

**VALDIR MARCOS STEFENON**

**ADAPTAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A  
EXTRAÇÃO DE DNA E PARA MARCADORES  
MOLECULARES EM *Araucaria angustifolia***

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FLORIANÓPOLIS  
FEVEREIRO DE 2003

VALDIR MARCOS STEFENON

ADAPTAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A  
EXTRAÇÃO DE DNA E PARA MARCADORES  
MOLECULARES EM *Araucaria angustifolia*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Rubens Onofre Nodari

FLORIANÓPOLIS  
FEVEREIRO DE 2003

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	5
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	6
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	8
<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	13
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	15
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
4.1. Habitat e Características Botânicas da Araucária.....	16
4.2. Importância Econômica e Cultural da <i>A. angustifolia</i> .....	17
4.3. Marcadores Moleculares na Análise da Diversidade Genética de <i>A. angustifolia</i> .....	18
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
5.1. Extração de DNA total de Acículas de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	21
5.2. Otimização do Protocolo para Marcadores RAPD.....	22
5.3. Adaptação do Protocolo para Marcadores AFLP.....	24
5.4. Transferibilidade de Marcadores Microssatélites.....	25
5.5. Análise da Diversidade Genética de uma População Natural.....	26
<b>6. RESULTADOS</b> .....	29
6.1. Extração de DNA total de Acículas de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	29
6.2. Otimização do Protocolo para Marcadores RAPD.....	30
6.3. Adaptação do Protocolo para Marcadores AFLP.....	37
6.4. Transferibilidade de Marcadores Microssatélites.....	44
6.5. Análise da Diversidade Genética de uma População Natural.....	46
6.5.1. Análise da Diversidade Genética a partir de Marcadores RAPD.....	46
6.5.2. Análise da Diversidade Genética a partir de Marcadores AFLP.....	49

6.5.3. Análise da Diversidade Genética a partir de Marcadores RAPD e AFLP agrupados.....	52
6.5.4. Comparação do índice de Diversidade Genética obtido a partir de Marcadores RAPD, AFLP, isoenzimas e PCR-RFLP.....	55
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>74</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>81</b>

## AGRADECIMENTOS

À minha esposa e filho, que suportaram toda a falta de tempo e dedicação.

A meus pais, pelo exemplo de vida e dignidade e pelo constante apoio.

Aos amigos e familiares que de uma maneira ou outra me apoiaram.

Ao professor Rubens Nodari, orientador e amigo, pela paciência e ensinamentos dispensados.

Aos professores dos programas de Pós-graduação em Biotecnologia e de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela amizade e conhecimentos transmitidos, em especial aos professores Maurício, Guerra e Aparecido.

Aos colegas do LFDGV e do curso, pela amizade, colaboração e ensinamentos.

A Deus, pela vida e pelo mundo.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Amostras de DNA extraídas a partir de acículas de *A. angustifolia* coletadas 24 horas antes da extração e acondicionadas em sílica gel..... 35
- Figura 2:** Amplificação de marcadores RAPD em indivíduos da população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages, utilizando o iniciador OPA17, com diferentes concentrações de DNA..... 35
- Figura 3:** Polimorfismo revelado em marcadores RAPD em *A. angustifolia*, entre indivíduos da população do Parque Ecológico Municipal de Lages, utilizando o iniciador OPAN08 e diferentes ciclos de PCR..... 35
- Figura 4:** Polimorfismo revelado em marcadores RAPD em *A. angustifolia*, entre indivíduos das populações do Parque Ecológico Municipal de Lages e do Parque de Campos de Jordão, utilizando o iniciador OPF08..... 35
- Figura 5:** Polimorfismo revelado em marcadores RAPD em *A. angustifolia*, entre os trinta indivíduos da população do Parque Ecológico Municipal de Lages, utilizando o iniciador OPA04..... 36
- Figura 6:** Número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem de bandas polimórficas para iniciadores RAPD testados para *A. angustifolia* para a população natural do Parque Ecológico Municipal de Lages..... 36
- Figura 7:** Teste para volume de reação e tempo para digestão do DNA para reações AFLP em indivíduos de *A. angustifolia* das populações do Parque Ecológico Municipal de Lages (n=2) e do Parque de Campos de Jordão (n=1)..... 38
- Figura 8:** Concentrações de iniciadores *EcoRI* (0,7, 0,25 e 0,1 ng/μL) em reações AFLP para indivíduos de *A. angustifolia* das populações do Parque Ecológico Municipal de Lages e do Parque de Campos de Jordão..... 38
- Figura 9:** Número total de bandas amplificadas, número de bandas polimórficas e porcentagem de bandas polimórficas para combinações de iniciadores AFLP testados para *A. angustifolia*..... 40-41
- Figura 10:** Número e porcentagem de combinações de iniciadores AFLP, segundo a classificação proposta..... 42
- Figura 11:** Padrão de bandas amplificadas em indivíduos da população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages, utilizando o iniciador cpDNA4..... 45
- Figura 12:** Padrão de bandas amplificadas em indivíduos da população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages, utilizando o iniciador cpDNA5..... 45
- Figura 13:** Dendograma de similaridade genética entre indivíduos, estimado pelo índice de Jaccard para a população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages, estimado com 18 marcadores RAPD..... 48

**Figura 14:** Dendograma de similaridade genética entre indivíduos, estimado pelo índice de Jaccard para a população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages, estimado com 62 marcadores AFLP..... 51

**Figura 15:** Dendograma de similaridade genética entre indivíduos, estimado pelo índice de Jaccard para a população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages, estimado com 18 marcadores RAPD e 62 marcadores AFLP agrupados..... 54

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Coquetel para reações RAPD para *A. angustifolia* para a população natural do Parque Ecológico Municipal de Lages.....31
- Tabela 2:** Programas de PCR testados para as reações de RAPD, utilizando uma única temperatura para anelamento dos iniciadores para a população natural de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages.....33
- Tabela 3:** Programas de PCR testados para as reações de RAPD, utilizando duas temperaturas para anelamento dos iniciadores para a população natural de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages.....33
- Tabela 4:** Iniciadores utilizados para reações RAPD polimórficos para a população natural de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages.....34
- Tabela 5:** Número total de bandas geradas, número de bandas polimórficas e classificação das combinações de iniciadores para reações AFLP em *A. angustifolia* da população natural do Parque Ecológico Municipal de Lages.....39
- Tabela 6:** Programa de amplificação PCR para os iniciadores cpDNA4 e cpDNA5, otimizado para o genoma de *A. angustifolia* da população natural do Parque Ecológico Municipal de Lages.....43
- Tabela 7:** Comparação entre as categorias taxonômicas de espécies utilizadas na transferência de iniciadores microssatélites no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e de Genética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.....44
- Tabela 8:** Iniciadores utilizados nas reações RAPD e respectivos índices de diversidade genética para a população natural de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages.....46
- Tabela 9:** Agrupamento e nível de similaridade dentro de cada grupo e entre grupos, determinado pelo índice de similaridade de Jaccard, para as trinta plantas da população natural do PEM de Lages, analisadas com marcadores RAPD.....47
- Tabela 10:** Combinações de iniciadores utilizados nas reações AFLP e respectivos índices de diversidade genética para a população natural de *A. angustifolia* do PEM de Lages.....49
- Tabela 11:** Agrupamento e nível de similaridade dentro de cada grupo e entre grupos, determinado pelo índice de similaridade de Jaccard, para as trinta plantas da população natural do PEM de Lages, analisadas com marcadores AFLP.....50
- Tabela 12:** Iniciadores utilizados nas reações AFLP e RAPD e respectivos índices de diversidade genética para a população natural de *A. angustifolia* do PEM de Lages.....52



**Tabela 13:** Agrupamento e nível de similaridade dentro de cada grupo e entre grupos, determinado pelo índice de similaridade de Jaccard, para as trinta plantas da população natural do PEM de Lages, analisadas com marcadores AFLP.....53

**Tabela 14:** Comparação do índice de diversidade genética de Shannon, estimado para plantas de *A. angustifolia* da população natural do Parque Ecológico Municipal de Lages, utilizando marcadores RAPD, AFLP e isoenzimas.....55

## RESUMO

O presente trabalho apresenta os resultados referentes à otimização de um protocolo para a extração de DNA a partir de acículas de plantas adultas de *Araucaria angustifolia* e critérios para o armazenamento e conservação do material vegetal, além da otimização e adaptação de protocolos para as técnicas RAPD e AFLP, bem como o teste de transferibilidade de iniciadores para marcadores microssatélites de *Pinus sp* para *A. angustifolia*. A capacidade informativa destes marcadores para análise da diversidade genética de *A. angustifolia* foi testada em uma população natural do Parque Ecológico Municipal de Lages/SC, a qual já havia sido estudada com marcadores isoenzimáticos e RFLP-PCR. Observou-se que o acondicionamento e armazenamento das acículas é um fator crucial para a qualidade do DNA extraído. A quantidade de DNA obtido nas extrações variou entre 66 a 400 µg por grama de tecido, com um valor médio de 147,3 µg para os materiais acondicionados em sílica gel. Materiais acondicionados em caixas térmicas com gelo resultaram em DNA com qualidade inferior, com uma média de 137,3 µg. Materiais armazenados por até três meses a – 20°C resultaram em menor quantidade de DNA, com qualidade inferior. O protocolo otimizado resultou em DNA com baixa contaminação por proteínas, com razão OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> entre 1,7 e 2,0 em 80% das amostras analisadas. Com o protocolo otimizado para a técnica RAPD, 10% dos iniciadores utilizados revelaram polimorfismo quando testados em indivíduos de duas populações, todavia, apenas 7,5% revelaram polimorfismo quando somente a população de Lages foi analisada. Os seis iniciadores utilizados revelaram 18 bandas polimórficas. O protocolo adaptado para a técnica AFLP possibilitou um número variável de bandas polimórficas, entre nenhuma e 29 bandas, dependendo da combinação de iniciadores utilizada. Dentre 29 iniciadores para marcadores microssatélites testados, somente dois geraram produtos amplificados em *A. angustifolia*, sem, no entanto serem utilizados para a análise da diversidade genética da população, devido à característica das bandas. A análise da diversidade genética da população foi realizada a partir de 18 marcadores RAPD, 62 marcadores AFLP e com os 80 marcadores agrupados. A diversidade genética estimada pelo índice de Shannon foi de 0,53, 0,54 e 0,54, respectivamente. Os dendogramas de similaridade genética gerados também apresentaram grande coerência entre as três situações testadas. O nível de diversidade genética estimado com esses marcadores foi superior àquele obtido com marcadores isoenzimáticos e RFLP-PCR utilizados anteriormente por outros pesquisadores. Os resultados obtidos neste trabalho levam à conclusão que o armazenamento das folhas e o processo de extração do DNA são cruciais para o sucesso de estudos utilizando marcadores baseados na análise direta do DNA e confirmam a hipótese de que marcadores RAPD e AFLP são poderosas ferramentas para estudos genéticos em *A. angustifolia*, devido à sua capacidade de acessar aleatoriamente, amplas regiões genômicas. Já o baixo nível de transferibilidade de iniciadores microssatélites deve-se, provavelmente, à grande distância taxonômica entre as espécies utilizadas no estudo, caracterizando a necessidade do desenvolvimento de iniciadores para regiões microssatélites específicos para *A. angustifolia*.

## ABSTRACT

This work displays the outcomes concerning the DNA extraction protocol optimization from *Araucaria angustifolia* leaves, and the storage and conservation rules of plant material, besides the optimization and adaptation protocols for the RAPD and AFLP techniques, as well as the conveyance capability test of microsatellite marker primers from *Pinus* sp to *A. angustifolia*. These markers informative capability for the *A. angustifolia* genetic diversity analysis was tested in a natural population of the Municipal Ecological Park of Lages/SC, which had been studied with isozyme and PCR-RFLP markers. The leaves storage and conditioning was identified as a crucial factor for the extracted DNA quality. The achieved DNA amount from the extractions varied between 66 to 400 µg per tissue gram, with an average value of 147,3 µg for the silica gel conditioned materials. Conditioned materials in boxes with ice brought lower DNA quality, with an average value of 137,3 µg. Three-month stored materials at -20°C resulted in a lower amount of DNA and quality. The optimized protocol caused DNA with low protein contamination with an  $OD_{260}/OD_{280}$  rate between 1.7 and 2.0 in 80% of the analyzed samples. Because of the protocol optimization for the RAPD technique, 10% of the used primers displayed polymorphism when tested in individuals from two populations. Nevertheless, only 75% unfolded polymorphism when the Lages population was analyzed. The six used primers showed 18 polymorphic bands. The AFLP technique adapted protocol generated a variable number of polymorphic bands, between none and 29 bands, depending on the used primers combination. Among 29 primers for the microsatellite tested, only two originated *A. angustifolia* broadened products, notwithstanding, without being used for the population genetic diversity analysis due to the bands features. The population genetic diversity analysis was carried out from 18 RAPD markers, 62 AFLP makers and the 80 clustered markers. The Shannon index estimated genetic diversity was 0.53, 0.54 e 0.54, respectively. The genetic similarity generated dendograms showed, moreover, great coherence among the three tested circumstances. The genetic diversity level estimated through these markers was higher than the one obtained from PCR-RFLP (Shannon index  $H=0$ ) and isozyme markers (Shannon index  $H=0,29$ ) used by other researchers. The achieved outcomes from this work lead to the conclusion that the leaves storage and extraction process are vital for the successful studies using DNA direct analysis based markers and confirm the hypothesis that the RAPD and AFLP are powerful tools for the *A. angustifolia* genetic studies, due to its capability to randomly access broad genomic regions. Yet, the low conveyance capability level of microsatellite primers is likely due to the great taxonomic gap among the species studied, featuring the markers development need for the *A. angustifolia* specific microsatellite regions.

