

MARIANE HATSUNO MURAKAMI

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADOR MOLECULAR ASSOCIADO À  
EXPRESSÃO SEXUAL EM *Araucaria angustifolia* (BERT) O. KTZE.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Florestal, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Antonio R. Higa

CURITIBA

2002



Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Agrárias – Centro de Ciências Florestais e da Madeira  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**  
Av. Lothário Meissner, 3400 - Jardim Botânico – CAMPUS III  
80210-170 - CURITIBA - Paraná  
Tel. (41) 360.4212 - Fax. (41) 360.4211 - <http://www.floresta.ufpr.br/pos-graduacao>  
e-mail: [pinheiro@floresta.ufpr.br](mailto:pinheiro@floresta.ufpr.br)

## PARECER

Defesa nº 485

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, após arguir a mestrand *MARIANE HATSUNO MURAKAMI* em relação ao seu trabalho de dissertação intitulado "IDENTIFICAÇÃO DE MARCADOR MOLECULAR ASSOCIADO À EXPRESSÃO SEXUAL EM *Araucária angustifolia* (BERT) O. KTZE", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de *Mestre em Ciências Florestais*, na área de concentração em *Silvicultura*.

*Dr. Antonio Riovei Higa*  
Departamento de Ciências Florestais da UFPR  
Orientador e presidente da banca examinadora

*Dr. Paulo Mauricio Ruas*  
Universidade Estadual de Londrina - UEL  
Primeiro examinador

*Dra. Vânia Aparecida Vicente*  
Departamento de Patologia Básica da UFPR  
Segunda examinadora

Curitiba, 28 de agosto de 2002.

*Nivaldo Eduardo Rizzi*  
Nivaldo Eduardo Rizzi  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal  
Franklin Galvão  
Vice-coordenador

*Dedico essa dissertação aos meus pais,  
Etsuro e Haidê.*

*Jamais mediram esforços para que eu  
obtivesse muito sucesso na minha vida. Pelos  
conselhos, pelo orgulho que sinto por eles, pelos  
inúmeros ensinamentos que levarei para toda a  
vida. Por terem me ajudado a ser alguém...*

*Por me darem asas para voar bem alto, com  
a certeza de ter sempre onde pousar... para onde  
voltar...*

## AGRADECIMENTOS

Ao Sr. Antonio R. Higa, por sua amizade, pela sua compreensão, paciência, incentivo e por proporcionar todas as fases da dissertação possíveis e executáveis. Pela sua preocupação de poder contribuir com a minha vida profissional e pessoal. Uma das pessoas mais extraordinárias que já conheci, tanto por sua capacidade intelectual como sua maneira de encarar a vida. Por tê-lo como meu MESTRE e um pouco de pai.

Ao Sr. Paulo M. Ruas e a Claudete de Fátima Ruas pela dedicação, paciência, amizade e incentivo. E por tornarem possível a realização de uma etapa tão importante para o desenvolvimento de minha dissertação. À Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela permissão do uso do Laboratório de Marcadores Moleculares.

A Maria Cristina Mazza e Juliana Bittencourt, pelo apoio logístico, pela amizade, carinho e por estarem sempre a minha disposição nos mais difíceis momentos. À EMBRAPA Florestas, pela oportunidade de ter desenvolvido grande parte do projeto, em especial, aos Sres. Jonatas Queller, Roberto Carleto e Harry Hoffman.

Ao Sr. Arnaldo R. Ferreira, pela amizade, apoio, grande incentivo e ajuda prestada por tantas vezes; amparo desde a minha graduação, até os dias de hoje. À RIGESA, Celulose, Papel e Embalagens Ltda., aos senhores Celso Santos e Valdemar Veiga.

Ao Sr. Edson Casagrande, Vilson Brandeleiro e demais funcionários da Celulose Irani S.A. pela coleta do material vegetativo, identificação de sexo das árvores e pela disponibilidade de tempo e atenção para nos auxiliar.

Ao Sr. Elcio Hirano, à Sra. Maristela A. Sorato e demais funcionários da EMBRAPA Recursos Tecnológicos em Canoinhas-SC.

Ao Sr. Jarbas Y. Shimizu, pessoa a qual sempre pude trocar e amadurecer idéias, aprender muito, e pela sua disposição a ajudar.

À FATMA – Fundação do Meio Ambiente do Governo do Estado de Santa Catarina, em especial ao Diretor Administrativo – Sr. Nilton Dauer, à Coordenadora da Regional do Planalto Norte Catarinense – Patrícia de Souza Gazaniga e aos técnicos: Cinthya Mônica Zanuzzi, Nelson Rosa, Agostinho Machado Filho, Rogel Cavazotti, Vera Seleme, Marcelle Meneses, Carla Groskopf, Fernando Fornari e Sueli Pape, pelo apoio e compreensão enquanto funcionária desta Fundação.

Ao Sr. Aداucto Pereira, professor da Universidade Federal do Paraná, Curso de Biologia.

À Sra. Valdinia, que me auxiliou na parte prática e tornou-se grande amiga.

À Professora Vânia Vicente, nos últimos momentos deste e que pude aprender muita coisa, mesmo em pouco tempo.

Aos amigos Cristiano Medri, Mayra Gallo, Danielle G. da Silva, Sheila Recepute, que estiveram ao meu lado durante todo o período em que estive em Londrina, e que ainda estão me apoiando e torcendo por mim, a vocês toda a minha amizade, meu carinho e meus agradecimentos...

À Daniela Cleide de Abreu com quem sempre pude contar, pelo apoio, principalmente pela amizade. Com quem pude dividir os melhores e piores momentos deste curso.

Ao Rodrigo D. Scarduelli, que sempre esteve ao meu lado, quem agüentou os momentos mais difíceis da minha vida. Tentando dar o melhor de si para me ajudar no que fosse preciso, apoio, incentivo, pelas horas perdidas para me fazer companhia no laboratório, na biblioteca, nos cursos, no desenvolvimento deste trabalho... pelo seu carinho, respeito e amor.... muito obrigada!

À minha família, que sempre me apoiou, me incentiva, e que demonstra muito orgulho pela minha pessoa. Meus pais, minhas irmãs e minha sobrinha, que são a razão da minha luta para ser alguém nesta vida, meu orgulho, meu exemplo...

A Deus por poder estar entre tantas pessoas fantásticas, aprendendo com cada acerto e com cada erro, me fazendo mais forte para enfrentar o que ainda está por vir.

