupos foram formados com o restante dos genótipos, sendo o grupo IV integrando os genótipos do S 7 ao S33 e o grupo V envolvendo os demais genótipos (do S 19 a C 03).

Observa-se que os clones integraram grupos distintos: o C 01 no grupo IV, o C 02 no grupo III e o clone 03 no V, juntamente com a maioria dos genótipos (52%). O valor cofenético calculado foi de 0,93, o que demonstra que o dendrograma explica praticamente a totalidade da matriz de dissimilaridade original.

4.3.2 Primers ISSR

4.3.3 Otimização dos primers

Dentre os vinte *primers* testados, somente onze foram eficientes. Sendo eles: UBC 807; UBC 810; UBC 812; UBC 834; UBC 850; UBC 861; UBC 866; UBC 867; UBC 873; UBC 880 e UBC 891. As temperaturas ótimas de anelamento foram 46 °C para os *primers* UBC 807; UBC 810; UBC 812; UBC 834; UBC 850; UBC 861; UBC 873 e UBC 880 e 44°C para os *primers* UBC 866; UBC 867 e UBC 891.

Dos 11 *primers* ISSR selecionados foram gerados um total de 84 locos, dos quais 36 eram polimórficos e 48 monomórficos. Os valores de Número de alelos por *primer* (\hat{A}); Número de locos polimórficos (LP); Porcentagem de locos polimórficos (P); Heterozigosidade esperada por loco (H_e) e avaliação da confiabilidade do *primer* (PIC) estão descritos na Tabela 15.

TABELA 15. Valores de número de alelos por *primer* (\hat{A}), número de locos polimórficos por *primer* (LP); porcentagem de locos polimórficos (P), heterozigidade média esperada (H_e) e *PIC* em cada *primer* ISSR testado em teca.

<i>Primer</i>	\hat{A}	LP	P	H_e	<i>PIC</i>
UBC 807	6	2	33	0,489	0,369
UBC 810	9	2	22	0,461	0,354
UBC 812	7	3	43	0,646	0,570
UBC 834	13	9	69	0,804	0,784
UBC 850	4	2	50	0,499	0,370
UBC 861	9	3	33	0,436	0,364
UBC 866	4	3	75	0,665	0,591
UBC 867	9	2	22	0,476	0,363
UBC 873	10	5	50	0,689	0,631
UBC 880	7	2	29	0,487	0,368
UBC 891	6	3	50	0,569	0,475
Média	7,6	3,3	43,3	0,57	0,476

Pelos dados obtidos, verifica-se que o número de locos por *primer* variou de 4 (UBC 866) a 13 (UBC 834), com média de 7,6. A porcentagem de locos polimórficos variou de 22 a 75%, apresentando média de 43,3%. O *primer* UBC 866 exibiu a maior porcentagem de locos polimórficos (75%), porém o maior número de locos polimórficos foi observado no *primer* UBC 834 e o menor nos *primers* 807; 810; 850; 867 e 880 (Tabela 15).

Do total de 36 locos polimórficos, 5 evidenciaram frequência menor que 0,05 sendo estes denominados locos raros: Três locos no *primer* UBC 834; um no *primer* UBC 861 e um no *primer* UBC 873 (Tabela 16).

O valor de heterozigidade média esperada foi maior no *primer* UBC 834 (0,80) e menor no *primer* UBC 861 (0,43). O *PIC* variou de 0,78 no *primer* UBC 834 a 0,35 no *primer* UBC 810, notando também, assim como para o RAPD, que quanto maior a heterozigidade média esperada maior o valor de *PIC*.

TABELA 16. Alelos encontrados em cada *primer* ISSR e suas frequências em teca.

Primer	Alelo	Frequência
UBC 807	a	0,51
	b	0,48
UBC 810	a	0,64
	b	0,36
UBC 812	a	0,36
	b	0,42
	c	0,22
UBC 834	a	0,03
	b	0,03
	c	0,03
	d	0,09
	e	0,31
	f	0,09
	g	0,16
	h	0,17
	i	0,08
	UBC 850	a
b		0,74
UBC 861	a	0,03
	b	0,7
	c	0,27
UBC 866	a	0,36
	b	0,32
	c	0,32
UBC 867	a	0,61
	b	0,39
UBC 873	a	0,01
	b	0,30
	c	0,36
	d	0,045
	e	0,28
UBC 880	a	0,58
	b	0,42
UBC 891	a	0,44
	b	0,48
	c	0,08

As distâncias genéticas entre os 50 acessos de teca foram calculadas a partir da raiz binária obtida pela análise dos locos polimórficos. Essas variaram entre 0,308 e 0,018 (Matriz completa em anexo), sendo a distância genética média de 0,15. Isso mostra que os *primers* ISSR detectaram baixa variabilidade entre os indivíduos de teca analisados. Os maiores valores observados referem-se à distância entre os genótipos S 42 e C 63, e a menor distância entre os genótipos S 2 e S 14. Outro cálculo realizado foram as distâncias de cada genótipo em relação aos demais da população (Tabela 17).

TABELA 17. Distância genética média de cada acesso e clone de teca em relação aos demais com a utilização dos *primers* ISSR.

Genótipo	Distância Média	Genótipo	Distância Média
S 1	0,11	S 27	0,14
S 2	0,13	S 28	0,14
S 4	0,14	S 29	0,14
S 5	0,14	S 30	0,14
S 6	0,16	S 31	0,15
S 7	0,13	S 32	0,13
S 8	0,14	S 33	0,12
S 9	0,14	S 34	0,13
S 10	0,12	S 35	0,14
S 11	0,12	S 36	0,15
S 12	0,17	S 37	0,18
S 13	0,17	S 38	0,17
S 14	0,12	S 39	0,15
S 15	0,14	S 40	0,17
S 16	0,14	S 41	0,18
S 17	0,14	S 42	0,14
S 18	0,13	S 43	0,19
S 19	0,15	S 44	0,14
S 20	0,17	S 45	0,08
S 21	0,16	S 46	0,16
S 22	0,17	S 47	0,14
S 23	0,15	C 1	0,11
S 24	0,15	C 2	0,18
S 25	0,14	C 3	0,11
S 26	0,13		

Pode-se visualizar que o genótipo mais semelhante aos demais é o S 45 com distância média de 0,08. Em contrapartida o genótipo mais distante dos demais é o S 43 que apresentou distância média de 0,19.

As distâncias entre os genótipos e a distribuição dos mesmos nos grupos de dissimilaridade podem ser observadas no dendrograma (Figura 7).

