

**PAULO SÉRGIO SCHLÖGL**

**“Análise da diversidade genética em regiões não  
codificadoras de DNAs de cloroplastos em *Araucaria  
angustifolia* por PCR-RFLP”**

**“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal de Santa Catarina, visando a obtenção de grau de mestre em  
Biotecnologia”**

**Professor Orientador: Dr. Rubens O. Nodari**

**Florianópolis, Fevereiro de 2000**

**"ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM REGIÕES  
NÃO CODIFICADORAS DE DNAs DE CLOROPLASTOS EM  
ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA POR PCR-RFLP"**

**POR**

**PAULO SÉRGIO SCHLÖGL**

**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pelo Orientador e membros  
da Comissão Examinadora.**

**Comissão Examinadora:**



---

**Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari**  
**Orientador - FIT/CCA/UFSC**



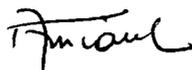
---

**Profa. Dra. Célia Regina Monte Barardi**  
**MIP/CCB/UFSC**



---

**Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis**  
**FIT/CCB/UFSC**



---

**Profa. Dra. Ana Maria Viana - BOT/CCB/UFSC**  
**Coordenadora do Programa de**  
**Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**

**Florianópolis, fevereiro de 2000**

AOS DEUSES INVISÍVEIS, AOS MEUS PAIS E ESPOSA,  
E AS ARAUCÁRIAS

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os amigos que, de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho e contribuíram para minha formação;

Em especial, a professora Dra Anete Pereira de Souza, pela valiosa colaboração, dedicação, compreensão e paciência;

Ao Professor Dr. Rubens O. Nodari pela orientação e oportunidade de realização deste trabalho;

A todos os participantes da comissão avaliadora;

Ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina e ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade da realização do treinamento;

A professora Ana Maria Viana e ao secretário da Pós-Graduação em Biotecnologia, o amigo, João Santana;

Ao PADCT pelos recursos financeiros;

E finalmente, a CAPES pela concessão da bolsa.

## SUMARIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
SUMÁRIO.....	V
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMO.....	VIII
SUMMARY.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>A. angustifolia</i> .....	1
1.2. Marcadores Moleculares.....	3
1.3. Genoma de Cloroplastos em Coníferas.....	4
1.4. Análise da Diversidade Genética.....	7
2. JUSTIFICATIVA.....	8
3. OBJETIVOS.....	9
3.1. Gerais.....	9
3.2. Específicos.....	9
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1. Amostras.....	10
4.2. Reações PCR-RFLP do Genoma de Cloroplastos.....	11
4.3. Análise dos Dados.....	12
5. RESULTADOS.....	15
5.1. Amplificações.....	15
5.2. PCR-RFLP.....	23
5.3. Polimorfismos.....	27
5.4. Diversidade Genética.....	34
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÕES.....	53
8. BIBLIOGRAFIA CITADA.....	55
9. ANEXOS.....	63
9.1. Haplótipos.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise da Variância Molecular hierarquizada (AMOVA), segundo EXCOFFIER et al. (1992).

Tabela 2 - Caracterização dos dezessete pares de iniciadores de cloroplastos testados em *A. angustifolia*.

Tabela 3 - Temperatura de digestão, número de fragmentos obtidos com a digestão dos produtos de das regiões não codificadoras de cloroplastos em *A. angustifolia*.

Tabela 4 - Combinações produtos da PCR e endonucleases, e o tamanho dos fragmentos polimórficos obtidos após digestão.

Tabela 5 - Número de indivíduos avaliados (N), frequência absoluta de haplótipos por população e número total de diferentes haplótipos por população (nh).

Tabela 6 - Frequências relativas e total de 12 haplótipos baseado em regiões não codificadoras de cloroplastos de *Araucaria angustifolia*.

Tabela 7 - Valores médios de  $h_T$ ,  $h_S$ ,  $G_{ST}$  e suas variâncias computadas pelo programa HAPLODIV (PONS e PETIT, 1995) com base nas frequências de 12 haplótipos observados em oito populações de *A. angustifolia*.

Tabela 8 - Índices moleculares de diversidade genética molecular em oito populações naturais de *A. angustifolia*.

Tabela 9 - Resultados da análise de variância (AMOVA) com base no Método de Distância: Diferença entre Pares calculado pelo Programa Arlequin 1.1. (SANTOS 2002)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa genético do Tabaco mostrando a localização das regiões onde os iniciadores das regiões não codificadoras são localizados.

Figura 2 – Resultados das amplificações dos DNAs de *A. angustifolia* com o par de iniciadores DT.

Figura 3 – Resultado das amplificações dos DNAs de embriões e megagametófitos de *A. angustifolia* com o par de iniciadores CS.

Figura 4 - Perfil dos fragmentos gerados pela digestão dos produtos da PCR pelas endonucleases em *A. angustifolia* após eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.

Figura 5 - Perfil dos fragmentos gerados pela digestão dos produtos da PCR pelas endonucleases em *A. angustifolia* após eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.

Figura 6 - Perfil dos fragmentos gerados pela digestão dos produtos da PCR pelas endonucleases em *A. angustifolia* após eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.

Figura 7 - Perfil dos fragmentos gerados pela digestão dos produtos da PCR pelas endonucleases em *A. angustifolia* após eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.

## RESUMO

A *Araucaria angustifolia*, comumente denominada de pinheiro brasileiro, é a espécie predominante da Floresta Ombrófila Mista, sendo a única espécie do seu gênero com ocorrência natural no Brasil. Originalmente, a região coberta com o pinheiro brasileiro alcançava cerca de 20 milhões de hectares no Sul e Sudeste. Destes, 31% em Santa Catarina (SC), dos quais restam alguns relictos remanescentes com uma área de aproximadamente 3% da área original, devido a exploração desenfreada da madeira, o que levou a espécie a uma condição vulnerável. Com o objetivo de conhecer a variabilidade genética presente em diferentes populações naturais que ocorrem em SC utilizou-se a técnica de PCR-RFLP para acessar os polimorfismos em regiões não codificadoras de DNA de cloroplastos, com o uso de iniciadores específicos, digestão dos produtos amplificados com enzimas de restrição e separação em géis de agarose e poliacrilamida. O uso de seis pares de iniciadores e três endonucleases, possibilitou a identificação e caracterização de 12 haplótipos diferentes entre as 141 plantas coletadas em oito populações de ocorrência natural no Estado de Santa Catarina e Paraná. A diversidade total,  $h_T$ , foi de 0,612 e a diferenciação entre os haplótipos das populações,  $G_{ST}$ , foi de 0,28. Apenas duas populações apresentaram os mesmos haplótipos (Rancho Alegre e Amola Faca) e as outras se distinguiram umas das outras por apresentarem haplótipos específicos, que foram em número de oito. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) confirmou que a maior parte da variação está distribuída dentro das populações ( $\phi_{SC} = 0,153$ ), porém, uma significativa diferenciação entre as populações existe ( $\phi_{ST} = 0,113$ ). Contudo, a mesma análise revelou que nenhuma estrutura regional da diversidade, exemplo: baseada em proximidade geográfica, foi demonstrada quando as populações foram agrupadas em seis grupos regionais.

**Palavras chaves :** Polimorfismos / regiões não codificadoras / DNA de cloroplasto / *A. angustifolia*

## SUMMARY

*Araucaria angustifolia*, commonly called pinheiro brasileiro or araucária, is an dominant species in the Mixed Evergreen Forest, being the single species from the *Araucaria* genus of natural occurrence in the South of Brazil. Originally, this species covered over 20 million hectares, mostly in the three very south states. From that, 31% were located in Santa Catarina (SC), from which, it remains no more than 3% due to the uncontrolled extraction across years. This fact led the species to a vulnerable status. With the objective of to characterize the genetic variation currently expressed by different populations, naturally occurring in SC and Paraná, it was used the PCR-RFLP technique in order to access the existing polymorphism in the non coding chloroplast regions, by using of specific primers, followed by restriction digestion with endonucleases of the PCR products and the resolution through agarose and polyacrilamide gel electrophoresis. The six pair of primers and four endonucleases provided the identification and characterization of 12 different haplotypes among the 141 adult plants tested, sampled in eight populations. The total diversity,  $h_T$  was 0.612 and the differentiation among haplotypes between populations, measured by  $G_{ST}$  was 0.28. Only two populations shared the same set of haplotypes and all others were distinguished from each others by their specific set of haplotypes. While the haplotype 12 was the only shared by all populations, a total of eight haplotypes out of 12 were specific to a particular population. The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) reinforced that the majority of the genetic variation was distributed within populations ( $\phi_{SC} = 0.153$ ). However, a significant differentiation between population ( $\phi_{ST} = 0.113$ ) do exist. The AMOVA revealed the absence of a significative specific genetic structure (ex: structure based on geographic proximity) when populations were grouped in six different groups.

**Key Words:** polymorphisms / non-coding regions / chloroplast

## INTRODUÇÃO

### *Araucaria angustifolia*

A *Araucaria angustifolia*, comumente denominada de pinheiro brasileiro, ou simplesmente araucária, é a espécie predominante da Floresta Ombrófila Mista do Planalto Meridional Brasileiro, domínio da Mata Atlântica. Também conhecida pelos nomes comuns de pinheiro-do-Paraná, pinheiro brasileiro, araucária ou simplesmente pinheiro, sendo a única espécie de seu gênero de ocorrência natural no Brasil (CARVALHO, 1994; MATTOS, 1994)..

No Brasil sua área original era de cerca de 200.000 km<sup>2</sup> (SEITZ, 1986), de formato irregular, ocorrendo principalmente nos Estados do Paraná (40% de sua superfície), Santa Catarina (31%) e Rio Grande do Sul (25%) e como manchas esparsas no sul de São Paulo (3%), internando-se até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro (1%) (CARVALHO, 1994; MATTOS, 1994).

As árvores de araucária apresentam-se com 10 a 35 metros de altura e 50 a 120 centímetros de diâmetro, troncos retos, quase cilíndricos e raramente ramificados (CARVALHO, 1994). Casca grossa e resinosa, ramificação racemosa em verticilos quase horizontais que se ramificam em abundantes ramos secundários constituindo as grimpas e se adensam para o ápice do caule, formando copa típica em forma de candelabro, "umbrela" ou corimbo nas árvores adultas (REITZ et al., 1978). As florestas de *A. angustifolia* fornecem madeira de alta qualidade para construções em geral, fabricação de móveis, laminados, polpa e outros usos (SHIMIZU e OLIVEIRA, 1981; CARVALHO, 1994). Sua madeira contém 58,3 % de celulose e 28,5 % de lignina, produzindo assim papel de alta qualidade. A resina exsudada principalmente da casca, serve para a fabricação de vernizes, terebentina, acetona e outros produtos químicos. E, finalmente, o pinhão é muito apreciado na alimentação humana, de animais domésticos e da fauna silvestre.

Devido as suas excelentes qualidades, a exploração da madeira que se intensificou a partir de 1934, além da expansão das áreas agrícolas, fez com que as reservas de *A. angustifolia* fossem quase extintas. Em Santa Catarina, atualmente, restam alguns relictos remanescentes com uma área de aproximadamente 3% da área original (GUERRA et al., 1999).

As reduções nas populações naturais resultam na perda da diversidade genética, seja pela deriva genética e ou pelo aumento da homozigose nos locos gênicos através do acasalamento entre parentes (endogamia), induzida por causas naturais e ou por causas relacionadas ao mau uso dos ecossistemas naturais. Isto causa nas populações uma diminuição da capacidade de resposta adaptativa às pressões da seleção natural e também uma depressão, mesmo em espécies com processos de reprodução auto-fecundantes de ocorrência natural podendo levar as espécies a extinção (TRAVIS et al., 1996).

O tamanho diminuto da maioria dos fragmentos bem como o decréscimo acentuado de fluxo gênico gerado pela fragmentação, se constituem em fatores perturbadores da estrutura genética e evolução da espécie. Tais fatos aliado a exploração são numa ameaça a sua sobrevivência, estando a mesma classificada na categoria de vulnerável de acordo com os critérios da Conservation International (IUCN) (GUERRA et al., 1999).

Desta forma, o maior desafio para a biologia conservacionista é a conservação das espécies através da manutenção dos níveis naturais de diversidade genética (TRAVIS et al., 1996). Uma melhor compreensão dos processos genéticos envolvidos nas populações das diversas espécies é realmente um passo crítico e importante para a conservação e uso sustentável dos ecossistemas naturais (SZMIDT e WANG, 1994).

O reflorestamento com *A. angustifolia* foi realizado primeiramente por um número reduzido de empresas particulares, assim como pelo Governo Federal. Cerca de 90.000 ha foram plantados até 1979, declinando drasticamente até uma taxa inferior a 300 ha por ano, no início da década de 80. Isso aconteceu porque a araucária é exigente em solos férteis e tem crescimento lento, produzindo sementes apenas após 15 - 20 anos de idade, e mesmo depois de adulta seu ciclo de desenvolvimento é lento comparativamente a outras espécies arbóreas perenes (SHIMIZU e OLIVEIRA, 1981). Este pensamento que predominou até os anos 80, é atualmente questionado, uma vez que, reflorestamentos no Paraná e na Argentina, tem demonstrado crescimentos acima da expectativa em algumas áreas (Roberto Pedrobom, comunicação pessoal). Na verdade pouco se conhece sobre a performance desta espécie em diferentes condições ambientais, uma vez que poucos estudos foram feitos.

Devido a produção limitada de sementes, valor econômico e social inegáveis da *A. angustifolia*, é de grande importância a utilização de técnicas aplicadas de caracterização da

diversidade genética dentro da espécie para uso em projetos de conservação. Estudos empregando técnicas moleculares nas populações de espécies naturais podem auxiliar na obtenção de informações valiosas a respeito da organização da variabilidade genética existente, bem como dos fatores que afetam a natureza e a magnitude desta diversidade para que, desta forma, os projetos de conservação e uso sustentável dos ecossistemas florestais tenham êxito (SZMIDT, 1991; POWELL et al., 1995).

### **Marcadores Moleculares**

Diferentes tipos de marcadores moleculares têm sido desenvolvidos e aplicados para descrever e medir a variabilidade genética existente em várias espécies de plantas.

Em muitas espécies os níveis de diversidade genética são reduzidos e o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a quantificação dos mesmos é muito importante, tanto para os fins de conservação de espécies como em projetos de melhoramento.

Recentemente, com o advento da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) (SAIKI et al., 1988), novos tipos de marcadores moleculares no nível do DNA têm sido desenvolvidos (POWELL, 1995). Os marcadores moleculares baseados na reação de PCR apresentam a vantagem de requererem baixas quantidades de DNA que não necessita ser altamente purificado, são técnicas simples e relativamente rápidas. Pela rapidez e conveniência os marcadores moleculares baseados em PCR permitem a análise de grande quantidade de indivíduos quando comparada com outras técnicas e muitas das metodologias utilizadas já estão com protocolos amplamente testados e desenvolvidos para muitas espécies.

Marcadores moleculares no nível do DNA de organelas, como os cloroplastos e as mitocôndrias, tem sido utilizados em estudos da diversidade genética em um grande número de espécies, tais como a análise de restrição e mais recentemente, com a técnica de PCR-RFLP. Esta técnica consiste da digestão dos produtos da PCR por enzimas de restrição de corte freqüente, originando perfis eletroforéticos variáveis para indivíduos de populações diferentes quando os genomas citoplasmáticos apresentam polimorfismos (PALMER, 1985, 1987; WANG e SZMIDT, 1993; KORMUTAK et al., 1993; BYRNE e MORAN, 1994; SZMIDT et al., 1996; KRUPKIN et al., 1996; GUO et al., 1996; CLAYTON, 1996; LEVY et al., 1996; PARDUCCI e SZMIDT, 1999).

## Genoma de Cloroplastos em Coníferas

O genoma de cloroplastos, principalmente, em relação a outros genomas eucariontes apresenta um modelo evolutivo único e conservativo, o que o torna uma ferramenta útil para propostas filogenéticas, levando-se em consideração as variações intraespecíficas, estudos de fluxo gênico (PALMER, 1985, 1987; HARRIS e INGRAM, 1991; McCAULEY, 1994; LATTA et al., 1998;) e estudos de diferenciação populacional dentro de espécies (PALMER, 1987; HARRIS e INGRAM, 1991; TABERLET et al., 1991; SZMIDT e WANG, 1993; PETIT et al., 1993; KORMUTÁK et al., 1993; WANG e SZMIDT, 1993; TSUMURA et al., 1994; BERGQVIST et al., 1995; VICARIO et al., 1995; ZUNK et al., 1996; KRUPKIN, et al., 1996; SZMIDT et al., 1996; OROZCO-CASTILHO et al., 1996; PARDUCCI e SZMIDT, 1999).

Estes genomas são moléculas circulares e apresentam pouca variação de tamanho (120 - 217 Kb) e muita desta variação está associada com uma grande duplicação invertida que é característica de todos DNAs de cloroplastos, com exceção de um grupo de leguminosas (PALMER, 1985 e 1987).

SZMIDT (1991) e WAGNER et al. (1989) sugeriram que o genoma dos cloroplastos em coníferas apresenta características únicas quando comparado ao de outras plantas, pois não há a ocorrência de estruturas repetidas invertidas, é herdado paternalmente em várias espécies (NEALE et al., 1989; DONG e WAGNER, 1994; OWENS, 1990, 1991), carrega uma duplicação do gene psbA, o arranjo geral dos genes é diferente do encontrado em outras espécies e que uma ampla extensão taxonômica das coníferas não apresenta um dos elementos repetidos invertidos (LIDHOLM et al., 1988; RAUBESON e JANSEN, 1992; HIPKINS et al., 1994).

Mudanças na complexidade de regiões existentes no genoma são originadas por mutações de tamanho extremamente curtas, que representam adições ou deleções de novas seqüências (PALMER, 1985 e 1987; CLEGG, 1993, 1994). Cinco gêneros diferentes de coníferas foram analisados por hibridização molecular utilizando a técnica descrita por Southern (1975) e todas as espécies dentro dos cinco gêneros analisados mostraram que os genes 16S e 23S não são duplicados. Esta conclusão surgiu quando os fragmentos obtidos

de uma região isolada de DNA de cloroplasto contendo o gene 16S, foram clonados e seqüenciados (LIDHOLM et al., 1988; RAUBESON e JANSEN, 1992).

A taxa de substituição de nucleotídeos é baixa e sua taxa de evolução estrutural é semelhante ao DNA mitocondrial de animais e difere drasticamente da taxa de rearranjos de DNA mitocondrial de plantas (WOLFE, 1987; CLEGG, 1993, 1994). Assim, sua baixa taxa de rearranjos internos permite uma comparação dos genomas de cloroplastos por métodos simples como RFLP sem uso de southern blot (PALMER, 1987) e também por PCR-RFLP (WANG e SZMIDT, 1994; DEMESURE et al., 1994; McCAULEY, 1994; DUMOLIN-LAPEGUE et al., 1995; VICARIO et al., 1995; ZIEGENHANGEN et al., 1995; DEMESURE et al., 1996; ZIEGENHANGEN et al., 1996; DUMOLIN-LAPEGUE et al., 1997; BUCCI et al., 1998; LATTA et al., 1998; PARDUCCI e SZMIDT, 1999).