### *Araucária*

*Araucária*

*Nasci forte e altiva,*

*Solitária.*

*Ascendo em linha reta*

*- Uma Coluna verde-escura*

*No verde cambiante da campina*

*Estendendo braços hirtos e serenos*

*Não há na minha frente*

*Nem veludos quentes de folhas*

*Nem risos vermelhos de flores,*

*Nem vinhos estonteantes de perfumes.*

*Só há o odor agreste de resina*

*E o sabor primitivo dos frutos.*

*Espalmo a taça verde no infinito.*

*Embalo o sono dos ninhos*

*Ocultos em meus espinhos,*

*Na silente nudez do meu isolamento*

*(Helena Kolody)*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE ABRAVIATURAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
2.1. <i>A Araucaria angustifolia</i> .....	20
2.1.1. Distribuição Natural da <i>Araucaria angustifolia</i> .....	20
2.1.2. Descrição da <i>Araucaria angustifolia</i> .....	21
2.1.3. Fenologia e Biologia Reprodutiva .....	23
2.1.4. Importância Econômica e Ecológica da <i>Araucaria Angustifolia</i> .....	26
2.2. BIODIVERSIDADE E VARIAÇÃO GENÉTICA .....	27
2.2.1. Melhoramento e Conservação Genética .....	27
2.2.2. Marcadores Genético .....	29
2.2.3. Marcadores Moleculares .....	29
2.2.3.1. Aplicações dos marcadores de DNA .....	31
2.2.3.2. PCR – Reação de polimerase em cadeia.....	31
2.2.3.3. RAPD – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso.....	32
2.2.3.4. Vantagens do RAPD .....	33
2.2.3.5. BSA – Análise de conjunto de amostras .....	34
2.3. DIOICIDA EM ARAUCARIA .....	35
2.3.1. Características Morfológicas Ligadas ao Sexo das Plantas .....	36
2.3.2. Características Fisiológicas Ligadas ao Sexo das Plantas .....	37
2.3.3. Propriedades Físicas da Madeira .....	38
2.3.4. Relação entre Proporção de Sexo e Mortalidade .....	38
2.3.5. Relação entre Sexo e Crescimento em DAP e em Altura .....	39
2.3.6. Proporção de Plantas Femininas e Masculinos em Espécies Dióicas .....	39
2.3.7. Características Cromossômicas .....	40
2.3.8. Determinação de Sexo com o Uso de Marcadores Moleculares .....	41
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
3.1. IDENTIFICAÇÃO DE SEXO .....	42
3.2. COLETA DO MATERIAL VEGETATIVO .....	43

3.3. EXTRAÇÃO DE DNA .....	44
3.4. PURIFICAÇÃO DO DNA .....	47
3.5. QUANTIFICAÇÃO DO DNA .....	47
3.6. APLICAÇÃO DO RAPD .....	48
3.7. ELETROFORESE.....	49
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>69</b>



## LISTA DE FIGURAS

1.	DISTRIBUIÇÃO NATURAL DA <i>Araucaria angustifolia</i> .....	20
2.	<i>Araucaria angustifolia</i> – ASPECTOS GERAIS .....	22
3.	ESTRUTURA REPRODUTIVA MASCULINA EM <i>Araucaria angustifolia</i> .	23
4.	ESTRUTURA REPRODUTIVA FEMININA FECUNDADA EM <i>Araucaria angustifolia</i> .....	24
5.	SEMENTES DE <i>Araucaria angustifolia</i> .....	24
6.	ÁREA DE COLETA DE MATERIAL VEGETATIVO DE <i>Araucaria angustifolia</i> .....	42
7.	TIRO NO TERMINAL DOS RAMOS .....	43
8.	ESPINGARDA CALIBRE 12 .....	43
9.	COLETA DAS FOLHAS JOVENS .....	43
10.	ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DE DNA .....	47
11.	ESQUEMA DE MARCADOR RAPD .....	50
12.	ANEXO 1. PRIMER OPERON SÉRIE OPAA .....	70
13.	ANEXO 2. PRIMER OPERON SÉRIE OPAB .....	70
14.	ANEXO 3. PRIMER OPERON SÉRIE OPAS- OPAC E OPAG .....	71
15.	ANEXO 4. PRIMER OPERON SÉRIE OPAJ .....	71
16.	ANEXO 5. PRIMER OPERON SÉRIE OPAL.....	72
17.	ANEXO 6. PRIMER OPERON SÉRIE OPAT .....	72
18.	ANEXO 7. PRIMER OPERON SÉRIE OPAT (REPETIÇÃO) .....	73
19.	ANEXO 8. PRIMER OPERON SÉRIE OPAS .....	73
20.	ANEXO 9. PRIMER OPERON SÉRIE OPAK .....	74
21.	ANEXO 10. PRIMER OPERON SÉRIE OPAU .....	74
22.	ANEXO 11. PRIMER OPERON SÉRIE OPS .....	75
23.	ANEXO 12. PRIMER OPERON SÉRIE OPT .....	75
24.	ANEXO 13. PRIMER OPERON SÉRIE OPAM .....	76
25.	ANEXO 14. TESTE INDIVIDUAL COM PRIMERS OPAM 01, OPAM 20, OPAK 05, OPAM 10, OPX 02, 03 E 04 .....	76
26.	ANEXO 15. TESTE INDIVIDUAL COM PRIMERS OPAB 06, OPA 18, 19 E 09, OPAD 02, 06, 13 E 16, OPAS 03 E 06.....	77
27.	ANEXO 16. TESTE INDIVIDUAL COM PRIMERS OPAS 11, OPAC 03, 04, 07 E 09 .....	77
28.	ANEXO 17. TESTE INDIVIDUAL COM PRIMERS OPAF 05 E 16, OPAE 05,	

OPO 04 E 18 .....	77
29. ANEXO 18. TESTE INDIVIDUAL COM PRIMERS OPAR 01, 02 E 05, OPAW 03, 08, 09, 10 E 11, OPS 06 E 09. ....	78
30. ANEXO 19. TESTE INDIVIDUAL COM PRIMERS OPAK 17 E 18, OPJ 01...	78
31. ANEXO 20. TESTE INDIVIDUAL COM PRIMERS OPW 02 E 05, OPE 05 E 10, OPAV 07 E 18, OPE 13, 17 E 18, OPAR 4 .....	78

## LISTA DE TABELAS

1. CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES PARA EXTRAÇÃO DE DNA .....	44
2. CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES PARA REAÇÃO DE PCR .....	48
3. “PRIMERS” TESTADOS EM “BULKS” .....	49
4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA. ....	51
5. DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES PARA REAÇÃO DE PCR .....	55
6. CONTAGEM DAS BANDAS NOS “PRIMERS” TESTADOS EM “BULKS” ..	55