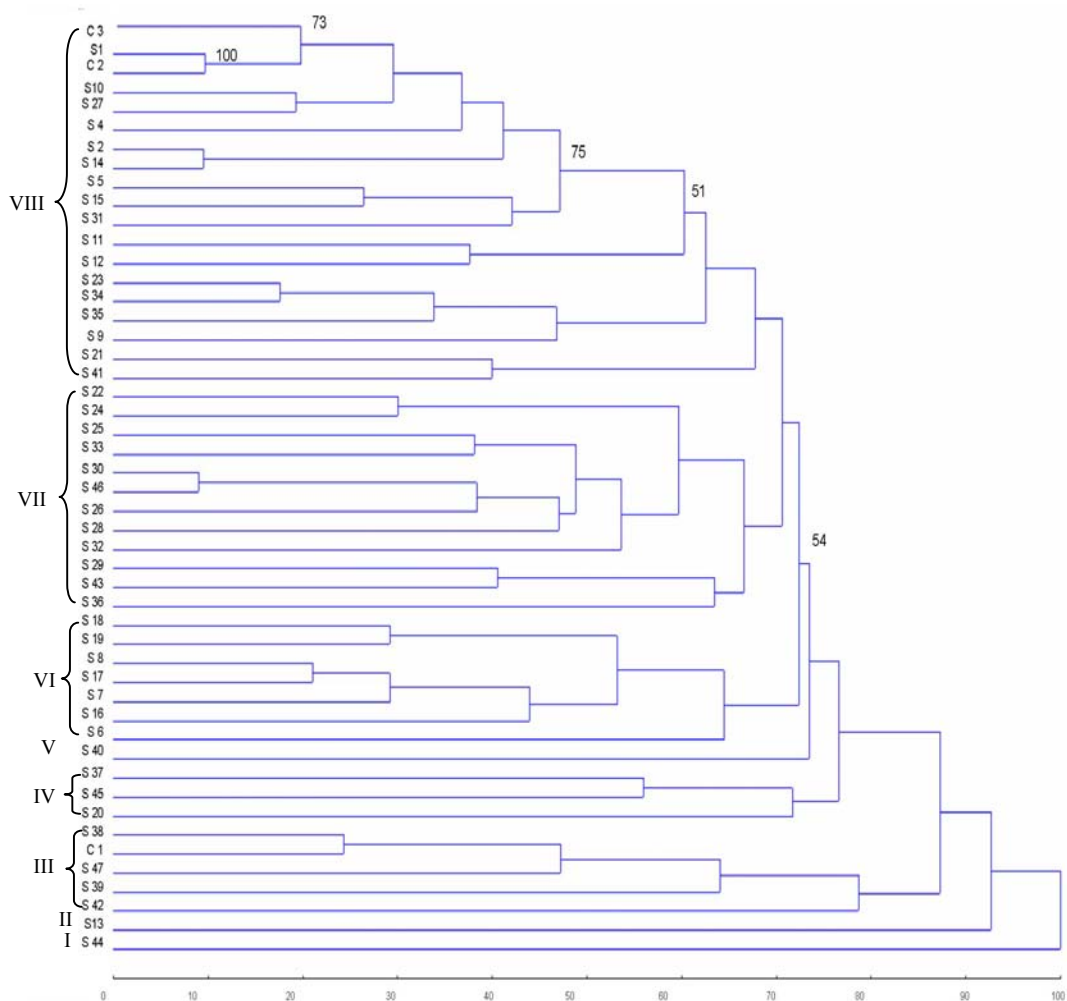


FIGURA 7. Análise de agrupamento pelo método UPGMA baseado na similaridade de Jaccard, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas, utilizando-se 11 *primers* ISSR em acessos e clones de teca. A consistência dos nós foi obtida através de 1.000 reamostragens de *bootstrap*.

Pela análise do dendrograma, constata-se a formação de 8 grupos: grupo I (S 44); grupo II (S 13); III (S 42; S 39; S 47; C 1 e S 38); IV (S 20; S 45 e S 37), V (S 40), VI (S 6, S 16, S 7, S 17, S 8, S 19, S 18), VII (S 36, S 43, S 29, S 32, S 28, S 26, S 46, S 30, S 33, S 25, S 24, S 22), VIII (S 41, S 21, S 9, S 35, S 34, S23, S12, S 11, S 31, S 15, S 5, S 14, S 2, S 4, S 27, S 10, C 2, S 1 e C3).

Nota-se que os clones integraram grupos distintos, uma vez que o C 1 incorporou-se no grupo III, o C 2 e C 3 no grupo VIII.

O valor cofenético calculado entre os valores de distância do dendrograma e a matriz de dissimilaridade original foi de 0,71, refletindo uma boa concordância com os valores de similaridade genética.

5 DISCUSSÃO

5.1 Estabelecimento *in vitro* de teca

Segundo Palanisamy e Subramanian (2001), o uso da propagação vegetativa de *Tectona grandis* é altamente dependente do grau de maturidade fisiológica e do estado nutricional do material vegetal, sendo esse o principal entrave para o sucesso da sua propagação clonal. Várias publicações discutem o potencial da micropropagação da teca, principalmente utilizando material vegetal juvenil como propágulos, porém poucas são as informações com material adulto e na maioria dos casos não se aplicam à produção em larga escala (ABDELNOUR e MUNOZ, 2005).

Na iniciação de culturas lenhosas, é comum a ocorrência de compostos fenólicos, que podem estar ligados a processos de regulação de crescimento. A oxidação fenólica pode dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, pois algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas, as quais são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e a morte dos explantes em grande número de espécies (ANDRADE *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam os estudos publicados por Shirin *et al.* (2005). De acordo com os autores, gemas caulinares de teca apresentaram altos níveis de oxidação, bem como uma baixa resposta morfogênica dos explantes.

Rocha *et al.* (2007), utilizando gemas axilares de plantas adultas de Canjarana (*Cabrlea canjerana*) tratadas com hipoclorito de sódio 0,03 e 2,0%, verificaram que, após 7 dias, uma média de 90% apresentou sintomas de contaminação. Entretanto, ao utilizar concentrações maiores 6,0 e 8,4% os explantes se oxidaram.

Tiwari *et al.* (2002) verificaram que explantes de teca, submetidos ao tratamento com solução de cloreto de mercúrio para desinfestação a 0,1% por 5 min., apresentaram rápida exudação de fenóis *in vitro*. Para amenizar esse problema, os explantes foram submetidos a cinco transferências para um meio fresco. Os explantes que não foram submetidos às transferências não apresentaram sucesso *in vitro*.

Uma característica intrínseca da teca é a formação de compostos fenólicos em seus tecidos, que podem ser uma ferramenta da própria planta para se defender do ataque de pragas e patógenos no campo. Entretanto, esses compostos são prejudiciais à cultura de tecidos, visto que quando liberados no meio de cultura impedem a planta de absorver os nutrientes de forma adequada, podendo ocasionar a morte dos explantes. Dessa forma, o estabelecimento *in vitro* de gemas caulinares de teca apresenta grandes problemas com relação à produção de compostos fenólicos e à baixa resposta morfogênica dos explantes. Deve-se citar também que os próprios agentes desinfestantes como o hipoclorito de sódio e o álcool 70%, se não utilizados em concentrações e tempo adequados podem se caracterizar como agentes causadores de oxidações (CALDAS *et al.*, 1998).

5.2 Doses de citocininas para a fase de multiplicação da teca

A etapa de estabelecimento é considerada a fase mais crítica para a cultura de tecidos, podendo haver perdas de 100% dos explantes. Apesar da dificuldade, não houve perdas consideráveis dos explantes em questão sendo que aproximadamente 85% dos explantes sobreviveram.

O 6-Benzilaminopurina na dose estimada de 1,96 mg.L⁻¹ foi o que melhor contribuiu para o crescimento dos explantes de teca. Esses resultados podem ser explicados devido ao fato de que existe um intervalo de concentração

exógena de 6-BAP que deve ser fornecido às plântulas sem causar um efeito inibidor, cujas concentrações altas podem causar alguns problemas, dentre eles a redução no alongamento das plantas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Andrade (2009), em experimentos com teca, verificou que o maior comprimento do explante foi observado na dose de 1,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP, ocorrendo redução no tamanho com o aumento da dosagem para 2,0 mg.L⁻¹. Resultados similares foram encontrados por Cordeiro *et al.* (2004) que, trabalhando com Paricá (*Schizolobium amazonicum*), uma espécie florestal, constataram que houve resposta inversa tanto para o 6-BAP quanto para cinetina, ou seja, à medida em que se aumentavam as concentrações dos reguladores de crescimento menor era o comprimento, sendo testadas as doses de 1,25 a 3,25 mg.L⁻¹.

Machado *et al.* (2006) também verificaram efeito negativo no comprimento das brotações com o aumento na concentração de 6-BAP (1,0 a 3,0 mg.L⁻¹) no meio de cultivo em porta-enxerto de uva (*Vitis vinifera*). Efeito semelhante foi constatado também para cinetina, evidenciando que com o aumento na concentração dessa citocinina há uma diminuição no comprimento dos brotos.

Entre os fatores que controlam a morfogênese *in vitro* destacam-se os reguladores de crescimento, dos quais as citocininas, juntamente com as auxinas, são as classes mais utilizadas. Além de serem essenciais à citocinese, promovem alterações na taxa metabólica, atividade enzimática, indução e formação de órgãos, quebra de dominância apical, mobilização de nutrientes orgânicos e inorgânicos e aumento da longevidade de tecidos e órgãos (CID, 2005).

No presente trabalho, foi observada pequena taxa de multiplicação, sendo obtidos em média 1,67 brotos por explante. Resultados semelhantes de baixa resposta morfogênica dos explantes foram encontrados por Andrade *et al.*

(2000) na propagação da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) em que apenas um broto por explante foi produzido.

Segundo Erig e Schuch (2005), a sobrevivência dos explantes é indicada pela coloração verde dos mesmos. Entretanto, a alta porcentagem de sobrevivência dos explantes nem sempre pode ser usada como indicativo de que haverá o estabelecimento de plantas a partir desses explantes. Muitas vezes os tecidos continuam vivos (apresentando a coloração verde), no entanto, não emitem folhas ou brotos, isto é, não se estabelecem *in vitro*, o que pode ser justificado pelo grau de desenvolvimento da gema do explante. Esse evento pode ser utilizado pra explicar o que ocorreu nos explantes de teca, pois mesmo se mantendo verdes nos sucessivos subcultivos, não emitiam brotações, somente cresciam e formavam novas folhas.