## 1. INTRODUÇÃO

A Floresta Ombrófila Mista ou Floresta de Araucária (Guerra et al., 2002) é uma importante formação vegetal componente da Mata Atlântica, no Sul do Brasil. Nesta formação vegetal, a *Araucaria angustifolia* é a principal espécie vegetal encontrada, dominando o estrato superior da mata e consorciada com diversas espécies vegetais, como *Ocotea porosa* (imbuia), *Ilex paraguariensis* (erva-mate), *Nectandra lanceolata* (canela-lageana) e *Ocotea pretiosa* (canela-sassafrás) (Klein, 1978).

Originalmente com ampla distribuição nos três Estados da Região Sul do país, a Floresta de Araucária foi gradativamente cedendo lugar aos campos, reflorestamentos com espécies exóticas e lavouras diversas. Atualmente, estima-se entre 2 e 4% o remanescente da área original (Guerra et al., 2002), distribuída de forma fragmentada e isolada.

Um dos principais fatores causadores do desaparecimento da *A. angustifolia* de seu habitat natural é seu alto valor econômico, explorado por diversas indústrias madeireiras e papelerias. Em função desta exploração, pode-se prever que houve redução da diversidade genética original dessa espécie. Porém, pouco se conhece sobre o quanto dessa diversidade ainda existe.

O conhecimento existente sobre a diversidade genética atual dos remanescentes de araucária é proveniente de estudos desenvolvidos com marcadores morfológicos e isoenzimáticos. Além de escassos, esses estudos apresentam limitações inerentes às técnicas utilizadas, como a interferência ambiental nos marcadores morfológicos e o baixo número de locos acessados pelas isoenzimas.

Ferramentas que permitem a análise direta da molécula de DNA, acessando de maneira aleatória uma ampla região genômica, foram desenvolvidas nas últimas duas décadas, sem, no entanto terem sido empregadas de maneira efetiva para estudos genéticos desta importante espécie florestal.

O presente trabalho apresenta a otimização de protocolos para extração de DNA, para marcadores moleculares RAPD e AFLP e resultados referentes ao teste de transferibilidade de iniciadores para marcadores microsatélites de *Pinus* spp para *Araucaria angustifolia*, além de uma comparação da capacidade informativa entre estes marcadores e a técnica de análise de isoenzimas.

## 2. JUSTIFICATIVA

Classificada como vulnerável na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção, pela Portaria 37-N/92 (IBAMA, 2002), a *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. deve esta condição à exploração desordenada promovida desde o final do século XIX e à expansão de fronteiras agrícolas no Sul do Brasil. A principal causa dessa exploração é o alto valor de sua madeira, devido à qualidade para a fabricação de móveis e construção civil, além de suas fibras, que apresentam excelente qualidade para a produção de papel e celulose.

Na década de 1970, a Floresta de Araucária do Sul do Brasil (Floresta Ombrófila Mista) foi considerada a região mais importante para a economia florestal e madeireira do país. A araucária correspondia, na época, a 90% de cerca de um milhão de m<sup>3</sup> de madeira exportada pelo país (Hueck, 1972). Essa exploração, mais intensa no período de 1950 a 1970, causou grande perda de parte da diversidade genética nas populações naturais de araucária, reduzidas a fragmentos de tamanhos variáveis.

Para a espécie humana, a árvore é considerada símbolo das regiões em que é encontrada, sendo motivo de inspiração para festas, músicas, poesias e lendas.

Além do valor econômico e cultural, a araucária tem uma importante função ecológica na Floresta Ombrófila Mista, sendo responsável pela produção de alimento para diversos mamíferos e aves, como bugios, cutias, gralhas e papagaios (Reitz e Klein, 1966) e criando ambientes propícios ao desenvolvimento de dezenas de espécies vegetais em seu caule e galhos e na região sombreada por sua copa (Mattos, 1994).

A acentuada fragmentação dessas populações provoca alterações na dinâmica de sua regeneração e reprodução, além da erosão da variação genética e aumento da divergência genética entre populações através da deriva genética, endogamia e redução do fluxo gênico (Shimizu et al., 2000; Auler et al., 2002). O aumento da endogamia e da deriva genética pode ainda gerar fragilidade nas novas gerações, por promover o aparecimento de genes deletérios.

Apesar de certas procedências serem capazes de apresentar um incremento médio anual superior a 20 m<sup>3</sup>/ha/ano (Guerra et al., 2002), as poucas tentativas de reflorestamento promovidas com *A. angustifolia* têm apresentado resultados pouco atrativos no que diz respeito ao seu crescimento e um dos fatores limitantes pode ser o pouco conhecimento relacionado à genética dos ecótipos específicos de cada região geográfica (Guerra e Reis, 1998; Hampp et al., 2000).

Em função de sua importância e pelo alto grau de degradação das matas de araucária, o desenvolvimento de técnicas de estudos da diversidade genética de *A. angustifolia* é de grande relevância, pois pode auxiliar significativamente em dois grandes programas: (i) de conservação, que envolve a preservação, recuperação e manejo dessas matas e (ii) de melhoramento genético, que envolve a seleção de combinações alélicas adaptadas aos diversos ambientes para fins de reflorestamento. Contudo, é crucial que essas técnicas permitam o acesso à diversidade genética das populações de araucária, de forma rápida e eficiente.

Os estudos existentes sobre a diversidade genética de populações naturais de araucária no Brasil têm sido realizados basicamente a partir de marcadores morfológicos (Reitz e Klein, 1966), em testes de procedência e progênie (Shimizu e Higas, 1980, Kageyama e Jacob, 1980, Monteiro e Spelz, 1980; Fahler e DiLucca, 1980) e com marcadores isoenzimáticos (Shimizu et al., 2000; Auler et al., 2002; Mantovani et al., 2002).

Os avanços da biologia molecular permitem a identificação de marcadores em diferentes partes de regiões genômicas, através da análise direta da molécula de DNA. Seu uso pode possibilitar em um curto espaço de tempo a avaliação da diversidade genética de populações naturais, notadamente aquela de valor não adaptativo.

Neste sentido, a definição de um protocolo rápido para a extração do DNA a partir de folhas e a padronização de técnicas RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites para araucária são extremamente importantes para que se possa desencadear os programas anteriormente citados, de conservação e melhoramento genético da espécie. A combinação de marcadores morfológicos com a análise direta do DNA permite uma melhor compreensão da organização da diversidade genética e conseqüentemente contribui para a estruturação de estratégias de manutenção de áreas naturais com indivíduos mais produtivos economicamente ou que apresentem quaisquer outras características de interesse.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL:

Adaptar e otimizar protocolos de marcadores moleculares e avaliar comparativamente a eficiência informativa destes na análise da diversidade genética de uma população de *Araucaria angustifolia*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Definir um protocolo para a extração de DNA total a partir de folhas, obtendo um material de alta qualidade.
- Otimizar um protocolo da técnica RAPD.
- Adaptar um protocolo da técnica AFLP.
- Testar a transferibilidade de iniciadores para a amplificação de seqüências microssatélites de *Pinus* sp para *Araucaria angustifolia*.
- Realizar uma comparação relativa dos índices de diversidade dos marcadores isoenzimáticos, RAPD, AFLP e microssatélites em uma população natural de *Araucaria angustifolia*.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. HABITAT E CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DA ARAUCÁRIA

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, é a única espécie nativa representante da Família *Araucariaceae* no Brasil (Marchiori, 1996; Guerra e Reis, 1998). O gênero *Araucaria*, por sua vez, é composto por dezenove espécies, exclusivas do hemisfério Sul, sendo duas espécies oriundas da América do Sul e as demais, da região Sudoeste do Pacífico (Nikles, 1980).

Popularmente conhecida como pinheiro-brasileiro, pinheiro-do-paraná ou simplesmente araucária, essa espécie é encontrada em uma vasta área no planalto sul-brasileiro, em regiões acima de 500 m entre 18 e 30° de latitude Sul, com predominância nos Estados do Sul do Brasil e alguns pontos descontínuos no Sudeste, além de pequenas manchas existentes na Argentina, (extremo nordeste) e no leste do Paraguai. No Brasil, sua área original de cerca de 20 milhões de hectares, distribuía-se em seis Estados, da seguinte forma: 40% no Paraná, 31% em Santa Catarina, 25% no Rio Grande do Sul, 3% no sul de São Paulo, e 1% em áreas elevadas no sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro (Reitz e Klein, 1966; Hueck, 1972; Reitz et al., 1979; Mattos, 1994).

Nos Estados da região Sul, onde mais se adensam os pinhais, o clima predominante varia do sub-tropical ao temperado, com temperaturas médias de 20°C a 21°C no verão e 10°C a 11°C no inverno e precipitação média entre 1500 e 1750 mm anuais, com variações extremas entre 1300 e 3000 mm anuais (Reitz e Klein, 1966).

Quando vistas ao longe, as florestas de araucária apresentam uma aparência homogênea, contudo, as mesmas são extremamente heterogêneas em virtude de suas sub-matas, podendo ser classificadas em duas sub-formações vegetais: a Floresta dos Pinhais, onde prevalecem os pinheiros de grande porte com sub-matas densas bem desenvolvidas e a Floresta dos Faxinais, que apresenta pinheiros de menor porte e esparsos, com sub-mata baixa e pouco densa (Klein, 1978).

A árvore jovem de pinheiro brasileiro apresenta copa cônica, com ramos primários cilíndricos, curvos para cima, os inferiores maiores que os superiores. Árvores adultas apresentam a copa em forma de taça, com tronco geralmente cilíndrico e reto, raramente ramificado, coberto por casca grossa e resinosa, com espessura de até 15 cm. A árvore adulta pode atingir de 30 a 50 metros de altura e de 150 a 250 centímetros de diâmetro na altura do peito (DAP) (Reitz e Klein, 1966; Reitz et al., 1979).



As folhas verticiladas, encontradas concentradas na porção terminal dos galhos, medem cerca de 15-80 mm de comprimento e 6-35 mm de largura, possuem numerosas nervuras finas estendendo-se da base ao ápice, sem nervura central (Reitz e Klein, 1966; Goldberg e Smith, 1975).

A *Araucaria angustifolia* apresenta-se com árvores dióicas, porém, exemplares monóicos ocorrem raramente, com produção alternada anualmente de cones masculinos e femininos; plantas masculinas que passam a produzir cones femininos ou a produção, na mesma árvore, de cones masculinos e femininos (Reitz e Klein, 1966).

Os estróbilos masculinos coniformes, axilares ou terminais, medem de 50 a 100 mm de comprimento e 13 a 19 mm de largura, com escamas formadas por várias anteras pendentes. Os cones femininos são formados por até 200 escamas, com um óvulo por escama. Essas escamas, quando maduras (o pinhão) se desprendem do cone, com exceção ocorrendo para a variedade *indehiscens* (Reitz e Klein, 1966; Goldberg e Smith, 1975).

#### **4.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E CULTURAL DA *A. angustifolia***

Além da indiscutível importância ecológica da *A. angustifolia*, esta espécie apresenta uma crucial contribuição para os aspectos econômico e cultural nas regiões de sua ocorrência.

Sua madeira possui alto valor comercial tanto no mercado interno, quanto para exportação. Estima-se em 15 milhões de m<sup>3</sup> a quantidade de madeira de araucária exportada entre os anos de 1958 e 1987 (Guerra et al., 2002). Durante o Ciclo da Madeira na região Sul do Brasil, as toras da araucária eram comercializadas objetivando principalmente, à obtenção de madeira para tabuados, vigamentos, pranchões, caixas, móveis, cabos de vassouras e ferramentas, palitos de dentes e de fósforos, fabricação de compensados, caixas de ressonância para pianos, tacos de nós, mourões e telhas de tabuinhas (Guerra et al., 2002).