## LISTA ABREVIATURAS

- AFLP** = polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism)
- Azul-de-bromofenol** = 3',3'',5',5'' – tetrabromofenol-sulfonaftaleína
- BSA** = Análise de conjunto de amostras segregantes (Bulk Segregant Analysis)
- CIA** = clorofórmio- álcool isoamílico
- CTAB** = brometo de cetiltrimetilamônio (Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide).
- dATP** = desoxiadenosina trifosfato
- dCTP** = desoxicitosina trifosfato
- DEPC** = dietil pirocarbonato
- dGTP** = desoxiguanina trifosfato
- DNA** = ácido desoxirribonucléico
- DNase** = desoxirribonuclease
- dNTP** = desoxinucleotídeo trifosfato
- dTTP** = desoxitimina trifosfato
- EDTA** = ácido etileno diamono tetracético (Ethylenediaminetetracetate)
- mRNA** = RNA mensageiro
- PCR** = reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
- PVP** = polivinilpirrolidona (Polyvinilpirrolidone).
- RAPD** = polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Random Amplified Polymorphic DNA)
- RFLP** = polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- RNA** = ácido ribonucléico
- RNase** = ribonuclease
- rpm** = rotações por minuto
- Sarcosil** = N-lauroilsarcosina
- SCAR** = Região de seqüência característica amplificada (Sequence Characterized Amplified Region)
- SDS** = Dodecil sulfato de sódio
- Tris** = tris-(hidroximetil)-aminometano
- UV** = radiação ultravioleta
- VNTR** = Número variável de repetições ao acaso (Variable Number of Tandem Repeats)

## RESUMO

A *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE foi uma das espécies nativas mais importante do Sul do Brasil durante o último século. Nos dias de hoje, a área de distribuição da espécie foi reduzida a menos de um por cento de sua área original, no Estado do Paraná. Medidas visando a conservação genética das populações remanescentes estão sendo tomadas. No entanto, estratégias para conservação genética *ex situ* e incremento de produção de sementes estão sendo limitados por uma série de fatores. Um desses fatores é a dificuldade de se reconhecer a árvore feminina ou a masculina em fase jovem. Araucária é uma espécie dióica e em populações naturais, sem ações antrópicas, a proporção de árvores masculinas e femininas é de 1:1 (BANDEL E GURGEL, 1967) . A espécie frutifica após 15 a 20 anos de idade e não existem caracteres morfológicos e citogenéticos que possam diferenciar os indivíduos femininos e masculinos na fase jovem. Por esse motivo foi utilizado o método RAPD, o mais citado na literatura para a determinação de sexo em diversas espécies de forma eficiente. Esta dissertação tem por objetivo identificar marcadores moleculares que possam estar associados ao sexo visando sua utilização em programas de melhoramento e conservação genética da espécie. Para isso, foram utilizadas 10 árvores adultas femininas e 10 árvores adultas masculinas amostradas em uma área original, localizada na empresa Celulose Irani S.A. no município de Vargem Bonita - SC. O material vegetativo foi coletado dessas árvores para extração de DNA - Método CTAB, formando dois *bulks* para a análise de marcadores moleculares (RAPD). Foram utilizados 500 *primers* visando encontrar o(s) marcador(es) associado(s) a determinação de sexo. No entanto, não foi possível a diferenciação dos sexos utilizando o marcador RAPD. Dos *primers* testados, 78 apresentaram polimorfismo

entre os *bulks*, no masculino ou no feminino. Quando o mesmo *primer* foi testado nos indivíduos separadamente, foi observado um polimorfismo em indivíduos.

Este projeto foi desenvolvido em parceria com a Embrapa Floresta – Colombo/PR e Embrapa Recursos Tecnológicos – Canoinhas/SC, UEL - Universidade Estadual de Londrina, RIGESA Mead-Westvaco e Celulose Irani S.A. e com o apoio financeiro da FUPEF/IPGRI (International Plant Genetic Resource Institute).

## ABSTRACT

*Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE was the most important native forest tree species in the Southern Brazil, during the last century. Nowadays the original distribution of this species is reduced to less than one percent in the Paraná State. The adoption of strategies for ex situ genetic conservation and improved seed production has been limited by several factors. One of them is the difficulty of recognize the male or female tree in the young ages. It is a dioecious species and at its natural range, without human interference, the proportion of male and female trees is 1:1. The species produces seeds only after 15 to 20 years old and, until now, there is no morphologic and cytogenetic characters that can differentiate the female and male individuals in the young phase. This project aims to identify molecular markers that can be associate to sex. This study will be based on 20 adult trees (10 male and 10 female) sampled in original area, in Vargem Bonita/SC. The vegetative material, collected from these trees, was used for DNA extraction for analysis of molecular markers (RAPD). The final objective is to establish a protocol for analysis of vegetative material of the araucaria collected from young trees or in any phase of sexual maturation.

This project was developed in partnership with Embrapa Forestry Research – Colombo/PR and Embrapa Technological Resources - Canoinhas/SC, UEL - Londrina State University, RIGESA Mead-Westwaco and Celulose Irani S.A. and financier support by FUPPEF/IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute).

## 1. INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., também conhecida pelos nomes comuns pinheiro-do-paraná, pinheiro-brasileiro ou simplesmente araucária, é a única espécie do gênero com distribuição natural no Brasil (CARVALHO, 1994). Cerca de 35% da cobertura vegetal total do Sul do Brasil era representada pela Floresta com Araucária, uma formação vegetal típica caracterizada pela presença da espécie (GURGEL FILHO, 1980).

Devido à alta qualidade de sua madeira ser reconhecida tanto no mercado interno como externo, sua exploração tornou-se uma das principais atividades que proporcionaram o desenvolvimento econômico da Região Sul do Brasil. Esse fato, aliado a necessidade de expansão agrícola, ocasionou a redução nas áreas de ocorrência natural, a apenas 1,48% da área original (SOS MATA ATLÂNTICA, 1993). A forma que vinha sendo explorada, fez com que a espécie fosse incluída na Lista de Espécies em Extinção e, conseqüentemente, tomadas medidas que proibiu seu corte (Resolução 278 do CONAMA – Comissão Nacional do Meio Ambiente).

