

Padronização de protocolo AFLP e sua capacidade informativa para análise da diversidade genética em *Araucaria angustifolia*

AFLP protocol standardization and its informative capacity to genetic diversity analysis in *Araucaria angustifolia*

Valdir Marcos Stefenon
Rubens Onofre Nodari
Maurício Sedrez dos Reis

RESUMO: Com o intuito de analisar a eficiência informativa de marcadores AFLP, investigou-se a diversidade genética intrapopulacional de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista do Estado de Santa Catarina. Foram selecionadas aleatoriamente sete combinações de iniciadores para reações AFLP, gerando 62 marcadores polimórficos, os quais foram utilizados para estudar uma população natural do Parque Ecológico Municipal de Lages, SC. Foi gerada uma matriz binária, a partir da qual foram determinados a diversidade genética pelo índice de Shannon ($H = 0,54$), o índice de similaridade de Jaccard entre indivíduos e construído o dendrograma correspondente. O número médio de bandas obtidas por iniciador foi de 89,3 e a porcentagem de bandas polimórficas foi de 9,8%. Estes índices de diversidade genética foram comparados àqueles obtidos a partir de marcadores isoenzimáticos ($H=0,29$; $A=1,4$; $P=20\%$) e PCR-RFLP ($H=0,0$; $A=1$; $P=0\%$). Realizando o agrupamento das plantas sem uma padronização de valor para a similaridade genética, sete grupos distintos foram obtidos, sendo que 46% das plantas formaram um único grupo com similaridade genética variando entre 45 e 75% e somente duas plantas apresentaram similaridade superior a 75%. Devido à ampla cobertura genômica proporcionada pela técnica AFLP, foi possível estimar a diversidade genética desta população, partindo-se do grau de similaridade genética entre os indivíduos e das bandas polimórficas. Apesar destas estimativas não serem equivalentes aos índices tradicionalmente utilizados (heterozigosidade e estatísticas F), a técnica AFLP pode ser considerada uma poderosa ferramenta para a análise da diversidade genética de populações naturais de araucária, possibilitando subsídios aos programas de melhoramento e conservação genética.

PALAVRAS-CHAVE: Pinheiro-do-paraná, Marcadores moleculares, Similaridade genética, Coníferas

ABSTRACT: In order to analyze the informative efficiency of AFLP markers, the intrapopulational genetic variability in a remnant of the Rain Forest in the state of Santa Catarina was investigated. Seven primer combinations to AFLP reactions were tested, resulting in sixty two markers which were used in the study. A binary matrix was built, from which the genetic diversity was determined by using the Shannon's index ($H = 0.54$), the Jaccard's similarity index and the correspondent dendrogram. The mean number of marker bands per primer was 89.3 and 9.8% of the marker bands were polymorphic. Those genetic diversity indexes were compared to indexes obtained by isozyme ($H=0.29$; $A=1.4$; $P=20\%$) and PCR-RFLP ($H=0.0$; $A=1$; $P=0\%$). Without using a standardized value for genetic similarity, seven distinct groups were obtained, while 46% of the plants formed a unique group with genetic similarity between 45 and 75%. Only just two plants showed similarity higher than 75%. Owing to the wide genomic coverage allowed by the AFLP

technique, the genetic variability within population was estimated by the genetics similarity among plants and among polymorphic marker bands. Although these estimates are not equivalent to those traditionally used (heterozygosity and F-statistics), the AFLP technique can be considered a powerful tool for the analysis of genetic variability in Brazilian pine natural populations. This can become a valuable help to plant breeding and gene conservation.

KEYWORDS: Brazilian pine, Molecular markers, Genetic similarity, Conifers

INTRODUÇÃO

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

Na década de 1970, Hueck (1972) considerou as Matas de Araucária do sul do Brasil a região mais importante para a economia florestal e madeireira do país. A araucária correspondia, na época, a 90% de cerca de um milhão de metros cúbicos de madeira exportada pelo país. Essa exploração, mais intensa no período de 1950 a 1970, pode ter causado perda de parte da diversidade genética nas populações naturais de araucária, concentradas em fragmentos de tamanhos variáveis.