Segundo Guerra et al. (2002), a alta qualidade de suas fibras longas levou à utilização da araucária para fabricação de pasta mecânica, celulose e papel, além de matéria plástica, lã e seda artificial.

A resina exsudada pela casca das árvores de araucária era utilizada na fabricação de vernizes, terebentina e outros produtos químicos (Guerra et al., 2002), além das propriedades medicinais atribuídas a esse produto, utilizado ainda hoje, no tratamento de reumatismo. Também as folhas jovens são utilizadas para a produção artesanal de xarope para o combate de bronquites.

O comércio do pinhão nas margens de rodovias ou nos mercados é também uma importante fonte de renda para a população de regiões onde os remanescentes de araucária persistem (Guerra et al., 2002).

Além de alimentar representantes da fauna local, o pinhão é muito apreciado na culinária regional. No município de Lages, estado de Santa Catarina, desde 1988 realiza-se anualmente a Festa Nacional do Pinhão, tendo como principais atrativos as apresentações culturais e os diversos pratos preparados com pinhão.

#### **4.3. MARCADORES MOLECULARES NA ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *A. angustifolia***

Uma característica capaz de detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos ou organismos pode ser considerada um marcador genético, desde que seja transmitida pelos pais para as progênes e que permita a análise de similaridades e diferenças entre indivíduos. Assim, podemos considerar como marcador genético, toda característica fenotípica proveniente da expressão de um gene (marcadores morfológicos e isoenzimáticos) ou qualquer segmento de DNA expresso ou não (marcadores moleculares ou de DNA).

Apesar de apresentarem resultados que possibilitam a análise da diversidade e a vantagem de indicar o valor adaptativo dos genótipos em um determinado ambiente, características morfológicas são em geral altamente influenciadas por fatores ambientais, além de suscetíveis à pleiotropia e controle por vários genes simultaneamente. Outro fator limitante desses marcadores é que, em alguns casos, somente podem ser avaliados na planta após vários anos de seu desenvolvimento em campo (Alfenas et al., 1991; Shimizu et al., 2000).

Os marcadores isoenzimáticos são uma importante ferramenta para os estudos genéticos, obtidos através de uma técnica simples, acessível e de custo relativamente baixo. Essa técnica permite análises diretas pela identificação das bandas em um gel. Contudo, esses marcadores permitem acessar somente uma baixa parcela do genoma, identificando um pequeno número de locos e um baixo número de alelos por loco (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Dessa forma, a utilização de marcadores genéticos baseados na análise direta do DNA é indicada para complementar ou substituir estudos desenvolvidos com marcadores morfológicos e isoenzimáticos. Alterações da molécula de DNA podem ser detectadas

através de técnicas que identifiquem variação no comprimento ou a presença/ausência dos fragmentos de DNA revelados em um gel.

Marcadores moleculares baseados na análise direta da molécula de DNA surgiram com a utilização da técnica RFLP ou polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição por Botstein et al. (1980). Esta técnica consiste na clivagem da molécula de DNA com enzimas de restrição e análise do padrão de bandas formado após eletroforese, hibridação com sondas radioativas e autoradiografia em filme de raios-X. Essa técnica gera dados altamente consistentes, porém é bastante trabalhosa e exige a utilização de grande quantidade de DNA altamente purificado. Com o desenvolvimento da técnica de amplificação de segmentos de DNA, pela reação em cadeia da polimerase ou PCR (Mullis et al., 1986), um novo horizonte se abriu para o desenvolvimento de marcadores moleculares, partindo-se de pequena quantidade de material e sem a necessidade de DNA altamente purificado. Neste método *in vitro*, a síntese de ácido nucléico possibilita a replicação de um segmento específico de DNA, com alta especificidade (Mullis e Faloona, 1987).

A partir da técnica de PCR, foram desenvolvidos, entre outros, marcadores moleculares baseados na amplificação de seqüências microssatélites (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989), marcadores baseados no polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Williams et al., 1990; Welsh e McClelland, 1990) e marcadores baseados no polimorfismo de fragmentos amplificados (Vos et al., 1995).

Estudos relacionados à diversidade genética de *A. angustifolia* começaram a ser desenvolvidos na década de 1970, em função da importância econômica e ecológica desta espécie e à forte pressão extrativista, exercida principalmente pelas indústrias madeireiras.

Marcadores morfológicos foram utilizados em testes de procedência e progênie, para a caracterização do desenvolvimento de plantas de araucária, relacionando as condições edafoclimáticas e geográficas das regiões de origem das sementes e de germinação e crescimento das mesmas, buscando a caracterização de ecótipos específicos para esta espécie (Shimizu e Higas, 1980, Kageyama e Jacob, 1980, Monteiro e Spelz, 1980; Fahler e DiLucca, 1980). Todavia, apesar da importância prática dos dados gerados por estes trabalhos, esse tipo de estudo é demasiadamente demorado, tornando-se difícil a análise da diversidade genética de muitas populações naturais de araucária.

Marcadores isoenzimáticos têm sido o principal recurso gerador de informações a respeito da diversidade genética em populações naturais de *A. angustifolia*. Essa técnica tem permitido caracterizar desde populações que não se encontram em equilíbrio de

panmixia, mas apresentam alto número de locos polimórficos (Shimizu et al., 2000) a populações naturais em total equilíbrio de panmixia (Mantovani et al., 2002), além de diferenças nos índices de diversidade, relacionadas ao estado de conservação dos fragmentos estudados (Auler et al., 2002).

Mesmo com o advento das técnicas de análise direta do DNA, poucos trabalhos de análise da diversidade genética em populações naturais de araucária têm registrado a utilização destes marcadores. Pode-se citar a utilização de marcadores RAPD (Mazza, 1997), marcadores PCR-RFLP (Schlögl, 2000) e uma tentativa de caracterização de marcadores microssatélites (Hampp et al., 2000).

A vantagem da utilização de marcadores moleculares na análise da diversidade genética em populações de *A. angustifolia* está relacionada com a capacidade destes marcadores em acessar uma maior diversidade, devido à cobertura de uma ampla região genômica, que inclui segmentos não codificantes de DNA, os quais não são acessados com marcadores morfológicos ou isoenzimáticos. Como as seqüências de DNA não codificadoras não sofrem pressão direta de forças evolutivas como a seleção natural, os marcadores baseados nessas regiões podem ser considerados praticamente neutros. Além disso, marcadores moleculares são identificados em grande quantidade e de forma extremamente rápida, quando comparados a marcadores morfológicos e isoenzimáticos. Esses dois aspectos são uma importante vantagem para trabalhos que envolvem um grande número de indivíduos a serem analisados, como estudos de diversidade genética.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE FOLHAS DE *Araucaria angustifolia*

MATERIAL VEGETAL – folhas de plantas adultas de populações naturais do Parque de Campos do Jordão - Instituto Florestal do Estado de São Paulo (100 amostras) e do Parque Ecológico Municipal João J. T. C. Neto – Prefeitura do Município de Lages/SC (30 amostras) foram coletadas, acondicionadas em sílica gel ou em caixas térmicas com gelo e transportadas até o laboratório. Parte das amostras foi mantida a  $-20^{\circ}$  C por um período de uma semana a três meses, até o momento da extração. Outra parte do material foi submetida à extração imediatamente após a chegada ao laboratório.

EXTRAÇÃO DO DNA – Os protocolos descritos por Murray e Thompson (1980), Hattori et al. (1987), Rogers e Bendich (1988), Doyle e Doyle (1990), Cheng et al. (1997), Ferreira e Gratappaglia (1998) e Romano e Brasileiro (1999) foram testados (com exceção das etapas de centrifugação em gradiente de cloreto de cézio e cromatografia citada em alguns protocolos) e, posteriormente, um protocolo padrão foi definido e otimizado para a extração de DNA a partir de folhas de plantas adultas de *A. angustifolia*. Para a definição do protocolo de extração, foram testadas: concentrações de 0, 1 e 2% de PVP (polivinilpirrolidona); a utilização de PVP ou PVPP (polivinilpolipirrolidona); 1, 2 ou 3 lavagens com CIA (clorofórmio:álcool isoamílico - 24:1); lavagem com solução CTAB 10% (CTAB 10%; NaCl 1,4 M); lavagem com solução de NaCl 1 M; tratamento com RNase nos passos iniciais da extração ou na etapa de diluição do DNA em tampão TE (tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM); e utilização de material desidratado sob vácuo em sílica gel.

QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE DO DNA - O DNA extraído foi resolvido em eletroforese com gel de agarose 0,8% (Gibco) corado com solução de 0,02% de brometo de etídeo (Sigma), visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (Sigma T2202), conforme descrito por Sambrook et al. (1989) e fotografado com filme *polaroid* preto e branco. A quantidade de DNA obtido para cada amostra foi estimada pela comparação com DNA de fago Lambda (Pharmacia) com concentrações conhecidas de 20, 50, 100 e 200 ng/ $\mu$ L. A leitura em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1200) em 260 e 280

nm foi realizada para determinar a pureza das amostras frente à contaminação por proteínas, através da relação  $OD_{260}/OD_{280}$ .

**PROTOCOLO DEFINIDO PARA A EXTRAÇÃO DE DNA DE FOLHAS DE *A. angustifolia*** – 0,15 g de folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas em gral de porcelana, até obter um pó fino. Imediatamente, acrescentou-se 1,5 mL de tampão de extração [CTAB 2% (Gibco BRL); NaCl 1,5 M (Vetec); EDTA 20 mM (Synth); Tris-Cl pH 8,0 100 mM (Sigma); PVP 2% (Sigma); 2-mercaptoetanol 1% (Sigma)] a 60°C. O material foi dividido em 2 tubos *ependorf* de 2 mL e mantido em banho-maria (60°C) por 40 a 60 min, invertendo-se a cada 15 min. para homogeneizar. Depois de decorrido o tempo, os tubos foram deixados sobre a bancada para esfriar e acrescentou-se 600 µL de CIA [clorofórmio (Nuclear):álcool isoamílico (Nuclear) 24:1], homogeneizando o material por inversão, durante 3 min. Após este procedimento, centrifugou-se os tubos a 13.000 RPM por 5 min. e o sobrenadante foi transferido para 2 novos tubos *ependorf* de 2 mL. Acrescentou-se 5 µL de RNase A, com concentração de 10 µg/mL (Sigma), seguido de homogeneização. Após essa etapa, o material foi mantido na estufa a 34°C por 40 min. Acrescentou-se então 600 µL de CIA, homogeneizando por 3 min. e centrifugando a 13.000 RPM por 5 min. O sobrenadante foi transferido para dois tubos *ependorf* de 1,5 mL, acrescentando 50 µL de solução de CTAB 10% [CTAB 10% (Gibco BRL); NaCl 1,4 M (Vetec)] a 60°C. Após a homogeneização, adicionou-se 600 µL de CIA, invertendo por 3 minutos e centrifugando a 13.000 RPM por 5 min. Transferiu-se o sobrenadante para 2 novos tubos *ependorf* de 1,5 mL, adicionando 2/3 do volume de isopropanol (Nuclear) – 20°C. O material foi deixado em freezer a –20°C por 30 min. e posteriormente centrifugado a 7.000 RPM por 5 min. Após descartar o sobrenadante, acrescentou-se 1 mL de etanol 95% (Nuclear) ao precipitado, que foi mantido a –20°C por 10 min. O material foi centrifugado a 8.000 RPM por 5 min. e o sobrenadante foi descartado, deixando o precipitado secar a temperatura ambiente. Ao DNA, adicionou-se 100 µL de TE [Tris-Cl 10 mM, pH 8,0 (Sigma); EDTA 1 mM (Synth)], mantendo a temperatura ambiente por 12-16 horas e armazenando a -20°C, até o momento do uso.

## **5.2. OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO PARA MARCADORES RAPD**

**MATERIAL VEGETAL** – O DNA de quatro plantas da população de Lages e de quatro plantas da população de São Paulo foi selecionado aleatoriamente entre as amostras

extraídas e utilizado para a seleção dos iniciadores polimórficos. O DNA de todas as plantas foi extraído utilizando o protocolo definido para *A. angustifolia*.

**REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO** – Partindo-se do coquetel descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998), realizou-se a otimização da técnica, testando diferentes concentrações de magnésio (2,5; 3,8 e 5,0 mM), de iniciadores (0,4 e 0,6  $\mu$ M), de dNTPs (0,2 e 0,4 mM) e de DNA (0,8, 1,2, 1,5 e 2,0 ng); e a presença ou não de BSA (0,8 mg/mL). O programa de PCR foi otimizado partindo-se do programa descrito por Mazza (1997), testando diferentes tempos para desnaturação do DNA (30 s, 45 s ou 1 min.), para anelamento dos iniciadores (30 s, 45 s ou 1 min.) e para a extensão da cadeia de DNA pela enzima DNA-polimerase (1, 1,5 ou 2 min.); a temperatura para o anelamento dos iniciadores (35, 40 ou 45°C); 30 ou 35 ciclos com a mesma temperatura de anelamento ( $T_m$ ) (35, 40 ou 45°C); três ciclos com  $T_m$  de maior estringência (40 ou 45°C), seguido de 30 ciclos com  $T_m$  de menor estringência (35°C); e três ciclos com  $T_m$  de menor estringência (35 ou 40°C), seguido de 30 ciclos com  $T_m$  de maior estringência (45°C). Após a padronização da reação de amplificação, oitenta iniciadores de 10 bases (kits A, C, F e AN da Operon Technologies) foram testados para a identificação de marcadores polimórficos. As reações de PCR foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.).

**VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO** – os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen) corado com brometo de etídeo 0,02% (Sigma), em cuba de eletroforese submersa (Pharmacia), com tampão de cuba TBE 1X [tris-Cl 20 mM (Synth); ácido bórico 2 M (Nuclear); EDTA, 20 mM (Synth)]. Após a eletroforese, as bandas foram visualizada sob luz ultravioleta (Sambrook et al., 1987) e fotografadas com filme *polaroid* preto e branco. Também foi realizada eletroforese em gel não desnaturante de 3,5% de poliacrilamida [bis-acrilamida 1% (Sigma); acrilamida 29% (Sigma)], em cuba vertical modelo SA32 (Life Technologies), com corrente elétrica constante de 2 V/cm<sup>2</sup> (Sambrook et al., 1989) e visualização das bandas após coloração com nitrato de prata.

Para a coloração dos géis com nitrato de prata, foram testados o protocolo descrito por Dantas (2002) e o protocolo descrito por Caetano-Anollés e Gresshoff (1994). O primeiro protocolo baseia-se na fixação do DNA com solução de ácido acético 0,5% + etanol 5% por dez min. e com ácido nítrico 1% por três min.; impregnação com solução de nitrato de prata 0,2% por trinta minutos; revelação com solução de carbonato de sódio 3%

+ formaldeído 0,2% e finalização da revelação com solução de ácido acético 5%. Entre cada etapa, o gel é lavado durante 20 segundos com água destilada. O segundo protocolo utiliza solução de ácido acético 7,5% para a fixação do DNA, por 20 min.; impregnação com solução de nitrato de prata 0,15% + formaldeído 0,056% por trinta minutos; revelação com solução de carbonato de sódio 3% + formaldeído 0,056% + tiosulfato de sódio 400µg/L e finalização da revelação com solução de ácido acético 7,5% a 4°C. Após a fixação do DNA, o gel é lavado três vezes com água destilada, por dois minutos cada e após a impregnação com prata, é lavado uma vez por 20 segundos.

Após a coloração dos géis com prata, os mesmos foram avaliados visualmente sob transiluminador de luz branca e registrados por meio de fotografia digital ou escaneados.

### **5.3. ADAPTAÇÃO DO PROTOCOLO PARA MARCADORES AFLP**

MATERIAL VEGETAL – O DNA de duas plantas da população de Lages e de uma planta da população de São Paulo foram selecionadas aleatoriamente entre as amostras extraídas e utilizado para a otimização das reações AFLP. O DNA de todas as plantas foi extraído utilizando o protocolo definido para *A. angustifolia*.

REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO - As reações de AFLP, conforme descrito por Vos et al. (1995), foram desenvolvidas utilizando-se o kit AFLP® Analysis System I (Life Technologies®). Após a digestão com as enzimas *EcoRI* e *MseI* e ligação dos oligonucleotídeos adaptadores, o DNA foi amplificado utilizando iniciadores com uma base seletiva (*EcoRI*-A e *MseI*-C) (pré-amplificação). Após essa etapa, o DNA pré-amplificado foi diluído e amplificado utilizando iniciadores com três bases seletivas (*EcoRI*-NNN e *MseI*-NNN). Iniciadores *EcoRI*-NNN foram utilizados sem a diluição recomendada pelo fabricante. Para a restrição enzimática, foram testados dois procedimentos (2 h a 36°C e 12 horas a temperatura ambiente); a ligação dos adaptadores foi por 2 h a 20°C; o volume das reações de pré-amplificação foi testado para 25 ou 50 µL; e a diluição testada para o DNA pré-amplificado foi de 1:25 e 1:50. Para os iniciadores, cada N corresponde a uma base nitrogenada: A, C, T ou G. As reações de PCR foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.), utilizando os programas descritos no manual do kit. Todo o processo foi otimizado utilizando os iniciadores *EcoRI*+AAC e *EcoRI*+AGC, combinado com os iniciadores *MseI*-CNN. As 48



combinações de iniciadores restantes do kit foram selecionadas e classificadas a partir das condições otimizadas de pré-amplificação e amplificação.

**VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO** - a visualização dos resultados foi realizada após a eletroforese em gel desnaturante de 6% de poliacrilamida [bis-acrilamida 1% (Sigma); acrilamida 29% (Sigma); uréia 0,42 g/mL (Nuclear)] em aparato vertical modelo S2 (Life Technologies), testando-se o tampão TBE 1X [tris-Cl 20 mM (Synth); ácido bórico 2 M (Nuclear); EDTA, 20 mM (Synth)] nas cubas inferior e superior e a adição de acetato de sódio 0,35 M (Vetec) na cuba inferior. O gel foi aquecido até 50°C com potência constante de 85 W (pré-eletroforese) e as amostras de DNA foram desnaturadas por 5 min. a 94°C. A eletroforese foi testada com potência constante de 60 ou 65 W, para uma, duas, três e quatro horas de corrida. Para a coloração dos géis com nitrato de prata, foram testados os mesmos protocolos descritos para as reações RAPD. A avaliação e registro dos dados também foram realizados da mesma forma descrita para as reações RAPD.

#### **5.4. TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

**MATERIAL VEGETAL** – O DNA de duas plantas da população de Lages e de uma planta da população de São Paulo foram selecionadas aleatoriamente entre as amostras extraídas e utilizado para a seleção dos iniciadores que revelaram produtos amplificados em araucária. Uma planta de *Pinus taeda* foi utilizada como controle positivo para as reações de amplificação de regiões microssatélites. O DNA de todas as plantas foi extraído utilizando-se o mesmo protocolo definido para *A. angustifolia*

**REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO** - Vinte iniciadores para regiões microssatélites em cloroplastos de *P. thunbergii* e nove iniciadores para regiões microssatélites em DNA nuclear de *P. taeda* e de *P. strobus* foram selecionados a partir da listagem disponibilizada na internet, no endereço <http://dendrome.ucdavis.edu/Data/primer.html>. Sua transferibilidade foi testada utilizando-se o a reação descrita pelos autores e os iniciadores que revelaram produtos amplificados em *A. angustifolia* tiveram a reação e o programa de PCR otimizados. O coquetel otimizado para as reações de PCR foi composto por tampão de PCR 1 X (acompanha a *Taq*); *Taq* DNA polimerase 1 U; dNTPs 0,2 mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM; iniciadores 0,2 µM de cada; e 2 ng/µL de DNA. A temperatura de anelamento de

cada par de iniciadores foi calculada pela fórmula  $T_m = [2 \times (A + T) + 4 \times (C + G)] - 5$  (Innis e Gelfand, 1990). A partir deste valor, um programa de amplificação foi elaborado para cada par de iniciadores, constando de uma etapa de desnaturação inicial de 4 min. a 94°C, seguida de ciclos de 1 min. para a desnaturação (94°C), 1 min. para anelamento dos iniciadores (com redução da estringência em 1°C a cada dois ciclos, partindo-se da temperatura de anelamento mais alta, até a temperatura de 51°C, seguido de 29 ciclos com esta temperatura) e 2 min. para extensão da cadeia de DNA pela enzima *Taq* DNA polimerase (72°C). A finalização do programa constou de uma etapa de 5 min. a 72°C para a completa extensão dos produtos amplificados. Todas as reações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.). O coquetel e os ciclos de PCR foram otimizados a partir daqueles descritos por Echt et al. (1999).

**VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO** - a visualização dos resultados foi realizada após a eletroforese em gel desnaturante de 6% de poli-acrilamida [bis-acrilamida 1% (Sigma); acrilamida 29% (Sigma); uréia 0,42 g/mL (Nuclear)] em aparato vertical modelo S2 e SA32 (Life Technologies), com tampão de cuba TBE 1X [tris-Cl 20 mM (Synth); ácido bórico 2 M (Nuclear); EDTA, 20 mM (Synth)]. A corrida eletroforética foi realizada com potência constante de 65 W. Para a coloração dos géis com nitrato de prata, foram testados os mesmos protocolos descritos para as reações RAPD. A avaliação e registro dos dados também foi realizada da mesma forma descrita para as reações RAPD e AFLP.

## **5.5. ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO NATURAL**

**MATERIAL VEGETAL** – Procedeu-se a análise da diversidade genética da população natural de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages / SC (Parque Ecológico Municipal João José Theodoro da Costa Neto). O referido Parque apresenta uma área aproximada de quarenta hectares, com uma altitude média de 918 metros, localizado a 27°47'52'' de latitude Sul e 50°22'30'' de longitude oeste. Trinta plantas foram selecionadas aleatoriamente no parque, buscando amostrar a totalidade de sua área. O DNA de todas as plantas foi extraído utilizando o protocolo definido para *A. angustifolia*.

MARCADORES RAPD - Os iniciadores OPA04, OPA09, OPA17, OPC06, OPF08, OPF16, OPAN13 e OPAN15 (Operon Technologies) foram utilizados para proceder a análise da diversidade genética da referida população. Para os segmentos polimórficos amplificados foi construída uma matriz binária, analisando-se a presença ou ausência de cada banda, codificada por 1 ou 0 respectivamente. A partir dessa matriz, foi determinado o índice de similaridade de Jaccard entre indivíduos e posteriormente realizado agrupamento do tipo UPGMA (método das médias das distâncias). A análise dos dados e construção do dendograma foi feita com auxílio do programa NTSYS-pc 2.02 (Rohlf, 1995). Os índices estimados foram: a similaridade genética, o número médio de bandas, a porcentagem de bandas polimórficas e a diversidade genética (Lewontin, 1972). A diversidade genética foi determinada pela medida de Shannon (1945), que é dada por  $H = -\sum p_i \ln(p_i)$ , considerando cada banda polimórfica como um loco com dois alelos. Foi considerada uma banda polimórfica aquela em que a frequência do alelo mais comum não ultrapassou 95%.

MARCADORES AFLP - Sete combinações de iniciadores (E-ACG + M-CAG e E-ACA + M-CTT, E-AGC + M-CAC, E-ACT + M-CAA, E-AAG + M-CTG, E-ACC + M-CAT, E-AAC + M-ACA) foram selecionadas aleatoriamente para se proceder a análise da diversidade genética da população. A análise dos dados para a caracterização da diversidade genética e os índices de diversidade determinados foram os mesmos utilizados para os marcadores RAPD.

MARCADORES MICROSSATÉLITES – uma vez que somente dois iniciadores para regiões microssatélites em cloroplastos (cpDNA 4 e cpDNA5) revelaram produtos amplificados para *A. angustifolia* e que os mesmos apresentaram-se monomórficos ou não satisfizeram o limite de 95% de frequência para serem considerados polimórficos, esses marcadores não foram utilizados para proceder a análise da diversidade genética da população.

COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE INFORMATIVA ENTRE MARCADORES - os índices referentes à análise da diversidade genética da população, estimados com marcadores RAPD e AFLP foram comparados com índices obtidos para a mesma população por Auler et al. (2002) e Schlögl (2000), com marcadores isoenzimáticos e PCR-RFLP respectivamente, levando em consideração suas diferenças técnicas. Os dados

originais referentes a marcadores isoenzimáticos (Auler, 2000), foram utilizados para a determinação do índice de diversidade genética de Shannon [ $H = -\sum p_i \ln(p_i)$ ]. Para esse cálculo, cada alelo de um loco revelado no gel foi considerado como sendo uma banda independente e os dados foram avaliados como marcadores dominantes.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE FOLHAS DE *Araucaria angustifolia*

A quantidade média de DNA extraído a partir de folhas acondicionadas em sílica gel ou em caixas térmicas com gelo, mostrou-se equivalente na análise dos géis de agarose (147,3 µg e 137,3 µg por grama de tecido, respectivamente), porém, em materiais acondicionados em gelo e armazenados a -20° C, observou-se que houve degradação do DNA e redução na quantidade de DNA obtido, sendo maior a degradação e menor a quantidade de DNA, quanto maior o tempo de armazenamento do material vegetal. Para folhas acondicionadas a -20°C por três meses, a média de DNA extraído foi de 43,8 µg (entre 13,3 e 66,6 µg por grama de tecido). Para os materiais cuja extração foi realizada aproximadamente 24 horas após a coleta, a quantidade de DNA obtida variou entre 66,6 e 400 µg por grama de tecido (Figura 1).