Apesar dessa medida, a situação permanece praticamente inalterada, pois não está havendo uma reposição em forma de plantios com intensidade desejada. Este fato em parte, é creditado à exigência da espécie por solos de boa qualidade, à falta de conhecimento sobre procedências mais adequadas ao plantio em diferentes condições edafoclimáticas, à dificuldade de obtenção de sementes de algumas procedências testadas e recomendadas (SHIMIZU e HIGA, 1980; MONTEIRO et al., 1982). Sendo assim, à falta de sementes melhoradas geneticamente de forma geral, à falta de conhecimentos de técnicas que proporcionem melhor relação produtividade/custo de produção, e conseqüentemente ao menor crescimento



volumétrico quando comparado às espécies tradicionalmente plantadas dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus* (SHIMIZU e OLIVEIRA, 1981).

A araucária é uma espécie dióica e em populações naturais, livre de ações antrópicas, a proporção de árvores masculinas e femininas é de aproximadamente 1:1 (BANDEL e GURGEL, 1967). A determinação de sexo é feita exclusivamente pela visualização de órgãos florais que começam a ser produzidos a partir dos 15 anos de idade. Esse fato dificulta os trabalhos de conservação e melhoramento genético, e implantação de populações para produção de sementes para fins alimentícios ou para produção de mudas para reflorestamentos.

O uso de uma área natural de Floresta com Araucária para produção de sementes poderia proporcionar uma renda bruta anual de aproximadamente R\$ 270,00/ha por ano. Esta estimativa foi obtida considerando uma colheita de 180 kg/ha.ano e um valor de R\$1,50/ kg de pinhão. Em contrapartida, a rentabilidade de uma Floresta com Araucaria manejada é estimada em R\$ 390,00/ano, considerando que o manejo em regime sustentado prevesse a retirada apenas o crescimento anual em volume de 5 m<sup>3</sup>/ha.ano, e um valor médio de R\$ 78,00/ m<sup>3</sup> de madeira, considerando que varia de R\$ 56,00/ m<sup>3</sup> para diâmetro menor que 40 cm a R\$ 100,00/ m<sup>3</sup> para diâmetro acima de 40 cm (CASAGRANDE, 2002 in: informações pessoais). Com base neste exercício simples, conclui-se que a produção de sementes é uma alternativa economicamente viável e importante, tendo em vista a possibilidade de adicionar os valores econômicos indiretos proporcionados pela permanência da floresta, relacionados com a conservação do solo, da qualidade da água, da biodiversidade e dos valores culturais. Com a proibição do corte, talvez a produção de sementes seja a principal opção econômica para proprietários de terras com araucária.

No caso de produção de sementes para fins alimentícios ou para produção de mudas, o manejo envolve desbastes na fase juvenil da árvore, com a finalidade de favorecer a permanência de árvores femininas e estimular a floração das árvores pela maior entrada de luz (PITCHER, 1975). Como nesta fase, ainda não se

conhece o sexo das árvores, a prática do desbaste poderia remover maior número de árvores femininas, o que é uma situação indesejada para a produção de sementes. Além da produção de sementes, o conhecimento do sexo das árvores em idades jovens é fundamental para definir estratégias de conservação e melhoramento genético da espécie.

A manifestação da expressão sexual em indivíduos da araucária, é tardia, ocorrendo somente após 15 a 20 anos de idade. Esse assunto tem merecido atenção dos pesquisadores há mais de 30 anos. BANDEL e GURGEL (1967) tentaram diferenciar os sexos por meio de características morfológicas, testando hipóteses relacionadas com a forma e densidade da copa e sentido da rotação de galhos. Estas hipóteses, no entanto, não foram comprovadas uma vez que, as copas das araucárias em uma mata fechada adulta formam uma massa compacta, com os dois sexos apresentando a mesma forma, com a parte superior formando uma linha horizontal e com a disposição dos galhos e ramos para cima.

Outras hipóteses foram testadas por vários pesquisadores. BANZATTO et al. (1968), por exemplo, estudou a densidade básica média da madeira de 20 árvores do sexo masculino e 20 árvores do sexo feminino, oriundas de povoamentos naturais de araucária, e não encontrou diferenças significativas entre os sexos. AMARAL et al. (1971), deu continuidade ao estudo de BANZATTO et al. (1968), e verificou que a variação interna da densidade no sentido da medula/casca em árvores dos sexos femininos e masculinos, comportam-se identicamente. PINTO (1979), afirmou que o crescimento diamétrico e em altura, independe de sua dioicidia. BANDEL (1970), analisou o cariótipo da espécie, que possui  $n=13$  cromossomos, e relatou que não foi possível separar os cromossomos sexuais ou alguma estrutura cromossômica ligada ao sexo. SOUSA (2000), utilizou a técnica de isoenzimas, mas também não conseguiu diferenciar os indivíduos masculinos e femininos.

O mecanismo de determinação de sexo em espécies dióicas ainda não é conhecido, mas muitos trabalhos já foram realizados, recentemente, no sentido de

identificar genes, ou seqüências de pares de base que estão associados à determinação do sexo.

Análises citogenéticas sugeriram que não existem cromossomos sexuais heteromórficos que possam ser usados para determinação de sexo em *Atriplex garrettii* (Chenopodiaceae). No entanto, foi possível a determinação de um fragmento específico de DNA em plantas masculinas nesta espécie dióica e diplóide, com o uso de marcadores moleculares tipo RAPD (RUAS et al., 1998). Resultados semelhantes foram observados em *Asparagus officinalis* L. (JIANG e SINK, 1997). Com *Myristica fragans* (Myristicaceae), que é uma espécie arbórea e dióica, com possibilidade de distinguir os sexos somente após seis a oito anos de idade, as bandas estavam presentes nos indivíduos femininos e ausente nos masculinos (SHIBU et al., 2000). O mesmo foi observado em *Pistachia vera* (HORMAZA et al., 1994).

Nas últimas décadas, os marcadores moleculares tornaram-se ferramentas fundamentais para os estudos em plantas, principalmente na determinação da estrutura genética de populações, de similaridades entre progênies, no estabelecimento de filogenias, na marcação de genes específicos e no mapeamento do genoma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Na pesquisa florestal, a maioria dos dados gerados com os marcadores moleculares provém de espécies de clima temperado e subtropical, principalmente dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*. Estes resultados têm demonstrado que a tecnologia de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) é uma técnica rápida, precisa, com sensibilidade e relativamente de baixo custo para análise do genoma de espécies arbóreas (CHEN e PHILLIPS, 1996; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A utilização de marcadores moleculares- RAPD, na identificação do sexo em qualquer estágio de desenvolvimento da araucaria poderá contribuir, de maneira significativa, para diminuir o tempo necessário para definir os indivíduos que irão

compor as populações de conservação genética, populações de melhoramento e populações de produção de sementes.