Na técnica de PCR-RFLP, a reação de amplificação utiliza iniciadores específicos para regiões conservadas do DNA de cloroplastos que são flanqueadoras de regiões variáveis, gerando produtos que posteriormente são clivados por enzimas de restrição que podem gerar diferenças nos perfis de restrição, geralmente, com enzimas de restrição de corte freqüente (TABERLET et al., 1991). Tais diferenças, reveladas por esta técnica são do tipo inserções e ou deleções e ganhos ou perdas de sítios de restrições, devido a mutações de ponto.

Uma hipótese aceita até bem pouco tempo admitia que, devido a baixa taxa total de alterações no DNA dos cloroplastos, principalmente no nível de seqüências de nucleotídeos, fazia deste genoma uma ferramenta valiosa para estudos em nível de espécie e acima, mas pouco valioso em relação ao nível populacional. Contudo, recentemente, WANG e SZMIDT (1994) encontraram níveis de polimorfismo nos genomas de cloroplastos nas populações de *Picea densata* mais elevados do que o nível de polimorfismo isoenzimático, possibilitando a diferenciação das mesmas. Contudo, os mesmos autores não encontraram nenhuma diferenciação e polimorfismos em populações de *P. tabulaeformis*, *P. yunnanensis* e *P. massoniana*.

Outros exemplos, seriam os resultados obtidos com populações de *Eucalyptus nitens*, por BYRNE e MORAN (1994), onde os autores sugeriram uma alta taxa de diferenciação entre populações e regiões, provavelmente, devido a disjunção das populações, efeitos de deriva genética e efeitos de isolamento. PARDUCCI e SZMIDT

(1999) analisando, através das técnicas de PCR-RFLP, algumas espécies do gênero *Abies* (da família das Pináceas) encontraram variações intra e interspecíficas em dez diferentes regiões do genoma, codificadoras e não codificadoras, em todas as espécies testadas. HOOGLANDER e colaboradores (1993) também encontraram variações de sítios de restrição, que originaram pequenas mutações de peso intraspecíficas no genoma de cloroplastos de espécies de *Plantago spp.*, que discriminaram subespécies de *P. major* (*ssp. major* e *ssp. pleiosperma*). Os autores utilizaram estas variações para sugerirem que na Dinamarca ocorreu uma introgressão de genes, via cloroplastos, da subespécie *pleiosperma* para a subespécie *major* e encontraram variações entre e dentro de populações de *P. lanceolata* e *P. media*.

Devido a sua herança paternal, é útil na determinação de efeitos recíprocos, linhagens patriarcais e sistemas de cruzamento sexual, especialmente nas coníferas (SZMIDT, 1991; ZIEGENHAGEN et al., 1995). Além do seu uso em estudos de fluxo gênico (McCAULEY, 1994; LATTA et al., 1998).

Recentemente, grande atenção têm sido dada para as variações intraespecíficas do DNA dos cloroplastos, tanto em angiospermas, bem como em gimnospermas, no caso coníferas (ALI et al., 1991; WAGNER et al., 1992; DONG et al., 1993; HONG et al., 1993; TSUMURA et al., 1994; BOSCHERINI et al., 1994; VICARIO et al., 1995; ZIEGENHAGEN et al., 1995; CATO e RICHARDSON, 1996; LATTA e MITTON, 1997; ECHT et al., 1998; BUCCI et al., 1998; VENDRAMIN et al., 1998, 1999; PARDUCCI e SZMIDT, 1999). Estes polimorfismos intraespecíficos podem se tornar uma ferramenta metodológica útil para investigações genéticas e ecológicas nas espécies florestais (WAGNER, 1992; ZIEGENHAGEN et al., 1995), pois estes polimorfismos podem auxiliar no estudo do fluxo gênico parental (herança uniparental) entre as populações (McCAULEY, 1994; LATTA et al., 1998), em tópicos evolutivos relacionados com a história da espécie, tais como migrações glaciais e pós-glaciais (PETIT et al., 1993; ZIEGENHAGEN et al., 1995; VENDRAMIN, 1998, 1999).

### **Análise da diversidade genética**

A análise da diversidade genética de populações naturais com base em variações nos genomas de organelas, como cloroplastos e mitocôndrias, requer a estimativa de índices

específicos, uma vez que os genomas organelares não têm cromossomos homólogos (neste caso seriam haplóides) e não sofrem recombinação. Uma das metodologias que vem sendo empregada na análise da diversidade de populações subdivididas, no conceito de Nei, baseia-se na estimativa de índices de diversidade  $h_T$ ,  $h_S$  e  $G_{ST}$ , a partir de variações que ocorrem em cloroplastos (PONS e PETIT, 1995). Para a estimativa de tais índices, os autores desenvolveram o programa HAPLODIV.

Além destes, com haplótipos de cloroplastos é possível estimar tanto o índice padrão de diversidade genética como o índice molecular. O índice padrão de diversidade, que neste caso é equivalente a heterozigosidade esperada ( $H$ ; NEI, 1987) para dados diplóides, é definida como a probabilidade de dois haplótipos casualmente escolhidos serem diferentes dentro da amostragem (SCHNEIDFR et al., 1997). O índice molecular, denominado de número médio de diferenças entre pares de haplótipos dentro da amostra ( $\pi$ ), tem como base o número de mutações ocorridas desde a divergência dos haplótipos e a frequência dos mesmos na população (TAJIMA, 1993).

Uma segunda abordagem, desenhada para estudar a estrutura genética de populações, bastante utilizada em coníferas, é a Análise Molecular da Variância (AMOVA: EXCOFFIER et al., 1992). Este método analítico tem o formato de uma análise de variância que possibilita estimar o grau da subdivisão genética intraespecífica.

Segundo os autores, a AMOVA, que é uma extensão dos trabalhos de Cockerham e outros, e utiliza-se do fato de que uma soma dos quadrados convencional pode ser escrita como a soma dos quadrados das diferenças entre todos os pares de observações. Este modelo emprega os componentes de diversidade dentro de populações, entre populações dentro de grupos, e entre grupos, de modo hierarquizado, diretamente da matriz dos quadrados das distâncias entre os pares de haplótipos. Esta análise estima a correlação alélica entre demes, lavando em conta o número de mutações entre os haplótipos moleculares. O método de análise permite que diferentes suposições possam ser impostas ao processo de diferenciação entre os haplótipos, de maneira que possam ser traduzidas em diferentes matrizes de distância, as quais não requerem nenhuma mudança nas estruturas das análises subsequentes. Quando todas as distâncias entre os haplótipos são presumivelmente iguais, a AMOVA é equivalente a uma análise de variância multi-alélica

(multivariada). Alternativamente, pode-se utilizar a média do número dos diferentes sítios de restrição como uma medida de distância entre os haplótipos.

A estrutura da análise é semelhante às estatísticas F de WRIGHT (1965), mas permite o uso para análise de genomas haplóides, o que possibilita o seu emprego para análise de um arranjo de medidas de correlações haplotípicas, chamadas de estatísticas  $\phi$  (EXCOFFIER et al., 1992), onde  $\phi_{ST}$  é a correlação dos haplótipos casuais dentro das populações, relativos aos pares casuais dos pares de haplótipos retirados de dentro da espécie como um todo.  $\phi_{CT}$  é a correlação dos haplótipos casuais dentro de um grupo de populações em relação aos pares casuais de haplótipos retirados de uma espécie e  $\phi_{SC}$  é a correlação da diversidade molecular dos haplótipos casuais dentro das populações em relação aos pares casuais de pares de haplótipos retirados de uma região..

As limitações impostas pelas pressuposições das estatísticas  $\phi$  são as mesmas que aquelas para as estatísticas F, uma vez que tais pressuposições (amostragem casual para criar as subdivisões a cada nível, deriva e ausência de fluxo gênico) dificilmente são satisfeitas nas populações naturais.

## JUSTIFICATIVA

A Floresta Ombrófila Mista (Floresta de Araucárias ou Floresta de Coníferas Sazonal Subtropical) é um dos biomas mais importantes do Sul do Brasil. Com o crescimento populacional, demanda por terras para a agricultura, além da extensiva extração da madeira de araucária, a floresta foi extensivamente derrubada e atualmente, restam apenas 1 % da área original, o que a remete para a categoria de vulnerável (GUERRA et al., 1999).

Durante o processo de exploração, a floresta que era contínua foi fragmentada e as populações remanescentes estão isoladas em ilhas, processo que provavelmente levou a erosão genética da espécie. Por esta causa, o conhecimento da diversidade genética e sua distribuição dentro das populações, poderá ser útil na definição de estratégias de conservação da espécie e do bioma.

Contudo, esta espécie apresenta potencial econômico que ainda não foi adequadamente explorado. Trata-se da produção de madeira, pinhão e sua função ecológica. No primeiro caso, poucos estudos foram feitos. Num deles, a produção de madeira foi igual a de pinus (Roberto Pedrobom, comunicação pessoal). No caso da produção de pinhões, ainda não é conhecido nem a quantidade, nem a rentabilidade da atividade, embora, milhares de famílias no sul do Brasil, se dedicam a esta atividade. Por último, esta espécie desempenha uma função ecológica, que ainda não foi profundamente estudada.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos Gerais do Projeto:**

Caracterizar a variabilidade genética em regiões não codificadoras dos genomas de cloroplasto de *A. angustifolia* em populações naturais do Estado de Santa Catarina, utilizando a reação de PCR seguida por RFLP. Com este estudo, espera-se conhecer melhor a diversidade desta espécie, o que poderá ser útil na definição de estratégias de conservação e melhoramento genético no futuro, que visam o aproveitamento do potencial desta espécie acima mencionado.

### **Objetivos Específicos do Projeto:**

- 1) Verificar a utilidade dos marcadores moleculares no nível organelar para utilização em estudos da caracterização genética das populações naturais de *A. angustifolia*.
- 2) Verificar a existência de cloroplastos nos megagametófitos e embriões nos pinhões de *A. angustifolia*.
- 3) Estimar índices de diversidade entre e dentro de populações naturais de *A. angustifolia*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## AMOSTRAS

Os tecidos foliares de indivíduos adultos de oito populações naturais (n = 12-20) de *A. angustifolia* no Estado de Santa Catarina foram coletados nas áreas denominadas: Parque Municipal de Lages (PML / n = 12), Floresta Nacional de Três Barras (FTB / n = 20), Fazenda Rancho Alegre - Lages (FRA / n = 16), EPAGRI - Caçador (ECA / n = 18), Fazenda Guamirim Gateado (FGG / n = 18), Reserva do Caraguatá - Antônio Carlos (RAC / n = 18), Fazenda Amola Faca - Lages (FAF / n = 19) e de indivíduos da Serra de Curitiba (CUR / n = 20) e cada indivíduo foi identificado com as iniciais das localidades onde foram coletados adicionadas de um número que representa a ordem de coleta dos indivíduos nas populações dentro das localidades.

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV)-CCA/UFSC, das quais foi extraído o DNA total, de acordo com FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1995), onde 300 mg dos tecidos foliares foram macerados, em tubos eppendorff, em presença de nitrogênio líquido, sendo em seguida, misturados por vortex a 700 µl de tampão de extração (2% de CTAB, 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA, 100 mM de Tris pH 8, 0,2% de 2 β-mecaptoetanol e 1% de Polivinilpirrolidona). Os tubos contendo a mistura do material celular e solução de extração foi deixada em banho-maria 65°C, para lise celular e extração do DNA, em torno de 2 horas e durante este processo a mistura foi agitada a cada 15 minutos.

Em seguida os tubos foram retirados do banho-maria e deixados esfriar até temperatura ambiente e então, foram adicionados a cada tubo 600 µl da solução clorofórmio - álcool isoamílico 24:1). Os tubos foram agitados durante 5 minutos e centrifugados, em seguida, por 5 minutos a 13000 rpm.

Quatrocentos microlitros (400 µl) da fase aquosa (fase superior) de cada um dos tubos foi recuperada e colocada em um novo tubo e a esta foram adicionados 2/3 de seu volume de álcool isopropílico gelado (-20°C), a solução foi misturada lentamente por inversão para precipitação do DNA e os tubos foram colocados em um freezer (-20°C) por 1 hora para acelerar a precipitação dos ácidos nucleicos.

Os tubos foram retirados do freezer e centrifugados por 5 minutos a 6000 rpm para formar um precipitado ("pellet"), após a centrifugação o álcool isopropílico foi totalmente

retirado e o precipitado lavado com álcool etílico 70% por 3 minutos. O processo de lavagem com álcool etílico foi repetido e o precipitado foi deixado para secar a temperatura ambiente na bancada do laboratório.

O precipitado foi dissolvido em 400 µl de água bidestilada autoclavada e após a dissolução completa do precipitado foram adicionados, ao mesmo tubo, 400 µl de uma solução de fenol/clorofórmio (24:1). Em seguida, a solução foi centrifugada a 13000 rpm e 350 µl da fase aquosa (fase superior) foi recuperada e transferida a um novo tubo. A esta foram adicionados 2/3 do volume de álcool isopropílico gelado, a mistura foi agitada lentamente por inversão e colocada por 1 hora no freezer (-20°C).

Os tubos foram retirados do freezer e centrifugados por 5 minutos a 6000 rpm para precipitar o DNA. Em seguida, o álcool isopropílico foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com álcool etílico 70%. Após a lavagem com álcool etílico, o precipitado foi deixado na bancada para secar e após seco, foi dissolvido em 200 µl de solução de tampão TE pH 7,8.

O DNA foi em seguida submetido a uma corrida em gel de agarose 0,8% por 1 hora para verificar sua qualidade e para ser quantificado em comparações com diferentes concentrações de DNA de fago Lambda conhecidas, geralmente 20, 50, 100 e 250 ng.

A quantidade de DNA total obtida das extrações dos tecidos foliares de *A. angustifolia* foi sempre em torno de 400 a 600 ng.

Além dos tecidos foliares, foram extraídos DNAs de megagametófitos e embriões de pinhas coletadas na região de Lajes, utilizadas em estudos anteriores em nosso laboratório e o método de extração foi o mesmo utilizado nos tecidos foliares. Sendo que as concentrações de DNA obtidas foram de 500ng nos tecidos do megagametófitos e 300 a 600 ng nos tecidos embrionários.

Após a quantificação os DNAs foram diluídos em água bidestilada até uma concentração de 5 ng por µl e utilizados imediatamente ou guardados em freezer (-20°C) até uso posterior.

O DNA de uma árvore de *Pinus taeda* foi extraído e utilizado como controle positivos nas reações de PCR, quando o par de iniciadores AF (TABERLET et al., 1991) foi utilizado.

## REAÇÕES PCR-RFLP DO GENOMA DE CLOROPLASTOS

Os iniciadores para a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) foram desenhados segundo, TABERLET et al. (1991), DEMSURE et al. (1994) e DUMOLIN-LAPEGUE (1996) com base nas sequências do genoma de cloroplastos do Tabaco, *Marcanthia polimorpha* e do arroz, após alinhamento das seqüências. Os iniciadores foram desenhados preferencialmente dentro de regiões conservadas dos genes dos RNAs transportadores que flanqueiam regiões não codificadoras, na região Cópia Única Grande (Large Single Copy, LSC), que é caracterizada por uma alta taxa de substituições (DEMASURE et al., 1994, 1995).

As condições de reação da Reação da Polimerase em Cadeia foram: 1 ciclo de 3 minutos a 94°C para a desnaturação do DNA, em seguida 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto com as temperaturas de anelamento variando com os 17 iniciadores utilizados (Tabela 2), 2 a 4 minutos a 72°C, também dependente do tamanho do fragmento a ser amplificado e 10 minutos a 72°C para a finalização das reações. As reações foram feitas em um termociclador (MJ, CT, USA), em um volume final de reação de 50 µl (tampão 2x [acompanha enzima], 2 µM de cada iniciador, água bidestilada, 0,5 U Taq polimerase, 5 mM de dNTPs e 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e 50 ng de DNA total.

Dez microlitros do produto das reações da PCR foram digeridos por 1 hora e 30 minutos ou por uma noite inteira em estufa, cujas temperaturas variaram de 37 a 62°C, dependendo da enzimas de restrição utilizada, em um volume final de reação de digestão de 15 µl, contendo 0,3 µl (5U) de enzimas de restrição, 1,5 µl de tampão da enzima e água bidestilada autoclavada completando o volume final. No presente trabalho foram utilizadas oito enzimas de restrição em testes preliminares, a saber: *Hinfl*, *HindIII*, *RsaI*, *HaeIII*, *TaqI*, *BamHI*, *KpnI* e *EcoRI*. Após a digestão, a reação foi resolvida em um gel de poliacrilamida a 8% [água 26,25 ml, 7,5 ml de acrilamida 40%, 3,75 ml TBE 10x, 180 µl de persulfato de amônia 10% e 30 µl de TEMED] em um aparato vertical de eletroforese (BIORAD). As condições das reações de PCR, digestão e eletroforese dos produtos da PCR foram de 50 V por 30 minutos, seguidos de 2 a 3 horas a 200 V (DEMASURE et al., 1994).

A coloração por nitrato de prata foi feita de acordo com BASSAM et al. (1991), onde após a eletroforese, o gel foi colocado por 20 minutos em uma solução fixadora contendo ácido acético a 0,5% e etanol a 10%. Após fixação, o gel foi submetido a uma

impregnação com nitrato de prata (0,2 g em 200 ml) por 10 minutos, em seguida o mesmo foi lavado em água por 20 segundos e então, houve a revelação com uma solução contendo NaOH (3g/100 ml) e formaldeído (0,6 ml/100 ml). Para interromper o processo de coloração foi utilizada uma solução de parada da revelação, que é a solução fixadora (ácido acético a 0,5% e etanol a 10%), por no mínimo 5 minutos. Em seguida, o gel foi fotografado ou escaneado em um escaner tipo TCE S 510.

## **ANÁLISE DOS DADOS**

As combinações dos polimorfismos encontrados nas diferentes regiões não codificadoras dos cloroplastos e digeridas por enzimas de restrição foram consideradas como diferentes haplótipos. As frequências dos haplótipos em cada população foi estimada por  $p_i = x_i/n$ , onde  $x_i$  e  $n$

Os índices de diversidade genética propostos por PONS e PETIT (1995),  $h_S$ ,  $h_T$  e  $G_{ST}$ , foram computados com o programa HAPLODIV (PONS e PETIT, 1995) com os índices sendo calculados como:

$$h_S = 1 - \sum_i (p_i^2 + V_i),$$

$$\text{sendo } V_i = E p_{ki}^2 - p_i^2,$$

onde  $p_{ki}$  é frequência do haplótipo,  $p_i$  sua esperança e  $V_i$  a variância;

$$h_T = 1 - \sum_i p_i^2 \text{ e}$$

$$G_{ST} = \sum_i V_i / h_T.$$

Equivalente a heterozigosidade esperada em diplóides, o índice padrão da diversidade genética  $H$  (NEI, 1987) foi estimada, juntamente com sua variância  $V_{(H)}$ , com auxílio do programa Arlequin, versão 1.1. (SCHNEIDER et al., 1997) como:

$$H = (n/n) - 1(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2),$$

onde  $n$  é o número de cópias dos genes na amostra (indivíduos nos dados haplóides),  $k$  é o número de haplótipos e  $p_i$  é a frequência do haplótipo  $i$ th na amostra (SCHNEIDER et al., 1997).