Em estudos realizados por Andrade (2009), utilizando meristemas apicais de teca, definiu-se 1,5 mg.L⁻¹ como a melhor dose de 6-BAP para multiplicação da cultura, obtendo-se média de 3,3 brotos/explante. Gyves e Rugini (2007), desenvolvendo protocolo para propagar comercialmente teca, alcançou maior taxa de multiplicação de 3,8 brotos por explante e atribuiu o resultado ao meio MS acrescido de 1,5 mg.L⁻¹ de BAP, 0,01 mg.L⁻¹ de AIB e 0,1 mg.L⁻¹ de GA₃.

Tiwari *et al.* (2002), usando segmentos nodais de teca de 45 anos de idade, conseguiram média de 5,76 brotos por explantes com tamanho médio de 3,7 cm sob efeito de 5 mg.L⁻¹ BAP e 0,01mg.L⁻¹ de AIA. A mesma dosagem de BAP (5 mg.L⁻¹), em combinação com AIA (0,01 mg.L⁻¹) adicionados ao meio de cultura, apresentou significância estatística na multiplicação *in vitro* de matrizes adultas com 60 anos de idade resultando em 6,33 brotos por explante quando comparado à testemunha que obteve 1 broto sem adição de reguladores de crescimento no meio (SHIRIN *et al.*, 2005).

Várias referências na literatura são encontradas no que diz respeito às elevadas concentrações de reguladores de crescimento, principalmente do 6-BAP, que podem apresentar toxidez à cultura, redução do alongamento das plântulas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, o que leva a problemas na fase de enraizamento, além de aumentar o risco de variação somaclonal (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Estudos realizados por Cordeiro *et al.* (2004) com Paricá demonstraram maior número médio de brotações com a concentração de 3 mg.L⁻¹ obtendo-se em média 2,14 brotos por explante. Fráguas *et al.* (2003), estudando multiplicação *in vitro* de *Ficus carica*, obtiveram 3,36 brotos com a utilização de 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina, porém, a partir da concentração de 2 mg.L⁻¹ de cinetina, observou-se a formação de brotos pequenos e vitrificados.

Machado *et al.* (2006), testando concentrações de cinetina (0,00; 1,75; 3,5 e 5,25) em porta-enxerto de uva, notaram efeito semelhante à testemunha (1,0 brotação/explante). Resultados semelhantes foram encontrados por Gray e Benton (1991) em meios de cultura com ou sem a presença de cinetina que apresentaram o mesmo efeito na micropropagação de *Vitis rotundifolia*.

Resultados semelhantes também foram registrados por Marinho *et al.* (2011) com a espécie *Lippia gracilis*, uma verbenácea como a teca, testando várias combinações de BAP (0,0; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹) com ANA (0,0; 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹). Esse autor verificou que em todas as concentrações não houve respostas para a multiplicação dessa espécie, apenas proporcionaram formação de calos. No presente trabalho, o maior número de folhas ocorreu nos explantes submetidos à dose de 1,75 mg.L⁻¹ de 6-BAP com média de 4,49 folhas/explante. Esses resultados são similares aos encontrados por Andrade (2009), que verificou maior resposta do desenvolvimento de folhas com média de 4,8 folhas por explante, submetidas à concentração de 2,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP.

Resultado similar foi encontrado por Gradaille *et al.* (2000) que constatou 4,8 folhas por explante de teca utilizando meio MS acrescido de 1,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP, e o menor valor foi conseguido com o tratamento 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP, não havendo diferença significativa entre as dosagens de 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹. Neste trabalho foi verificada a menor média no tratamento 1,25 mg.L⁻¹.

Alguns trabalhos demonstram que o aumento na concentração de 6-BAP não favorece o aumento no número de folhas. Machado (2006), estudando a multiplicação *in vitro* de videira, observou que as doses de 6-BAP de 2,5 a 5,0 mg.L⁻¹ não diferiram da testemunha, com relação ao número de folhas. Dzazio *et al.* (2002) obtiveram resultados semelhantes aos encontrados por Machado (2006), que observaram que o número de folhas por brotação nas concentrações de 2,5 a 5,0 mg.L⁻¹ foi inferior à testemunha.

Estudos realizados por Costa (2007) com a espécie *Lippia siloidis*, que pertence à mesma família da teca (Verbenaceae), testando diferentes reguladores de crescimento, concluiu que a concentração de 0,01 mg.L⁻¹ de BAP promoveu maior acúmulo de matéria fresca nas folhas dessa espécie micropropagada em meio de cultura MS.

A presença de calos é considerada comum para a espécie quando cultivada *in vitro*, mesmo na ausência de auxinas no meio de cultura. Gyves e Rugini (2007) verificaram início de desenvolvimento de calos na base do explante de teca entre sete e dez dias após o estabelecimento da cultura em meio suplementado com concentrações variando de 1,0 a 3,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP. A formação de calos também foi observada por Andrade (2009), avaliando diferentes concentrações de BAP em explantes de teca (de 1,0 a 2,5 mg.L⁻¹).

Daquinta *et al.* (2000) também obtiveram plântulas de teca com desenvolvimento de calos como meio base o MS com 2 mg.L⁻¹ de TDZ. Os autores observaram que os calos oriundos de explantes internodais se

apresentavam compactos, endurecidos, o que pode se relacionar com o material não morfogênico. Todavia, calos provenientes de cotilédones apresentavam se friáveis e com características morfogênicas por se tratar de material juvenil.

De acordo com Vieira (2002), as citocininas estimulam o desenvolvimento de porções de tecido meristemático, mais especificamente das gemas axilares, desencadeando o crescimento e divisões celulares que culminam ou no surgimento de uma brotação ou na formação de calos. O balanço entre as quantidades de citocininas exógenas e auxinas endógenas varia conforme o tecido utilizado como explante.

Borges *et al.* (2004) verificaram que as citocininas BAP, BA, cinetina e 2 iP nas dosagens 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹ promoveram o desenvolvimento de calo na base do explante em Acácia negra (*Acácia mearnsii*). As calosidades tinham maiores dimensões principalmente nos tratamentos com concentrações elevadas de citocinina, porém constatou-se, ainda, que houve formação de calo em explantes que não foram submetidos à ação dos hormônios de crescimento.

Estudos realizados por Machado *et al.* (2006), testando diferentes doses de BAP e cinetina (2,5 e 5,0 mg.L⁻¹) em *Vitis vinifera*, revelaram formação de calo em 100% dos explantes na presença das duas citocininas. Por outro lado, não se verificou formação de calo nos explantes na ausência de citocinina.

Aragão *et al.* (2011), testando diferentes doses de 6-BAP (1,25 a 2,5 mg.L⁻¹) em Pau Brasil, verificaram formação de calos somente nos segmentos nodais cujo meio de cultivo foi suplementado com 6-BAP.

5.3 Marcadores moleculares

Os marcadores RAPD e ISSR mostraram-se eficazes para estudos de diversidade genética em teca, devido a fatores associados à quantidade de locos polimórficos obtidos, rapidez na obtenção de resultados e facilidade de otimização. Ambos os marcadores são amplamente utilizados para diversidade, mapeamento, análise e identificação de genótipos de plantas, incluindo espécies florestais (FOFANA, 2009).

É interessante salientar que apesar da amplificação de diferentes regiões no genoma, ambos os marcadores produziram resultados semelhantes para os índices de diversidade. Os *primers* RAPD amplificaram maior número de locos polimórficos do que os *primers* ISSR. Esses resultados são similares aos obtidos por Narayanan *et al.* (2007) em estudo de caracterização molecular de teca que observaram maior número de amplificações polimórficas utilizando o marcador RAPD. Entretanto, McGregor *et al.* (2000), mesmo utilizando poucos marcadores ISSR, conseguiram capturar muito mais variabilidade a partir de um único segmento genômico do que vários *primers* RAPD com cobertura aleatória em todo o genoma.

O número médio de 7,6 alelos por *primer* ISSR foi similar ao trabalho publicado por Ansari *et al.* (2012) que, analisando cinco *primers* ISSR para caracterização de populações de teca, obtiveram 43 locos polimórficos, correspondendo a uma média de 8,6 locos por *primer*.

Narayanan *et al.* (2007) encontraram um total de 49 locos, dos quais 47 eram polimórficos com uma média de 9,4 locos polimórficos por *primer* em estudos realizados com teca (5 *primers* ISSR). O mesmo autor encontrou um total de 133 locos, sendo 124 polimórficos com média de 12,4 locos polimórficos por *primer* utilizando-se 10 *primers* RAPD.