Devido à consistência fibrosa das folhas, houve necessidade de seu congelamento com nitrogênio líquido e maceração em gral de porcelana, para completa pulverização do material vegetal. Folhas maceradas diretamente no tampão de extração ou com nitrogênio líquido em tubos eppendorf não puderam ser completamente pulverizadas.

Extrações de DNA realizadas sem a adição de PVP ao tampão de extração, ou com a adição deste composto na concentração de 1% resultaram em precipitados de coloração escurecida, devido à oxidação de compostos fenólicos que se ligam ao DNA. Também se observou, diretamente nos géis de quantificação, a degradação do DNA. Dessa forma, houve a necessidade adicionar PVP ao tampão de extração, na concentração de 2%, além de 2-mercaptoetanol 1%. Por outro lado, a utilização de PVP ou de PVPP não gerou diferenças na qualidade e quantidade do DNA obtido.

A realização de três extrações orgânicas com clorofórmio (CIA), mostrou-se necessária para a obtenção de DNA de boa qualidade. Quando essa etapa foi realizada uma ou duas vezes, restaram contaminantes protéicos no produto final da extração, detectados pela leitura em espectrofotômetro. A adição de solução de CTAB 10% + NaCl 1,4 M também foi necessária para a limpeza do DNA, uma vez que protocolos que não apresentavam esse passo, resultaram em precipitados com consistência viscosa, resultado da contaminação do DNA com polissacarídeos (Cheng et al., 1997; Ferreira e Gratappaglia, 1998). A limpeza do DNA com NaCl 1 M, indicada em alguns protocolos

como uma opção para a precipitação seletiva (Ferreira e Gratappaglia, 1998), resultou em amostras com menor quantidade de DNA, não compensando a sua utilização.

A adição da RNase nos passos iniciais da extração, ou junto ao TE no momento da diluição do DNA não demonstrou diferenças quanto à sua ação, que é a degradação dos RNAs presentes. Em ambos os casos, a avaliação dos géis de quantificação demonstrou ausência destas moléculas.

Extrações realizadas a partir de material desidratado sob vácuo em sílica gel apresentaram resultados iguais ao do material não desidratado e dessa forma, optou-se por não desidratar o material, uma vez que esse passo torna a extração mais trabalhosa e longa.

Na leitura espectrofotométrica, a razão OD260/OD280 resultou em um valor entre 1,7 e 2,0 em 80% das amostras obtidos a partir do protocolo otimizado, indicando uma baixa contaminação das amostras por proteínas.

#### OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO PARA MARCADORES RAPD

O coquetel de amplificação a partir do qual se procedeu a otimização das reações de RAPD foi o descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998) e consta de tampão de PCR 1 X, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,8 mg/μL de BSA, 0,4 μM de iniciadores, 1 U de Taq DNA-polimerase e 1,2 ng/μL de DNA (Tabela 1).

O aumento gradativo na concentração de magnésio proporcionou um aumento no número de bandas amplificadas. Uma concentração de 3,8 mM possibilitou a amplificação de um médio número de bandas, não ambíguas e com alta intensidade, gerando um padrão de fácil análise. A utilização de uma concentração de 2,5 mM gerou um padrão com menor número de bandas e menor intensidade das mesmas, enquanto uma concentração de 5,0 mM gerou um alto número de bandas, com um padrão de difícil interpretação devido à ambigüidade das mesmas.

A utilização de 0,4 ou 0,6 μM de iniciadores não proporcionou diferenças no produto das amplificações, gerando um padrão de bandas igual para ambas as concentrações. Já o aumento na concentração de dNTPs de 0,2 para 0,4 mM revelou diferenças no padrão de bandas amplificadas, com maior intensidade das mesmas quando uma maior concentração foi utilizada.

Reações de amplificação com concentrações de DNA de 0,8 e 1,2 ng/μL apresentaram boa amplificação para algumas amostras, porém, outras amostras revelaram bandas de baixa intensidade. Quando foram utilizadas as concentrações de 1,5 e 2,0 ng/μL,

o padrão de bandas amplificadas revelou alta intensidade, optando-se então pela utilização da concentração de 1,5 ng/ $\mu$ L (Figura 2).

A utilização de BSA revelou-se desnecessária, uma vez que reações realizadas com ou sem esse reagente resultaram em produtos amplificados, gerando bandas de mesma intensidade para diversos iniciadores utilizados.

Com base nestes testes, o coquetel que proporcionou melhor amplificação foi composto por tampão de PCR 1X, 3,8 mM de cloreto de magnésio, 0,4 mM de dNTPs, 0,4  $\mu$ M de iniciadores, 1,5 ng/ $\mu$ L de DNA e 1 U de *Taq* DNA-polimerase (Tabela 1).

**Tabela 1:** Coquetel para reações RAPD para *A. angustifolia* para a população natural do Parque Ecológico Municipal de Lages. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.

Componente	Marca	Concentração Final
Tampão de PCR	Cenbiot	1X
Cloreto de Magnésio	Cenbiot	3,8 mM
DNTPs	Pharmacia	0,4 mM
Iniciadores	Operon Technologies	0,4 $\mu$ M
DNA	---	1,5 ng/ $\mu$ L
<i>Taq</i> DNA-polimerase	Cenbiot	1 U

O programa de PCR descrito por Mazza (1997) consta de 40 ciclos de amplificação (94°C por 15 s; 35°C por 30 s; 72°C por 1 min.) e não gerou produtos amplificados quando utilizado com o coquetel descrito pela mesma autora. Utilizado com o coquetel otimizado no presente trabalho, este programa de PCR gerou produtos amplificados de baixa intensidade.

Bandas de alta e média intensidade foram obtidas otimizando o programa de PCR, que constou de uma etapa inicial de desnaturação (92°C por 4 min.), seguido de 35 ciclos de amplificação (92°C por 45 s., 35°C por 45 s. e 72°C por 1 min e 15 s.), finalizando com uma etapa de extensão da cadeia de DNA (72°C por 3 min.).

A utilização de 45 segundos para as etapas de desnaturação e anelamento dos iniciadores apresentou resultado igual ao revelado com a utilização de 1 min. O desenvolvimento dessas etapas por 30 segundos gerou um padrão de bandas menos intenso. Para a etapa de extensão da cadeia de DNA, resultados semelhantes foram observados, com bandas de alta e média intensidade sendo reveladas quando 1 min. e 15 s ou 2 minutos foram utilizados para esta etapa. Uma etapa inicial de desnaturação (92°C por

4 min.) e uma etapa final de extensão (72°C por 3 minutos), também auxiliaram na obtenção de padrões de bandas com alta e média intensidade.

Programas formados por temperaturas mais estridentes (40 e 45° C) apresentaram um número reduzido de bandas amplificadas (Figura 3) ou padrões de bandas de baixa intensidade.

Os programas de PCR com duas temperaturas diferentes para anelamento dos iniciadores apresentaram o resultado igual para a temperatura utilizada nos últimos trinta ciclos e os programas de PCR com a mesma temperatura de anelamento em único ciclo. Os programas de PCR testados estão descritos nas tabelas 2 e 3.

Dentre os oitenta iniciadores testados, oito (10%) apresentaram polimorfismo entre indivíduos para as amostras utilizadas de duas populações. Uma banda foi considerada monomórfica quando a sua presença ou ausência apresentou uma frequência superior a 95%. Os iniciadores polimórficos foram: OPA04, OPA09, OPA17, OPC06, OPF08, OPF16, OPAN13 e OPAN15. O número total de bandas para os iniciadores polimórficos variou entre seis e treze e o número de bandas polimórficas, entre uma e cinco (Tabela 4). Cinco dos oitenta iniciadores (6,25%) não apresentaram bandas amplificadas (OPF10, OPF17, OPF18, OPC11 e OPAN14).

Utilizando os oito iniciadores polimórficos selecionados, os iniciadores OPF08 (duas bandas polimórficas) e OPAN13 (uma banda polimórfica) não revelaram polimorfismo para a população do Parque Ecológico Municipal de Lages, mesmo havendo apresentado bandas polimórficas na seleção, a qual foi realizada com amostras de plantas de São Paulo e de Lages (Figura 4).

Todos os demais seis iniciadores revelaram polimorfismo para a população do Parque Ecológico Municipal, com uma média de 11,2 bandas reveladas e 3 bandas polimórficas por iniciador, valor correspondente a 26,9% do total de bandas reveladas. A Figura 5 apresenta o polimorfismo observado entre 30 indivíduos da população natural de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages, utilizando o iniciador OPA04. Os iniciadores OPA09, OPF16 e OPAN15 foram os que apresentaram maior número total de bandas (13), enquanto o iniciador OPA17 apresentou o menor número (06). OPF16 revelou cinco bandas polimórficas, correspondendo 38,5% do total de bandas reveladas pelo iniciador. O menor número de bandas polimórficas foi revelado pelo iniciador OPA17 com uma única banda (16,7%), porém a menor porcentagem de polimorfismo foi revelada pelo iniciador OPA09, com 15,4% de polimorfismo, valor correspondente a duas bandas (Tabela 4 e Figura 6).



**Tabela 2:** Programas de PCR testados para as reações de RAPD, utilizando uma única temperatura para anelamento dos iniciadores para a população natural de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.

N.º de ciclos	Programa 1*	Programa 2	Programa 3
	Temperatura / Tempo	Temperatura / Tempo	Temperatura / Tempo
1	92°C / 4 min.	92°C / 4 min.	92°C / 4 min.
35	92°C / 45 s.	92°C / 45 s.	92°C / 45 s.
	35°C / 45 s.	40°C / 45 s.	45°C / 45 s.
	72°C / 1min. e 15 s.	72°C / 1min. e 15 s.	72°C / 1min. e 15 s.
1	72°C / 3 min.	72°C / 3 min.	72°C / 3 min.

\* Ciclo de PCR selecionado para desenvolvimento das reações de RAPD

**Tabela 3:** Programas de PCR testados para as reações de RAPD, utilizando duas temperaturas para anelamento dos iniciadores para a população natural de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.

N.º de ciclos	Programa 4	Programa 5	Programa 6
	Temperatura / Tempo	Temperatura / Tempo	Temperatura / Tempo
1	92°C / 4 min.	92°C / 4 min.	92°C / 4 min.
3	92°C / 45 s.	92°C / 45 s.	92°C / 45 s.
	35°C / 45 s.	35°C / 45 s.	40°C / 45 s.
	72°C / 1min. e 15 s.	72°C / 1min. e 15 s.	72°C / 1min. e 15 s.
1	72°C / 3 min.	72°C / 3 min.	72°C / 3 min.
30	92°C / 45 s.	92°C / 45 s.	92°C / 45 s.
	40°C / 45 s.	45°C / 45 s.	35°C / 45 s.
	72°C / 1 min. e 15 s.	72°C / 1 min. e 15 s.	72°C / 1 min. e 15 s.
1	72°C / 3 min.	72°C / 3 min.	72°C / 3 min.

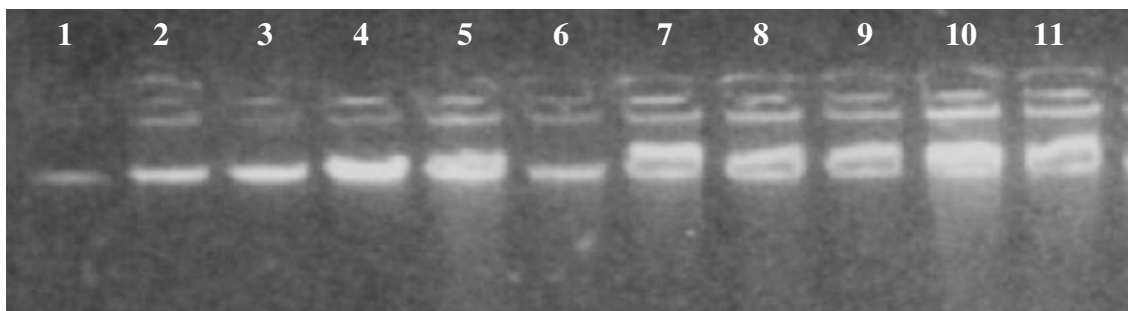
**Tabela 4:** Iniciadores utilizados para reações RAPD polimórficos para a população natural de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.