A acentuada fragmentação das populações de *A. angustifolia* pode provocar alterações na dinâmica de sua regeneração e reprodução, além de redução da diversidade genética e aumento da divergência genética entre populações através da deriva genética, endogamia e redução do fluxo gênico (Shimizu et al., 2000; Auler et al., 2002). O aumento da endogamia e da deriva pode ainda gerar fragilidade nas no-

vas gerações, ao facilitar o surgimento de homozigotos para genes deletérios.

Dados referentes à diversidade genética de espécies florestais também podem ser utilizados na elaboração de programas de melhoria e conservação destas.

Estudos de diversidade genética, realizados com marcadores isoenzimáticos em diferentes populações naturais de *A. angustifolia* (Shimizu et al., 2000; Mantovani et al., 2002; Auler et al., 2002), revelaram valores de heterozigosidade esperada entre 0,059 e 0,248, heterozigosidade observada entre 0,053 e 0,24, número médio de locos entre 1,4 e 2,3 e número médio de locos polimórficos entre 19,9% e 80%, dependendo do estado de conservação dos remanescentes. As coníferas, em geral, apresentam uma média de 67,7% de locos polimórficos, heterozigosidade de 0,207 e número de alelos por loco igual a 2,29 (Hamrick e Loveless, 1986; Hamrick e Godt, 1990).

Portanto, quando comparadas à populações de coníferas, populações de *A. angustifolia* podem apresentar índices de diversidade genética superiores à média.

Contudo, algumas tentativas de reflorestamento promovidas com *A. angustifolia* têm apresentado resultados pouco atrativos no que diz respeito ao seu crescimento e um dos fatores limitantes pode ser o pouco conhecimento relacionado à genética dos ecótipos específicos de cada região geográfica (Guerra e Reis, 1998; Hampp et al., 2000), uma vez que certas procedências são capazes de apresentar um incremento médio anual superior a 20 m³/ha/ano (Guerra et al., 2002).

Além do valor econômico, a araucária tem uma importante função ecológica na Floresta Ombrófila Mista, sendo responsável pela produção de alimento para diversos mamíferos e aves, como bugios, cutias, gralhas e papagaios (Reitz e Klein, 1966) e criando ambientes propícios ao desenvolvimento de dezenas de espécies vegetais em seu caule, galhos e no dossel inferior, sombreado por sua copa (Mattos, 1994).

Em função de sua importância ecológica e econômica e do alto grau de degradação das matas de araucária, o desenvolvimento de técnicas de estudos da diversidade genética dessa espécie é de grande importância, pois pode auxiliar em dois programas relevantes: (i) de conservação, que envolve a preservação, recuperação e manejo dessas matas e (ii) de melhoramento genético, que envolve a seleção de combinações alélicas adaptadas aos diversos ambientes para fins de reflorestamento. Ferramentas da biologia molecular, como os marcadores baseados na amplificação do DNA via reação em cadeia da polimerase (Mullis e Faloona, 1987), podem auxiliar no avanço de conhecimento da organização da diversidade genética entre e dentro de populações.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência informativa de marcadores AFLP na determinação da diversidade genética de populações naturais de *A. angustifolia*, comparativamente a marcadores isoenzimáticos e PCR-RFLP.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Foram utilizadas acículas de 30 plantas adultas, coletadas aleatoriamente no Parque Ecológico Municipal (Parque Ecológico Municipal João J.T.C. Neto), no Município de Lages, SC. A população de araucária distribuiu-se em uma região com superfície de 2,34 Km² e altitude entre 910 e 1.222 m. As acículas coletadas fo-

ram acondicionadas em sacos plásticos contendo sílica gel para o transporte e posteriormente, armazenadas a 4°C até o momento da extração do DNA.

Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA seguiu o protocolo otimizado para *A. angustifolia*, descrito por Stefenon e Nodari (2001). O material vegetal foi macerado e tratado com tampão de extração [CTAB 2%; NaCl 1,5 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl pH 8,0, 100 mM; PVP 2%; β-mercaptoetanol 1%] e, para eliminação dos contaminantes presentes no DNA, realizou-se extração orgânica com CIA [clorofórmio:álcool isoamílico 24:1] e lavagem com CTAB 10% [CTAB 10%; NaCl 1,4 M]. O RNA foi eliminado com a adição de 5 μL de RNase A (10 μg/mL) e o DNA foi precipitado pela desidratação com isopropanol, etanol 90% e etanol 75%. O DNA precipitado foi diluído em 100 μL de TE [Tris-HCl pH 8,0, 10 mM; EDTA 1 mM], quantificado em gel de agarose 0,8% corado com solução de 0,02% de brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (Sambroock et al., 1989), comparando as amostras com DNA lambda de concentrações conhecidas (20, 50, 100 e 200 ng/μL).