O índice molecular, que representa o número médio de diferenças entre todos os pares de haplótipos na amostra ( $\pi$ ; TAJIMA, 1993), foi calculado como:

$$\pi = \sum_{i=1}^k \sum_{j < i} p_i p_j d_{ij},$$

onde  $d_{ij}$  é uma estimativa do número de mutações tendo ocorrido desde a divergência dos haplótipos  $i$  e  $j$ ,  $k$  é o número de haplótipos e  $p_i$  ou  $p_j$ , é a frequência dos haplótipos  $i$  ou  $j$ .

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992), foi realizada com auxílio do programa Arlequin, versão 1.1 (SCHNEIDER, 1997) conforme modelo inserido na Tabela 1.

Neste caso, os indivíduos foram arranjados em populações e as populações arranjadas dentro de grupos definidos a priori em critérios não genéticos, empregando-se o modelo linear (EXCOFFIER et al., 1992):

$$p_{jig} = p + a_g + b_{ig} + c_{jig},$$

onde  $p_{jig}$  indexa o cromossomo  $j$ th, aqui equivalente ao indivíduo  $j$ th ( $j = 1, \dots, N_{ig}$ ) na população  $i$ th ( $i = 1, \dots, I_g$ ) no grupo  $g$ th ( $g = 1, \dots, G$ ), e  $p$  é a esperança desconhecida de  $p_{jig}$ , a média sobre todo o estudo. Os efeitos são  $a$  para o grupo,  $b$  para a população e  $c$  para os indivíduos dentro das populações. Os efeitos são assumidos ser aditivos, casuais, não correlacionados e têm  $\sigma_a^2$ ,  $\sigma_b^2$  e  $\sigma_c^2$  como componentes de variância associados (o quadrado dos desvios esperados).

Para cada escolha de partição hierárquica para  $N$  indivíduos dentro dos estratos, escreve-se;  $SSD_{(TOTAL)} = SSD_{(ENTRE ESTRATOS)} + SSD_{(DENTRO DOS ESTRATOS)}$ , designada como AMOVA. Pode-se então subdividir a soma total dos quadrados dos desvios,  $SSD_{(TOTAL)}$ , em componentes para a variação dentro das populações, na variação entre as populações dentro de grupos regionais e na variação entre os grupos (Tabela 1). Os graus de liberdades representam a média do tamanho das amostras para os níveis de hierárquicos particulares, permitindo um número de amostras desigual. Os componentes de variância para cada nível hierárquico são extraídos pela equação das médias dos quadrados das suas esperanças.

A estimativa das estatísticas  $\phi$  foi feita com base nas equações definidas por EXCOFFIER et al. (1992):

$$\sigma_c^2 = (1 - \phi_{ST}) \sigma^2,$$

$$\sigma_b^2 = (\phi_{ST} - \phi_{CT}) \sigma^2 \text{ e}$$

$$\sigma_a^2 = \phi_{CT} \sigma^2,$$

$$\text{onde } \sigma^2 = \sigma_a^2 + \sigma_b^2 + \sigma_c^2.$$

$\phi_{ST}$  é a correlação dos haplótipos casuais dentro das populações, relativos aos pares casuais dos pares de haplótipos retirados de dentro da espécie como um todo.  $\phi_{CT}$  é a correlação dos haplótipos casuais dentro de um grupo de populações em relação aos pares casuais de haplótipos retirados de uma espécie e  $\phi_{SC}$  é a correlação da diversidade molecular dos haplótipos casuais dentro das populações em relação aos pares casuais de pares de haplótipos retirados de uma região.

Estas estatísticas  $\phi$ , podem ser reescritas, segundo EXCOFFIER et al. (1992) como:

$$\phi_{ST} = (\sigma_a^2 + \sigma_b^2) / \sigma^2,$$

$$\phi_{CT} = \sigma_a^2 / \sigma^2 \quad e$$

$$\phi_{SC} = \sigma_b^2 / (\sigma_b^2 + \sigma_c^2).$$

Muita discussão tem surgido sobre os métodos utilizados para testar a significância dos componentes de variância. O método requerido para as menores suposições é análise da distribuição nula para cada um dos componentes de variância. Sobre a hipótese nula, as amostras são consideradas como retiradas da população global, com a variação devida a amostragem casual para a construção das populações. Para se obter a distribuição nula, cada indivíduo é alocado de uma população escolhida casualmente, enquanto o tamanho esperado das amostras constantes em cada valor. Esta quantidade de permutação casual das linhas e das colunas correspondentes da matriz de distancia dos quadrados. Os componentes de variância são estimados de um grande número de matrizes permutadas (1000). O teste de permutação é utilizado no programa Arlequin para testar a distribuição nula e a significância de  $\phi_{ST}$  e  $\sigma_c^2$ . Dois outros esquemas de permutação são úteis, o primeiro assume que as regiões são realmente reais, mas as populações dentro delas não são, permutando-se indivíduos dentro de grupos regionais sem considerar a população, um procedimento usado para obter a distribuição nula para  $\phi_{SC}$  e  $\sigma_b^2$ . O segundo assume que as populações são reais e os grupos regionais não, permutando-se todas as populações dentro dos grupos, com o tamanho dos grupos variando em cada corrida permutacional.

Para a análise de variância molecular (AMOVA) as populações foram agrupadas por localização geográfica em 6 grupos, grupo 1 população Serra de Curitiba, grupo 2 população Floresta Nacional de Três Barras, grupo 3 populações Fazenda Amola Faca, Parque Municipal de Lages e Fazenda Rancho Alegre, grupo 4 população EPAGRI

Caçador; grupo 5 Fazenda Guamirim Gateados e grupo 6 população Reserva do Caraguatá, Antônio Carlos.

Tabela 1 - Análise da Variância Molecular hierarquizada (AMOVA) segundo EXCOFFIER et al. (1992).

Causas da variação	GL	Quadrados Médios	Quadrados Médios Esperados
Entre regiões (ER)	$G - 1$	$QM_{ER}$	$\sigma_c^2 + n'\sigma_b^2 + n''\sigma_a^2$
Entre populações dentro de regiões (EP/DG)	$\sum_{g=1}^G I_g - G$	$QM_{EP/DG}$	$\sigma_c^2 + n'\sigma_b^2$
Entre indivíduos dentro de populações (DP)	$N - \sum_{g=1}^G I_g$	$QM_{DP}$	$\sigma_c^2$
Total	$N - 1$		

## RESULTADOS

### AMPLIFICAÇÕES

Nas reações de amplificação das regiões não codificadoras dos cloroplastos de *A. angustifolia* foram testados dezessete pares de iniciadores e somente seis pares originaram produtos que foram utilizados nos estudos da diversidade genética nas oito populações amostradas.

Outro resultado relevante foi obtido com o par de iniciador AF, região entre os genes *trnT* e *trnF* (TABERLET et al., 1991), que amplificou com sucesso uma região de 1500 pb em todas as espécies de coníferas utilizadas em outros estudos (ZIEGENHAGEN et al., 1995 e 1996; PARDUCCI e ZSMIDT, 1999), mas foi incapaz de apresentar produtos após amplificação por PCR com o DNA de *A. angustifolia*.

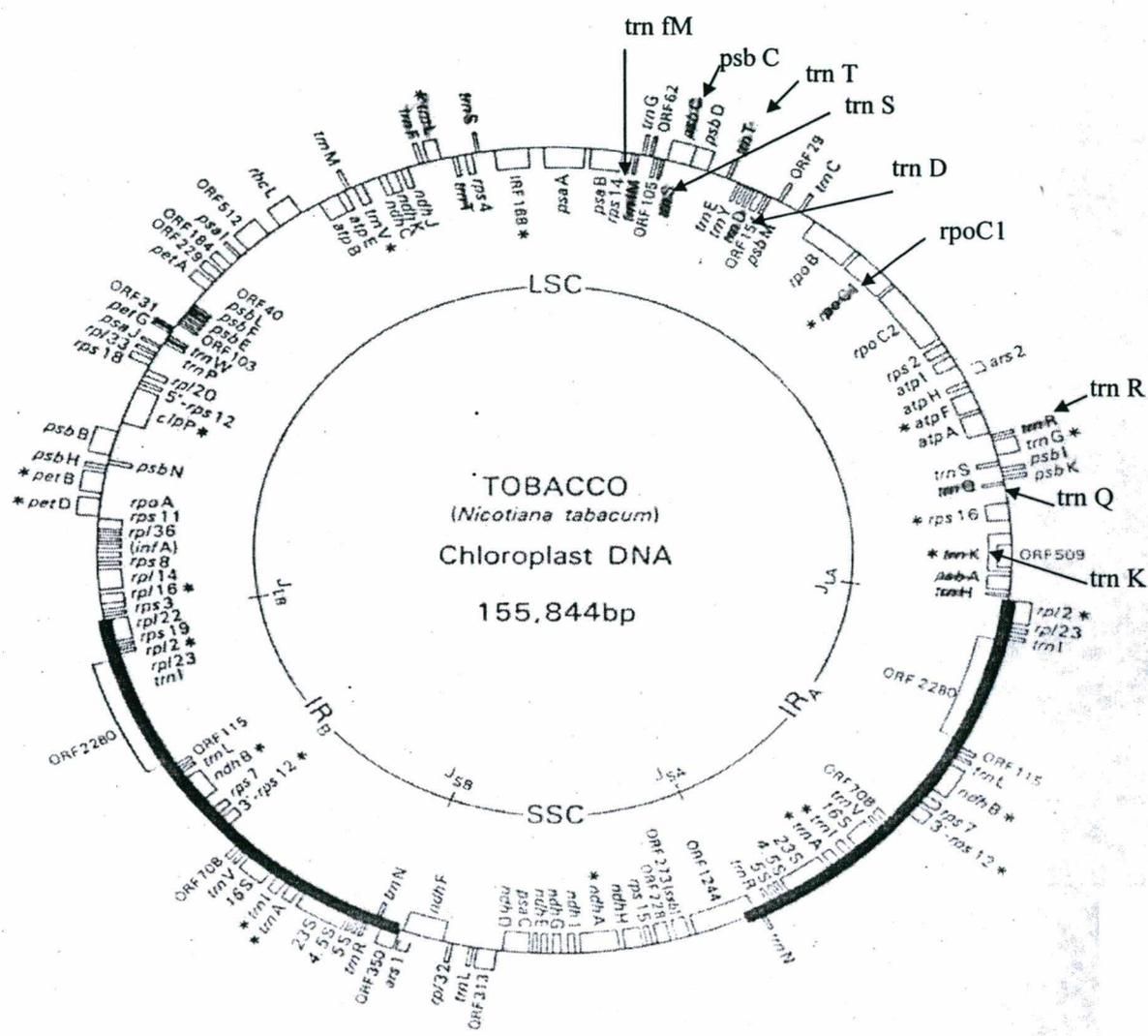
Foram amplificados com os seis pares de iniciadores um total de 12 Kb o que representa apenas 10,2 % do tamanho total do genoma de cloroplastos das coníferas, assumindo-se que este tenha em média 120 Kb (WAKASUGI et al., 1994)..

As seqüência dos iniciadores utilizados, suas temperaturas de anelamento, o tamanho dos produtos da reação da PCR esperados, com base nas seqüências das espécies que foram desenhados, e o tamanho do produto obtido em *A. angustifolia* são mostrados na Tabela 2 e Figura 1.

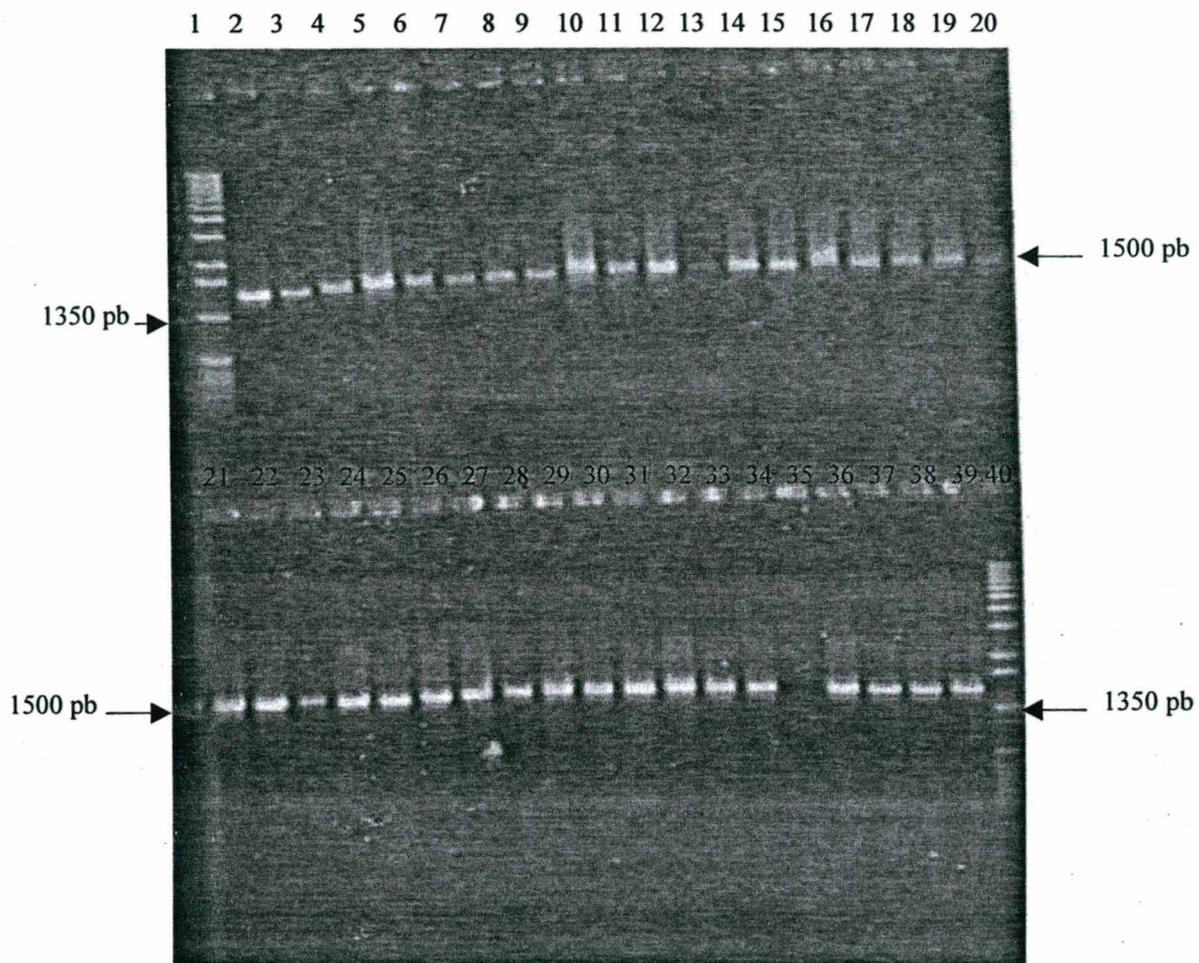
Os produtos das reações de PCR com os seis iniciadores obtidos com DNA de *A. angustifolia* mostraram-se monomórficos em géis de agarose 1%, para todos os indivíduos que apresentaram produtos após amplificação como mostrado na Figura 2.

Os resultados da amplificação dos megagametófitos e embriões com o par de iniciadores CS mostrou a existência de genomas de cloroplastos em ambos tecidos (Figura 3).

Alguns dos produtos obtidos com os DNAs de *A. angustifolia* nas reações de PCR são ligeiramente diferentes em relação aos tamanhos esperados dos produtos das espécies de onde os iniciadores foram originados (Tabela 2) e de outros estudos que utilizaram estes iniciadores anteriormente (ZIEGENHAGEN et al., 1995, 1996; PARDUCCI e ZSMIDT, 1999; MARCHELLI et al., 1998). Isto sugere a existência de algumas diferenças de tamanho nas seqüências das regiões amplificadas em todas as espécies estudadas. Além deste fato, os produtos resultantes da reação de PCR em *A. angustifolia* mostraram-se como bandas

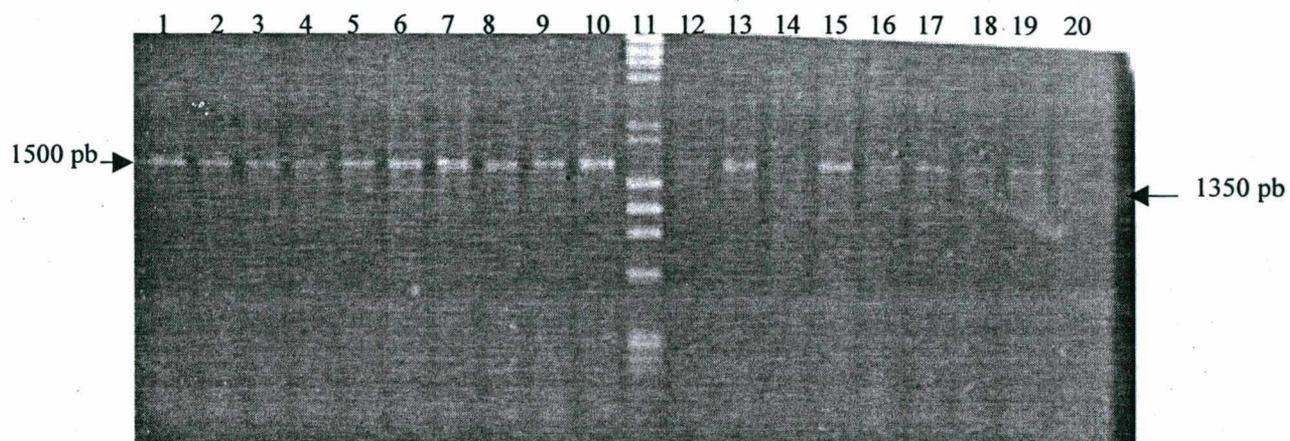


**Figura 1** - Mapa genético do cloroplasto de Tabaco. São destacadas as regiões onde são ancorados alguns dos iniciadores das regiões não codificadoras utilizados neste estudo (SUGIURA, 1992).



**Figura 2** - Resultados das amplificações dos DNAs extraídos dos tecidos foliares de *Araucária angustifolia* com o par de iniciadores DT.

- Linha 1 = Padrão de peso molecular Lambda *Hind* III / *Hae* III (1350pb).
- Linha 2 a 4 = Indivíduos da população RAC.
- Linha 5 a 12 = Indivíduos da população FTB.
- Linha 13 = Indivíduo da população PML.
- Linhas 14 a 20 = Indivíduos da população FGG.
- Linha 21 a 26 = Indivíduos da população FRA.
- Linha 27 a 33 = Indivíduos da população CUR.
- Linha 34 a 39 = Indivíduos da população FAF.
- Linha 40 = Padrão de peso molecular Lambda *Hind* III / *Hae* III (1350pb).