Esta dissertação tem como objetivo identificar marcadores moleculares, utilizando a técnica RAPD, ligados à expressão sexual em indivíduos de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.

A identificação de um marcador, ligado à expressão sexual da araucaria, integrará os seguintes objetivos específicos: testar e adaptar métodos de extração de DNA; determinar a quantidade ideal de reagentes para que os fragmento específicos de DNA sejam amplificados com eficiência e vistos nitidamente no gel de agarose; selecionar marcadores potenciais na identificação de sexo, que mostrarem bandas em um dos “bulks” (feminino ou masculino); validar os marcadores selecionados em “screening” de amostras individuais de árvores masculinas e femininas.

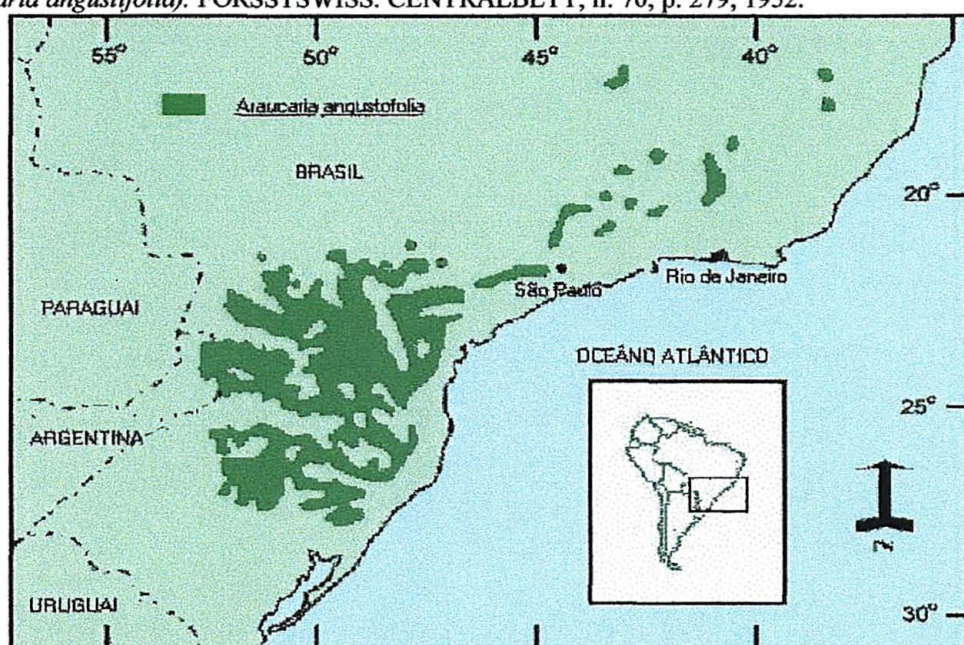
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A *Araucaria angustifolia*

#### 2.1.1. Distribuição Natural da *Araucaria angustifolia*

A área original da araucária no Brasil era de aproximadamente de 250.000km<sup>2</sup> (SOUSA, 2000), concentrada no Paraná (40%), Santa Catarina (31%), Rio Grande do Sul (25%), uma pequena área no sul de São Paulo (3%) e Minas Gerais (1%) e em pequenas áreas de montanhas no Rio de Janeiro e Espírito Santo (LAMPRECHT, 1990). A espécie tinha como limites latitudinais, 18°S (Minas Gerais) e 31°30'S (no Rio Grande do Sul). A leste limitava com as formações da Serra do Mar (incluindo áreas de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro) e ao oeste, com a província Argentina de Misiones (FIGURA. 1).

FIGURA 1. DISTRIBUIÇÃO NATURAL DA *Araucaria angustifolia*. IN: HUECK, L. VERBREITUNG UND STANDORTSANSPRÜCHE DER BRASILIANISCHEN ARAUKARIE (*Araucaria angustifolia*). FORSTSWISS. CENTRALBLTT, n. 70, p. 279, 1952.



A Floresta com Araucária ocorre em altitude entre 500 a 2.300 m acima do nível do mar, contudo predomina em áreas entre 500 a 1.500 m, preferencialmente em áreas com categorias climáticas Cfb e Cfa de Köppen, correspondente a clima sub-tropical úmido sem estações secas, mas com verão quente. Sua distribuição por volta de 1.300 m, a araucária ocorre em áreas isoladas (“capões”) entre os campos, com ar seco e frio (CARVALHO, 1994).

A temperatura média em regiões de ocorrência da araucária, é de 20° a 21°C no verão, e 10° a 11°C no inverno. As regiões com araucária mostram 1.270 a 2.494 mm de precipitação de chuva anual (GOLFARI, 1971).

A ação antrópica reduziu drasticamente a área de vegetação original do bioma. No inventário de espécies florestais do Sul do Brasil, publicado pelo IBDF/FUPEF em 1978, foi estimada que a cobertura da Floresta com Araucaria nos estados, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; era de 565.418 ha, correspondente a 3% da área original. Em 1993, o remanescente era de apenas 1,48% da área original (SOS Mata Atlântica, 1993).

### 2.1.2. Descrição da *Araucaria angustifolia*

A *Araucaria angustifolia*, pertence à Classe *Pinopsida*, Ordem *Pinales*, e família *Araucariaceae*, observada unicamente no Hemisfério Sul. Conta com dois gêneros: *Araucaria* Juss. e *Agathis* Salisb. O gênero *Araucaria* está representado por 14 espécies, sendo duas na América do Sul e 12 na área do Pacífico Meridional, deste subtotal, sete são nativas de Nova Caledônia (CARVALHO, 1994).

A araucária possui ampla distribuição geográfica no Brasil. Conseqüentemente, diferenças fenotípicas têm sido detectadas em populações naturais. MATTOS (1972) reconhece cinco diferentes “variedades” de araucária no Brasil: *dependens*, *striata*, *catharinensis*, *caiova* e *indehiscens*. REITZ e KLEIN (1966), propõem nove “variedades”: *elegans*, *sancti josephi*, *angustifolia*, *caiova*,



*indehiscens*, *nigra*, *striata*, *semi-alba* e *alba*, as quais são classificadas pela cor das sementes maduras.

A araucária é uma árvore perenifólia de aspecto contrastante com as demais árvores. Comumente atinge entre 10 a 25 m de altura e 50 a 120 cm de DAP (diâmetro a altura do peito). O tronco é reto e quase cilíndrico e o fuste pode atingir 20 m ou mais de comprimento. A vistosa copa é alta, estratificada, umbiliforme típico da idade avançada e uma copa piramidal, oval ou colunar em exemplares jovens (FIGURA 2).