Reações de AFLP e visualização das bandas

As reações de AFLP, conforme descrito por Vos et al. (1995), foram desenvolvidas utilizando-se o kit AFLP® Analysis System I (Life Technologies®). Após a digestão com as enzimas EcoRI e MseI e ligação dos oligonucleotídeos adaptadores, o DNA foi amplificado utilizando iniciadores com uma base seletiva (EcoRI-N e MseI-N), em 25 μL de reação. Após essa etapa, o DNA pré-amplificado foi diluído (1:25) e amplificado utilizando iniciadores com três bases seletivas (EcoRI-NNN e MseI-NNN), sendo que para os iniciadores, cada N corresponde a uma base: A, C, T ou G. As reações de

PCR foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research). A visualização dos resultados foi realizada após a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% em aparato vertical modelo S2 (Life Technologies) com tampão de cuba TBE 1X. A coloração do gel com nitrato de prata seguiu o protocolo descrito no manual Silver SequenceTM da Promega, modificado pela inclusão de tratamento do gel com ácido nítrico 1% antes da impregnação com prata e pela exclusão do formaldeído na solução de nitrato de prata 0,2%.

Análise da diversidade genética e comparação da eficiência informativa

Para os fragmentos polimórficos amplificados, foi construída uma matriz binária, analisando-se a presença ou ausência de cada banda, codificada por 1 ou 0, respectivamente. A partir dessa matriz, foi determinado o índice de similaridade de Jaccard entre indivíduos e, posteriormente, realizado o agrupamento do tipo UPGMA (método das médias das distâncias). A análise dos dados e a construção do dendrograma foram feitas com auxílio do programa NTSYS-pc 2.02 (Rohlf, 1995). Os índices estimados foram: a similaridade genética, o número médio de bandas, a porcentagem de bandas polimórficas e a diversidade genética (Lewontin, 1972). O cálculo da diversidade genética foi realizado utilizando-se o índice de Shannon (1948), que é determinada por $H = -\sum p_i \ln p_i$, considerando cada banda polimórfica como um loco com dois alelos.

Resultados obtidos para a mesma população a partir de marcadores isoenzimáticos (Auler et al., 2002) e de PCR-RFLP para genoma de cloroplastos (Schlögl, 2000), foram utilizados para a comparação da eficiência informativa das técnicas. A partir dos dados primários, foi determinado o índice de diversidade de Shannon para os dois trabalhos e realizada a compara-

ção. O número médio de locos isoenzimáticos e de haplótipos PCR-RFLP, foi comparado com o número médio de bandas AFLP. O polimorfismo de locos isoenzimáticos, de haplótipos PCR-RFLP e de bandas AFLP foram comparados diretamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração e quantificação do DNA

Em função da presença de grande quantidade de polifenóis (Fonseca et al., 2000) e de proteínas (Mazza e Bittencourt, 2000) nas acículas de *A. angustifolia*, houve a necessidade de se otimizar o protocolo CTAB de extração de DNA vegetal (Doyle e Doyle, 1987) para a obtenção de DNA com boa qualidade e quantidade. Dentre os protocolos testados para a extração de DNA de araucária (Stefenon e Nodari, 2001), vários não continham PVP no tampão de extração ou continham esse composto em concentração de 1%, enquanto o β -mercaptoetanol era utilizado em concentração média de 0,1%.

Para a obtenção de DNA com as características desejadas, foram utilizados PVP 2% para a eliminação dos polifenóis e β -mercaptoetanol 1%, para a desnaturação das proteínas. Para total limpeza do DNA, três extrações com solvente orgânico (clorofórmio) foram necessárias, além de utilização de CTAB 10%. Extrações com menos de três lavagens com clorofórmio resultaram em DNA contaminado com polifenóis e proteínas e, portanto, de baixa qualidade. A solução de CTAB 10% foi necessária para a eliminação polissacarídeos da amostra (Rogers e Bendich, 1985; Rogers e Bendich, 1988).