Os valores de heterozigosidade média esperada, utilizando os *primers* RAPD e ISSR, foram de 0,75 e 0,57 respectivamente. Esses resultados estão acima dos relatados por Ansari (2012), que obtiveram média de 0,45 em estudos com teca utilizando o ISSR. Estopa (2006) *et al.* encontraram valores mais baixos de heterozigosidade (0,40), usando *primers* RAPD em *Eremanthus erythropappus*, popularmente conhecida como candeia, uma espécie florestal como a teca.

Alcântara (2009), empregando *primers* microssatélites em teca, obteve valores de heterozigosidade média esperada variando de 0,29 até 0,75 nos diferentes *primers*, com média de 0,46. O valor de heterozigosidade média esperada mais baixo foi registrado para os clones de Cáceres (0,21), e o valor mais alto para clones originários da Ilhas Salomão e Indonésia (0,44).

Foram observados maiores valores de *PIC* nos *primers* RAPD com média de 0,71 e nos *primers* ISSR média de 0,47. Esses resultados indicam que nos próximos estudos é aconselhável o uso dos *primers* com maior valor de *PIC*, pois estes são mais informativos de acordo com a classificação de Botstein *et al.* (1990).

Com relação à ocorrência de locos raros, foram observados no presente trabalho tanto para os *primers* RAPD quanto para os ISSR, porém, nos *primers* RAPD foi verificada maior ocorrência. Essa informação confirma que os referidos *primers* foram capazes de encontrar diferenças específicas entre os acessos avaliados.

Pela análise do dendrograma obtido com o índice de Jaccard, no presente trabalho, observa-se a formação de cinco grupos com a utilização do *primer* RAPD e oito grupos com a utilização do *primer* ISSR. Os genótipos coletados na Fazenda Bom Sucesso e os coletados no município do Jaíba se distribuíram em grupos em comum, ou seja, não houve a formação de grupos distintos que envolvessem somente os genótipos coletados de um mesmo local. Esse fato pode

ter ocorrido devido à origem comum das sementes que foram utilizadas para compor os dois plantios. Houve a formação desses grupos distintos porque, mesmo os materiais apresentando baixa variabilidade, eles não são indivíduos idênticos, visto que são originários de sementes e por isso já possuem uma diversidade entre eles. Os que se agruparam provavelmente são mais próximos entre si.

Da mesma forma ocorreu para os clones C 01; C 02 e C 03, que agruparam juntamente com os materiais advindos de semente. Com a utilização dos *primers* ISSR houve um agrupamento dos clones C 02 e C 03. Provavelmente esses clones são indivíduos superiores selecionados da população melhorada da Cáceres Florestal, ou seja, foram selecionados da mesma população que originou os indivíduos por via seminal, por isso observa-se a baixa diversidade entre eles podendo ter alelos em comum.

Os valores de distância genética encontrados foram bem inferiores aos esperados, indicando baixa variabilidade genética na população. Esses valores obtidos estão em concordância com os encontrados para outras espécies alógamas tropicais. Em *Eugenia dysenterica*, Zucchi (2002) observou uma divergência genética de 27,03% entre dez populações da espécie acessadas por marcadores RAPD. Sales *et al.* (2001) encontraram uma divergência genética de 28,58% entre populações de *Digitalis minor*. Wadt (2001) verificou que 28,1% da diversidade genética está atribuída entre populações de *Piper hispidinervium*.

Em estudos de diversidade genética por meio de marcadores microssatélites em teca, realizados por Alcântara (2009), observou-se elevada diversidade total; no entanto, os acessos avaliados eram de diferentes países. Quando a avaliação foi realizada apenas entre os acessos provenientes de Cáceres, constatou-se baixa diversidade genética entre os acessos oriundos de sementes e os clones uma vez que a análise de agrupamento baseado no índice de Jaccard demonstrou que os acessos de Cáceres formaram um mesmo grupo.

No presente estudo, observou-se que a diversidade dos genótipos não foi tão elevada como era esperado. 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. Consoante Goh e Monteuuis (2005), a produtividade da teca pode ser substancialmente melhorada a partir de seleção cuidadosa de procedência e genótipos superiores. Para a melhoria das espécies que têm a madeira como produto de interesse principal, o melhoramento considera o genótipo superior como aquele associado às características como incremento volumétrico, forma de fuste, produção de sementes e resistência ou tolerância às adversidades do meio (SHIMIZU, 2001).

Com os ciclos seletivos, a variabilidade vai decrescendo pela diminuição da frequência de indivíduos heterozigotos. Isso pode ser uma explicação para a baixa variabilidade encontrada entre os genótipos avaliados.

Visando ao aumento da área plantada no local de coleta dos genótipos, sugere-se a não utilização de sementes provindas dessa população original, visto que ela apresenta baixa variabilidade, podendo gerar endogamia. Dessa forma, faz-se necessária a aquisição de sementes de outras áreas, pois o proprietário tem o objetivo de selecionar indivíduos superiores para serem utilizados como doadores de explantes para produção clonal, via micropropagação.

5 CONCLUSÕES

O tipo de explante mais apropriado para o estabelecimento da teca é o apical, e a idade variando de um ano e meio a dois anos e meio.

Os reguladores de crescimento utilizados não foram eficientes para a multiplicação de teca.

Os *primers* RAPD e ISSR são eficientes para condução de estudos sobre diversidade genética em teca.

Os indivíduos avaliados apresentam baixa diversidade genética entre si.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOUR, A.; MUNOZ, A. Micropropagación de teca (*Tectona grandis*). Kurú: **Revista Florestal**, San José, v. 2, n. 5, p. 1-11, 2005.

ALCÂNTARA, B. K. **Caracterização da diversidade genética de teca (*Tectona grandis*) de diferentes procedências usando marcadores microssatélites**. 2009 93 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. *et al.* Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.

ANDRADE, W. F. **Indução de rejuvenescimento de teca (*Tectona grandis* L. f) através de enxertia seriada e micropropagação**. 2009. 76 f Piracicaba. 2009. Tese (Doutorado em Recursos Florestais - Silvicultura) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

ANGELI, A.; STAPE, J.L. ***Tectona grandis* (Teca)**. IPEF. Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/tectona.grandis/asp>>. Acesso em: 29 de maio 2012.

ANSARI, S. A.; NARAYANAN, C.; WALI, S. A.; KUMAR, R.; SHUKLA, N. KUMAR, S. R. ISSR markers for analysis of molecular diversity and genetic structure of Indian teak (*Tectona grandis* L. f.) populations. **Annals of forest research**, Jabalpur, v. 55, Jan. 2012.

ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. A. O efeito do BAP (6-Benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de Pau-Brasil. **Revista Cerne**, Lavras, v.17, n.3, p. 339-345, jul/set 2011.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T., editores. **Marcadores Moleculares** – Viçosa: UFV, 2006, 374p.

BORGES, A.; ROSA, M. S.; RECCHIA, G. H.; SILVA, J. R. Q.; BRESSAN, E. A.; VEASEY, E. A. CTAB methods for extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.66, n.4, p. 529-534, Jul/Ago, 2009.

BORGES, N. J.; SOBORSA; R. C. CODER; M. P. M. Multiplicação in vitro de gemas axilares de Acácia negra (*Acácia mearnsii*). **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.4, p. 493-498, 2004.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v.32, n.3, p.314-331, 1990.

CÁCERES FLORESTAL S/A. **Iniciação ao florestamento da teca**: orientação técnica para a germinação das sementes, formação de mudas, plantio e condução. Cáceres: Cáceres Florestal, 2007. 19 p.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa-CNPH, 1998, v.1, p.87-132.

CHARTERS, Y. M.; WILKINSON, M.J., **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, n. 111, p. 47-55, 2000.

CHEN, Y.; HAUSNER, G.; KENASCHUK, E.; PROCUNIER, D.; DRIBNENKI, P. PENNER, G. Identification of microspore-derived plants in anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular markers. **Plant Cell Reports**, New York, n.18, p. 44-48, 1998.

CID, L. P. B. Citocininas em plantas superiores: síntese e propriedades fisiológicas. In: CID, L. P. B. **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005, p. 15-57.

CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, S. T. O.; OHASHI, S. T.; ROSAL, L.F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos in vitro de (Paricá). **Revista Cerne**. Lavras, v.10, n.001, p.118-124, 2004.

COSTA, A. S. et al. Estabelecimento de alecrim – pimenta *in vitro*. **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 25, n.1, p. 68-72, 2007.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2006. 442p.