FIGURA 2. *Araucaria angustifolia*. – ASPECTOS MORFOLÓGICOS GERAIS.



A casca possui espessura de sete cm (CARVALHO, 1994), é espessa, de coloração cinzenta escura e rugosa com rachaduras (LAMPRECHT, 1990). As acículas são de uma consistência coriácea, sésseis e pontiagudas, com até seis cm de comprimento por um cm de largura. As flores são unissexuadas sendo as masculinas em amento cilíndrico, e as femininas em estróbilo. As sementes desenvolvem-se a partir de óvulos nus, sem a presença de ovários e possuem geralmente tegumento duro e endosperma abundante (CARVALHO, 1994).

### 2.1.3. Fenologia e Biologia Reprodutiva

A araucária é uma espécie dióica, apresentando, portanto, árvores femininas e árvores masculinas. Os raros indivíduos monóicos são decorrentes de danos físicos ou consequências de doenças. (REITZ e KLEIN, 1966).

A polinização é realizada pelo vento. O amadurecimento do pólen e a subsequente polinização efetuam-se de agosto a outubro no Sul do Brasil e de outubro a dezembro em Minas Gerais. Quanto à floração, o amentilho, estrutura masculina (FIGURA 3), ocorre de agosto a dezembro (CARVALHO, 1994).

FIGURA 3. ESTRUTURA REPRODUTIVA MASCULINA EM *Araucaria angustifolia*.





O estróbilo é polinizado e o período que as pinhas levam até ficarem maduras é de dois anos, porém o ciclo completo que vai desde o carpelo primordial à semente, dá-se em um período de aproximadamente quatro anos (SHIMOIA, 1962). O estróbilo é visível o ano todo. As pinhas maduras (FIGURA 4) se encontram desde fevereiro até dezembro, com diâmetro de aproximadamente 17 cm e 12 cm de comprimento (CARVALHO, 1994).

FIGURA 4. ESTRUTURA REPRODUTIVA FEMININA FECUNDADA EM *Araucaria angustifolia*.



As pinhas (FIGURA 4) contêm em média 100 a 120 sementes, de cor marrom clara, com o comprimento de dois a quatro cm e uma largura de dois cm cada uma (FIGURA 5).

FIGURA 5. SEMENTES DE *Araucaria angustifolia*.



O peso de 100 sementes oscila entre 1200 a 7700 g. Atingida a maturidade das sementes, as pinhas se abrem nos meses de março a junho, liberando as sementes ou caem no chão ainda fechadas. (CARVALHO, 1994).

Levantamentos em povoamentos naturais não explorados revelam uma proporção de 52,4% de árvores masculinas para 47,6% de femininas (BANDEL e GURGEL, 1967). A proporção de sexo é muito importante para a conservação da variabilidade genética da espécie, pois está diretamente relacionada com o tamanho efetivo da população ( $N_e$ ), que representa seu tamanho genético. GREGORIUS (1983) formulou um modelo para a determinação da proporção de sexo, que otimize a eficiência da polinização em populações dióicas, que esteja com a proporção alta de plantas femininas. De acordo com o modelo, o excesso de plantas femininas é benéfico quando o número de grãos de pólen por planta masculina é de alta eficiência.

FINKELDEY (1998) sugere que as possíveis causas para ocorrência de diferentes proporções de sexos em populações dióicas podem ser causadas pelas diferenças no crescimento, idade de maturação ou longevidade entre os dois sexos. A diferença no crescimento e particularmente a diferença entre o tamanho dos indivíduos adultos em função do sexo, podem resultar no corte de árvores de um dos sexos que cresceu mais, alterando a proporção natural do sexo. A sobrevivência pode ser diferente entre plantas femininas e masculinas. Observou ainda, maior mortalidade nos indivíduos masculinos (2,3 machos: 1 fêmea) em populações de *Smilax herbacea*.

Para esses casos, é fundamental estabelecer um plano de manejo considerando o sexo de cada indivíduo a ser mantido na floresta, de forma a garantir a variabilidade genética e conseqüentemente a sustentabilidade dessa floresta.

#### 2.1.4. Importância Econômica e Ecológica da *Araucaria angustifolia*

A araucária pode ser usada como árvore ornamental em parques e jardins e as sementes são usadas como alimentação humana e animal. Contudo, a sua madeira é o produto mais valorizado, e foi um dos principais produtos de exportação no primeiro período do século passado. A espécie pode produzir fustes retilíneos e cilíndricos com até 20 m de comprimento, madeira com fibras longas e livres de canais resiníferos. O alburno da araucária é amarelado e seu cerne tem uma cor marrom clara, freqüentemente com estrias de cor vermelha e marrom. A parcela do lenho tardio nos anéis de crescimento é reduzida.

A madeira pode ser utilizada para diversos fins, como móveis finos, madeira decorativa para interiores e de ressonância, confecção de palitos de fósforos, cabos de vassoura ou ferramentas, fabricação de celulose, papel, chapas de fibra ou compensados. Os troncos extremamente cilíndricos garantem um alto grau de aproveitamento. Os galhos da copa e os nós de pinho resinosos, também são procurados para obras de entalhe e fornecem um cobiçado material combustível. (LAMPRECHT, 1990).

As múltiplas aplicações e ótima qualidade da madeira da araucária fizeram uma das espécies mais exploradas no Brasil no século passado. No entanto, o maior problema observado com a Floresta com Araucária é o fato da forma de exploração, não considerar a baixa capacidade de sustentabilidade da regeneração natural da espécie (LAMPRECHT, 1990), causando, deste modo, a diminuição drástica da variabilidade genética dessas populações ou até mesmo, a extinção da maioria de suas populações naturais em áreas onde foram efetuadas corte raso.

## 2.2. BIODIVERSIDADE E VARIAÇÃO GENÉTICA

A biodiversidade, como fator ecológico é de suma importância para a manutenção da variabilidade genética e consequente conservação da espécie, a araucária.

A variação genética é de fundamental importância, pois representa o potencial de evolução e uso do recurso genético de todas as espécies. Muitos fatores atuam na variação genética incluindo propriedades biológicas das espécies e fatores biofísicos do ambiente. As alterações do meio biofísico, como as mudanças climáticas ao longo da história geológica e o a exploração inadequada do recurso florestal afetam a sobrevivência e o crescimento dos indivíduos, prejudicando a sustentabilidade do bioma. No caso do bioma Floresta com Araucaria, a exploração contínua e extrativista, não deixou reservas suficientes para assegurar a produção sustentada e a conservação do acervo gênico da espécie (CARVALHO, 1994; LAMPRECHT, 1990).