Com base em géis de quantificação, a concentração do DNA extraído foi estimada entre 50 a 300 ng/ μ L, a partir de 0,15 g de acículas.

Reações de AFLP e visualização das bandas

Cinqüenta e seis combinações de iniciadores EcoRI-NNN + MseI-NNN foram testadas em três plantas de araucária. No presente estudo, foram selecionadas as duas combinações com maior e menor número de bandas polimórficas (E-ACG + M-CAG e E-ACA + M-CTT, respectivamente) e mais cinco combinações escolhidas aleatoriamente (E-AGC + M-CAC, E-ACT + M-CAA, E-AAG + M-CTG, E-ACC + M-CAT, E-AAC + M-CAC). Considerando somente as bandas de alta intensidade no gel, por não gerarem ambigüidade, o número total de bandas observadas variou de 60 (E-ACA + M-CTT) a 105 (E-ACC + M-CAT), com uma média de 89,3 bandas por combinação de iniciadores. Das 625 bandas consideradas, 62 (10,0%) revelaram polimorfismo e foram utilizadas como marcadores para análise da diversidade genética da população.

Utilizando a técnica AFLP para outras coníferas (*Pinus* sp e *Picea* sp), Lerceteau e Szmids (1999) obtiveram entre 150 e mais de 200 bandas em gel de poliacrilamida 6%, revelado com fósforo radioativo. O menor número de bandas obtidas no presente trabalho deve-se à menor sensibilidade da coloração com nitrato de prata, quando comparada à revelação radioativa. Dados semelhantes foram encontrados em estudos genéticos de *Malus domestica* (Dantas, 2002). Todavia, a utilização de prata para a coloração de DNA em gel de poliacrilamida tem se tornado uma técnica rotineira, devido a ser mais rápida, mais prática, dispensar salas especiais e não utilizar radioatividade.

Lerceteau e Szmids (1999) também relataram uma relação direta entre o número de bases A/T ou C/G nos iniciadores e o total de bandas obtidas. Quanto maior o número de bases C/G presente nos iniciadores, menor o número de bandas obtidas no gel. Todavia, para *A.*

angustifolia esta relação não foi observada. A combinação E-ACT + M-CAA (quatro bases A/T) gerou o mesmo número total de bandas que a combinação E-ACG + M-CAG (quatro bases C/G). Com relação ao número de bandas polimórficas, a combinação E-ACG + M-CAG revelou 21 bandas (21%), enquanto a combinação E-AGC + M-CAC revelou somente 4 bandas (4,4%). Portanto, em *A. angustifolia* a variação no número total de bandas (60 a 105) e no número de bandas polimórficas (3 a 21) não pode ser explicada como resultado da composição nucleotídica da espécie em relação à quantidade de A/T e C/G. Uma vez que combinações de iniciadores com diferente número de A/T e C/G em sua composição geraram números iguais de bandas, a melhor combinação de iniciadores deve ser determinada para cada estudo, após a seleção entre as combinações possíveis.

O tempo de corrida eletroforética foi otimizado para cada combinação de iniciadores EcoRI e MseI, variando entre 1h20min e 1h40min. Tempos de corridas maiores (até 2 horas) permitiram boa separação das bandas. Porém, as mesmas perderam qualidade, não sendo possível ter consistência na avaliação de todas as plantas. A potência utilizada também foi otimizada, obtendo-se os melhores resultados com potência constante de 65 W, corrente elétrica entre 1.420 e 1.510 V e intensidade entre 36 e 40 mA.

Diversidade genética

A combinação de iniciadores AFLP que apresentou maior número de bandas polimórficas foi E-ACG + M-CAG (21,0%), seguida da combinação E-AAC + M-CAC (12,2%). A menor porcentagem de bandas polimórficas foi obtida com a combinação E-AGC + M-CAC (4,4%) (Tabela 1).

Tabela 1

Combinações de iniciadores nas reações AFLP e respectivos índices de diversidade genética para a população natural de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal.

(Primer combinations of AFLP reactions and respective Genetic diversity indexes for the natural population of *A. angustifolia* from the Ecological Park).