DAQUINTA, M.; RAMOS, L.; CAPOTE, I.; LEZCANO, Y.; RODRÍGUEZ, R.; TRINA, D. ESCALONA, M. Micropropagación de La teca (*Tectona grandis*L.F.). Comunicación técnica. **Revista florestal Centroamericana**, Turrialba, v.35, p. 25-28, 2000.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L.. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockvile, v.12, p.13–18, 1990.

DZAZIO, P. M.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420–A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 759–764, 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Notícias de teca (*Tectona grandis*)**. [online]. Rio Branco: EMBRAPA, 2011 Disponível em: <<http://www.cpafac.embrapa.br/noticias/teca.htm>>. Acesso em: 22 Ago 2011.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento in vitro de Mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agrária**, Piracicaba, v. 6, n. 1-2, p. 91-96, 2005.

ESTOPA, R. A.; SOUZA, A. M.; MOURA, A. C. O.; BOTREL, M. C. G.; MENDONÇA, E. G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em populações naturais de candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n. 70, p. 97-106, abr. 2006.

FAO - **Food and Agriculture Organization**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>> Acesso em: 20 maio 2012.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D.. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 220p. 1998.

FIGUEIREDO, E. O. **Teca (*Tectona grandis* L.f.): produção de mudas tipo toco**. Rio Branco: Embrapa/Acre, 2005. 22p Documentos, 101.

FLORESTECA. **Resumo do plano de manejo: floresteca**. [online] Disponível em: <http://www.floresteca.com.br/pdf/plano_de_manejo.pdf>. Acesso em: 17 Ago 2011.

FOFANA, I. J.; OFORI, D.; POINTEL, 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.

FRÁGUAS, C.B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A.R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L. efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.2, p. 49-55, 2004.

FREITAS, R. M. O.; OLIVEIRA, M. K. T.; DOMBROSKI, J. L. D.; CÂMARA, F. A. A.; NETO, R. V. S. Efeito dos tratamentos de oxidação em *Aloysia virgata*. **Revista Caatinga**. Mossoró-Brasil v. 22, n. 1, p. 151-154. Jan/mar 2009.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture, handbook and directory of commercial laboratories**. Everley: Exegetics, 1984. 709 p.

GERA, M.; GERA, N.; SINCH, V. K. Rooting response of root cuttings of some species under low cost mist conditions. **Indian Forester**, DehraDun, v. 126, p. 171-174, 2000.

GOH, D. K. S.; GALIANA, A. Vegetative propagation of teak. **JIRCAS working report**, Tsukuba, n. 16, p.35-43, 2000.

GOH, D.; MONTEUUIS, O. Rationale for developing intensive teak clonal plantation, with special reference to Sabah. **Bôis et Forêts des Tropiques**, [S.l.], v.28, n. 3, p. 5-15, 2005.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M.. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, Dordrecht, n. 122, p. 81-89, 2001.

GRADAILLE, D. M.; RAMOS, L.; LEZCANO, Y.; RODRIGUEZ, R.; ESCANOLA, M. Algunos elementos en la micropropagacion de la teca. **Biotecnologia Vegetal**, Cuba, v.1, p.39-44, 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. ; BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação de genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998, v.1, p.183-260.

GRAY, D. J.; BENTON, C. M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Hague, v. 27, n. 1, p. 7-14, 1991.

GYVES, E. M.; RUGINI, J. I. E. Efficient method of micropropagation and in vitro rooting of teak (*Tectona grandis* L.) focusing on large-scale industrial plantations . **Annual Forest Science**, Nancy, v. 64, p.73-78, 2007.

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

KRISHNAPILLAY, B. Silviculture and management of teak plantations. **Unasyva**, Rome, v. 51, n. 201, p. 14-21, 1999.

LORENZI, H. **Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003. 368p.

MACHADO, M. P.; BIASI, L. A.; RITTER, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Multiplicação in vitro do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v..30, n.4, Jul/Ago. 2006

MARINHO, M. J. M.; ALBUQUERQUE, C. C.; MORAIS, M. B.; SOUZA, M. C. G.; SILVA, K. M. B. estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracillis* Schauer. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu v.13, n.2, p.246-252, 2011.

MCGREGOR, C. E., LAMBERT, C. A., GREYLING, M. M., LOUW, J. H.; WARNICH, L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. **Euphytica**, Dordrecht, v. 113, p. 135–144, 2000.

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre. 141 p. 1998

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F.A.; A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.15, p.473-497, 1962.

NARAYANAN, C.; WALI, S. A.; SHUKLA, N.; MANDAL, A. K.; ANSARI, S. A. RAPD and ISSR markers for molecular characterization of teak (*Tectona grandis*) plus tress. **Journal of Tropical Forest Science**. Cambridge, v.19, n.4, p. 218-225, 2007.

PALANISAMY, K.; SUBRAMANIAN, K. Vegetative propagation of mature teak trees (*Tectona grandis* L.). **Silvae Genética**, Frankfurt, v. 50, n. 5/6, p. 188-191, 2001.

PANDEY, D.; BROWN, C. Teak: a global overview. **Unasylva**, Rome, n. 201, v. 51, p. 3-13, 1999.

PASCAL, M. **Introdução:** fundamentos básicos. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. Cap. 5, p. 37-45.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.** Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 295 p. 1990.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A.. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v.128, p. 9-17, 2002.

ROCHA, S. C. da. QUORIM, M; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, Viçosa v. 31, n.1. Jan/Feb. 2007.

ROQUE, R. M. Influencia de La edad Del cambium, tasa de crecimiento y nivel de precipitación sobre La densidad básica de La teca em Costa Rica, **Madera y Bosques**, México, v.8, n.1, p.39-49, 2002.

SALES, E. et al. Population genetic study in the Balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers. **American Journal of Botany**, [S.l.], v.88, n.10, p.1750-1759, 2001.

SANCHÉZ, D. S. **Estúdio físico de suelos de dos sítios para determinar la factibilidad Del establecimiento de caboa (*Swietenia humilis* Zucc.) y teca (*Tectona grandis* L.f) – Honduras**, p. 203-220, dez 2002

SETH, S.K.; KAUL, O.N. Tropical Forest ecosystems of india: the teak forests. **Unesco**. Paris, p.628-640, 1978

SHIMIZU, J. Y. Melhoria de espécies florestais na Embrapa. In: workshop sobre Melhoria de espécies florestais e palmáceas no Brasil, 2001. Curitiba. **Anais**. Colombo: Embrapa florestas, 2001. p. 75-84 (Embrapa Florestas. Documentos, 62).

SHIRIN, F.; RANA, P. K.; MANDAL, A. K. *In vitro* clonal propagation of mature *Tectona grandis* through axillary bud proliferation. **Journal Forest Research**, Tokyo, v.10, n. 6, p. 465-469, 2005.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. [online]. Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia, simpósio 2001. < Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios>. Acesso em: 15 mar. 2012.

THOMAS, P., RAVINDRA, M. B. Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. **Journal of Horticulture Science**, Bangalore, v.72, n.5, p. 713- 722, Sept. 1997.

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

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. Micropropagação de plantas ornamentais. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo**, Campinas, n. 174, p. 58-62, maio 1998.

TORRES A. C, CALDAS L. S.; BUZZO J. A. (Eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v.1. e 2. Brasília, Embrapa, 864p. 1998.

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

VIEIRA, H. A.; MARTINS, E. P. M. PEQUENO, P. L. L.; LOCATELLI, M. **Aspectos silviculturais da teca (*Tectona grandis* L.) em Rondônia**. Porto Velho, 2002. 15 p. (Documentos EMBRAPA, 68).

WADT, H. O. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) visando seu uso e conservação**. 2001. 95f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2001.

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

WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 18, p. 6531–6535. 1990.

WOLFF, K.; ZIETKIEWICZ, E.; HOFSTRA, H.. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns **Theoretical and Applied Genetics**. Berlim, v. 91, p. 439-447, 1995.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC. utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 148 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ANEXOS

QUADRO 1 - Matriz de dissimilaridade genética obtida pelo coeficiente de Jaccard a partir dos marcadores moleculares de RAPD.