**Figura 3** - Resultado das ampliações dos DNAs de embriões e megagametófitos de *Araucaria angustifolia* com o par de iniciadores CS.  
 Linhas 1 a 10 = Amplificado do DNA extraído dos embriões de *Araucaria angustifolia*.  
 Linha 11: Marcador molecular Lambda *Hind* III / *Hae* III. Está indicado um fragmento de 1530 pb do marcador molecular.  
 Linhas 12 a 20 = Amplificado do DNA extraído dos megagametófitos de *Araucaria angustifolia*.

únicas, ou seja, não foram encontrados mais de uma banda nos géis de agarose 1% corados com brometo de etídio e fotografados em UV. Anteriormente, MARCHELLI et al. (1998), utilizando os mesmos dezesseis pares de iniciadores usados neste trabalho, com exceção do par AF, detectaram para a espécie *Nothofagus nervosa*, em gel de agarose após a amplificação, dois fragmentos para produtos do par de iniciadores QR, e três fragmentos para o produtos dos pares de iniciadores K2R e fMA.

**Tabela 2** – Caracterização dos dezessete pares de iniciadores de cloroplastos testados em *A. angustifolia*.

Iniciadores	Seqüência	Região de Anelamento	Temp. de Anelamento (C°)	Tamanho Esperado do Produto (pb)	Tamanho do Produto em <i>A. angustifolia</i> (pb) <sup>a</sup>
K1K2	5'GGGTTGCCCGGACTCGAAC3' 5'CAACGGTAGAGTACTCGGCTTTTA3'	tRNA lys Exon1 e Exon2	57,0	2580	2500
DT	5'ACCAATTGAACTACAATCCC3' 5'CTACCACCTGAGTTAAAAGGG3'	tRNA asp e tRNA thr	54,5	1500	1500
CS	5'GGTCGTGACCAAGAAACCAC3' 5'GGTTCGAATCCCTCTCTCTC3'	prot. psII e tRNA ser	57,0	1590	1600
QR	5'GGGACGGAAGGATTCGAACC3' ATTGCGTCCAATAGGATTTGAA3'	tRNAQ e tRNA <sup>R</sup> r	57,0	3380	2200
AS	5'ACTTCTGGTTCGGCGAACGAA3' 5'AACCACTCGGCCAATCTCTCCTA3'	apoptot. fotsist. I e tRNA ser	58,0	3700	3700
SIM	5'GAGAGAGAGGGATTCGAACC3' 5'CATAACCTTGAGGTCACGGG3'	tRNA ser e tRNA fmet	62,0	1500	1200
HK	5'ACGGGAATTGAACCCGCGCA3' 5'CCGACTAGTCCGGGTTTCGA3'	tRNA his e tRNA lys	62,0	1690	-
CD	5'CCAGTTCAAATCTGGGTGTC3' 5'GGGATTGTAGTTCAATTGGT3'	tRNA cys e tRNA asp	58,0	3000	f <sup>b</sup>
ST	5'CGAGGGTTCGAATCCCTCTC3' 5'AGAGCATCGCATTTTGTAATG3'	tRNA ser e tRNA thr	57,0	1500	F

Tabela 2. Continuação.....

<b>K2Q</b>	5'TAAAAGCCGAGTACTCTACC GTTG3'	tRNA lys Exon2	47,0	3075	-
	5'CTATTCCGGAGGTTCCGAAATCCCTTCC3'	e tmQ			
<b>RpoC1</b>	5'GCACAAAATTCRCCTTTTATRGG3'	rpoC1 e tRNA	47,0	4795	F
<b>C</b>	5'CGACACCCRGATTTGACCTGG3'	cys			
<b>TC</b>	5'GCCCTTTTAACTCAGTGGTA3'	tRNA thr e	52,0	3400	-
	5'GAGCTTGAGAAAGCTTCTGGT3'	psbC			
<b>FMA</b>	5'GAACCCGTGACCTCAAGGTTATG3'	tRNA fmet e	47,0	5108	múltiplas bandas fracas
	5'ATTTCGTTCCGCCGAAC CAGAAGT3'	psaA			
<b>TF</b>	5'CAATTACAAAATGCGATGCTCT3'	tRNA thr e tmF	57,0	1800	-
	5'ATTTGAACTGGTGACACGAG3'				
<b>FV1</b>	5'CTCGTGCACCAGTTCAAAT3'	tmF e tmV1	57,0	3490	-
	5'CCGAGAAGGTCTACGGTTCG3'				
<b>V2L</b>	5'CGAACCGTAGACCTTCTCCGG3'	tmV e rbcL	53,0	3850	-
	5'GCITTTAGTCTCTGTTTGTGG3'				
<b>AF<sup>c</sup></b>	5'CAATTACAAAATGCGATGCTCT3'	tmT e tmF	57,0	1500	-
	5'ATTTGAACTGGTGACACGAG3'				

\* Tamanho dos produtos obtidos por DEMESURE et al. (1994) e DUMOLIN-LAPEGUE et al. (1997).

<sup>a</sup> Tamanhos obtidos em comparação com o padrão de peso molecular  $\lambda$ -HindIII e  $\Phi$ X174 (HaeIII).

<sup>b</sup> Amplificações com bandas fracas.

<sup>c</sup> Nomenclatura de acordo com TABERLET et al., 1991.

### Análise PCR-RFLP

Após reação de amplificação por PCR, os produtos de 3 indivíduos de 4 populações foram submetidos a digestão por 8 enzimas de restrição, *HinfI*, *HindIII*, *RsaI*, *HaeIII*, *TaqI*, *BamHI*, *KpnI* e *EcoRI*. Este ensaio preliminar foi feito para selecionar as enzimas que cortassem e que originassem fragmentos polimórficos entre os indivíduos e entre as populações, em função de perfil de corte. Os resultados deste teste preliminar estão sumarizados na Tabela 3, onde são mostrados os números de fragmentos gerados pelas enzimas que cortaram os seis produtos gerados pela PCR com os seis iniciadores e que foram selecionadas para serem utilizadas para a análise dos demais indivíduos amostrados.

Também na Tabela 3, são mostrados os sítios de corte das enzimas de restrição, o número de fragmentos polimórficos e a temperatura de digestão. As enzimas não geraram fragmentos polimórficos nos 3 indivíduos das 4 populações testadas inicialmente. As enzimas *HindIII*, *BamHI*, *KpnI* e *EcoRI* não cortaram os produtos da PCR e por isto não foram utilizadas nas análises seguintes.

Foram então, selecionadas três enzimas de restrição que cortaram os produtos da PCR cujo perfil possibilitasse a obtenção do maior número de fragmentos possíveis, pois desta forma a probabilidade de encontrar fragmentos polimórficos poderia ser facilitada, uma vez que, grande parte do polimorfismo encontrado na maioria dos estudos com genoma de cloroplastos, é gerado por pequenas inserções e ou deleções (DEMESURE et al., 1994, 1995; El MOUSADIKI e PETIT, 1996). Além disto, também foi levado em consideração na hora da seleção, a disponibilidade das enzimas de restrição no laboratório.

**Tabela 3** – Temperatura de digestão, número de fragmentos obtidos com a digestão dos produtos das regiões não codificadoras de cloroplastos em *A. angustifolia*, digeridos com três enzimas de restrição.

Iniciadores (sigla)	Produto	Enzimas de restrição <sup>a</sup>		Temperatura de Digestão (C°)	N° de Fragmentos
psbC / trnS (CS)	1,65 Kb	<i>Hinf</i> I	5'G/ANTC3'	37	4
		<i>Hae</i> III	5'GG/CC3'	37	3
		<i>Rsa</i> I	5'GT/AC3'	37	5
trnS / trnfM (SfM)	1,2 Kb	<i>Hinf</i> I	5'G/ANTC3'	37	5
		<i>Rsa</i> I	5'GT/AC3'	37	3
		<i>Taq</i> I	5'T/CGA	65	3
psaA / trnS (AS)	3,7 Kb	<i>Hinf</i> I	5'G/ANTC3'	37	7
		<i>Taq</i> I	5'T/CGA	65	8
		<i>Rsa</i> I	5'GT/AC3'	37	5
trnK <sub>1</sub> / trnK <sub>2</sub> (K <sub>1</sub> K <sub>2</sub> )	2,5 Kb	<i>Hinf</i> I	5'G/ANTC3'	37	11
		<i>Rsa</i> I	5'GT/AC3'	37	5
		<i>Taq</i> I	5'T/CGA	65	7
trnQ / trnR (QR)	2,2 Kb	<i>Hinf</i> I	5'G/ANTC3'	37	8
		<i>Taq</i> I	5'T/CGA	65	6
		<i>Rsa</i> I	5'GT/AC3'	37	2
trnD / trnT (DT)	1,4 Kb	<i>Hinf</i> I	5'G/ANTC3'	37	3
		<i>Rsa</i> I	5'GT/AC3'	37	3
		<i>Taq</i> I	5'T/CGA	65	6

<sup>a</sup> Foram incluídas somente as enzimas que cortaram os produtos amplificados.

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos com os indivíduos das oito populações, apresentando produtos amplificados, que foram digeridos com as enzimas de restrição selecionadas no teste preliminar. Nesta tabela estão inseridos o número de indivíduos utilizados, o número de indivíduos apresentando fragmentos polimórficos, o tamanho dos fragmentos polimórficos e a combinação enzimas de restrição produto da PCR que originou os fragmentos polimórficos. Muitos indivíduos foram tomados ao acaso e as reações de digestão foram repetidas duas vezes para verificar a reproducibilidade dos resultados obtidos. Quando repetidas as reações revelaram resultados idênticos aos da primeira reação.

**Tabela 4** – Combinações produtos da PCR e enzimas de restrição, e o tamanho dos fragmentos polimórficos obtidos após digestão.

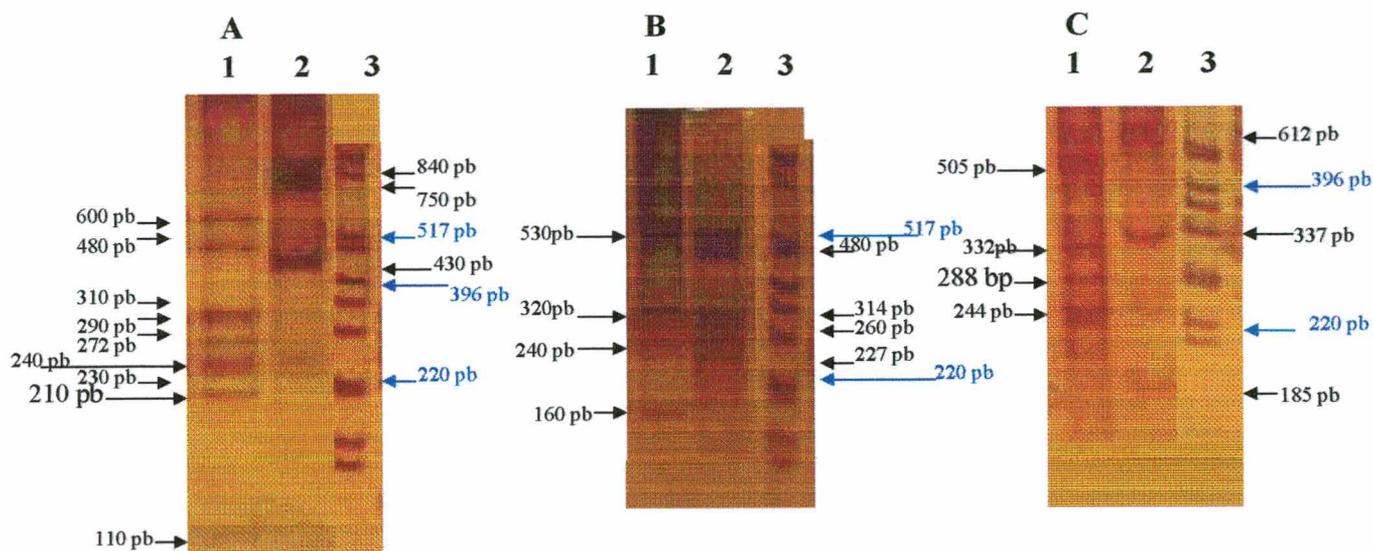
População	N	Produto/ Enzima	Tamanho do(s) Fragmento(s) Polimórfico(s) (pb)
Curitiba (CUR)	20	CS/HinI	111
		CS/RsaI	47
		todas	nenhum
Caçador (ECA)	18	ASHinI	430/750/840
		ASRsaI	219/387681/889/1006
		todas	nenhum
Três Barras (FTB)	20	CS/HinI	111
		CS/RsaI	47
		todas	nenhum
Rancho Alegre (FRA)	16	CS/HinI	111
		CS/RsaI	47
		todas	nenhum
Amola Faca (FAF)	19	CS/HinI	111
		CS/RsaI	47
		QRTaqI	198/216/237/344/504/558
		QR/RsaI	272/356/700/1220
		SfM/HinI	150/190/250/300/548
		todas	nenhum
Lages (PML)	12	todas	nenhum
Guamirim Gateados (FGG)	18	CS/HaeIII	1305/152/77/53
		SfM/TaqI	227/314/260/480
		todas	nenhum
Antônio Carlos (RAC)	18	CS/HinI	111
		CS/RsaI	47
		SfM/HinI	140/178/267/625
		SfM/TaqI	244/288/332/505
		K1K2/HinI	214

Os tamanhos dos fragmentos gerados após digestão quando somados não excederam o tamanho do fragmento amplificado não digerido. Em alguns casos, a soma dos mesmos ficou abaixo do tamanho do fragmento digerido, pois como alguns fragmentos gerados por digestão foram muito pequenos, possivelmente foram perdidos, se difundiram no gel durante a eletroforese, ou ainda migraram na mesma região do gel, o que tornou difícil sua visualização. Contudo, ocorreram exceções, a seguir mencionadas, nas quais o somatório dos fragmentos digeridos foi superior ao produto amplificado: (i) combinação do produto da PCR gerado com o primer SfM com a enzimas de restrição *Taq* I (Figura 4B, linha 2) gerou no indivíduo polimórfico da população Guamirim Gateados (FGG 6) um perfil que superou em mais ou menos em 100 pares de bases o tamanho do fragmento amplificado por este iniciador; (ii) o mesmo ocorreu com um indivíduo que apresentou polimorfismo na população Amola Faca, com 200 pares de bases a mais e (iii) também com um indivíduo da população FAF31 cuja soma dos fragmentos, quando o produto do iniciador QR foi digerido pela enzima *Rsa*I, superou em 300 pares de bases o produto da PCR não digerido (Figura 5A).

Alguns indivíduos nas populações Guamirim Gateados e Parque Municipal de Lages apresentaram perfis que foram polimórficos para a combinação produto do iniciador-enzima, mas seus perfis quando somados os fragmentos, superavam em muitos pares de bases o tamanho do fragmento não cortado e tinham perfis muito diferentes dos observados nos outros indivíduos para a mesma combinação. Nestes casos, os mesmos foram excluídos das análises.

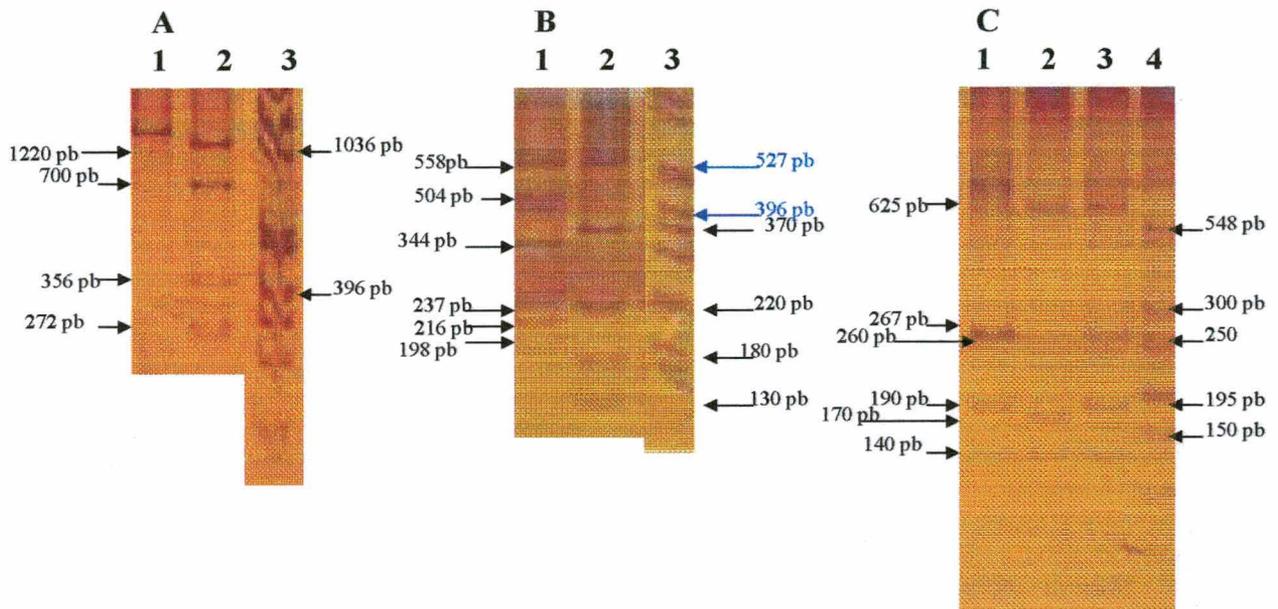
## **POLIMORFISMOS**

Ao todo foram analisados 94 fragmentos originados das combinações dos seis iniciadores com as enzimas de restrição selecionadas e destes 48 (51%) fragmentos apresentaram polimorfismos. Talvez pelo fato de que, muito dos indivíduos polimórficos mostraram vários ou senão todos os fragmentos resultantes da digestões alterados em seus tamanhos, tal como o indivíduo FAF31 com a combinação do produto QR e as enzimas *Rsa*I (Figura 5A, linha 2) e *Taq*I (Figura 5B, linha 2), e o produto SfM com a enzima *Hinf*I para os indivíduos FAF 31 e 21 (figura 5C, linhas 4 e 3, respectivamente).



**Figura 4** - Perfil dos fragmentos gerados pela digestão dos produtos da PCR pelas endonucleases em *A. angustifolia* após eletroforese em gel de poliácridamida a 12%.

- A**= Produto AS digerido pela enzima *HinfI*.  
 Linha 1: Perfil de um indivíduo não polimórfico.  
 Linha 2: Perfil de um indivíduo polimórfico = ECA 28.  
 Linha 3: Padrão de peso molecular 1 Kb (azul).
- B** = Produto SfM digerido pela enzima *TaqI*.  
 Linha 1: Perfil de um indivíduo não polimórfico.  
 Linha 2: Perfil de um indivíduo polimórfico = FG 6.  
 Linha 3: Padrão de peso molecular 1 Kb (azul).
- C**= Produto SfM digerido pela enzima *TaqI*.  
 Linha 1: Perfil de um indivíduo não polimórfico.  
 Linha 2: Perfil de um indivíduo polimórfico = FAF 31.  
 Linha 3: Padrão de peso molecular 1 Kb (azul).