### 2.2.1. Melhoramento e Conservação Genética

O melhoramento genético é uma das mais valiosas estratégias para o aumento da qualidade e da produtividade de espécies cultivadas pelo homem, de forma sustentável e ecologicamente equilibrada (BORÉM, 1997).

O melhoramento genético proporcionou grande aumento na produtividade de espécies florestais usadas no reflorestamento no Brasil, principalmente para espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*. Por esse motivo, o melhoramento florestal ainda continuará a desempenhar importante papel na melhoria da rentabilidade do empreendimento florestal nas próximas décadas, principalmente para espécies como a araucária, que não tem recebido muita atenção dos reflorestadores.

Algumas variáveis, tradicionalmente empregadas consideradas nos programas de melhoramento, como o crescimento em volume, a forma do fuste, a uniformidade das árvores, e a produção de madeira de alta qualidade, continuarão a receber atenção. Todas essas variáveis contribuem para aumentar a quantidade e a qualidade do produto, e aumentando a rentabilidade e competitividade do empreendimento.

GURGEL FILHO (1980) cita que, apesar da espécie ser a única conífera autóctone com grande valor econômico e em risco de extinção no sul Brasil, as Florestas com Araucária não foram objeto de estudos que possibilitassem uma regeneração natural adequada, nem a espécie foi utilizada no estabelecimento de plantações em larga escala. Os esforços para o melhoramento genético das populações têm sido incipientes e os investimentos nos reflorestamentos com a espécie não tem recebido muita atenção dos reflorestadores devido à sua baixa taxa de crescimento, quando comparada com espécies dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus* (SHIMIZU e OLIVEIRA, 1981).

A definição de estratégias de conservação dos recursos genéticos é baseada no conhecimento do nível de variabilidade genética existente entre e dentro populações, fato essencial para a sobrevivência e continuação da evolução da espécie. Uma redução da diversidade genética natural diminui o potencial da espécie em se ajustar às mudanças do ambiente natural e também limitará as possibilidades do homem manipular geneticamente esses recursos. (BORÉM, 1997).

A visualização e compreensão dessa estrutura genética dependerão, por sua vez, dos conhecimentos sobre a biologia reprodutiva da espécie em questão. Os testes de procedências e progênies de espécies florestais são de grande valia na caracterização da estrutura genética das populações (KAGEYAMA e DIAS, 1982).

No caso específico da araucária, há possibilidades de se obter gerações melhoradas com expressivos ganhos ou avanços genéticos, quantitativo e

qualitativo, visando florestas tão rentáveis e em menor espaço de tempo quanto às florestas plantadas de *Pinus* e *Eucalyptus* (GURGEL FILHO, 1980).

A utilização de métodos genéticos, para descrever o sistema reprodutivo da espécie, trouxe novas perspectivas para a conservação e para melhoramento genético da espécie.

### 2.2.2. Marcadores Genéticos

Marcadores genéticos são características que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente. Diferentes tipos de marcadores foram desenvolvidos para estudos genéticos em plantas. Cada tipo de marcador tem aplicações especiais na genética florestal. De acordo com MILACH (1998), os marcadores genéticos mais comuns são:

- a) Características morfológicas e/ou produtos de metabólitos secundários com herança mendeliana simples, como a cor e forma das sementes, e outras partes da planta, e/ou componentes bioquímicos como terpenos em coníferas.
- b) Incompatibilidade prezigótica.
- c) Marcadores citogenéticos.
- d) Marcadores de proteínas (isoenzimas).
- e) Marcadores moleculares ou marcadores de DNA.

### 2.2.3. Marcadores Moleculares

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA, e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Os principais tipos de marcadores moleculares

podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA.

- a) Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e minissatélites ou locos VNTR (Variable Number of Tandem Repeats).
- b) Aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions); STS (Sequence Tagged Sites); Microssatélite e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

As principais etapas requeridas para obtenção de resultados variam com o tipo de marcador molecular utilizado. (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Atributos como consistência e tempo para obtenção de resultados, nível de polimorfismo obtido, custo e facilidade de uso são importantes para a implementação de marcadores moleculares na rotina de um programa de melhoramento e de conservação genética.

Enquanto que marcadores de RFLP têm sido utilizados em estudos de mapeamento comparativo por causa da consistência dos resultados obtidos, estes tendem a ser mais caros e mais difíceis de serem utilizados para conhecer a estrutura destas populações. Por outro lado, marcadores identificados por amplificação, especialmente RAPDs, são mais fáceis de manipular e de custo menor, sendo, portanto, bastante usados nos estudos de estrutura entre indivíduos de uma mesma população e dentro de populações diferentes. Outros marcadores como microssatélites e AFLP revelam mais polimorfismo e têm sido a melhor opção para espécies onde este é limitado.

Muitos são os aspectos envolvidos na escolha do tipo de marcador molecular a ser utilizado, por isso não existe aquele que possa ser considerado superior para todos os atributos. Por esta razão, as opções disponíveis devem ser analisadas antes de ser decidido o tipo de marcador a ser empregado.

Marcadores moleculares podem ser empregados em programas de melhoramento de plantas para diferentes finalidades (LEE, 1989):

- a) Monitoramento e organização da variabilidade genética.
- b) Seleção assistida por marcadores moleculares.
- c) Proteção de cultivares.

No caso de espécies perenes, de ciclo longo, o uso de marcadores moleculares é de especial interesse quando a característica fenotípica demora alguns anos até ser expressa (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998), como é o caso do sexo da plantas de araucaria. Além disso, os marcadores moleculares apresentam a vantagem de acessar diretamente a variabilidade de DNA, portanto não é influenciado pelo ambiente, como são, por exemplo, os caracteres morfológicos e fenotípicos em geral de uma planta.

Entre outros usos dos marcadores moleculares, MILLACH (1998); FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1998) destacam:

- a) A possibilidade de planejar os cruzamentos de um programa de forma a maximizar as diferenças genéticas entre genótipos elites, diferenças essas que muitas vezes não podem ser observadas ao nível de fenótipo.
- b) A possibilidade de organizar o germoplasma do programa em *pools* gênicos, facilitando a escolha e diminuindo o número de combinações a serem feitas pelo melhorista.