	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10	S 11	S 12	S 13	S 14	S 15	S 16	S 17	S 18
S 2	0,29																	
S 3	0,18	0,22																
S 4	0,29	0,20	0,25															
S 5	0,25	0,30	0,26	0,24														
S 6	0,21	0,31	0,25	0,24	0,18													
S 7	0,29	0,22	0,28	0,17	0,23	0,24												
S 8	0,28	0,26	0,25	0,19	0,27	0,26	0,16											
S 9	0,29	0,24	0,28	0,17	0,21	0,24	0,16	0,23										
S 10	0,30	0,31	0,22	0,38	0,27	0,34	0,35	0,41	0,34									
S 11	0,30	0,29	0,27	0,23	0,22	0,22	0,22	0,27	0,18	0,34								
S 12	0,29	0,26	0,29	0,27	0,20	0,29	0,24	0,32	0,19	0,23	0,25							
S 13	0,32	0,29	0,32	0,25	0,21	0,24	0,17	0,24	0,24	0,35	0,19	0,16						
S 14	0,29	0,22	0,31	0,12	0,25	0,26	0,11	0,21	0,19	0,36	0,24	0,22	0,15					
S 15	0,30	0,30	0,34	0,26	0,17	0,25	0,21	0,27	0,23	0,25	0,27	0,17	0,18	0,21				
S 16	0,28	0,26	0,30	0,19	0,20	0,26	0,23	0,23	0,23	0,33	0,27	0,23	0,26	0,24	0,15			
S 17	0,27	0,25	0,27	0,16	0,17	0,20	0,20	0,20	0,18	0,33	0,22	0,19	0,18	0,21	0,16	0,12		
S 18	0,26	0,26	0,26	0,26	0,25	0,26	0,26	0,18	0,23	0,37	0,27	0,25	0,28	0,26	0,24	0,23	0,22	
S 19	0,35	0,28	0,35	0,20	0,23	0,28	0,22	0,21	0,22	0,41	0,25	0,24	0,22	0,22	0,21	0,17	0,13	0,21
S 20	0,37	0,24	0,34	0,20	0,25	0,32	0,21	0,23	0,21	0,38	0,26	0,26	0,25	0,21	0,19	0,17	0,16	0,22
S 21	0,36	0,30	0,37	0,23	0,20	0,29	0,23	0,27	0,23	0,33	0,25	0,25	0,23	0,24	0,19	0,20	0,21	0,22
S 22	0,35	0,26	0,29	0,19	0,27	0,30	0,21	0,23	0,25	0,40	0,24	0,28	0,22	0,21	0,28	0,21	0,18	0,21
S 23	0,37	0,28	0,38	0,22	0,34	0,35	0,28	0,30	0,26	0,42	0,26	0,34	0,30	0,25	0,31	0,29	0,29	0,29
S 24	0,37	0,24	0,37	0,22	0,29	0,34	0,19	0,25	0,21	0,37	0,28	0,30	0,29	0,23	0,26	0,24	0,25	0,28

...continua...

QUADRO 1. Cont.

	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10	S 11	S 12	S 13	S 14	S 15	S 16	S 17	S 18
S 25	0,32	0,26	0,35	0,24	0,27	0,30	0,23	0,27	0,25	0,33	0,30	0,26	0,29	0,23	0,25	0,23	0,20	0,28
S 26	0,37	0,28	0,36	0,20	0,29	0,32	0,24	0,24	0,24	0,40	0,30	0,33	0,31	0,21	0,24	0,22	0,23	0,22
S 27	0,42	0,42	0,31	0,52	0,48	0,45	0,44	0,43	0,46	0,39	0,48	0,39	0,41	0,45	0,44	0,48	0,47	0,46
S 28	0,32	0,25	0,28	0,21	0,26	0,27	0,20	0,22	0,20	0,35	0,24	0,24	0,24	0,23	0,23	0,23	0,23	0,19
S 29	0,36	0,26	0,25	0,24	0,36	0,31	0,26	0,30	0,32	0,36	0,35	0,33	0,32	0,30	0,35	0,33	0,29	0,33
S 30	0,32	0,23	0,26	0,28	0,29	0,29	0,27	0,24	0,27	0,38	0,32	0,32	0,33	0,29	0,31	0,27	0,24	0,16
S 31	0,32	0,32	0,34	0,24	0,35	0,30	0,28	0,23	0,28	0,45	0,32	0,37	0,31	0,25	0,34	0,32	0,27	0,26
S 32	0,38	0,27	0,32	0,23	0,32	0,33	0,27	0,26	0,27	0,40	0,30	0,30	0,31	0,27	0,27	0,21	0,20	0,24
S 33	0,38	0,27	0,35	0,29	0,36	0,35	0,22	0,22	0,33	0,40	0,38	0,36	0,33	0,29	0,29	0,29	0,33	0,27
S 34	0,33	0,35	0,33	0,37	0,34	0,35	0,43	0,38	0,37	0,33	0,38	0,32	0,37	0,37	0,35	0,35	0,35	0,31
S 35	0,32	0,28	0,34	0,25	0,30	0,29	0,24	0,22	0,24	0,40	0,29	0,29	0,27	0,25	0,26	0,23	0,23	0,18
S 36	0,33	0,26	0,32	0,20	0,28	0,26	0,22	0,21	0,22	0,41	0,29	0,29	0,27	0,19	0,28	0,26	0,19	0,18
S 37	0,31	0,29	0,36	0,27	0,32	0,31	0,28	0,26	0,26	0,36	0,32	0,33	0,33	0,29	0,28	0,26	0,25	0,28
S 38	0,35	0,28	0,34	0,24	0,25	0,30	0,24	0,28	0,22	0,36	0,29	0,28	0,28	0,27	0,25	0,25	0,20	0,21
S 39	0,32	0,28	0,31	0,22	0,31	0,30	0,28	0,23	0,26	0,38	0,29	0,34	0,32	0,27	0,29	0,25	0,24	0,23
S 40	0,35	0,30	0,34	0,24	0,28	0,30	0,30	0,30	0,26	0,35	0,29	0,28	0,32	0,27	0,27	0,25	0,24	0,21
S 41	0,36	0,27	0,33	0,29	0,30	0,33	0,25	0,24	0,29	0,35	0,35	0,34	0,34	0,31	0,29	0,29	0,30	0,27
S 42	0,38	0,27	0,37	0,23	0,28	0,29	0,23	0,24	0,27	0,37	0,27	0,34	0,28	0,24	0,27	0,27	0,24	0,25
S 43	0,32	0,30	0,31	0,21	0,29	0,27	0,27	0,20	0,25	0,42	0,34	0,38	0,33	0,27	0,33	0,29	0,22	0,23
S 44	0,29	0,27	0,27	0,22	0,32	0,29	0,26	0,26	0,26	0,39	0,32	0,31	0,32	0,24	0,30	0,28	0,25	0,24
S 45	0,37	0,26	0,31	0,20	0,28	0,30	0,30	0,28	0,24	0,36	0,27	0,33	0,33	0,26	0,32	0,30	0,25	0,26
S 46	0,34	0,25	0,33	0,21	0,27	0,27	0,25	0,25	0,23	0,38	0,26	0,28	0,26	0,23	0,27	0,27	0,24	0,21
S 47	0,37	0,33	0,38	0,27	0,28	0,30	0,28	0,26	0,28	0,39	0,29	0,32	0,30	0,29	0,27	0,21	0,22	0,25
C 01	0,36	0,35	0,35	0,31	0,28	0,29	0,31	0,28	0,31	0,40	0,30	0,32	0,26	0,31	0,25	0,25	0,20	0,30
C 02	0,32	0,38	0,26	0,38	0,37	0,34	0,36	0,35	0,38	0,40	0,39	0,38	0,38	0,41	0,39	0,37	0,36	0,39
C 03	0,36	0,31	0,39	0,29	0,33	0,33	0,29	0,30	0,31	0,36	0,33	0,30	0,31	0,31	0,25	0,28	0,27	0,28

...continua...

OUADRO 1. Cont.