**Figura 5** - Perfil dos fragmentos gerados pela digestão dos produtos da PCR pelas endonucleases em *A. angustifolia*, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%.

- A=** Produto QR digerido pela enzima RsaI.  
 Linha 1: perfil de um indivíduo não polimórfico.  
 Linha 2: perfil de um indivíduo polimórfico = FAF31.  
 Linha 3: padrão de peso molecular 1Kb.
- B=** Produto QR digerido pela enzima TaqI.  
 Linha 1: perfil de um indivíduo não polimórfico.  
 Linha 2: perfil de um indivíduo polimórfico = FAF31.  
 Linha 3: padrão de peso molecular 1Kb (azul).
- C=** Produto SfM digerido pela enzima HinfI.  
 Linha 1: perfil de um indivíduo polimórfico = RAC34.  
 Linha 2: perfil de um indivíduo não polimórfico.  
 Linha 3: perfil de um indivíduo polimórfico = FAF21.  
 Linha 4: perfil de um indivíduo polimórfico = FAF31.

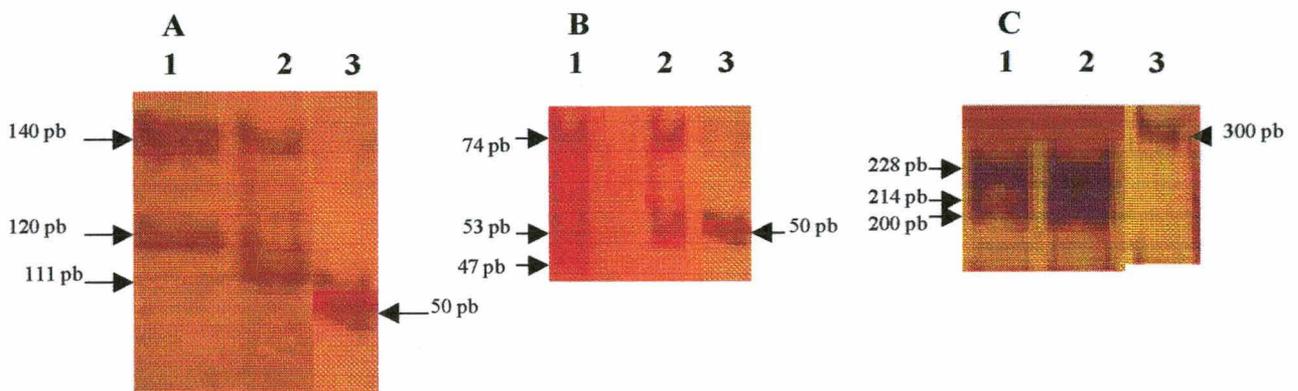
O indivíduo FAF31 da população Amola Faca mostrou-se polimórfico para 3 diferentes regiões não codificadoras amplificadas submetidas a digestão com enzimas de restrição. As combinações das regiões e as enzimas de restrição utilizadas na digestão foram, região CS/*HinfI* (Figura 6A, linha 2), SfM/*HinfI* (Figura 5C, linha 4), QR/*RsaI* (Figura 5A, linha 2) e QR/*TaqI* (Figura 5B, linha 2).

Muitos indivíduos mostraram polimorfismos para a mesma região amplificada após digestão com diferentes enzimas de restrição, tais como o indivíduo ECA 28 da população de Caçador – EPAGRI, quando o produto AS foi digerido com as enzimas de restrição *HinfI* (Figura 4A, linha 2) e *RsaI* (Figura 7 A, linha 1), os indivíduos FRA 1, 9-1, 6, 9, 17 e 16 da população Rancho Alegre para a região CS quando digerido pelas enzimas *HinfI* (Figura 6A, linha 2) e *RsaI* (Figura 6B, linha 2) e os indivíduos RAC 7 e RAC2 da população Antônio Carlos polimórficos para a mesma combinação produto/enzimas de restrição dos indivíduos da população Rancho Alegre.

Alguns polimorfismos podem ser sugeridos como originados de inserções e ou deleções, como no caso do indivíduo RAC3 da população Antônio Carlos com a combinação do produto K1K2 com a enzimas de restrição *HinfI* (Figura 6C, linha 2), que mostrou um fragmento de 214 pares de bases a mais do que os outros indivíduos utilizados neste estudo.

Os indivíduos RAC34 (Antônio Carlos) e FAF21 (Amola Faca) também mostraram polimorfismos possivelmente originados de inserção e ou deleção (Figura 5C, linhas 1 e 3, respectivamente). Os polimorfismos encontrados no indivíduo ECA 28 também, parecem ser originados de inserções e ou deleções (Figura 7A, linha 1). Para confirmar se estes polimorfismos realmente são originados por inserções e ou deleções outras enzimas de restrição devem ser utilizadas, ou ainda a técnica de seqüenciamento.

Outros polimorfismos mostraram-se mais complexos para se sugerir apenas inserções ou deleções, uma vez que, os perfis eletroforéticos dos indivíduos polimórficos mostraram-se bastante diferenciados dos demais indivíduos não polimórficos. Neste caso,



**Figura 6** - Perfil dos fragmentos gerados pela digestão dos produtos da PCR pelas endonucleases em *A. angustifolia*, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. Na figura são mostrados apenas os fragmentos que mostraram polimorfismo.

**A** = Produto CS digerido pela enzima HinfI.

Linha 1: Perfil de um indivíduo não polimórfico.

Linha 2: Perfil de um indivíduo polimórfico = RAC 7.

Linha 3: Padrão de peso molecular 100 pb.

**B** = Produto CS digerido pela enzima RsaI.

Linha 1: Perfil de um indivíduo não polimórfico.

Linha 2: Perfil de um indivíduo polimórfico = FRA 13.

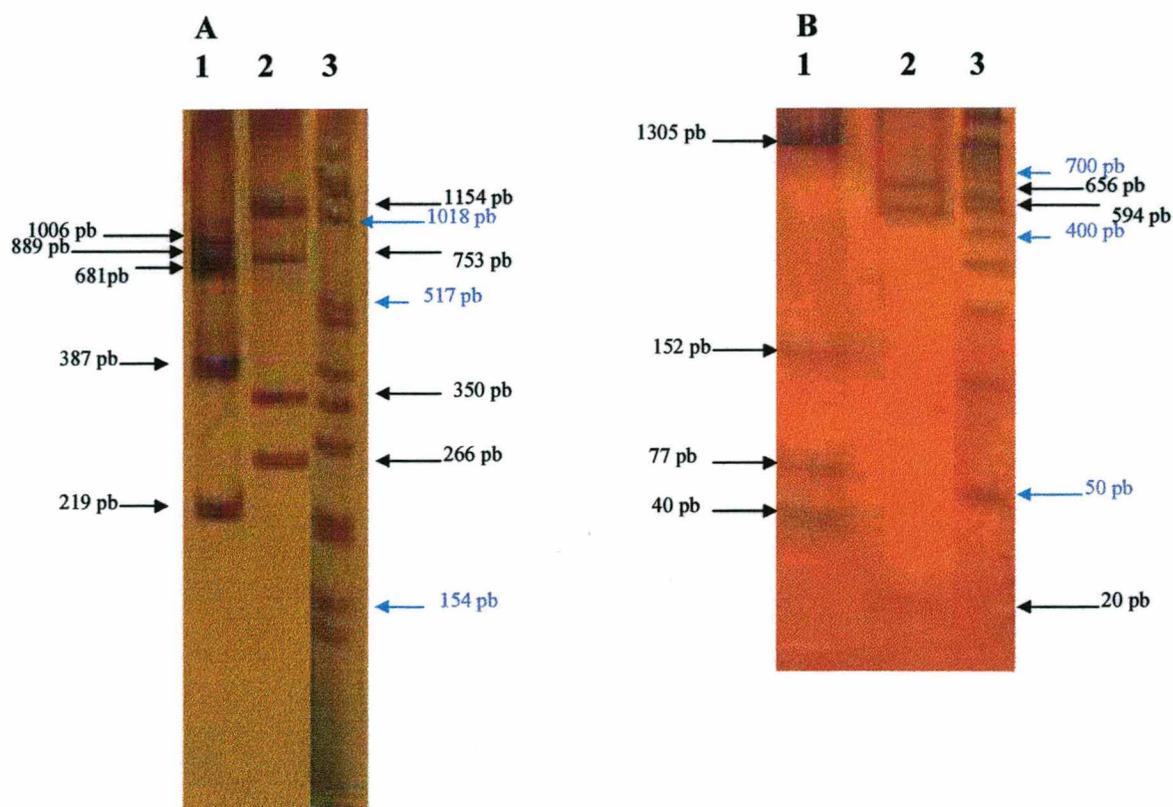
Linha 3: Padrão de peso molecular 100 pb.

**C** = Produto K1K2 digerido pela enzima HinfI

Linha 1; Perfil de indivíduo não polimórfico.

Linha 2: Perfil de indivíduo polimórfico = RAC 3.

Linha 3: Padrão de peso molecular 100 pb.



**Figura 7** - Perfil dos fragmentos gerados pela digestão dos produtos da PCR pelas endonucleases em *A. angustifolia*, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%.

**A** = Produto AS digerido com a enzima *Rsa* I.

Linha 1: Perfil de um indivíduo polimórfico = ECA 28.

Linha 2: Perfil de um indivíduo não polimórfico.

Linha 3: Padrão de peso molecular 1 Kb ladder (azul).

**B** = Produto CS digerido com a enzima *Hae* III.

Linha 1: perfil de um indivíduo polimórfico = FGG 12.

Linha 2: perfil de um indivíduo não polimórfico.

Linha 3: Padrão de peso molecular 100 pb (azul).

pode-se sugerir a hipótese de que foram as mutações que originaram novos sítios de restrição dentro das seqüências dos produtos amplificados por PCR.

Ao todo foram identificados 12 haplótipos diferentes (Lista Anexa), quando computados os dados obtidos das digestões dos seis produtos da PCR combinados com a digestão pelas enzimas de restrição. Alguns dos haplótipos foram específicos à determinadas populações e outros compartilhados por algumas das populações (Tabela 5). Os haplótipos 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10 e 11 foram específicos para as populações Caçador (h1), Amola Faca (h2 e h8), Antônio Carlos (h3, h7 e h9) e Guamirim Guateados (h10 e h11).

Outros haplótipos foram encontrados em mais de uma população. Assim, os haplótipos 5 e 6 foram compartilhados pelas populações Curitiba, Amola Faca, Três Barras, Antônio Carlos e Rancho Alegre.

O h12 foi comum a todas as populações, pois o haplótipo 12 caracterizou-se pelo monomorfismo entre os fragmentos gerados pelas combinações dos produtos da PCR e digestão com as enzimas de restrição para todos os indivíduos dentro das oito populações de *A. angustifolia* testadas.

Os dados da Tabela 5 mostram que a população Antônio Carlos apresentou o maior número de haplótipos (7) em relação as outras populações, dos quais três (h3, h7 e h9) são específicos desta população. Para as demais populações, o número de haplótipos por população variou de 1 a 5, sendo que nos indivíduos coletados no Parque Municipal de Lages foi encontrado apenas um haplótipo (h12), que foi o único compartilhado por todas as populações e o mais freqüente em cinco das oito populações estudadas. A população Guamirim Gateados também, apresentou uma freqüência elevada deste haplótipo (89%), mas diferencia-se da população Lages por apresentar dois haplótipos exclusivos (h10 e h11).

Existe uma associação inversa entre freqüência e número de haplótipos numa mesma população (Tabela 5). Em geral, naquelas populações em se detectou um baixo número de haplótipos, a freqüência dos mesmos foi mais elevada do que nas demais populações. Enquanto a freqüência do h12 foi 100% na população Lages, que apresentou o menor número de haplótipos, o haplótipo mais freqüente (h5) na população Antônio Carlos atingiu 39%.

**Tabela 5** – Número de indivíduos avaliados (N), frequência absoluta de haplótipos por população e número total de diferentes haplótipos por população (nh).

Haplótipo	Populações								Total
	FAF	RAC	ECA	CUR	FGG	PML	FRA	FTB	
N	19	18	18	20	18	12	16	20	141
h1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
h2	1	0	0	0	0	0	0	0	1
h3	0	1	0	0	0	0	0	0	1
h4	0	2	0	0	0	0	4	0	6
h5	6	7	0	12	0	0	6	2	33
h6	1	4	0	1	0	0	3	3	12
h7	0	1	0	0	0	0	0	0	1
h8	1	0	0	0	0	0	0	0	1
h9	0	1	0	0	0	0	0	0	1
h10	0	0	0	0	1	0	0	0	1
h11	0	0	0	0	1	0	0	0	1
h12	10	2	17	7	16	12	3	15	82
Nh*	5	7	2	3	3	1	4	3	12

\* Número de diferentes haplótipos por população.

## **DIVERSIDADE GENÉTICA**

As frequências totais dos haplótipos foram computadas com auxílio do programa HAPLODIV (PONS e PETIT, 1995) e estão inseridas na Tabela 6. As frequências relativas dos haplótipos dentro das populações, incluídas na mesma tabela, foram calculadas utilizando-se o programa Arlequin 1.1 (SCHNEIDER et al., 1997).

A análise dos dados, revelou que o haplótipo de maior frequência, o h12, apresentou uma frequência relativa de 0,595. Com base nos indivíduos amostrados, pode-se concluir que este haplótipo está fixo na população Parque Municipal de Lages e é predominante nas

populações de Caçador, Guamirim Gateados e Três barras. (Tabela 6). A frequência relativa do segundo haplótipo mais freqüente (h5) alcançou o valor de 0,222., sendo compartilhado por 62,5% das populações estudadas. Todos os outros haplótipos foram encontrados com frequências baixas nas populações, pois foram população específicos, com exceção do haplótipo h4, compartilhado pelas populações Antônio Carlos e Rancho Alegre.

**Tabela 6** – Frequências relativas e total de 12 haplótipos baseado em regiões não codificadoras de cloroplastos de *Araucaria angustifolia*.

Haplótipo	Populações								Total*
	FAF	RAC	ECA	CUR	FGG	PML	FRA	FTB	
h1	0	0	0,055	0	0	0	0	0	0,0070
h2	0,053	0	0	0	0	0	0	0	0,0065
h3	0	0,056	0	0	0	0	0	0	0,0070
h4	0	0,111	0	0	0	0	0,250	0	0,0450
h5	0,316	0,389	0	0,600	0	0	0,375	0,100	0,2220
h6	0,053	0,222	0	0,050	0	0	0,188	0,150	0,0830
h7	0	0,056	0	0	0	0	0	0	0,0070
h8	0,053	0	0	0	0	0	0	0	0,0065
h9	0	0,056	0	0	0	0	0	0	0,0070
h10	0	0	0	0	0,056	0	0	0	0,0070
h11	0	0	0	0	0,056	0	0	0	0,0070
h12	0,530	0,111	0,945	0,350	0,888	1,000	0,187	0,750	0,5950
N	19	18	18	20	18	12	16	20	1,0000

\* Frequências computadas pelo programa HAPLODIV (PONS e PETIT et al., 1995).

<sup>a</sup> Todas as outras frequências foram obtidas com o programa Arlequins 1.1 (SCHNEIDER et al., 1997).

A população com menor diversidade genética foi a população Parque Municipal Lages, pois apresentou um único haplótipo (h12), que se constitui também no haplótipo mais comum em outras quatro populações.

As estimativas dos parâmetros  $h_T$ ,  $h_S$  e o  $G_{ST}$  e suas variâncias foram feitas com o programa HAPLODIV (PONS e PETIT et al., 1995) e os resultados estão mostrados na Tabela 7.

A análise destes resultados indicam também uma diferenciação entre as populações estudadas. A diversidade genética medida pelo  $h_T$ , alcançou o valor de 0,612, enquanto que a média de diversidade dentro das populações,  $h_S$ , foi de 0,441 (Tabela 7). A proporção desta variação entre as populações, medida pelo  $G_{ST}$ , foi de 0,28. Os resultados evidenciados pelo presente trabalho são semelhante aqueles encontrados com microssatélites de cloroplastos nas espécies *Pinus brutia* e *P. halepensis*, para os quais os valores de  $G_{ST}$  foram 0,289 e 0,308, respectivamente (BUCCI et al., 1998). Contudo esta comparação deve ser tomada com cautela, pois os valores não são necessariamente estritamente comparáveis, uma vez que os marcadores utilizados são diferentes e podem detectar diferentes tipos de eventos causadores de variação.

Para outras espécies de *Pinus*, os marcadores RFLPs revelaram valores bem mais elevados de  $G_{ST}$ , tais como 0,842 e 0,682 para as espécies *Pinus muricata* e *P. attenuata*, respectivamente (HONG et al., 1993).

AULER (2000), utilizando 15 locos alozímicos em nove populações de *A. angustifolia*, detectou de 1,3 a 1,9 alelos por loco. A percentagem média de locos polimórficos na espécie foi de 73,3% e 26,6% nas nove populações estudadas. A mesma autora estimou o valor de heterozigosidade como sendo 0,072 e um valor para  $F_{st}$  de 0,044. Resultados estes que se contrastam com os dados obtidos com a técnica de PCR-RFLP de regiões não codificadoras de cloroplastos utilizadas neste estudo.

**Tabela 7** – Valores médios de  $h_T$ ,  $h_S$ ,  $G_{ST}$  e suas variâncias computadas pelo programa HAPLODIV (PONS e PETIT, 1995) com base nas frequências de 12 haplótipos observados em oito populações de *A. angustifolia*.

Parâmetros	Valor
$h_T$ (Pons)	0,612
$h_S$ (Pons)	0,441
$G_{ST}$ (Pons)	0,280
Var $h_S$	0,012
Var $h_T$	0,012
Var $G_{ST}$	0,004

Os índices padrões de diversidade genética e molecular para cada população foram calculados com auxílio do programa Arlequin 1.1 (SCHNEIDER et al., 1997) e os resultados são mostrados na Tabela 8.

A análise dos resultados mostrou que a população Antônio Carlos exibiu a maior diversidade genética, com a média de diversidade de 0,81, enquanto que a população Lages exibiu a menor média de diversidade, que neste caso foi zero. A mesma análise revelou que os índices de diversidade foram em ordem crescente de valor para as populações Rancho Alegre, Amola Faca, Curitiba, Três Barras, Guamirim Gateados e Caçador (Tabela 8).

O número médio de diferenças entre pares de haplótipos quando uma população é comparada com as demais, que se constitui num índice molecular de diversidade, variou de 0 a 3,52 (Tabela 8). As populações Fazenda Amola Faca ( $\pi=3,52$ ), Reserva Antônio Carlos ( $\pi=2,24$ ) e EPAGRI Caçador ( $\pi=2,22$ ) foram aquelas que apresentaram o maior índice molecular. De outro lado as população Parque Municipal de Lages ( $\pi=0$ ), Floresta de Três Barras ( $\pi=0,42$ ) e Serra de Curitiba ( $\pi=0,60$ ), apresentaram o menor número de diferenças entre pares.