Iniciador	Número total de bandas amplificadas	Número de bandas polimórficas*	Porcentagem de bandas polimórficas
OPA04	12	03	25,0
OPA09	13	02	15,4
OPA17	06	01	16,7
OPC06	10	03	30,0
OPF16	13	05	38,5
OPAN15	13	04	30,7
Valores médios	11,2	3,0	26,9

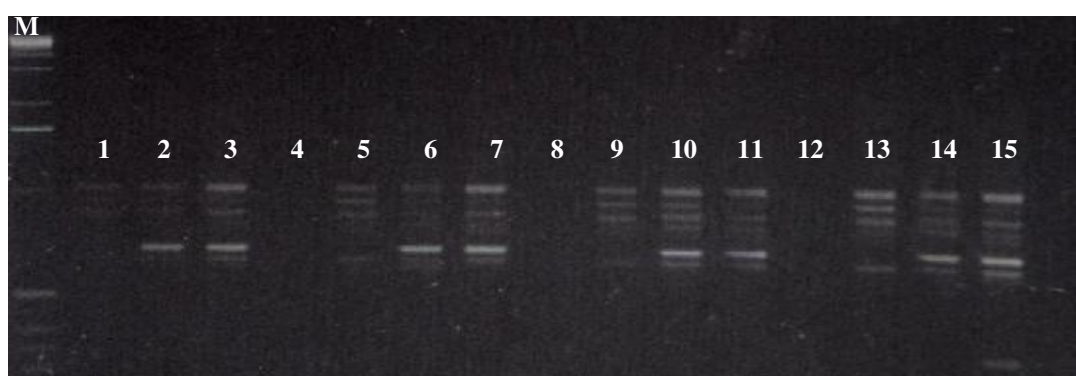
\* Critério de 95% para a presença ou ausência da banda

A comparação entre os géis de agarose corados com brometo de etídeo e os géis de poliacrilamida corados com prata revelou o mesmo número de bandas de alta e média intensidade. Apesar da maior sensibilidade da coloração de DNA com prata, as bandas fracamente coradas pelo brometo de etídeo no gel de agarose apresentaram fraca revelação nos géis de poliacrilamida.

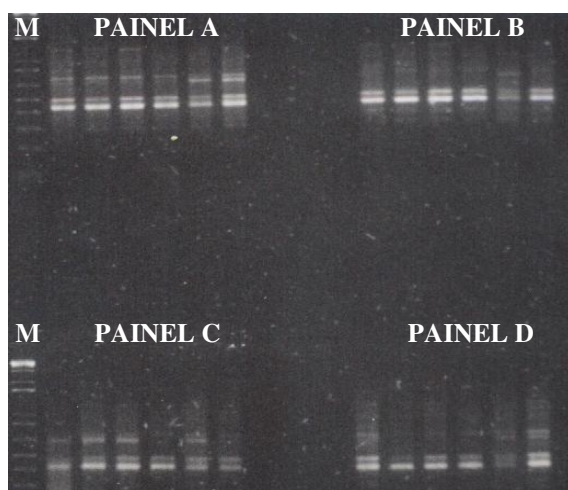
Com relação aos protocolos utilizados para a coloração dos géis de poliacrilamida, ambos permitiram a observação do mesmo número de bandas no gel, com intensidade semelhante, optando-se pelo uso do protocolo descrito por Dantas (2002).



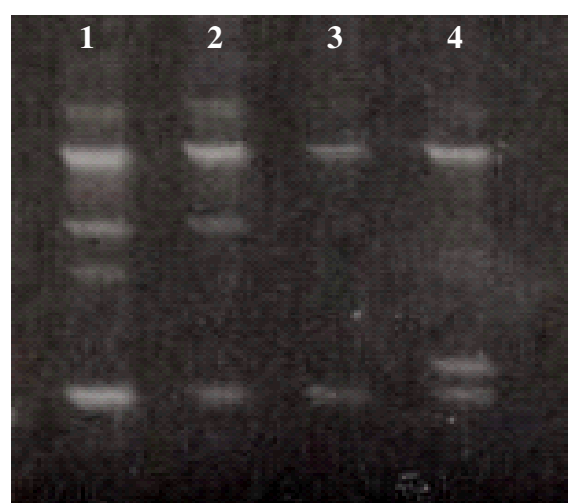
**Figura 1:** Amostras de DNA extraídos a partir de folhas de *A. angustifolia* coletadas 24 horas antes da extração e acondicionadas em sílica gel. Gel de 0,8% de agarose corado com solução de 0,02% de brometo de etídio. Linha 1: DNA  $\lambda$  20 ng/ $\mu$ L; linha 2: DNA  $\lambda$  50 ng/ $\mu$ L; linha 3: DNA  $\lambda$  100 ng/ $\mu$ L; linha 3: DNA  $\lambda$  200 ng/ $\mu$ L; linhas 5 a 11: DNA de *A. angustifolia*. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.



**Figura 2:** Amplificação de marcadores RAPD em indivíduos da população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages, utilizando o iniciador OPA17, com diferentes concentrações de DNA. Linhas 1 a 3: 0,8 ng/ $\mu$ L; linhas 5 a 7: 1,2 ng/ $\mu$ L; linhas 9 a 11: 1,5 ng/ $\mu$ L; linhas 13 a 15: 2,0 ng/ $\mu$ L. Linhas 4, 8 e 12: vazias. M= marcador de peso molecular 1kb. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.



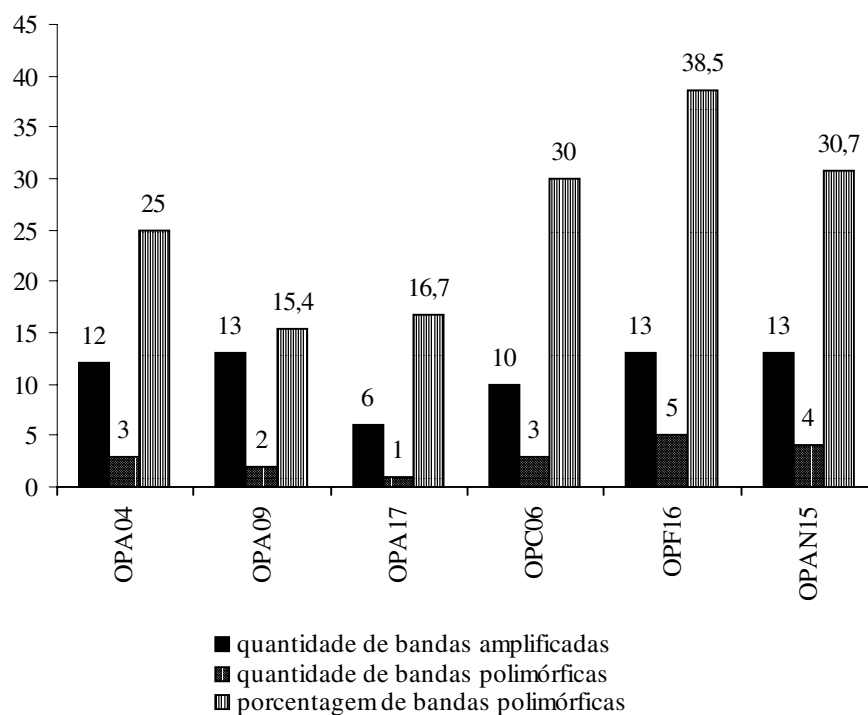
**Figura 3:** Polimorfismo revelado em marcadores RAPD em *A. angustifolia*, entre indivíduos da população do Parque Ecológico Municipal de Lages, utilizando o iniciador OPAN08 e diferentes ciclos de PCR. Painel A: ciclo de  $T_m=35^\circ\text{C}$ ; Painel B: ciclo de  $T_m=45^\circ\text{C}$ ; Painel C: ciclo de  $T_m=35^\circ\text{C}$  (3 ciclos iniciais) e  $40^\circ\text{C}$  (30 ciclos finais); Painel D: ciclo de  $T_m=40^\circ\text{C}$  (3 ciclos iniciais) e  $35^\circ\text{C}$  (30 ciclos finais). M= marcador de peso molecular 1kb. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.



**Figura 4:** Polimorfismo revelado em marcadores RAPD em *A. angustifolia*, entre indivíduos das populações do Parque Ecológico Municipal de Lages e do Parque de Campos de Jordão, utilizando o iniciador OPF08. Linhas 1 e 2: indivíduos da população do Parque de Campos de Jordão; linhas 3 e 4: indivíduos da população do Parque Ecológico Municipal de Lages. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.



**Figura 5:** Polimorfismo revelado em marcadores RAPD em *A. angustifolia*, entre os trinta indivíduos da população do Parque Ecológico Municipal de Lages, utilizando o iniciador OPA04. Linhas 1 a 30: indivíduos da população. M= marcador de peso molecular 1kb. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.



**Figura 6:** Número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem de bandas polimórficas para iniciadores RAPD testados para *A. angustifolia* para a população natural do Parque Ecológico Municipal de Lages. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.

### 6.3. PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO PARA MARCADORES AFLP

O resultado da restrição enzimática realizada por duas horas a 36°C foi satisfatória, gerando produtos amplificados na reação de AFLP com amplo espectro de peso molecular, sem a concentração de bandas de alto peso, características de digestões parciais do DNA. Resultado semelhante foi obtido na restrição enzimática realizada por oito horas a temperatura ambiente de aproximadamente 25°C (Figura 7).

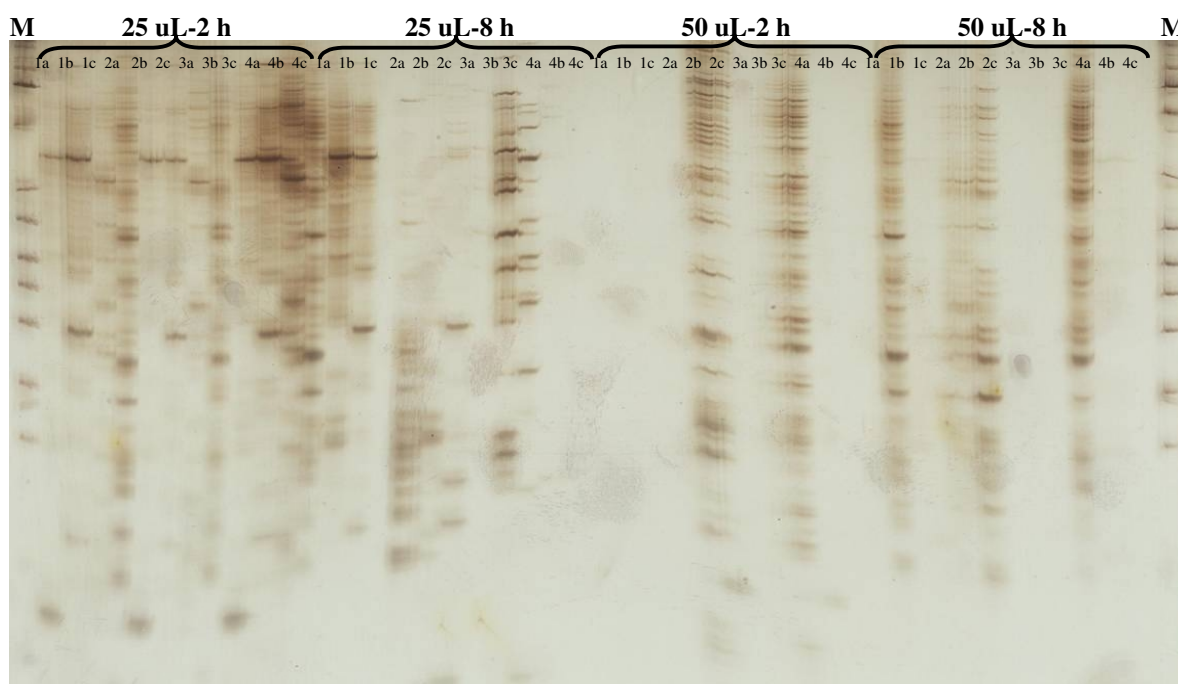
A reação de amplificação realizada em 25 µL, aliada à diluição do DNA na razão de 1:25, apresentou os mesmos resultados obtidos em 50 µL de reação, com diluição de 1:50 gerando bandas de alta e média intensidades, possíveis de serem analisadas sem ambigüidade (Figura 7).

A concentração de iniciadores EcoRI que apresentou melhores padrões de bandas no gel foi de 0,7 ng/µL, mantendo a concentração de iniciadores MseI (1,5 ng/µL). As concentrações de 0,1 e 0,25 ng/µL amplificaram um grande número de bandas de alto peso molecular, gerando padrões de difícil interpretação (Figura 8).