	S 20	S 21	S 22	S 23	S 24	S 25	S 26	S 27	S 28	S 29	S 30	S 31	S 32	S 33	S 34	S 35	S 36	S 37
S 21	0,19																	
S 22	0,16	0,19																
S 23	0,20	0,25	0,24															
S 24	0,17	0,19	0,16	0,22														
S 25	0,18	0,23	0,22	0,30	0,23													
S 26	0,13	0,24	0,21	0,16	0,17	0,25												
S 27	0,51	0,52	0,48	0,51	0,51	0,42	0,54											
S 28	0,20	0,23	0,22	0,20	0,20	0,31	0,14	0,48										
S 29	0,33	0,30	0,27	0,31	0,25	0,31	0,33	0,46	0,25									
S 30	0,22	0,27	0,22	0,30	0,20	0,30	0,22	0,48	0,22	0,26								
S 31	0,29	0,27	0,27	0,24	0,23	0,29	0,21	0,50	0,22	0,25	0,24							
S 32	0,19	0,27	0,22	0,22	0,23	0,26	0,15	0,49	0,14	0,29	0,20	0,22						
S 33	0,28	0,27	0,34	0,32	0,24	0,32	0,29	0,48	0,28	0,31	0,28	0,30	0,28					
S 34	0,40	0,37	0,44	0,41	0,43	0,34	0,40	0,40	0,34	0,35	0,34	0,36	0,34	0,38				
S 35	0,21	0,21	0,20	0,21	0,17	0,31	0,18	0,48	0,12	0,26	0,20	0,18	0,17	0,24	0,34			
S 36	0,17	0,24	0,16	0,25	0,21	0,21	0,15	0,48	0,21	0,28	0,22	0,23	0,21	0,31	0,33	0,16		
S 37	0,20	0,25	0,24	0,24	0,20	0,24	0,17	0,50	0,22	0,33	0,28	0,22	0,22	0,34	0,40	0,19	0,23	
S 38	0,20	0,20	0,22	0,21	0,18	0,28	0,18	0,52	0,17	0,26	0,16	0,22	0,15	0,28	0,33	0,13	0,18	0,22
S 39	0,20	0,23	0,20	0,21	0,20	0,28	0,12	0,52	0,17	0,30	0,23	0,20	0,18	0,31	0,41	0,15	0,20	0,10
S 40	0,22	0,20	0,20	0,24	0,20	0,26	0,16	0,51	0,17	0,30	0,27	0,28	0,20	0,31	0,35	0,13	0,14	0,20
S 41	0,24	0,27	0,28	0,30	0,20	0,28	0,16	0,49	0,20	0,30	0,27	0,28	0,24	0,24	0,43	0,21	0,26	0,17
S 42	0,20	0,18	0,13	0,21	0,13	0,26	0,14	0,52	0,17	0,26	0,23	0,22	0,22	0,31	0,41	0,16	0,16	0,17
S 43	0,24	0,25	0,20	0,24	0,20	0,28	0,19	0,53	0,20	0,24	0,23	0,13	0,22	0,32	0,38	0,18	0,16	0,22
S 44	0,26	0,28	0,21	0,26	0,26	0,32	0,24	0,49	0,22	0,24	0,23	0,21	0,27	0,31	0,33	0,17	0,17	0,24
S 45	0,24	0,23	0,21	0,20	0,19	0,27	0,15	0,54	0,18	0,26	0,25	0,21	0,20	0,34	0,36	0,19	0,17	0,22
S 46	0,20	0,23	0,20	0,17	0,22	0,28	0,16	0,46	0,10	0,27	0,23	0,26	0,18	0,30	0,34	0,12	0,18	0,24
S 47	0,22	0,20	0,20	0,26	0,18	0,28	0,18	0,52	0,17	0,28	0,23	0,22	0,15	0,33	0,37	0,14	0,22	0,20
C 01	0,24	0,29	0,28	0,32	0,33	0,26	0,27	0,47	0,28	0,31	0,34	0,26	0,24	0,38	0,34	0,27	0,23	0,24
C 02	0,35	0,38	0,38	0,39	0,35	0,43	0,37	0,46	0,33	0,34	0,31	0,31	0,33	0,39	0,42	0,30	0,38	0,38
C 03	0,25	0,27	0,29	0,28	0,27	0,27	0,21	0,50	0,20	0,33	0,30	0,24	0,22	0,34	0,34	0,21	0,27	0,24

...continua...

QUADRO 1. Cont.

	S 38	S 39	S 40	S 41	S 42	S 43	S 44	S 45	S 46	S 47	C 01	C 02
S 39	0,19											
S 40	0,19	0,15										
S 41	0,23	0,15	0,19									
S 42	0,17	0,15	0,15	0,19								
S 43	0,21	0,17	0,19	0,24	0,17							
S 44	0,24	0,22	0,19	0,29	0,23	0,16						
S 45	0,22	0,17	0,10	0,23	0,14	0,12	0,19					
S 46	0,19	0,17	0,15	0,19	0,17	0,22	0,23	0,19				
S 47	0,15	0,17	0,15	0,23	0,12	0,19	0,26	0,17	0,19			
C 01	0,23	0,26	0,23	0,30	0,26	0,26	0,31	0,26	0,30	0,19		
C 02	0,37	0,35	0,39	0,40	0,39	0,35	0,29	0,37	0,35	0,33	0,38	
C 03	0,26	0,26	0,24	0,26	0,22	0,28	0,27	0,24	0,24	0,22	0,26	0,33

QUADRO 2 – Matriz de dissimilaridade genética obtida pelo coeficiente de Jaccard a partir dos dados moleculares de ISSR.

	S1	S2	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
S2	0,06																
S4	0,07	0,07															
S5	0,06	0,08	0,05														
S6	0,10	0,19	0,11	0,13													
S7	0,10	0,13	0,14	0,14	0,13												
S8	0,13	0,12	0,13	0,17	0,11	0,06											
S9	0,09	0,10	0,14	0,15	0,14	0,14	0,14										
S10	0,02	0,12	0,07	0,09	0,05	0,13	0,13	0,07									
S11	0,04	0,13	0,12	0,14	0,14	0,14	0,14	0,12	0,07								
S12	0,05	0,08	0,17	0,17	0,16	0,14	0,15	0,10	0,09	0,07							
S13	0,16	0,15	0,23	0,22	0,20	0,10	0,12	0,17	0,20	0,20	0,16						
S14	0,06	0,02	0,13	0,13	0,19	0,11	0,13	0,14	0,07	0,12	0,11	0,17					
S15	0,09	0,10	0,12	0,05	0,20	0,10	0,16	0,14	0,11	0,14	0,15	0,17	0,07				
S16	0,13	0,15	0,14	0,14	0,10	0,07	0,10	0,13	0,10	0,21	0,17	0,16	0,15	0,17			
S17	0,13	0,11	0,12	0,14	0,13	0,06	0,04	0,15	0,13	0,17	0,16	0,13	0,12	0,17	0,08		
S18	0,09	0,13	0,11	0,13	0,14	0,07	0,11	0,17	0,10	0,14	0,15	0,16	0,09	0,11	0,12	0,10	
S19	0,12	0,12	0,13	0,17	0,14	0,11	0,11	0,16	0,12	0,16	0,15	0,14	0,13	0,19	0,13	0,09	0,06
S20	0,10	0,17	0,15	0,22	0,18	0,15	0,15	0,21	0,09	0,18	0,17	0,21	0,12	0,22	0,15	0,14	0,13
S21	0,12	0,08	0,10	0,10	0,18	0,19	0,19	0,17	0,09	0,23	0,16	0,23	0,16	0,17	0,17	0,15	0,17
S22	0,15	0,18	0,19	0,18	0,20	0,13	0,16	0,19	0,16	0,22	0,18	0,21	0,18	0,18	0,13	0,17	0,16
S23	0,15	0,14	0,19	0,12	0,18	0,19	0,22	0,15	0,09	0,23	0,19	0,23	0,19	0,11	0,19	0,20	0,21
S24	0,11	0,17	0,15	0,14	0,20	0,09	0,14	0,19	0,16	0,17	0,18	0,20	0,14	0,13	0,15	0,15	0,10
S25	0,14	0,11	0,17	0,13	0,19	0,11	0,14	0,17	0,14	0,19	0,18	0,19	0,14	0,11	0,15	0,15	0,10
S26	0,15	0,15	0,20	0,21	0,19	0,09	0,10	0,18	0,16	0,16	0,16	0,12	0,16	0,18	0,13	0,10	0,12
S27	0,07	0,12	0,06	0,07	0,14	0,14	0,18	0,16	0,04	0,14	0,15	0,19	0,06	0,12	0,15	0,16	0,16
S28	0,17	0,12	0,14	0,16	0,23	0,13	0,17	0,17	0,15	0,20	0,16	0,16	0,11	0,14	0,17	0,15	0,14
S29	0,14	0,15	0,13	0,10	0,16	0,16	0,18	0,19	0,14	0,19	0,20	0,21	0,17	0,18	0,19	0,14	0,19

...continua...

QUADRO 2. Cont.