**Tabela 8** – Índices moleculares de diversidade genética molecular em oito populações naturais de *A. angustifolia*.

Parâmetros	População (N)							
	Curitiba (20)	Caçador (18)	Amola Faca (19)	Três Barras (20)	Antônio Carlos (18)	Guamirim Gateados (18)	Parque Municipal Lages (12)	Rancho Alegre (16)
Número de haplótipos	3	2	5	3	7	3	1	4
Diversidade Genética (H) <sup>a</sup>	0,54 +/- 0,07	0,11 +/-0,09	0,65 +/- 0,08	0,42 +/- 0,12	0,81 +/-0,07	0,21 +/- 0,12	0 +/- 0	0,77 +/- 0,06
Média de número de diferenças entre pares <sup>b</sup>	0,60 +/-0,5	2,22 +/-1,3	3,52 +/-1,9	0,46 +/-0,42	2,24 +/-1,3	1,33 +/-0,01	0 +/-0	1,02 +/-0,72

<sup>a</sup>Desvio Padrão do processo de amostragem

<sup>b</sup>Método de Distância: Diferença entre Pares

Para a Análise de Variância Molecular (AMOVA) as populações foram agrupadas por localização geográfica em seis diferentes grupos: grupo 1 - população Curitiba; grupo 2 - população Três Barras; grupo 3 - populações Amola Faca, Lages e Rancho Alegre; grupo 4 - população Caçador; grupo 5 - população Guamirim Gateados e grupo 6 - população Antônio Carlos.

As estatísticas  $\phi_{ST}$ ,  $\phi_{CT}$  e  $\phi_{SC}$ , (EXCOFFIER et al., 1992), derivados das estatísticas F de Wright, que significam a medida de correlação de haplótipos dentro das populações, a medida de correlação dos haplótipos entre populações dentro de grupos e a medida de correlação de diversidade molecular de haplótipos dentro das populações entre regiões, respectivamente, cujos valores são mostrados na Tabela 9.

Os resultados dos cálculos dos índices de fixação mostraram uma fraca estrutura genética ao nível regional, pois o valor de  $\phi_{CT}$  estimado foi de -0,48, enquanto que os índices relativos a diversidade intrapopulacional ( $\phi_{SC}$ ) e interpopulacional ( $\phi_{ST}$ ) foram, respectivamente, 0,153 e 0,113, o que sugere que a variação maior está ocorrendo dentro de populações (Tabela 9).

As mesmas inferências podem ser tomadas utilizando-se a porcentagem de variação molecular, onde a maior fonte de variação ocorreu dentro das populações, a intrapopulacional, (88,17%), sendo que a variação interpopulacional alcançou o valor de 16,5%.

**Tabela 9** - Resultados da análise de variância (AMOVA) com base no Método de Distância: Diferença entre Pares calculado pelo Programa Arlequin 1.1 (SCHNEIDER et al., 1997).

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Componentes da Variância	Percentual de variação
Entre grupos	5	11,815	-0,040 Va	-4,78
Entre Populações dentro de grupos	2	5,732	0,140 Vb	16,5
Dentro de populações	133	100,600	0,750 Vc	88,17
Total	140	118,147	0,850	

**Índices de Fixação**

$\phi_{CT}$  : -0,048

$\phi_{ST}$  : 0,113

$\phi_{SC}$  : 0,153

Vc and  $\phi_{ST}$  : P(valor ao acaso < valor observado) = 0

Vb and  $\phi_{SC}$  : P (valor ao acaso > valor observado) = 0,055

Va and  $\phi_{CT}$  : P (valor ao acaso > valor observado) = 0,75

## DISCUSSÃO

O sucesso parcial obtido com a amplificação de regiões de DNA de cloroplasto em araucária com o uso de iniciadores (6 amplificações de 17 tentativas) desenhados a partir da seqüência do genoma de cloroplastos de tabaco, ilustram dois aspectos evolutivos relevantes: de um lado reforçam a sugestão de um certo grau de universalidade destes iniciadores proposta anteriormente (TABERLET et al., 1991; DEMESURE et al., 1994, 1995 e DUMOLIN-LAPEGUE et al., 1997), mas por outro lado sugerem a existência de algumas características ímpares no DNA de cloroplastos das coníferas (HIPKINS et al., 1994).

Embora, a seqüência completa de seis genomas de cloroplasto esteja disponível para plantas e que estas representem praticamente, a diversidade total das mesmas (algas - *Euglena*; briófitas - *Marchantia*; coníferas - *Pinus*; dicotiledônias - tabaco; monocotiledônias - arroz e uma dicotiledônia parasita - *Epifagus*) e que quando comparadas entre si demonstrem uma conservação do conteúdo genético e da organização estrutural (CLEGG et al., 1994; DEMESURE et al., 1995), outros estudos (HIPKINS et al., 1994; LINDHOLM, 88; RAUBESON e JANSEN, 1992) tem demonstrado que o genoma de cloroplasto de coníferas apresenta algumas características ímpares, tais como, a perda de uma das inversão repetida, que estas duas regiões invertidas repetidas são características marcantes nos cloroplastos das plantas verdes, com exceção das leguminosas. Esta perda de uma das regiões invertidas teria reduzido o tamanho do genoma das coníferas de 150 Kb das plantas em geral, para 120 Kb (WAKASUGI et al., 1994).

O genoma de cloroplasto das coníferas apresenta seqüências repetitivas dispersas que tornam possíveis rearranjos estruturais. Por exemplo, em *Pseudotsuga menziesii* e *Pinus radiata* são encontradas seis famílias com várias centenas de bases, além de que estes genomas também apresentam outras pequenas seqüências repetidas (HIPKINS et al., 1994). Ainda que haja uma conservação estrutural entre os genomas dos cloroplastos das plantas, os processos mutacionais e evolutivos são bem variados nas diferentes espécies estudadas até o presente (CLEGG et al., 1994; PALMER, 1990), fatos que poderiam explicar os resultados obtidos neste estudo com os dezessete pares de iniciadores para regiões não codificadoras em cloroplastos, onde apenas seis destes pares de iniciadores apresentaram produtos que puderam ser utilizados para os estudos em *A. angustifolia*. Este pequeno

número de pares de iniciadores que geraram produtos em araucária pode ser explicado pelo fato de que, as seqüências destes pares de iniciadores são baseadas na seqüências de genomas de cloroplastos de angiospermas. Embora, os iniciadores tenham sido desenhados após alinhamento entre seqüências de genomas de cloroplastos disponíveis nos bancos gênicos (tabaco, arroz e *Marchantia*), incluindo o único cloroplasto de gimnosperma seqüenciado (*Pinus thunbergii*). Os resultados aqui obtidos sugerem que os iniciadores que falharam em amplificar em DNA de cloroplasto de *A. angustifolia* apresentam diferenças em relação a organização do genoma organelar da espécie em relação aos representantes de outras famílias. Mesmo o par de iniciador AF utilizado para amplificar uma região de 1,5 kb em várias espécies de coníferas (PARDUCCI e ZSMIDT, 1999; ZIEGENHAGEN et al., 1995) falhou em gerar algum produto em *A. angustifolia*, o que pode sugerir uma estruturação diferenciada dentro das coníferas, ou ainda, simplesmente alguma mutação que não permita o anelamento dos iniciadores nos seus sítios, impedindo assim, a amplificação por PCR.

Em relação as diferenças de tamanho em alguns dos produtos amplificados em *A. angustifolia* (Tabela 2), comparativamente aos estudos de DEMESURE e colaboradores (1995), os resultados do presente trabalho revelaram o fato de que a evolução ou as alterações nestas regiões, na sua maioria, são devido a deleções e ou adições de pares de bases dentro destas regiões intergênicas que são menos susceptíveis as pressões seletivas. Fato este que também foi verificado em outros estudos (MARCHELLI et al., 1998), indicando que estas regiões são fontes de diversidade intra e interespecíficas. Desta forma, as seqüências destas regiões podem ser utilizadas tanto em estudos populacionais e em estudos filogenéticos.

Os resultados da amplificação simultânea a partir de DNA extraído de megagametófitos e de embriões com o par de iniciadores CS mostrou a existência de genomas de cloroplastos em ambos tecidos (Figura 3). Resultados similares foram obtidos anteriormente em duas espécies de *Picea* (ZIEGENHAGEN, 1996) e em algumas espécies de *Pinus* (WANG et al., 1996). Estes resultados sugerem que, se assumir-se uma herança paterna dos cloroplastos em *A. angustifolia*, como ocorre na maioria das coníferas, deve existir um ou mais mecanismos de exclusão das organelas maternas durante a formação do

embrião, como sugerido em outros estudos (ZIEGENHAGEN, 1996; OWENS et al., 1990, 1991; SEARS, 1980).

Os dados aqui gerados não são suficientes nem para confirmar a transmissão paternal, predominante nas coníferas, nem para rejeitar esta hipótese. De um lado, houve a amplificação de DNA de megagametófitos, tecido haplóide, com iniciadores específicos de regiões de cloroplastos. Por outro lado, observou-se uma grande variação de haplótipos dentro das populações, o que contrasta com outros estudos com marcadores ao nível organelar de herança paternal via pólen e com dispersão por vento (caso das coníferas), onde nestes casos esperar-se-ia pouca variação entre populações (BIRKY et al., 1978; PARDUCCI e ZSMIDT, 1999; WAGNER et al., 1992; DONG et al., 1993; HONG et al., 1993; TSUMURA et al., 1994). Para tal, as amostras utilizadas neste estudo devem representar populações ainda estruturadas antes do período de grande exploração, ou ainda, havendo a possibilidade de uma herança maternal (via sementes) desta organela, restringindo o fluxo gênico devido a uma menor dispersão aumentando assim, as diferenças genéticas entre as populações. Outro fator que poderia estar influenciando nos resultados seria a amostragem, pois o número de populações estudadas é reduzido. A confirmação da herança dos genomas dos cloroplastos poderá ser obtida futuramente com o uso de populações com pedigree e técnicas moleculares permitindo esclarecer quais dos fatores seriam responsáveis pelos resultados obtidos neste estudo.

Três plantas, sendo duas da população Guamirim Gateados e um da população Parque Municipal de Lages, mostraram-se muito diferenciadas das demais populações em relação aos seus perfis nos géis de poliacrilamida quando o produto do par de iniciadores SfM foi digerido com a enzima *HinfI*, sendo desta forma excluídos das análises. Estes casos poderiam sugerir duas hipóteses, a primeira seria de que na reação de PCR estes iniciadores poderiam ter gerado produtos inespecíficos, dificultando a sua utilização na análise da diversidade, embora nenhum produto inespecífico de PCR tenha sido evidenciado no gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado em UV. Um artefato poderia ter ocorrido pelo fato de que há uma menor sensibilidade da coloração com o brometo de etídio (usado para produtos da PCR), quando comparada com a coloração com nitrato de prata utilizada nas eletroforeses das PCR-RFLPs em poliacrilamida. Outra hipótese seria a existência de heteroplasmia, ou seja, que o indivíduo poderia apresentar cópias de

diferentes genomas de cloroplastos, gerando assim, uma maior quantidade de fragmentos após a amplificação por PCR e digestão com enzimas de restrição. Alguns estudos (LEE et al., 1988; JOHNSON e PALMER, 1989) têm sugerido a existência de heteroplasmia. Contudo, os dados aqui gerados não podem corroborar nem rejeitar esta hipótese sem estudos adicionais.

Os resultados de PCR-RFLP em *A. angustifolia*, sugeriram que muitos dos polimorfismos encontrados neste estudo podem ser originados de inserções e ou deleções, a exemplo de outros estudos que verificaram a grande maioria das alterações dentro destas regiões eram do tipo inserções e ou deleções (DEMESURE et al., 1994, 1995; EL MOUSADIKI e PETIT, 1996). Um exemplo ilustrativo destes eventos foi proporcionado pela planta RAC3 da população Antônio Carlos. A digestão do produto K1K2 da PCR pela enzimas de restrição *Hinf*I (Figura 6C) produziu um fragmento de 214 pares de bases a mais do que os outros indivíduos utilizados neste estudo que apresentaram 11 fragmentos. Este fragmento pode ter sido originado do fragmento de 228 pares de bases por uma deleção de 14 pares de bases, ou ainda pela adição de 14 pares de bases a um fragmento de 200 pares de bases, ambos comuns a todos os indivíduos das 8 populações estudadas.

Outro fragmento passível do mesmo tipo de mutação de inserção e ou deleção é o fragmento de 260 pares de bases do indivíduo RAC34 (Figura 5C, linha 1), pois na planta com o perfil mais comum (Figura 5B, linha 2) este mesmo fragmento apresenta 267 pares de bases. Os indivíduos RAC 34 (Antônio Carlos) e FAF 21 (Amola Faca) também mostraram polimorfismos que podem ter se originado via inserção e ou deleção (Figura 5C, linhas 1 e 3, respectivamente) em um fragmento de 190 pares de bases em relação ao perfil mais comum que apresenta 178 pares de base (Figura 5C, linha 2). O mesmo pode ser sugerido para o polimorfismo do mesmo fragmento (195 pb) para o indivíduo FAF 31 (Figura 5C, linha 4). Outro fragmento passível do mesmo tipo de mutação de inserção e ou deleção é o fragmento de 267 pares de bases do indivíduo RAC 34 (Figura 5C, linha 1), pois no indivíduo com o perfil mais comum (Figura 5C, linha 2) este mesmo fragmento apresenta 260 pares de bases. Novos estudos utilizando outras enzimas poderão auxiliar a esclarecer a natureza das variações.

Alguns polimorfismos mostraram-se mais complexos para se sugerir apenas inserções ou deleções, uma vez que, os perfis eletroforéticos dos indivíduos polimórficos

mostraram-se bastante diferenciados dos indivíduos não polimórficos. Nestes casos, é possível que as mutações originaram novos sítios de restrição em diferentes regiões dentro das seqüências amplificadas por PCR. A planta RAC 28 da população de Antônio Carlos (Figura 4A, linha 2) ilustra este tipo de variação.

A técnica PCR-RFLP foi bastante eficiente na identificação de variantes em araucária, pois cinco dos seis pares de iniciadores utilizados neste trabalho mostraram polimorfismos, a exceção do iniciador DT, que mostrou-se monomórfico para todos os indivíduos, quando seu produto foi digerido por três enzimas de restrição. Os sítios de anelamentos destes iniciadores estão todos localizados na região grande cópia simples ('Large Single Copy' - LSC) do genoma do cloroplasto (Figura 1). Muitas destas regiões não codificadoras foram sugeridas como regiões apresentando pequenas repetições de pares de bases associadas a evoluções estruturais, tais como inserções, deleções e até outros rearranjos e que são sugeridas como regiões de "hotspot" mutacionais (HIPCKINS et al., 1994; PARDUCCI e SZMIDT, 1999). Além de que, CLEGG et al. (1994), DEMESURE et al. (1995), sugeriram que nesta região do genoma (LSC) dos cloroplastos ocorre uma taxa elevada de substituições quando comparada a outras regiões deste genoma organelar. Esta hipótese tem sustentação em parte pelos resultados obtidos no presente trabalho, pois foram identificados 12 haplótipos em 141 plantas oriundos de oito populações, com apenas três enzimas de restrição e seis produtos de PCR. Além disso, algumas plantas apresentaram polimorfismos em mais de uma das regiões amplificadas, como ocorreu com a planta FAF31 da população Amola Faca, que exibiu polimorfismo em 3 diferentes regiões não codificadoras amplificadas submetidas a digestão com enzimas de restrição. Neste caso específico, as combinações das regiões e as enzimas de restrição utilizadas na digestão foram, região CS/*Hinf*I (Figura 6A), SfM/*Hinf*I (Figura 5C.), QR/*Rsa*I (Figura 5A) e QR/*Taq*I (Figura 5C).

Foram encontrados e caracterizados neste trabalho doze diferentes haplótipos, onde muitos mostraram-se população específicos e outros foram compartilhados entre as populações. A média de haplótipos por população foi de 3,5, sendo que o número de haplótipos por população variou de 1 a 7. A população Lages foi a que apresentou o menor número de haplótipos, um, e a população Antônio Carlos a população que apresentou o

maior número, sete (Tabela 5). A população Antônio Carlos apresentou também, o maior índice de diversidade genética intrapopulacional, 0,81 (Tabela 8) (NEI, 1987).

Estes resultados tomados em conjunto são relevantes, uma vez que, a população Antônio Carlos é a população mais isolada, localizada próximo a costa do Atlântico no Estado de Santa Catarina, a 50 km de Florianópolis. Esta reserva de araucárias está a uma altitude de 600 m em relação ao nível do mar, enquanto todas as outras populações utilizadas neste trabalho localizam-se em altitudes mais elevadas. Todavia, este isolamento restringe drasticamente o fluxo gênico com as demais populações. Contudo, o fato de que esta população está localizada na região de transição entre a Floresta Ombrófila Densa e a Floresta Ombrófila Mista, possibilitaria o acúmulo de diferentes haplótipos, uma vez que o fluxo gênico permitiria a troca de haplótipos de diferentes populações além de que em zonas de transição a possibilidade de surgimento de variantes é maior (WANG et al., 1994), comparativamente a populações fora das regiões de transição. Alternativamente, as mutações surgidas foram mantidas na população, que desta forma se diferenciou ao nível do DNA de cloroplasto das demais populações.

Um conjunto de indicadores sugere que a população mais divergente foi a população Antônio Carlos. Esta população apresentou três haplótipos específicos e uma baixa frequência do haplótipo mais comum, o h12. Além disso, foram detectados 7 haplótipos nesta população. Contudo, as análises isoenzimas (AULER, 2000) indicaram um valor de heterozigosidade de 0,077, valor inferior aos encontrados nas populações de araucárias utilizados neste estudo.

Uma vez que o genoma haplóide dos cloroplastos apresenta, na maioria das coníferas, transmissão uniparental, as novas mutações são mantidas através de clones, menor pressão seletiva em regiões não codificadoras, além de não ocorrer recombinação, assim, marcadores moleculares nestes genomas podem ser sugeridos como indicadores sensíveis dos processos evolutivos que organizam a variabilidade genética dentro das populações (ECHT et al., 1998). Este fato pode ser sugerido como hipótese para explicar a diferença encontrada entre os marcadores organelares utilizados neste estudo e os marcadores isoenzimáticos utilizados por AULER (2000), praticamente nas mesmas populações de *A. angustifolia*. No trabalho referido o uso de 15 locos alozímicos evidenciou a existência de 1,6 alelos por loco, em média e que a percentagem média de

locos polimórficos na espécie foi de 73,3% (26,6% nas nove populações estudadas). A análise isoenzimática revelou ainda que a heterozigosidade atingiu 0,072 e que a maior parte da variação genética está dentro de populações, pois a divergência entre populações ( $F_{st}$ ) foi de apenas 0,044 (AULER, 2000). Como discutido anteriormente, os resultados não são muito similares levando-se em consideração que nas *Araucariaceae* a herança do genoma de cloroplasto seja paternal (OWENS et al., 1990) e a dispersão do pólen pelo vento, pois alguns estudos (HAMRICK e GODT, 1990; DONG e WAGNER, 1994; BUCCI et al., 1998) demonstraram que nestas condições a divergência entre as populações seria limitada pela possibilidade de um fluxo gênico, exceto é claro nas espécies que apresentem separação geográfica impedindo o fluxo gênico (BOSCHERINI et al., 1994; ECHT et al., 1998). Mas, levando-se em consideração a existência de genomas de cloroplastos amplificados nos megagametófitos não se pode excluir que possa existir a herança materna destas organelas na espécie aqui estudada, uma vez que algumas espécies de coníferas apresentam este tipo de herança dos genomas dos cloroplastos, o que poderia explicar a diversidade genética encontrada com o PCR-RFLP de regiões não codificadoras dos cloroplastos. Neste caso, a existência de uma alta divergência poderia ser esperada, porque a dispersão das sementes seria mais limitada (PONS e PETIT, 1995; EL MOUSADIKI e PETIT, 1996; DUMOLIN-LAPEGUE et al., 1997). Outra possibilidade para explicar os diferentes resultados poderia ser devido a ação da deriva genética que fixaria haplótipos diferentes nas populações estudadas e ou ainda, a possibilidade de um número limitado de populações estudadas e a efeitos de amostragem, gerando dados que superestimassem a diversidade encontrada neste estudo (PONS e PETIT, 1995).