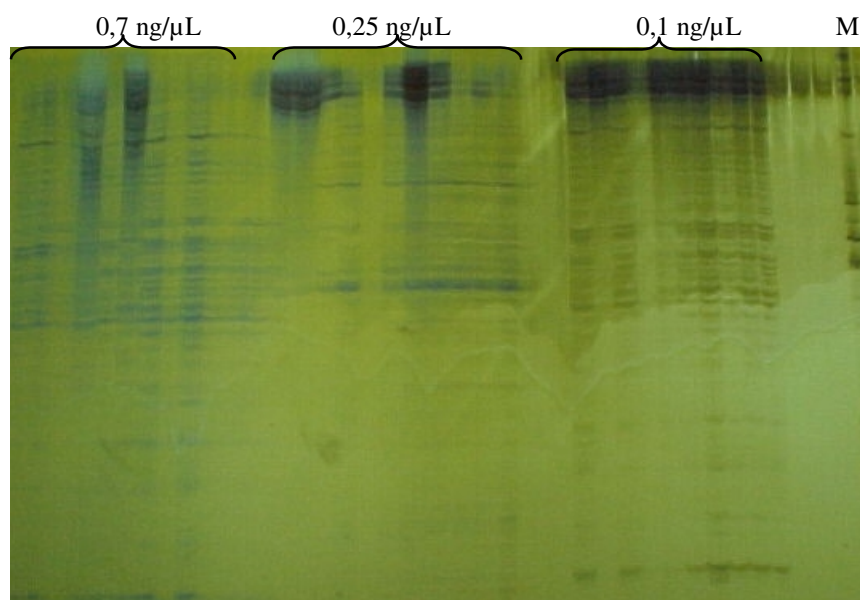
Depois de otimizadas as condições de pré-amplificação e amplificação do DNA, as 48 combinações de iniciadores para reações AFLP testadas foram selecionados em três categorias. Combinações que geraram padrões com poucas bandas amplificadas e todas monomórficas foram classificados como não recomendados (NR). Quando as combinações originaram padrões com bandas polimórficas, porém com baixa nitidez, gerando ambigüidade, foram classificados como pouco recomendados (PR). As combinações que geraram padrões com boa resolução e até 15% de bandas polimórficas foram classificadas como recomendadas (R). Finalmente, as combinações que geraram padrões com boa resolução número de bandas polimórficas acima de 15%, foram classificadas como altamente recomendadas (AR) (Tabela 5).

Seguindo essa classificação, 9 combinações (18,75%) foram altamente recomendadas, 6 combinações (12,5%) foram recomendadas, 22 (45,83%) foram pouco recomendadas e 11 (22,92%) não foram recomendadas (Figuras 9 e 10).

O nível de polimorfismo das combinações de iniciadores variou de nenhuma banda (várias combinações) a 33 bandas (EcoRI-AGG + MseI-CAA). Em termos de porcentagem, esses valores variaram de zero a 39,7% (Figura 9).



**Figura 7:** Teste para volume de reação e tempo para digestão do DNA para reações AFLP em indivíduos de *A. angustifolia* das populações do Parque Ecológico Municipal de Lages (a, b) e do Parque de Campos de Jordão (c), utilizando as combinações de iniciadores *EcoAGG+MseCTA* (1), *EcoAGG+MseCAC* (2), *EcoAGG+MseCAT* (3) e *EcoACC+MseCAG* (4). M= marcador de peso molecular 1kb. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.



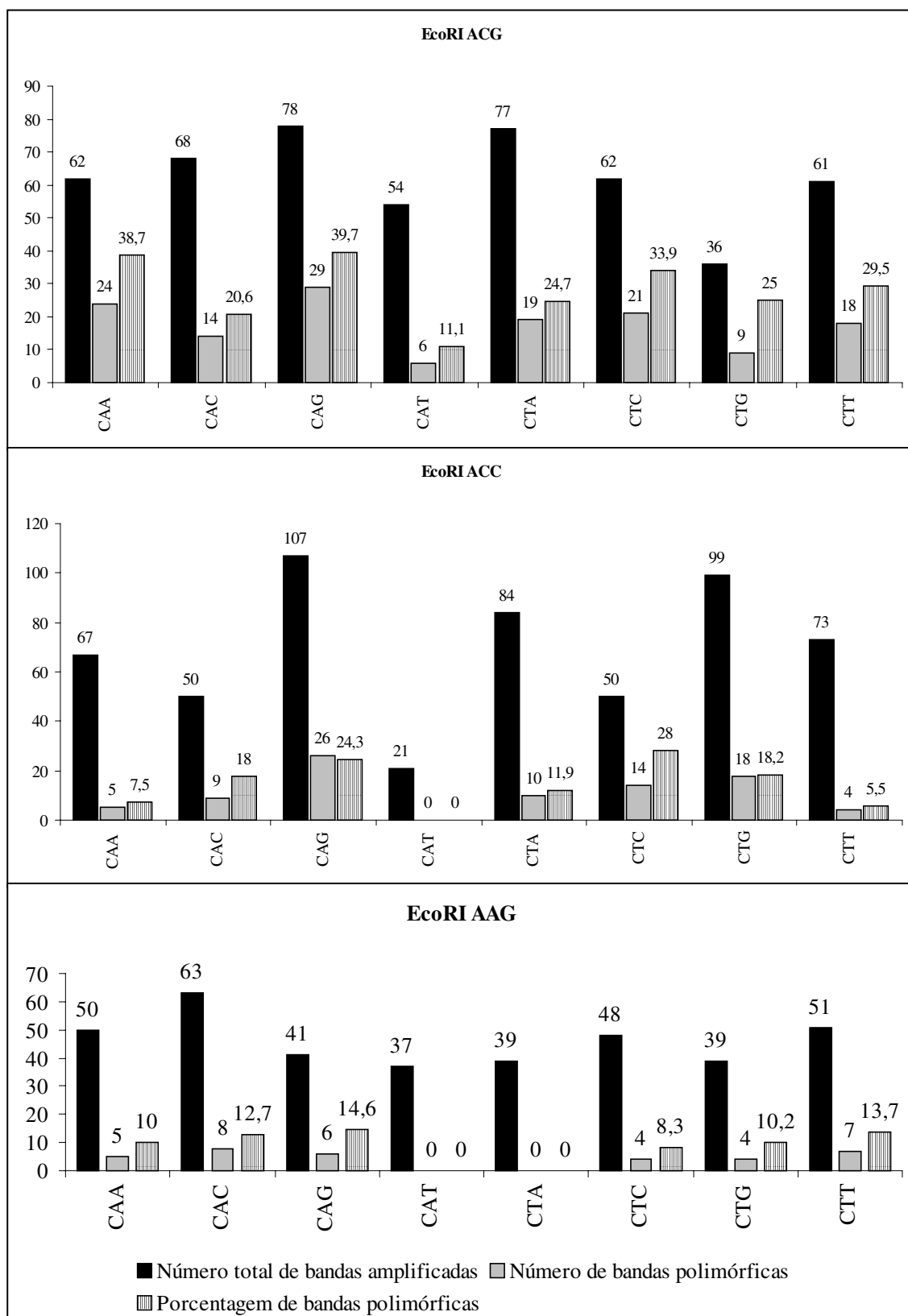
**Figura 8:** Concentrações de iniciadores *EcoRI* (0,7, 0,25 e 0,1 ng/μL) em reações AFLP para indivíduos de *A. angustifolia* (n=10) das populações do Parque Ecológico Municipal de Lages e do Parque de Campos de Jordão. Combinação de iniciadores: *Eco-AGC+Mse-CTG*. M= marcador de peso molecular 1 kb. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.

**Tabela 5:** Número total de bandas geradas, número de bandas polimórficas e classificação das combinações de iniciadores para reações AFLP em *A. angustifolia* da população natural do Parque Ecológico Municipal de Lages. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.

Combinação de iniciadores	Número total de bandas	Bandas polimórficas**	Classificação *	Combinação de iniciadores	Número total de bandas	Bandas polimórficas **	Classificação *
Mse CAA	62	24	PR	Mse CAA	67	5	PR
Mse CAC	68	14	AR	Mse CAC	50	9	PR
<b>Eco</b> Mse CAG	73	29	PR	<b>Eco</b> Mse CAG	107	26	AR
<b>A</b> Mse CAT	54	6	R	<b>A</b> Mse CAT	21	0	NR
<b>C</b> Mse CTA	77	19	PR	<b>C</b> Mse CTA	84	10	R
<b>G</b> Mse CTC	62	21	AR	<b>C</b> Mse CTC	50	14	AR
Mse CTG	36	9	PR	Mse CTG	99	18	AR
Mse CTT	61	18	AR	Mse CTT	73	4	PR
Mse CAA	50	5	PR	Mse CAA	28	0	NR
Mse CAC	63	8	R	Mse CAC	49	1	PR
<b>Eco</b> Mse CAG	41	6	PR	<b>Eco</b> Mse CAG	35	5	PR
<b>A</b> Mse CAT	37	0	NR	<b>A</b> Mse CAT	33	0	NR
<b>A</b> Mse CTA	39	0	NR	<b>C</b> Mse CTA	40	0	NR
<b>G</b> Mse CTC	48	4	R	<b>A</b> Mse CTC	22	0	NR
Mse CTG	39	4	PR	Mse CTG	26	0	NR
Mse CTT	51	7	R	Mse CTT	26	0	NR
Mse CAA	58	6	PR	Mse CAA	109	33	AR
Mse CAC	41	4	PR	Mse CAC	56	7	PR
<b>Eco</b> Mse CAG	39	6	PR	<b>Eco</b> Mse CAG	86	25	R
<b>A</b> Mse CAT	53	8	PR	<b>A</b> Mse CAT	57	8	PR
<b>C</b> Mse CTA	47	5	PR	<b>G</b> Mse CTA	108	22	AR
<b>T</b> Mse CTC	72	7	PR	<b>G</b> Mse CTC	60	3	PR
Mse CTG	45	0	NR	Mse CTG	79	21	AR
Mse CTT	0	0	NR	Mse CTT	59	7	PR

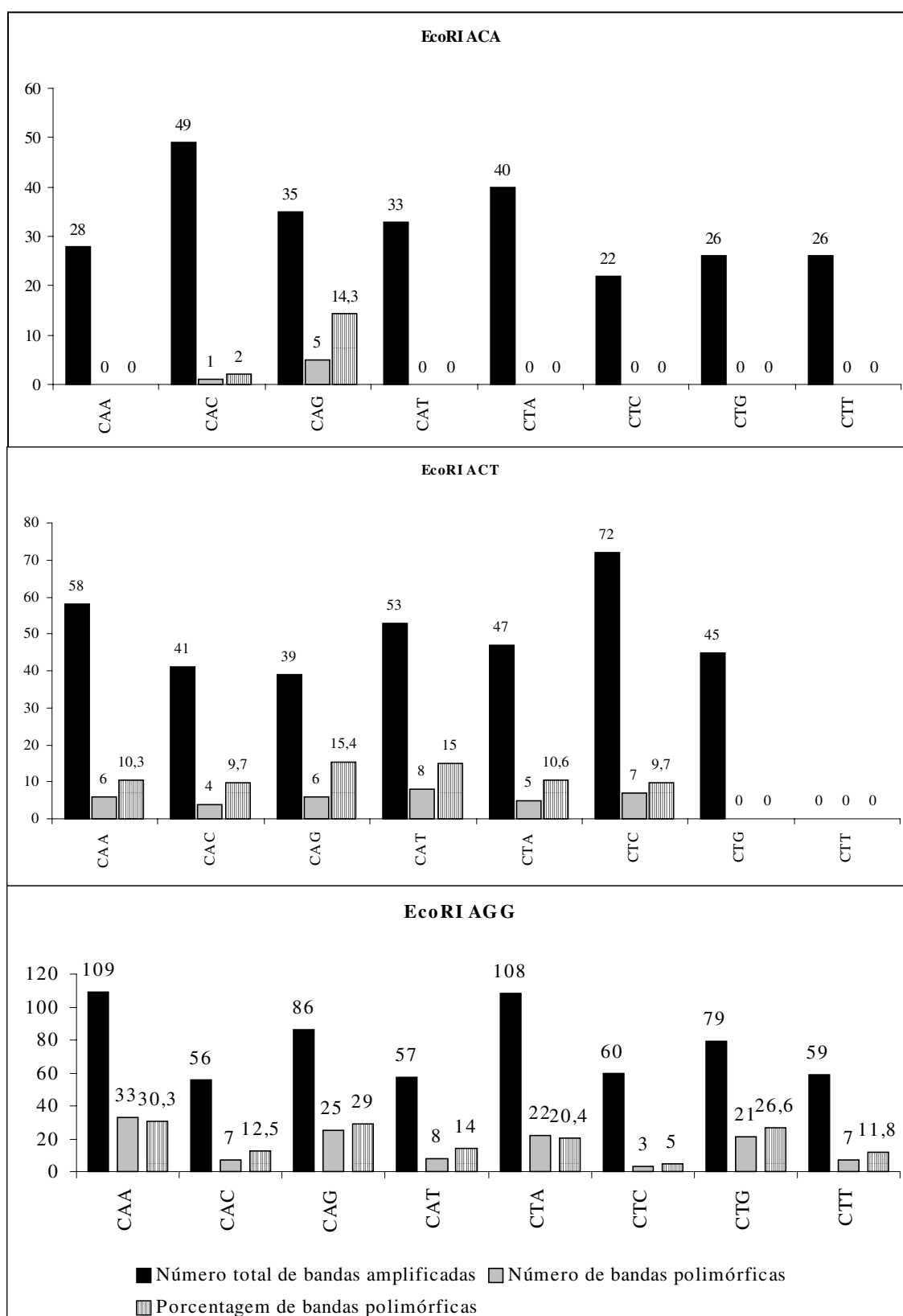
\* AR: altamente recomendado; R: recomendado; PR: pouco recomendado; NR: não recomendado.