	S1	S2	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
S30	0,14	0,11	0,16	0,14	0,19	0,17	0,15	0,15	0,12	0,17	0,19	0,18	0,16	0,17	0,19	0,12	0,13
S31	0,11	0,10	0,10	0,07	0,19	0,14	0,18	0,16	0,11	0,19	0,20	0,22	0,12	0,10	0,16	0,17	0,13
S32	0,11	0,13	0,10	0,13	0,17	0,17	0,16	0,14	0,12	0,14	0,15	0,22	0,15	0,14	0,21	0,17	0,12
S33	0,12	0,14	0,14	0,08	0,16	0,14	0,15	0,13	0,12	0,13	0,14	0,21	0,16	0,12	0,17	0,16	0,13
S34	0,11	0,11	0,07	0,07	0,13	0,12	0,16	0,04	0,06	0,13	0,10	0,19	0,07	0,08	0,13	0,14	0,15
S35	0,12	0,10	0,16	0,12	0,16	0,16	0,14	0,09	0,11	0,13	0,13	0,18	0,14	0,13	0,16	0,14	0,18
S36	0,16	0,15	0,14	0,13	0,14	0,11	0,14	0,14	0,14	0,17	0,15	0,17	0,16	0,11	0,11	0,15	0,15
S37	0,14	0,17	0,14	0,15	0,16	0,13	0,15	0,16	0,12	0,16	0,12	0,21	0,16	0,19	0,13	0,14	0,16
S38	0,21	0,22	0,19	0,19	0,15	0,21	0,19	0,20	0,15	0,23	0,21	0,25	0,23	0,19	0,18	0,20	0,23
S39	0,19	0,16	0,15	0,14	0,18	0,19	0,19	0,18	0,19	0,23	0,19	0,21	0,22	0,21	0,16	0,16	0,18
S40	0,15	0,13	0,13	0,08	0,18	0,13	0,15	0,15	0,14	0,18	0,19	0,18	0,15	0,10	0,14	0,16	0,11
S41	0,17	0,13	0,15	0,16	0,16	0,20	0,20	0,16	0,11	0,24	0,17	0,24	0,17	0,20	0,15	0,16	0,19
S42	0,19	0,18	0,20	0,23	0,22	0,15	0,14	0,20	0,21	0,20	0,21	0,20	0,17	0,20	0,19	0,18	0,16
S43	0,11	0,07	0,17	0,19	0,17	0,17	0,14	0,13	0,14	0,13	0,10	0,14	0,16	0,14	0,19	0,14	0,19
S44	0,09	0,16	0,21	0,22	0,20	0,24	0,24	0,23	0,12	0,23	0,19	0,23	0,18	0,24	0,21	0,25	0,24
S45	0,02	0,10	0,19	0,18	0,18	0,16	0,13	0,11	0,09	0,13	0,10	0,19	0,17	0,18	0,12	0,13	0,13
S46	0,04	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,10	0,05	0,07	0,08	0,08	0,11	0,07	0,08	0,07	0,07	0,03
S47	0,15	0,20	0,17	0,21	0,19	0,19	0,21	0,13	0,14	0,21	0,20	0,25	0,17	0,18	0,16	0,22	0,17
C01	0,14	0,13	0,16	0,14	0,15	0,17	0,14	0,16	0,15	0,16	0,16	0,22	0,18	0,14	0,16	0,14	0,15
C02	0,02	0,05	0,07	0,08	0,10	0,08	0,11	0,14	0,07	0,11	0,09	0,15	0,08	0,08	0,11	0,08	0,06
C03	0,09	0,14	0,16	0,13	0,19	0,17	0,21	0,24	0,12	0,19	0,17	0,17	0,17	0,17	0,21	0,17	0,17
	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	S33	S34	S35	S36
S20																	
S21	0,16																
S22	0,18	0,17															
S23	0,26	0,12	0,19														
S24	0,17	0,21	0,06	0,25													
S25	0,20	0,17	0,10	0,17	0,09												

...continua...

QUADRO 1. Cont.

	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	S33	S34	S35	S36
S26	0,14	0,21	0,12	0,19	0,11	0,11											
S27	0,11	0,09	0,16	0,15	0,12	0,18	0,17										
S28	0,17	0,09	0,13	0,11	0,15	0,10	0,09	0,13									
S29	0,21	0,13	0,15	0,19	0,13	0,16	0,16	0,07	0,13								
S30	0,16	0,16	0,15	0,19	0,15	0,13	0,08	0,13	0,09	0,10							
S31	0,24	0,14	0,15	0,17	0,14	0,13	0,19	0,12	0,13	0,09	0,14						
S32	0,18	0,15	0,17	0,17	0,14	0,11	0,14	0,18	0,10	0,14	0,11	0,12					
S33	0,24	0,16	0,09	0,11	0,12	0,07	0,13	0,18	0,10	0,14	0,10	0,15	0,09				
S34	0,15	0,07	0,14	0,03	0,16	0,10	0,16	0,09	0,10	0,13	0,12	0,10	0,08	0,10			
S35	0,20	0,15	0,19	0,06	0,19	0,15	0,12	0,15	0,12	0,19	0,12	0,19	0,12	0,11	0,07		
S36	0,20	0,20	0,15	0,20	0,13	0,14	0,14	0,13	0,16	0,13	0,15	0,13	0,14	0,16	0,10	0,17	
S37	0,16	0,13	0,15	0,16	0,19	0,18	0,14	0,15	0,13	0,14	0,17	0,18	0,14	0,14	0,11	0,17	0,16
S38	0,20	0,16	0,18	0,12	0,23	0,19	0,18	0,15	0,16	0,19	0,19	0,22	0,19	0,17	0,13	0,11	0,16
S39	0,22	0,14	0,21	0,18	0,24	0,22	0,16	0,16	0,15	0,18	0,16	0,21	0,20	0,19	0,17	0,16	0,16
S40	0,22	0,19	0,14	0,16	0,15	0,15	0,15	0,15	0,14	0,17	0,17	0,12	0,13	0,12	0,10	0,13	0,13
S41	0,20	0,08	0,21	0,11	0,26	0,21	0,22	0,14	0,11	0,17	0,20	0,18	0,19	0,17	0,08	0,14	0,21
S42	0,18	0,25	0,16	0,27	0,15	0,12	0,12	0,23	0,18	0,23	0,13	0,21	0,17	0,18	0,20	0,19	0,17
S43	0,17	0,13	0,13	0,15	0,13	0,15	0,11	0,10	0,08	0,08	0,09	0,14	0,13	0,14	0,09	0,10	0,12
S44	0,16	0,21	0,19	0,26	0,20	0,25	0,17	0,09	0,19	0,19	0,18	0,22	0,20	0,24	0,16	0,21	0,20
S45	0,12	0,17	0,12	0,21	0,12	0,14	0,11	0,14	0,15	0,17	0,13	0,18	0,16	0,15	0,07	0,14	0,16
S46	0,12	0,09	0,07	0,08	0,04	0,03	0,07	0,14	0,10	0,08	0,02	0,07	0,07	0,05	0,05	0,07	0,08
S47	0,20	0,21	0,16	0,15	0,19	0,13	0,17	0,23	0,15	0,21	0,17	0,17	0,11	0,12	0,10	0,14	0,17
C01	0,23	0,17	0,13	0,12	0,13	0,13	0,13	0,19	0,14	0,15	0,16	0,17	0,12	0,09	0,10	0,08	0,14
C02	0,13	0,07	0,17	0,13	0,11	0,10	0,12	0,09	0,08	0,10	0,14	0,08	0,08	0,10	0,09	0,11	0,15
C03	0,20	0,15	0,26	0,22	0,20	0,22	0,20	0,09	0,15	0,12	0,21	0,19	0,20	0,20	0,16	0,19	0,21

...continua...

QUADRO 2. Cont.

	S37	S38	S39	S40	S41	S42	S43	S44	S45	S46	S47	C 01	C 02
S38	0,17												
S39	0,15	0,13											
S40	0,14	0,16	0,16										
S41	0,12	0,15	0,14	0,20									
S42	0,20	0,16	0,18	0,21	0,26								
S43	0,15	0,15	0,19	0,20	0,15	0,18							
S44	0,22	0,21	0,23	0,24	0,24	0,23	0,14						
S45	0,11	0,20	0,20	0,16	0,19	0,18	0,11	0,14					
S46	0,13	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,12	0,10				
S47	0,15	0,11	0,16	0,15	0,18	0,11	0,18	0,22	0,18	0,13			
C01	0,15	0,05	0,09	0,13	0,16	0,15	0,14	0,24	0,17	0,13	0,08		
C02	0,11	0,19	0,15	0,15	0,11	0,20	0,13	0,17	0,16	0,05	0,18	0,14	
C03	0,16	0,24	0,19	0,24	0,19	0,31	0,15	0,22	0,20	0,15	0,29	0,20	0,07