Combinação de Iniciadores	Número total de bandas	Bandas polimórficas		Índice de diversidade (H)
		Quantidade	%	
E-AGC + M-CAC	90	4	4,4%	0,123
E-ACT + M-CAA	100	10	10,0%	0,036
E-ACA + M-CTT	60	3	5,0%	0,174
E-ACG + M-CAG	100	21	21,0%	0,114
E-AAG + M-CTG	80	6	7,5%	0,251
E-ACC + M-CAT	105	7	6,6%	0,068
E-AAC + M-CAC	90	11	12,2%	0,358
Total	625	62	--	--
Médias	89,3	8,8	9,8%	0,156

A diversidade genética determinada pelo índice de Shannon, utilizando marcadores AFLP, foi superior àquela determinada a partir dos dados relativos a isoenzimas (Auler et al., 2002) e PCR-RFLP (Schlögl, 2000).

Com base nos 62 marcadores AFLP utilizados no presente trabalho, a diversidade genética média da população foi $H=0,54$ e o número médio de bandas polimórficas foi de 9,8. A partir dos 11 locos isoenzimáticos analisados por Auler et al. (2002), a diversidade genética estimada foi $H=0,29$ e o número médio de locos foi de 1,4 com um polimorfismo de 20%.

Marcadores PCR-RFLP não foram capazes de identificar além de um único haplótipo nesta população ($H=0,0$; Tabela 2).

Tabela 2

Comparação de índices de diversidade genética obtidos através de marcadores isoenzimáticos, RFP-PCR e AFLP para a população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal

(Genetic diversity indexes comparison obtained by isozymes, PCR-RFLP and AFLP markers, to *A. angustifolia* population from the Ecological Park).

Índices	Isoenzimas ¹	PCR-RFLP ²	AFLP ³
A*	1,4	1,0	89,3
P**	20,0	0,0	8,8
H (Shannon)	0,29	0,0	0,54

¹ Auler et al., 2002; ² Schlögl, 2000; ³ Presente trabalho

* número médio de locos, haplótipos ou bandas;

** percentagem de locos, de haplótipos ou de bandas polimórficas.

Indiferente dos resultados obtidos com marcadores AFLP (presente trabalho), com marcadores isoenzimáticos (Auler et al., 2002) e com marcadores PCR-RFLP (Schlögl, 2000), devem ser considerados como fatores importantes na potencialização dos efeitos da deriva genética, endogamia e erosão da diversidade genética na população do Parque Ecológico Municipal, eventos como: (i) a extração de madeira sem critérios de manejo durante os anos do ciclo da madeira no Planalto Serrano Catarinense (1950-1960), restando, na época, somente as árvores de difícil acesso e de pequeno porte; (ii) a redução dos ambientes necessários para o desenvolvimento da araucária até seu estágio adulto, devido ao intensivo aumento de reflorestamentos com *Pinus* spp e da urbanização das regiões adjacentes ao Parque; (iii) a redução da taxa de germinação de sementes na natureza devido à coleta antrópica de pinhão e (iv) a diminuição do fluxo gênico face ao isolamento da área em relação a outros remanescentes da Mata de Araucária e à urbanização circunvizinha, que contribui para a redução dos agentes dispersores de sementes. Todos estes eventos, por sua vez, contribuem para o aumento da taxa de endogamia.

Partindo-se de um limite máximo de similaridade padronizado de 50%, obtiveram-se 15

grupos, sendo 11 destes formados por uma única planta (Figura 1). Um grupo com 40% das plantas pode ser discriminado, com similaridade genética inferior a este valor de referência e somente as plantas L5 e L26, apresentaram similaridade genética maior que 75%.