A segunda população com maior índice de diversidade foi a população Rancho Alegre, com  $H=0,77$  e apresentando quatro haplótipos diferentes, seguida da população Amola Faca, com  $H=0,65$  e cinco haplótipos (Tabelas 5 e 8). A diferença de média na diversidade entre estas duas populações se deve ao fato de que este valor é computado levando-se em conta o número de indivíduos na amostra, a frequência dos alelos e o número dos haplótipos na população. Assim, mesmo tendo menor número de haplótipos a população Rancho Alegre apresentou 16 plantas e quatro haplótipos com frequências não muito discrepantes entre si (Tabela 6).

No caso de programas de conservação estas três populações Antônio Carlos, Rancho Alegre e Amola Faca poderiam merecer particular atenção, embora as populações com haplótipos específicos, como Caçador e Guamirim Gateados, não possam ser excluídas das estratégias de conservação.

A população apresentando a menor variabilidade genética foi a população Lages, com zero de média de diversidade, pois na mesma só foi detectado um haplótipo, sendo este o único haplótipo compartilhado por todas as oito populações deste estudo (h12). Um pouco de precaução é necessário neste caso, pois deve-se levar em consideração que desta população foram avaliados somente 12 indivíduos, embora a população Rancho Alegre, com apenas dezesseis indivíduos, exibiu a segunda maior média de diversidade ( $H=0,77$ ).

Os níveis de diversidade encontrados nas populações de *A. angustifolia* mostrados na Tabela 7 revelaram uma diversidade total elevada ( $h_T = 0,612$ ), bem como uma variação intrapopulacional ( $h_S$ ) de 0,441, indicando a existência de uma quantidade razoável de variação ocorrendo dentro das populações. A proporção de diferenciação entre as populações, medido pelo  $G_{ST}$ , foi de 28%. Juntos estes resultados revelaram a existência de um nível elevado de polimorfismo dentro e entre as populações de *A. angustifolia* no nível do DNA de cloroplastos.

Apenas duas populações, Curitiba e Três Barras, compartilharam os mesmos haplótipos (h5, h6 e h12), embora apresentaram divergências quanto as frequências relativa e absoluta. Esta constatação é também relevante, pois ambas as populações podem ser agrupadas na mesma região geográfica, pois Três Barras dista 180 km da população de Curitiba. Na verdade, ambas poderiam fazer parte de uma população maior, agora separadas pelo processo exploratório, mas que ainda poderia permitir o fluxo gênico entre estas duas populações. Contudo, não existem estudos sobre a distância mínima de deslocamento de pólen e semente em araucária. Além disso, as populações Lages, Rancho Alegre e Amola Faca que estão localizadas próximas uma das outras aproximadamente, 40 quilômetros, apresentaram-se diferenciadas quanto a diversidade genética, pois as duas últimas exibiram índices elevados de diversidade intrapopulacional (0,77 e 0,65, respectivamente), enquanto nenhuma variação foi detectada nos cloroplastos de plantas da população Lages. Estes resultados embora pareçam contrastar com a hipótese de que as populações geograficamente próximas deveriam apresentar um fluxo gênico maior, e

portanto uma menor diferenciação, não podem ser utilizados para rejeitá-la, uma vez que houve o efeito da fragmentação nesta área e muito pouco se conhece sobre fluxo gênico da espécie. Deve-se ainda levar em consideração o tamanho das amostras e o número de populações utilizadas no presente trabalho bem como erros de amostragem.

Levando-se em consideração a média de diversidade para marcadores isoenzimáticos,  $G_{ST} = 6,8\%$  para coníferas, polinizadas pelo vento (HAMRICK e GODT, 1990), o índice calculado neste estudo o supera em quatro vezes (28%). Na verdade, as comparações entre diferentes marcadores entre espécies diferentes e ou mesmos em comparações intraespecíficas, são em geral bastantes restritas, pois elas dependem do tamanho efetivo da população ( $N_e$ ) (genomas haplóides tem metade do  $N_e$  dos genomas nucleares), taxas de mutação, recombinação e outros fatores que afetam os sistemas genéticos nuclear e organelar (VENDRAMIN et al., 1998).

Os valores de  $G_{ST}$  encontrados neste trabalho aproximam-se dos encontrados em outros estudos com marcadores no nível do DNA de cloroplastos, como os de BUCCI et al. (1998) que, utilizando microssatélites de cloroplastos, encontraram  $G_{ST}$  em torno de 29% para populações de *P. brutia* e 22% para *P. halepensis*, com base em 81 diferentes haplótipos encontrado em uma média de 10 populações por espécie. VENDRAMIN et al. (1998) caracterizaram em *P. pinaster*, 34 haplótipos e estimaram o  $G_{ST}$  em 23%, analisando em média 24 indivíduos de 10 populações. Os marcadores microssatélites de cloroplastos são altamente polimórficos (VENDRAMIN et al., 1998, 1999; BUCCI et al., 1998; ECHT et al., 1998; POWELL et al., 1995, 1996) e revelam uma grande proporção de polimorfismos. Contudo, o presente estudo com PCR-RFLP nas regiões não codificadoras de cloroplastos em *A. angustifolia* mostrou níveis de polimorfismos semelhantes aos dos microssatélites.

Os resultados dos estudos acima referidos, incluindo este com *A. angustifolia* não dão suporte a hipótese da existência de uma fraca subdivisão das populações em consequência do alto fluxo gênico entre as mesmas (DONG e WAGNER, 1994), pois os genomas organelares transmitidos paternalmente, apresentariam dispersão por pólen e sementes, além de poderem ser transmitidos a longas distâncias pelo vento, caso da maioria das coníferas e como tal, seria esperado valores baixos para  $G_{ST}$ . HONG et al. (1993) também encontraram valores altos de  $G_{ST} = 0,842$  em *P. muricata* quando analisaram os

DNAs de cloroplastos com RFLP. Contudo, DONG e WAGNER (1994), sugeriram que no caso do *P. muricata*, onde as populações eram isoladas reprodutiva e geograficamente, o que impossibilitaria o fluxo gênico e levaria então, a uma diferenciação das populações, explicando a diversidade genética da espécie. Os mesmos fatores explicariam a diferenciação encontrada com o *P. resinosa*, uma espécie com baixíssimos níveis de diversidade nuclear, tanto no nível isoenzimáticos, bem como ao nível de RAPD, mas que apresentou 12% de variação interpopulacional, quando analisado com microssatélites ao nível do genoma de cloroplastos. Os autores sugeriram ainda, que colonizações periódicas, efeitos de gargalo e extinções são responsáveis por tal diferenciação (ECHT et al., 1998).

Os valores médios de diferenças entre pares de haplótipos (Tabela 8) revelaram que algumas populações apresentam mais diversidade genética do que outras. Assim, as populações Fazenda Amola Faca, Reserva Antônio Carlos e EPAGRI-Caçador, se destacaram por apresentarem índices elevados de diferenças entre os haplótipos, ao contrário da população de Parque Municipal de Lages cujo índice foi zero. Desta forma, estes resultados suportam o que foi revelado por outros índices, de que existe diferenciação entre as populações.

No caso da *A. angustifolia*, onde não são conhecidas as taxas de mutação e fluxo gênico e considerando-se que antes da devastação a floresta era contínua, o que possibilitava o fluxo gênico intenso, o que tornaria as populações mais homogêneas, e se ainda considerarmos que a herança dos genomas de cloroplasto seja paterna, os resultados aqui apresentados (ex:  $G_{ST} = 28\%$ ) são contrários ao que poderia se esperar, segundo os estudos de BIRKY (1978), HAMRICK e GODT (1991), McCAULEY (1994) e PONS e PETIT (1995). O isolamento das populações provocado pela devastação e comercialização das madeiras de araucária, ainda não teria sido suficiente para que o acúmulo de variação pudesse provocar uma maior diferenciação entre populações, principalmente devido ao longo ciclo da espécie. De outro lado, os efeitos da redução do tamanho das populações, também provocada pela exploração madeireira, ainda merece ser melhor estudado.

Os valores da diversidade entre populações encontrados neste trabalho poderia ser devido então : (i) a existência prévia de variação genética ainda não quantificada anteriormente ao isolamento das populações, (ii) ao isolamento reprodutivo e geográfico entre populações, (iii) ação da deriva genética, (iv) modelo de herança do genoma dos

cloroplastos, (v) ao surgimento de novas mutações que originariam novos haplótipos (levando então, ao surgimento de haplótipos específicos) tendo em vista as regiões genômicas estudadas (não codificadoras), o que levaria a uma diferenciação entre as populações e (vi) erros de amostragem. Tais possibilidades foram discutidas por outros autores. DONG e WAGNER (1994) enfatizaram que quando populações são isoladas e não ocorre fluxo gênico, os mecanismos mutacionais podem influenciar a composição genética dentro e entre populações. BIRKY (1989) mostrou que a subdivisão das populações em equilíbrio é inversamente relacionada com a taxa de mutação. Como as taxas de mutações de ponto são consideravelmente baixas em relação as mutações de tamanho, ambas, no caso de ausência de fluxo gênico, levando-se em consideração o tamanho efetivo da população (McCAULEY, 1994), poderiam explicar parcialmente os níveis de diversidade encontradas neste estudo com regiões não codificadoras de cloroplasto *A. angustifolia*.

Muito embora, não se possa comparar dados com marcadores moleculares com características diferentes, tais como os microssatélites de cloroplasto e os baseados em regiões não codificadoras dos genomas de cloroplasto, devido a natureza da variação que detectam e diferentes pressões de seleção que estas regiões estão submetidas, e as diferentes propriedades dos genomas tais como taxa de mutação, recombinação entre outros, também não se pode comparar de forma estrita espécies distintas entre si, pois cada uma delas pode representar uma história evolutiva diferente. Porém, é possível fazer algumas comparações e generalizações, que podem auxiliar na elucidação de alguns parâmetros evolutivos e populacionais.

Neste trabalho com regiões não codificadoras de cloroplasto em *A. angustifolia*, foram encontrados níveis de divergência muito maiores do que os encontrados em outros estudos com microssatélites de DNA de cloroplastos em coníferas, tais como os estudos de VENDRAMIN et al. (1999), que caracterizou em *Abies alba* 90 haplótipos e obteve um valor para  $G_{ST}$  de 13,3% e ECHT et al. (1998), com 23 haplótipos caracterizados, e um valor estimado de  $G_{ST}$  de 12% em *P. resinosa*. Porém, contrariamente aos trabalhos mencionados, o que é intrigante, outros estudos não encontraram polimorfismos em cloroplastos. Assim, BOSCHERINI et al. (1994), utilizando regiões não codificadoras não encontraram polimorfismo algum em *P. leucodermis*, embora o autor tenha utilizado um sistema de gel de agarose comum (1,5%). No trabalho do citado autor foram analisados 80

indivíduos de sete populações, utilizados dois pares de iniciadores diferentes dos utilizados nos estudos com *A. angustifolia* e onze enzimas de restrição (número maior do que usado no presente trabalho). VICARIO et al. (1995), utilizando seis pares de regiões não codificadoras (TABERLET et al., 1991) e 15 enzimas de restrição, também, não tiveram sucesso em encontrar polimorfismos nas regiões estudadas, mesmo quando utilizaram um sistema de gel de agarose 3% (Nu Sieve), que apresenta uma capacidade de separação mais sensível a pequenas inserções e ou deleções do que a agarose comum.

A utilização de um sistema de gel (de agarose) pouco sensível a pequenas inserções e ou deleções, bem como a coloração dos géis por brometo de etídio pode ter dificultado a identificação de polimorfismos nos trabalhos acima mencionados. Mesmo que houvessem indivíduos variantes, estes dificilmente poderiam ser detectados por pelos motivos expostos. Assim, a escolha das metodologias é de fundamental importância para o alcance dos objetivos.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi feita com o programa Arlequin 1.1 (SCHNEIDER et al., 1997) e a divergência genética entre regiões, entre populações dentro de regiões e entre populações foi inferida pelos estimadores  $\phi_{CT}$ ,  $\phi_{SC}$  e  $\phi_{ST}$ , respectivamente. A AMOVA dos dados obtidos com o PCR-RFLP em *A. angustifolia*, quando as populações foram agrupadas em 6 grupos referentes a uma possível localização geográfica, mostraram (Tabela 9) que não há uma distribuição geográfica da diversidade genética das populações, pois a variância encontrada foi de -0,040 e a percentagem de variação de -4,78%, o que indica que não há uma estrutura genética no nível regional definida. Um segundo tipo de agrupamento das populações, agora em relação a vegetação associada a floresta de araucária, também foi analisada e novamente nenhuma estrutura foi associada com este agrupamento.

Os valores dos índices de fixação ou estatísticas  $\phi$  (EXCOFFIER et al., 1992), análogos as estatísticas F de Wright, confirmaram os resultados obtidos com o  $G_{ST}$ , demonstrando que a maior parte da variação ocorreu entre as populações,  $\phi_{SC} = 0,153$ , mas uma grande parte da divergência ocorre entre populações,  $\phi_{ST}$  foi de 0,113. Este último valor representa o grau de correlação da diversidade molecular dos haplótipos dentro das populações em relação a um par de haplótipos da espécie como um todo.

Os resultados negativos da variância entre grupos (-0,040) e a percentagem de variação (-4,78%) entre as populações é explicado por SCHNEIDER et al. (1997), como sendo devido ao fato de que os componentes de variância são em realidade covariâncias e seus índices de fixação associados podem ser compreendidos como coeficientes de correlação. Comumente, pequenos valores negativos para os componentes da variância na ausência de uma estrutura genética bem característica podem ocorrer. Assim, poder-se-ia por chance, obter valores positivos ou negativos muito pequenos para os componentes de variância. Na grande maioria das vezes, estes indicam a ausência de estrutura genética, mas mesmo assim, apresentam um significado biológico, pois em organismos com fecundação cruzada, tal como é a *A. angustifolia*, genes de diferentes populações podem estar mais relacionados do que genes da mesma população ( SCHNEIDER et al., 1997).

## CONCLUSÕES

Os resultados verificados neste estudo são os primeiros no nível molecular e os primeiros utilizando regiões não codificadoras de cloroplastos de *A. angustifolia*.

A investigação sobre a distribuição da diversidade genética ao nível regional com base nos haplótipos originados da aplicação da técnica PCR-RFLP em produtos amplificados de regiões não codificadoras do cloroplasto em *A. angustifolia* revelou que a maior parte da variação detectada está distribuída dentro de populações. Contudo, existe uma significativa divergência entre as populações estudadas.

Os diversos índices e abordagens utilizadas neste trabalho apresentaram resultados altamente convergentes. Assim, a diversidade genética medida por  $h_T$  e pelo  $G_{ST}$ , medida equivalentes a heterozigosidade e a proporção da variação entre populações, respectivamente, em genomas diplóides, foi corroborada pela Análise Molecular da Variância.

Os valores da diversidade entre populações encontrados neste trabalho poderia ser devido então (i) a existência prévia de variação genética ainda não quantificada anteriormente ao isolamento em ilhas das populações, (ii) ao isolamento reprodutivo e geográfico entre populações, (iii) ação da deriva genética, (iv) modelo de herança do genoma dos cloroplastos, (v) ao surgimento de novas mutações que originariam novos haplótipos (levando então, ao surgimento de haplótipos específicos) tendo em vista as regiões genômicas estudadas (não codificadoras), o que levaria a uma diferenciação entre as populações e (vi) efeitos de amostragem e tamanho populacional

As populações Antônio Carlos, Rancho Alegre e Amola Faca, apresentaram altos índices de diversidade enquanto as populações Guamirim Gateados e Caçador exibiram haplótipos específicos indicando que estas populações devem ser contempladas nas estratégias de conservação germoplasma para a espécie, bem como fonte de variabilidade genética para melhoramento ou estudos de genética e evolução.

Por se tratar de uma espécie de alta importância ecológica, econômica e social, e porque este é o primeiro grupo de dados relacionados a variabilidade genética no nível molecular, novos estudos complementares são necessários. Não se conhece ainda o efeito da fragmentação no nível de variabilidade genética, os efeitos do fluxo gênico, bem como o

conhecimento dos mecanismos evolutivos que produzem e mantêm a diversidade genética nesta espécie, além do modo de herança dos genomas de cloroplastos na espécie.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALI, L. E.; NEALE, D. B. e MARSHALL, K.A.. Chloroplast DNA Restriction Fragment Length Polymorphism in *Sequoia sempervirens* D. Don Endl., *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, *Calocedrus decurrens* (Torr.) and *Pinus taeda* L.. **Theor Appl Genet** 81:83-89, 1991.
- AULER, N. M. F.. Caracterização genética de populações naturais de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. KETZE. No Estado de Santa Catarina. **Dissertação de Mestrado**. UFSC, Florianópolis-SC. 97p., 2000.
- BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLÉS, G e GRESSHOFF, P. M.. Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in polyacrylamide Gels. **Analytical Biochemistry** 196: 80-83, 1991.
- BERGQVIST, G.; BREMER, B. e BREMER, K.. Chloroplast DNA variation and tribal position of *Eremothamnus* (Asteraceae). **Taxon** 44: 341-349, 1995.
- BIRKY, C. W. Jr.. Transmission Genetics of Mitochondria and Chloroplasts. **Annu. Ver. Genet.** 12: 471-512, 1978.
- BIRKY, C. W. Jr.; FUERST, P. e MARUYAMA, T.. Organelle Gene Diversity Under Migration, Mutation and Drift : Equilibrium Expectations, Approach to Equilibrium, Effects of heteroplasmic Cells and Comparison to nuclear Genes. **Genetics** 121: 613-627, 1989.
- BOSCHERINI, G., MORGANTE, M. ROSSI, P. e VENDRAMINI, G. G.. Allozyme and Chloroplast DNA Variation in Italian and Greek Populations of *Pinus leucodermis*. **Heredity** 73 : 284-290, 1994.
- BUCCI, G. ANZIDEI, M.; MADAGHIELE, A. e VENDRAMIN, G. G.. Detection of Haplotypic Variation and Natural Hybridization in halapensis-complex pine species using chloroplast Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. **Molecular Ecology** 7 : 1633-1643, 1998.
- BYRNE, M. e MORAN, G. F.. Population divergence in the chloroplast genome of *Eucalyptus nitens*. **Heredity** 73 : 18-28, 1994.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florfestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e usos da madeira.**, EMBRAPA-CNPQ, 640p. 1994.