\*\* Critério de 95% para a presença ou ausência da banda.

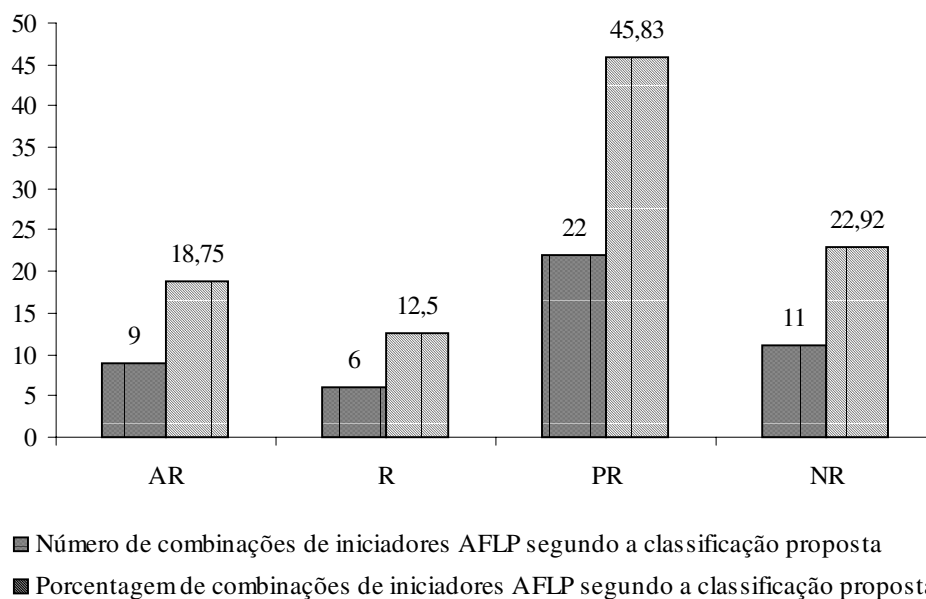


**Figura 9:** Número total de bandas amplificadas, número de bandas polimórficas e porcentagem de bandas polimórficas para combinações de iniciadores AFLP testados para *A. angustifolia*. As bandas foram consideradas polimórficas quando o alelo mais comum não excedeu 95%. Florianópolis - SC, CCB/UFSC, 2003 (continua...).





**Figura 9:** (Continuação) Número total de bandas amplificadas, número de bandas polimórficas e porcentagem de bandas polimórficas para combinações de iniciadores AFLP testados para *A. angustifolia*. As bandas foram consideradas polimórficas quando o alelo mais comum não excedeu 95%. Florianópolis - SC, CCB/UFSC, 2003.



**Figura 10:** Número e porcentagem de combinações de iniciadores AFLP, segundo a classificação proposta. AR: Altamente recomendada; R: recomendada; PR: pouco recomendada; NR: não recomendada. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.

A utilização de tampão TBE 1X nas cubas superior e inferior, com a adição de acetato de sódio 0,35 M nesta última, foi testada como alternativa para o melhor aproveitamento das bandas de baixo peso molecular, que perdem nitidez na porção inferior do gel de poliacrilamida e possibilitar um maior tempo de corrida eletroforética. Todavia, o resultado obtido foi o mesmo das corridas eletroforéticas realizadas somente com tampão TBE 1X em ambas as cubas.

A utilização de 65 W como potência constante para as corridas eletroforéticas possibilitou melhor separação das bandas no gel, sem aumentar o tempo de corrida ou a perda de nitidez das bandas de baixo peso molecular. Para obter a mesma separação das bandas com a utilização de 60 W de potência, foi necessário aumentar o tempo de corrida, sem alcançar melhores resultados na resolução das bandas.

A utilização de corridas com duas, três ou quatro horas, independente do tampão de cuba utilizado ou da potência, ocasionaram na perda de nitidez das bandas de baixo peso molecular, revelada na base do gel. O tempo de corrida ideal foi de 1:45 h para os iniciadores testados.

A coloração dos géis com prata apresentaram os mesmo resultados obtidos previamente para os géis de poliacrilamida corados para as reações de RAPD.

#### 6.4. TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Nas reações de microssatélites, dentre os vinte e nove iniciadores testados, todos amplificaram produtos específicos para *P. taeda*, mas apenas dois, desenhados para DNA de cloroplastos (cpDNA4 e cpDNA5), originaram produtos amplificados em *A. angustifolia*. Os fragmentos revelados em *A. angustifolia* apresentaram o mesmo tamanho daqueles amplificados para *P. taeda*.

Como os produtos amplificados em *A. angustifolia* geraram bandas de baixa intensidade, a concentração de DNA na reação foi aumentada e um novo programa de PCR foi estabelecido, calculando-se a temperatura de anelamento de cada iniciador e utilizando-se a técnica de redução da estringência ou “touchdown” (Tabela 6).

Após a otimização das reações de PCR, cada iniciador utilizado (cpDNA4 e cpDNA5) gerou uma única banda na planta controle (*P. taeda*), a qual chamamos de banda referencial, que também foi amplificada para *A. angustifolia*. Todavia, outras bandas também foram amplificadas em *A. angustifolia*, sem existência de bandas correspondentes em *P. taeda*.

**Tabela 6:** Programa de amplificação PCR para os iniciadores cpDNA4 e cpDNA5, otimizado para o genoma de *A. angustifolia* da população natural do Parque Ecológico Municipal de Lages. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.

Ciclos	Temperatura	Tempo
01	94°C	4 min.
Redução da estringência (1°C a cada 2 ciclos)	94°C	1 min.
	59 a 51°C (cpDNA4)	1 min.
	57 a 51°C (cpDNA5)	2 min.
29	72°C	2 min.
	94°C	1 min.
	51°C	1 min.
01	72°C	2 min.
	72°C	5 min.

Das trinta plantas, somente o padrão de bandas de uma delas foi diferente dos demais. Nesta, o iniciador cpDNA4 amplificou a banda referência com menor peso molecular. Duas bandas com maior peso molecular e três bandas com menor peso molecular, quando comparadas à banda referência, também foram amplificadas em algumas plantas, além da banda referência (Figura 11).

Além da banda referência, comum a todas as plantas, o iniciador cpDNA5 gerou mais cinco bandas com maior peso molecular e vinte e uma bandas com menor peso, todas polimórficas. Dentre essas, quatro bandas revelaram alta intensidade e as demais revelaram baixa a média intensidade (Figura 12).

Os géis de poliacrilamida foram corados com prata, empregando o mesmo protocolo utilizado para os géis de RAPD e AFLP. Os testes para coloração apresentaram os mesmos resultados obtidos na coloração dos géis de poliacrilamida utilizados para essas reações, conforme anteriormente citado.

A transferibilidade de iniciadores tem se mostrado uma importante ferramenta para diferentes espécies do mesmo gênero (Echt et al., 1999) e entre gêneros relacionados (Echt et al., 1999; Santos et al., 2001). Contudo, apesar da conservação das seqüências genômicas dos cloroplastos (Plamer, 1987; Lemieux et al., 2000), o baixo índice de transferibilidade pode ser justificado, devido à distância taxonômica existente entre *P. thumbergii* e *A. angustifolia*. As relações taxonômicas entre *P. thumbergii* e *A. angustifolia* e entre *Eucalyptus grandis* e *Acacia sellowiana* são apresentadas na Tabela 7.

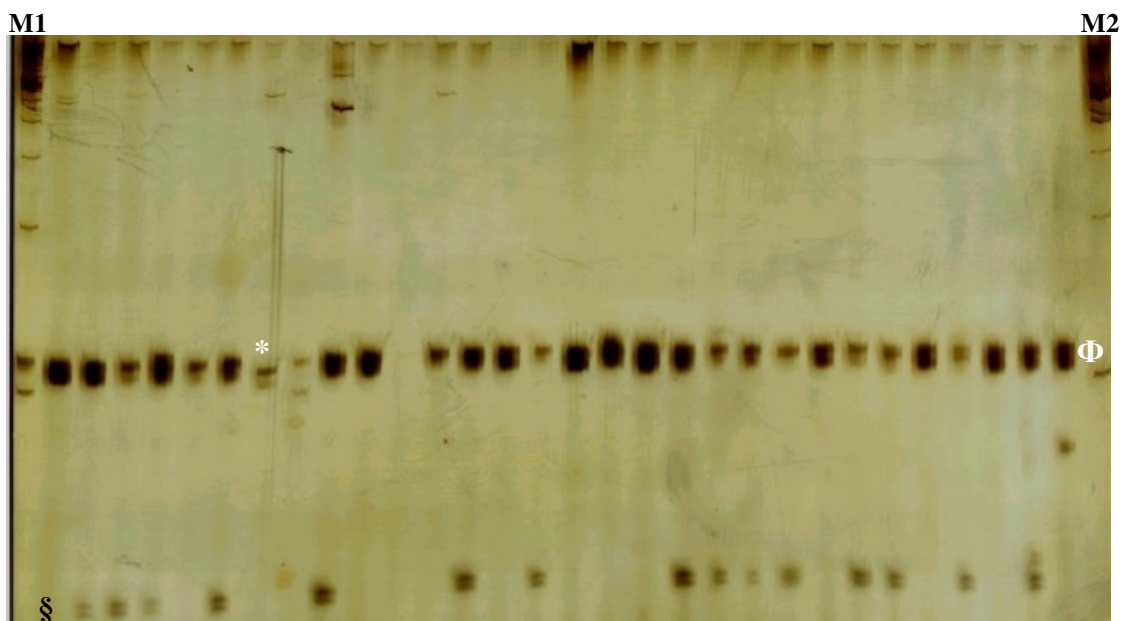
**Tabela 7:** Comparação entre as categorias taxonômicas<sup>1</sup> de espécies utilizadas na transferência de iniciadores microssatélites no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e de Genética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.

Categoria taxonômica	Transferência de <i>P. thumbergii</i> para <i>A. angustifolia</i>		Transferência de <i>E. grandis</i> para <i>A. sellowiana</i>	
Reino	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Gymnospermae</i>	<i>Gymnospermae</i>	<i>Antophyta</i>	<i>Antophyta</i>
Classe	<i>Coniferopsida</i>	<i>Coniferopsida</i>	<i>Dicotyledoneae</i>	<i>Dicotyledoneae</i>
Ordem	<i>Coniferales</i>	<i>Coniferales</i>	<i>Myrtales</i>	<i>Myrtales</i>
Família	<i>Pinaceae</i>	<i>Araucariaceae</i>	<i>Myrtaceae</i>	<i>Myrtaceae</i>
Gênero	<i>Pinus</i>	<i>Araucaria</i>	<i>Eucalyptus</i>	<i>Acacia</i>
Espécie	<i>P. thumbergii</i>	<i>A. angustifolia</i>	<i>E. grandis</i>	<i>A. sellowiana</i>

<sup>1</sup> Segundo Joly, 1998

Esses resultados sugerem a necessidade de desenvolvimento de iniciadores para regiões microssatélites específicos para *A. angustifolia*, uma vez que a transferibilidade não foi satisfatória.

Além disso, os resultados apontam também para a possibilidade de se utilizar DNA de cloroplastos para o desenvolvimento de iniciadores para regiões microssatélites, uma vez que esses marcadores já vêm sendo utilizados para estudos genéticos diversos em coníferas (Echt et al., 1999).



**Figura 11:** Padrão de bandas amplificadas em indivíduos da população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages, utilizando o iniciador cpDNA4. M1: marcador de peso molecular 100 pb com DNA controle de *Pinus taeda*. M2: marcador de peso molecular 100 pb.  $\Phi$ : banda referência. \*: banda referência de menor peso molecular, quando comparada às demais bandas e à planta controle. §: bandas não específicas amplificadas, com menor peso molecular. Florianópolis – SC, CCB/UFSC, 2003.