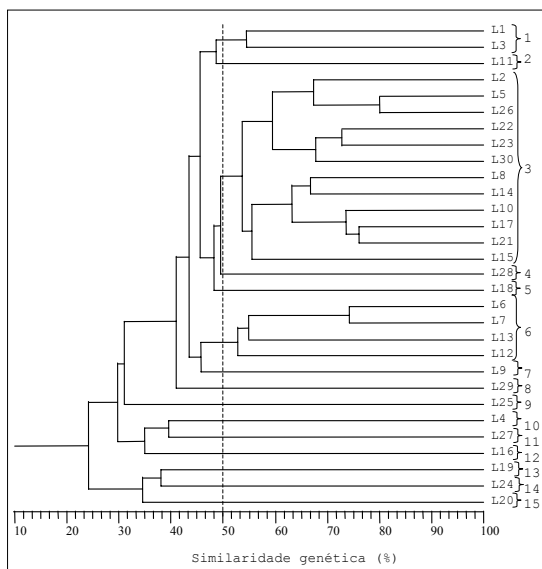


Figura 1
 Dendrograma da população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal, estimado pelo índice de Similaridade de Jaccard, a partir de 62 marcadores AFLP, com limite de similaridade genética padronizada de 50%. (Dendrogram of the *A. angustifolia* population from the Ecological Park, estimated by Jaccard's Similarity index based on 62 AFLP markers, with standardized genetic similarity of 50%).

Na análise do agrupamento sem padronização de valor para a similaridade genética, seis grupos distintos podem ser identificados (Tabela 3 e Figura 2), sendo um grupo formado por quatorze plantas (46%) com similaridade genética entre 45% e 75%. Destaca-se ainda um agrupamento formado por sete plantas em três grupos (grupo 5: L25; grupo 6: L4, L16 e L27; e grupo 7: L19, L20 e L24), que apresentam o mais baixo índice de similaridade genética com os demais, entre 24 e 30%.

Tabela 3

Agrupamento de plantas a partir do dendrograma, sem a padronização de similaridade genética. (Plant grouping, from the dendrogram, without genetic similarity standardization).

GRUPO	PLANTAS
1	L1, L3, L11
2	L2, L5, L8, L10, L14, L15, L17, L18, L21, L22, L23, L26, L28, L30
3	L6, L7, L9, L12, L13
4	L25
5	L29
6	L4, L16, L27
7	L19, L20, L24

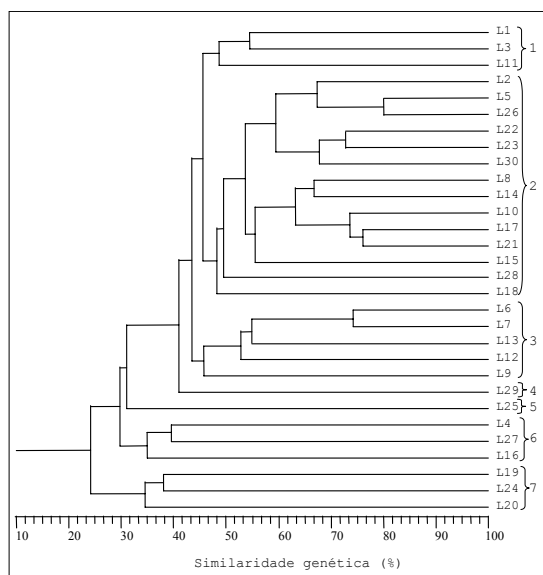


Figura 2
 Dendrograma da população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal, estimado pelo índice de Similaridade de Jaccard, a partir de 62 marcadores AFLP, sem limite de similaridade genética padronizada. (Dendrogram of the *A. angustifolia* population from the Ecological Park, estimated by Jaccard's Similarity index based on 62 AFLP markers, without standardized genetic similarity).

CONCLUSÃO

Apesar do pequeno tamanho da população e da amostragem, além do isolamento geográfico do Parque Ecológico Municipal de Lages, em relação a outros remanescentes de Floresta

Ombrófila Mista, foi detectada diversidade genética nesta população. A análise da diversidade genética da população de *A. angustifolia* pelo índice de Shannon e pela similaridade genética leva à conclusão que marcadores moleculares do tipo AFLP possuem capacidade informativa, podendo ser utilizados em estudos relacionados à diversidade genética dessa espécie.

O dendrograma obtido e a estimativa da diversidade demonstraram a existência de diversidade genética intrapopulacional, possibilitando auxílio na elaboração de planos de manejo e conservação para esta espécie.