- CATO, S. A. e RICHARDSON, T. E.. Inter and Intraspecific Polymorphism at Chloroplast SSR Loci and Inheritance of Plastids in *Pinus radiata* D. Don. **Theor Appl Genet** 93: 587-592, 1996.
- DEMASURE, B.; SODZI, N. e PETIT, R. J.. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. **Molecular Ecology**, 4:129-131, 1994.
- DEMASURE, B.; COMPS, B. e PETIT, R. J.. Chloroplast DNA phylogeography of the Common Beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. **Evolution** 50(6) : 2515-2520, 1996.
- DONG, J. e WAGNER, D. B.. Paternally Inherited Chloroplast Polymorphism in Pinus: Estimation of Diversity and Population Subdivision, and Tests of Disequilibrium With a maternally Inherited Mitochondrial Polymorphism. **Genetics** 136: 1187-1194, 1994.
- DUMOLIN-LAPÈGUE, S.; DEMASURE, B. e PETIT, R. J.. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. **Theor Appl Genet** 91 : 1253-1256, 1995.
- DUMOLIN-LAPÈGUE, S.; DEMASURE, B.; FINESCHI, S.; LE CORRE, V. e PETIT, R. J.. Phylogeographic structure of White Oaks throughout the European continent. **Genetics** 146: 1475-1487, 1997.
- ECHT, C. S.; DeVERNO, L. L.; ANZIDEI, M. e VENDRAMIN, G. G.. Chloroplast microsatellites Reveal Population Genetic Diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. **Molecular Ecology** 7 : 307-316, 1998.
- EL MOUSADIKI, A. e PETIT, R. J.. Chloroplast DNA Phylogeography of the argan tree of Morocco. **Molecular Ecology** 5: 547-555, 1996.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E. e QUATTRO, J. M.. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distance Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. **Genetics** 131: 479-491, 1992.
- FERREIRA, M. E. e GRATTAPAGLIA, D.. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 2ª Ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995.
- CLEGG, M. T.. Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90 : 363-367, 1993.
- CLEGG, M. T.; GAUT, B. S.; LEARN, G. H. Jr e MORTON, B. R.. Rates and Patterns of chloroplast DNA Evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 6795-6801, 1994.

- GUERRA, M.P.; REIS, M.S.; SCHNEIDER, L.; SILVEIRA, V. *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. In: **Inventário dos Recursos Florestais da Mata Atlântica**. Conselho Nacional da Reserva da Biosfera, 125p. 1999.
- GUO, J.H.; SKINNER, D. Z. e LIANG, G. H.. Phylogenetic relationships of sorghum taxa inferred from mitochondrial DNA restriction fragment analysis. **Genome** 39 : 1027-1034, 1996.
- HAMRICK, J. L. e GODT, M. J. W.. Allozyme Diversity in Plants Species. In: BROWN, A. D.H.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L. e WEIR, B. S.. **Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources**. Sinauer, Sunderland-Massachusetts, 43-63p., 1990.
- HARRIS, S. A. e INGRAM, R. Chloroplast DNA and biosystematics : The effects of intraspecific diversity and plastid transmission. **Taxon** 40 : 393-411, 1991.
- HIPKINS, V. D.; KRUTOVSKII, K. V. e STRAUSS, S. H.. Organelle Genomes in Conifers: Structure, Evolution and Diversity. **Forest Genetics** 1 (4): 179-189, 1994.
- HIPKINS, V. D.; MARSHALL, K. A.; NEALE, D. B.; ROTTMANN, W. H. e STRAUSS, S. H.. A Mutation Hotspot in the Chloroplast genome of a Conifer (Douglas-fir: *Pseudotsuga*) is Caused by Variability in the Number of Direct Repeats Derived from a Partially Duplicated tRNA Gene. **Curr. Genet.** 27: 572-579, 1995.
- HONG, Y-P., HIPKINS, V. D. e STRAUSS, S. H.. Chloroplast DNA Diversity Among Trees, Populations and Species in the California Closed-Cone Pines (*Pinus radiata*, *Pinus muricata* and *Pinus attenuata*). **Genetics** 135: 1187-1196, 1993.
- HOOGLANDER, N.; LUMARET, R. e BOS, M.. Inter-intraspecific variation of chloroplast DNA of European *Plantago* ssp. **Heredity** 70: 322-334, 1993.
- JOHNSON, L. B. e PALMER, J. D.. Heteroplasmy of chloroplast DNA in *Mendicago*. **Plant Molecular Biology** 12: 3-11, 1989.
- KORMUTÁK, A.; SZMIDT, A. E. e WANG, X.-R.. Restriction fragment length polymorphism of chloroplast DNAs in some species of fir (*Abies* sp.). **Biologia Plantarum** 35 (1): 113-119, 1993.
- KRUPKIN, A. B.; LISTON, A. e STRAUSS, S. H.. Phylogenetic Analysis of hard pinus (*Pinus* subgenus *Pinus*, Pinaceae) from Chloroplast DNA Restriction Site Analysis. **Amer. J. Bot.** 83 (4) : 489-498, 1996.

- LATTA, R. G. e MITTON, J. B.. A comparison of population differentiation across four classes of gene marker in Limber pine (*Pinus flexilis* James). **Genetics** 146 : 1153-1163, 1997.
- LATTA, R. G.; LINHART, Y. B.; FLECK, D. e ELLIOT, M.. Direct and Indirect Estimates of Seed Versus Pollen Movement Within a Population of Ponderosa Pine. **Evolution**: 52: 61-67, 1998.
- LEE, D. J., BLAKE, T. K. e SMITH, S. E.. Biparental inheritance of chloroplast DNA and the existence of heteroplasmic cells in alfafa. **Theor Appl Genet** 76 : 545-549, 1988.
- LEVY, F.; ANTONOVICS, J.; BOYNTON, J. E. e GILLHAM, N. W.. A population genetic analysis of chloroplast DNA in *Phacelia*. **Heredity** 76 : 143-155, 1996.
- LINDHOLM, J.; SZMIDT, A. E.; HÄLGREN, J-E. e GUSTAFSSON, P.. The Chloroplast Genome of Conifers Lack one of the rRNA-encoding Repeats. **Molecular and General Genetics** 212: 6-10, 1988.
- McCAULEY, D. E.. Contrasting the Distribution of chloroplast DNA and Allozyme Polymorphism Among Local Populations of *Silene alba*: Implications for Studies of Gene Flow in Plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 8127-8131, 1994.
- MARCHELLI, P.; GALLO, L.; SCHOLZ, F. e ZIEGENHAGEN, B.. Chloroplast DNA Markers Reveal a Geographical Divide Across Argentinean Southern Beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. Distribution Area. **Theor Appl Genet** 97: 642-646, 1998.
- MATTOS, J. R. **O pinheiro brasileiro**. V.1. 2 ed. Artes Gráficas Princesa LTDA. 225p. 1994.
- MAZZA, M. C. M.. Use of RAPD Markers in the Study of Genetic Diversity of *Araucaria angustifolia* (BERT.) Populations in Brazil. **Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management**. International Foundation For Science. Florianópolis, Brasil, pg. 103-111, 1997.
- NEALE, D. B.; MARSHALL, K. A. e SEDEROFF, R. R.. Chloroplast and mitochondrial DNA are paternally inherited in *Sequoia sempervirens* D. Don Endl.. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86 : 9347-9349, 1989.
- NEI, M.. **Molecular Evolucionary Genetics**. **Columbia University Press**, NY, USA, 1987.

- OROZCO-CASTILHO, C.; CHALMERS, K. J.; POWELL, W. e WAUGH, R.. RAPD and organelle specific PCR re-affirms taxonomic relationships within the genus *Coffea*. **Plant Cell Reports** 15 : 337-341, 1996.
- OWENS, J. N. e MORRIS, S. J.. Cytological Basis for Cytoplasmic inheritance in *Pseudotsuga menziesii*. I. Pollen Tube and Archegonial Development. **Amer. J. Bot.** 77: 433-445, 1990.
- OWENS, J. N. e MORRIS, S. J.. Cytological Basis for Cytoplasmic inheritance in *Pseudotsuga menziesii*. II. Fertilization and Proembryo Development. **Amer. J. Bot.** 78: 1515-1527, 1991.
- PALMER, J. D.. Chloroplast DNA evolution and Biosystematic uses of Chloroplast DNA variation. **The American Naturalist** 130 (supl.): S7-S29, 1987.
- PALMER, J. D.. Comparative organization of chloroplast genomes. **Ann. Rev. Genet** 19: 325-354, 1985.
- PARDUCCI, L. e SZMIDT, A. E.. PCR-RFLP Analysis of cpDNA in the Genus *Abies*. **Theor Appl Genet** 98: 802-808, 1999.
- PETIT, R. J.; KREMER, A. e WAGNER, D. B.. Geographic struture of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. **Theor Appl Genet** 87: 122-128, 1993.
- PONS, O. e PETIT, J.R.. Estimation, Variance and Optimal Sampling of Gene Diversity I. Haploid locus. **Theor Appl Genet** 90: 462-470, 1995.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; DOYLE, J. J.; McNICOL, J. W.; TINGEY, S. V. e RAFALSKI, A. J.. Genepool variation in genus *Glycine* subgenus *Soja* revealed by polymorphic nuclear and chloroplast microsatellites. **Genetics** 144: 793-803, 1996.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; McDEVITT, R.; VENDRAMIN, G. G. e RAFALSKI, A. J.. Polymorphic Simple Sequence Repeat Regions in chloroplast Genome: Applications to the population genetics of pines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92: 7759-7763, 1995.
- POWELL, W.; OROZCO-CASTILHO, C.; CHALMERS, K. J.; PROVAN, J. e WAUGH, R.. Polymerase chain reaction-based assays for the characterization of plant genetic resources. **Electrophoresis** 16 : 1726-1730, 1995.
- RAUBESON, L. A. e JANSEN, R. K.. A rare Chloroplast-DNA Structural Mutation is Shared by all Conifers. **Bioch. Syst. Ecol.** 20 : 17-24, 1992.

- REITZ, R.; KLEIN, R. M. e REIS, A.. **Projeto Madeira de Santa Catarina**. Itajaí: HBR, 320 p, 1978.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B. e HERLICH, H. A.. Iniciador-directed Enzimatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science** 239: 487-491, 1988.
- SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J-M.; ROSSELI, D. e EXCOFFIER, L.. Arlequin ver. 1.1 : A Software for Population Genetic Data Analysis. **Genetics and Biometry Laboratory**, University of Geneva, Switzerland, 1997.
- SEARS, B. B.. Elimination of Plastids During Spermatogenesis and fertilization in the Plant Kingdom. **Plamid** 4: 233-255, 1980.
- SEITZ, R. A. Crow development of *Araucaria angustifolia* in its natural environment during sixty years. Crow and canopy structure in relation to productivity. In: Fugimori, T. e Whitehead, D. (eds.) **Forestry and Forest Products Research Institute**. Ibaraki, Tokyo-Japan, p.129-145. 1986.
- SHIMIZU, J. Y. e OLIVEIRA, Y. M. M.. Distribuição da Variação e usos dos recursos genética de araucária no Sul do Brasil. **EMPRABA-URPFCS**, Documento 04, Curitiba-PR, 9p, 1981.
- SOUTHERN, E. M.. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.** 98: 503-517, 1975.
- SUGIURA, M.. The chloroplast genome. **Plant Molecular Biology** 19: 149-168, 1992.
- SZMIDT, A. E. Phylogenetic and applied studies on Chloroplast genome in forest conifers. **Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees**, S. Fineschi, M. E. Malvolti, F. Cannata and H. H. Hattemer (eds.), 1991 **SPB Academic Publishing bv**, The Hague, The Netherlands, pp. 185-196, 1991.
- SZMIDT, A. E.; WANG, X.-R. e CHANGTRAGOON, S.. Contrasting patterns of genetic diversity in two tropical pines: *Pinus kesia* (Royle ex Gordon) and *P. merkusii* (Jungh et De Vriese). **Theor. Appl. Genet.** 92: 436-441, 1996.
- SZMIDT, A. E. e WANG, X.-R.. Molecular systematics and genetic differentiation of *Pinus sylvestris* (L.) and *P. densiflora* ( Sieb. Et Zucc.). **Theor. Appl. Genet.** 86: 159-165, 1993.

- TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G. e BOUVET, J.. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology** 17 : 1105-1109, 1991.
- TAJIMA, F.. Measurement of DNA polymorphism. In: Mechanisms of Molecular Evolution. **Introduction to Molecular Paleopopulation Biology**, Edited by TAKAHATA, N e CLARCK, A. G., Tokyo, Sunderland, MA: Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc., 37-59, 1993.
- TRAVIS, S. E.; MASCHINSKI, J. e KEIM, P.. An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. **Mol. Ecol.** 5 : 735-745, 1996.
- TSUMURA, Y.; TAGUCHI, H.; SUYAMA, Y. E OHBA, K.. Geographical cline of chloroplast DNA variation in *Abies mariesii*. **Theor Appl Genet** 89 : 922-926, 1994.
- VENDRAMIN, G. G.; ANZIDEI, M.; MADAGHIELE, A. e BUCCI, G.. Distribution of genetic Diversity in *Pinus pinaster* Ait. as Revealed by Chloroplast Microsatellites. **Theor Appl Genet** 97: 456-463, 1998.
- VENDRAMIN, G. G.; DEGEN, B. ; PETIT, R. J.; ANZIDEI, M.; MADAGHIELE, A. ZIEGENHAGEN, B..High Level of Variation at *Abies alba* Chloroplast microsatellite loci in Europe. **Molecular Ecology** 8: 1117-1126, 1999.
- VICARIO, F.; VENDRAMIN, G. G.; ROSSI, P.; LIÒ, P. e GIANNINI, R.. Allozyme, chloroplast DNA and RAPD markers for determining genetic relationships between *Abies alba* and the relic population of *Abies nebrodensis*. **Theor. Appl. Genet.** 90 : 1012-1018, 1995.
- WAGNER, D. B.; GOVINDARAJU, D. R.; YETMAN, C. W. e PITEL, J. A.. Paternal chloroplast DNA inheritance in a diallel cross of Jack Pine (*Pinus banksiana* Lamb.). **The Journal of Heredity** 80(6) : 483-485, 1989.
- WAGNER, D. B.. Nuclear, chloroplast and mitochondrial DNA polymorphisms as Biochemical Markers in Population Genetic Analysis of Forest Trees. **New Forest** 6: 373-390, 1992.
- WAKASUGI, T.; TSUDZUKI, J.; ITO, S.; NAKASHIMA, K.; TSUDZUKI, T. e SUGIURA, M.. Loss of All *ndh* Genes as Determined by Sequencing the Entire

- Chloroplast Genome of the Black Pine *Pinus thunbergii*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 9794-9798, 1994.
- WANG, X.-R. e SZMIDT, A. E.. Chloroplast DNA-based phylogeny of Asian *Pinus* species (Pinaceae). **Pl. Syst. Evol.** 188: 197-211, 1993.
- WANG, X.-R. e SZMIDT, A. E.. Hybridization and Chloroplast DNA variation in a *Pinus* species complex from Asia. **Evolution** 48 : 1020-1031, 1994.
- WANG, X.-R.; SZMIDT, A. E. e LU, M-Z.. Genetic Evidence for the Presence of Cytoplasmic DNA in Pollen and Megagametophytes and Maternal Inheritance of Mitochondrial DNA in *Pinus*. **Forest Genetics** 3 (1): 37-44, 1995.
- WOLFE, K. H.; LI, W-H. e SHARP, P. M.. Rates of Nucleotide Substitution Vary Greatly Among Plant mitochondrial, Chloroplast and Nuclear DNAs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84: 9054-9058, 1987.
- WRIGHT, S.. The Interpretation of Population Structure by F-statistics With Special Regards to Systems of Mating. **Evolution** 19 : 395-420, 1965.
- ZIEGENHAGEN, B.; SCHAUERTE, M.; KORMUTÁK, A. e SCHOLZ, F.. Plastid DNA polymorphism of megagametophytes and pollen in two *Abies* species. **Silvae Genetica** 45: 5-6, 1996.
- ZIEGENHAGEN, B.; KORMUTÁK, A.; SCHAUERTE, M. e SCHOLZ, F.. Restriction site polymorphism in chloroplast DNA of Silver Fir (*Abies alba* Mill.). **Forest Genetics** 2 (2): 99-107, 1995.
- ZUNK, K.; MUMMENHOF, K.; KOCH, M. e HURKA, H.. Phylogenetic relationships of *Thlaspi* s. I. (subtribe Thlaspidinae, Lepidieae) and allied genera based on Chloroplast DNA Restriction Site variation. **Theor. Appl. Genet.** 92: 375-381, 1996.

## ANEXO

Lista de haplótipos obtidos com a digestão dos produtos da PCR com as enzimas de restrição. Na lista são mostrados apenas as regiões que se mostraram polimórficas, sendo que as outras combinações foram monomórficas e não são mostradas na constituição dos haplótipos.

### Haplótipo

**h1**= AS/ *Hinf*I / *Rsa*I, mais todas as outras combinações monomórficas das digestões dos produtos da PCR e pelas enzimas de restrição.

**h2**= CS / *Hinf*I

QR / *Taq*I / *Rsa*I

SfM / *Hinf*I, mais todas as outras combinações monomórficas das digestões dos produtos da PCR e pelas enzimas de restrição.

**h3**= CS / *Hinf*I

K1K2 / *Rsa*I, mais todas as outras combinações monomórficas das digestões dos produtos da PCR e pelas enzimas de restrição.

**h4**= CS / *Hinf*I / *Rsa*I, mais todas as outras combinações monomórficas das digestões dos produtos da PCR e pelas enzimas de restrição.

**h5**= CS / *Hinf*I, mais todas as outras combinações monomórficas das digestões dos produtos da PCR e pelas enzimas de restrição.

**h6**= CS / *Rsa*I, mais todas as outras combinações monomórficas das digestões dos produtos da PCR e pelas enzimas de restrição.

**h7**= CS / *Rsa*I

SfM / *hinf*I, mais todas as outras combinações monomórficas das digestões dos produtos da PCR e pelas enzimas de restrição.

**h8**= SfM / *Hinf*I, mais todas as outras combinações monomórficas das digestões dos produtos da PCR e pelas enzimas de restrição.

**h9**= SfM / *Taq*I, mais todas as outras combinações monomórficas das digestões dos produtos da PCR e pelas enzimas de restrição.

**h10**= Sfm / TaqI, mais todas as outras combinações monomórficas das digestões dos produtos da PCR e pelas enzimas de restrição.

**h11**= CS / HaeIII mais todas as outras combinações monomórficas das digestões dos produtos da PCR e pelas enzimas de restrição.

**h12**= combinação monomórfica de todas as digestões dos produtos da PCR pela enzimas de restrição.