AUTORES E AGRADECIMENTOS

VALDIR MARCOS STEFENON é Professor Colaborador na UNIPLAC - Universidade do Planalto Catarinense - Mestre em Biotecnologia pela CCB / UFSC - E-mail: gene_mol@hotmail.com
 RUBENS ONOFRE NODARI é Professor do Departamento de Fitotecnia da UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina - Caixa Postal 476 - Florianópolis, SC - 88040-900 - E-mail: nodari@cca.ufsc.br

MAURÍCIO SEDREZ DOS REIS é Professor do Departamento de Fitotecnia da UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina - Caixa Postal 476 - Florianópolis, SC - 88040-900 - E-mail:

Os autores agradecem à Prefeitura do Município de Lages, UFSC e UNIPLAC pelo apoio logístico; à FUNCITEC e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AULER, N.M.F.; REIS, M.S.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. The genetics conservation of *Araucaria angustifolia*: 1- genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and molecular biology**, v.25, n.3, p.329-338, 2002.

DANTAS, A.C.M. **Aplicação de técnicas de cultivo *in vitro*, de marcadores moleculares e bioquímicos no melhoramento genético da macieira (*Malus spp.*)**. Pelotas, 2002. 188p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pelotas.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, n.1, v.12, p.13-15, 1990.

FONSECA, F.N.; FERREIRA, A.J.S.; SARTORELLI, P.; LOPES, N.P.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W.; KATO, M.J. Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, n.55, p.575-580, 2000.

GUERRA, M.P.; REIS, M.S. ***Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze: segundo relatório parcial**. Florianópolis: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 1998. 39p.

GUERRA, M.P.; SILVEIRA, V.; REIS, M.S.; SCHNEIDER, L. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F., ed. **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: Editora SENAC, 2002. p.85-101

HAMPP, R.; MERZ, A.; SCHAIBLE, R.; SCHWAIGERER, M.; NEHLS, U. Distinction of *Araucaria angustifolia* seeds from different locations in Brazil by a specific DNA sequence. **Trees**, v.14, p.429-434, 2000.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Aozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S., ed. **Plant population genetics, breeding, and genetic resources**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p.43-63

HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. **Biotropica**, v.18, n.3, p.201-207, 1986.

HUECK, K. **As florestas da América do Sul: ecologia, composição e importância econômica**. São Paulo: Polígono, Editora da Universidade de Brasília, 1972. 466p.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Lista oficial de flora ameaçada de extinção**. Brasília: IBAMA, 2002. (Disponível em <http://www.ibama.gov.br>)

LERCETEAU, E.; SZMIDT, A.E. Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. **Heredity**, n.82, p.252-260, 1999.

LEWONTIN, R.C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary biology**, v.6, p.381-339, 1972.

- MANTOVANI, A.; MORELLATO, L.P.C.; REIS, M.S. Variação genética em uma população de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (Araucariaceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48, Águas de Lindóia, 2002. **Anais**. Águas de Lindóia: SBG, 2002. CD-ROM)
- MATTOS, J.R. **O pinheiro brasileiro**. 2.ed. Lages: Artes Gráficas Princesa, 1994. v.1, 225p.
- MAZZA, M.C.M.; BITTENCOURT, J.V.M. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de pesquisa florestal**, n.41, p.12-17, 2000.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in enzymology**, v.15, p.335-350, 1987.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M. **Flora Ilustrada Catarinense: Araucariáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1966. 62p.
- ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extraction of DNA from milligram of fresh, herbarium and mummified plant tissues. **Plant molecular biology**, v.5, p.69-76, 1985.
- ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extraction of DNA from plant tissues. **Plant molecular biology**, v.6, p.1-18, 1988.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc 2.02: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, 1995.
- SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v.3
- SCHLÖGL, P.S. **Análise da diversidade genética em regiões não codificadoras de DNAs de cloroplastos em *Araucária angustifolia* por PCR-RFLP**. Florianópolis, 2000. 64p. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina.
- SHANNON, C.E. A mathematical theory of communication. **The Bell System technical journal**, v.27, p.379-423, 632-656, 1948.
- SHIMIZU, J.Y.; JAEGER, P.; SOPCHAKI, S.A. Variabilidade genética em uma população remanescente de araucária no Parque Nacional do Iguaçu, Brasil. **Boletim de pesquisas florestais**, n.41, p.18-36, 2000.
- STEFENON, V.M.; NODARI, R.O. Extração de DNA para estudos genéticos em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista de divulgação científica e cultural**, v.4, n.1/2, ed. especial, p.115-131, 2001.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VANDELEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic acid research**, v.23, p.4407-4414, 1995.