#### 2.2.3.2. PCR – Reação de Polimerização em Cadeia.

PCR é um método *in vitro* que sintetiza seqüências específicas de DNA. Esta reação utiliza um DNA que é usado como "molde" e *primers*, que são oligonucleotídeos (pequenas seqüências que complementam o DNA), que hibridizam com hemi-hélice do molde de DNA para que seja copiada. A copia do molde é catalizada pela enzima *Taq* polimerase, extraída de uma bactéria que pode sobreviver em altas temperaturas denominada *Thermus aquaticus*. Uma série de



ciclos repetitivos faz que o molde seja separado em suas hemi-hélices, os “primers” hibridizem com o molde, a polimerase catalize a ligação de nucleotídeos para formar uma nova cópia da região de interesse do DNA. Como cada cópia produzida em um ciclo pode servir de molde no próximo ciclo, a cópia do DNA ocorre de forma exponencial. Em aproximadamente 20 ciclos, a concentração de DNA aumenta aproximadamente um milhão de vezes. (WILLIAMS, 1990).

#### 2.2.3.3. RAPD - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (MULLIS, 1991).

O RAPD é uma das técnicas baseadas na metodologia de PCR - Reação em Cadeia de Polimerase (WILLIAMS, 1990). Para amplificação específica da sequência de DNA, via PCR, é utilizado uma enzima DNA polimerase, cofatores, desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTP's), soluções tampões apropriadas, “primers” (oligonucleotídeos) e o molde de DNA. Este sistema é colocado sob condições controladas de temperatura. Os fragmentos de DNA são amplificados exponencialmente por 25 a 45 ciclos, separados por eletroforese, e visualizado por brometo de etídio.

Um ciclo de PCR estará completo após a terceira etapa (elongação), descrito a baixo:

- a) Desnaturação térmica da dupla-hélice do DNA, por meio de altas temperaturas (91 a 95° C) por cerca de um minuto.
- b) Anelamento de oligonucleotídeos ao DNA molde. As temperaturas durante a fase de anelamento variam entre 65 a 72° C durante 2 a 5 minutos, dependendo do oligonucleotídeo e do tamanho da sequência a ser amplificada.
- c) Duplicação e elongação (extensão), temperatura a 72° C pela ação da DNA polimerase em presença de d-nucleotídeos (dNTP's).

O número de ciclos pode variar também entre 25 a 40 ciclos, de acordo com o objetivo e condições utilizadas.

Os marcadores tipo RAPD podem ser usados para:

- a) Obtenção de “*fingerprints*” genômicos de indivíduos, variedades ou populações.
- b) Análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma.
- c) Estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies.
- d) A construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e a localização de genes de interesse.

#### 2.2.3.4. Vantagens dos marcadores RAPD:

FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1998) apontam as seguintes vantagens na utilização dos marcadores RAPD:

- a) O polimorfismo detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente.
- b) Possibilidade de detecção de polimorfismo pela visualização direta das bandas no gel, eliminando todas as etapas de transferência de DNA para membranas (“*Southern blot*”), hibridização com sondas e autoradiografia.
- c) Não requer o desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o organismo de interesse. Um conjunto único de “primers” pode ser utilizado para qualquer organismo.
- d) Quantidade mínima de DNA necessária (alguns nanogramas) para a análise genotípica de um indivíduo.
- e) Geração de uma grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA, distribuídos por todo o genoma do organismo.

O RAPD fornece um tipo de polimorfismo de DNA detectado na presença ou ausência de bandas discretas de DNA, apresentando a desvantagem de ser um marcador dominante, não detectando os indivíduos heterozigóticos, ao contrário de que acontece com o marcador RFLP, que tem herança co-dominante (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Uma grande vantagem, dos marcadores RAPD, é a quantidade mínima de DNA necessária para a análise genotípica de um indivíduo. Enquanto em RFLP são necessárias dezenas de microgramas de DNA, para RAPD são necessárias apenas dezenas de nanogramas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). O RAPD tem se mostrado mais eficiente do que o RFLP em eficiência em relação ao tempo e mão-de-obra (PARAN e MICHELMORE., 1993).

#### 2.2.3.5. BSA – Análise de conjunto de amostras.

Com o desenvolvimento de técnicas cada vez mais eficientes para a avaliação do DNA, foi criada uma técnica para identificação de regiões genômicas associadas a caracteres de herança simples que envolve a análise da mistura de DNA de indivíduos, que foi modificada por MICHELMORE et al. (1991). Foi proposto que essa mistura do DNA para a rápida identificação de marcadores em regiões específicas do genoma utilizando populações segregantes, técnica batizada de “BSA – Bulk Segregant Analysis”. A técnica foi proposta com base no uso de marcadores RAPD em vista de grande eficiência deste tipo de marcador para detectar polimorfismo, entretanto pode ser igualmente utilizado por qualquer outra técnica de marcadores.

O procedimento consiste em detectar diferenças entre duas amostras agrupadas de DNA obtidas em uma população segregante. Estas amostras agrupadas (“bulk samples”) são constituídas ao se misturar quantidades iguais de DNA de indivíduos selecionados com base na expressão fenotípica de um caráter

para se ter um genótipo idêntico em uma região genômica de interesse (“região alvo”) e genótipos ao acaso em regiões não ligadas à região alvo. Assim as duas amostras de DNA tendem a diferir somente na região selecionada (apresentam polimorfismo) e serão monomórficas para toda as outras regiões. A seleção de indivíduos para construir os “bulks” é feita identificando os fenótipos extremos de uma população segregante para características de interesse. O DNA das amostras agrupadas é então testado com um grande número de marcadores buscando-se aqueles que apresentem bandas presentes em uma e ausente em outra. A evidência preliminar de ligação gênica entre o marcador polimórfico e o loco alvo, é em seguida confirmada utilizando-se de todos os indivíduos da população segregante em um exercício tradicional de co-segregação genética entre marcador e fenótipo.

Basicamente, a técnica BSA utiliza uma seleção genômica prévia para reduzir drasticamente o esforço necessário para a identificação de ligação gênica, e focaliza a análise diretamente na região do genoma associada ao caráter de interesse (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

BSA é muito útil para a identificação de marcadores em regiões de mapas genéticos ainda não descobertos. (MICHELMORE et al., 1991).

### 2.3. DIOICIA EM ARAUCARIA.

Embora a araucária seja uma espécie dióica, foram constatados alguns casos de indivíduos monóicos (BANDEL e GURGEL, 1967; MATTOS 1972; REITZ e KLEIN, 1966). No entanto, REITZ e KLEIN (1966) consideram que essa anomalia se deva ao ataque do fungo *Uleiela paradoxa* Schroete, ou algum trauma, e pode ser manifestado de diferentes formas:

- a) Árvores produzindo flores masculinas e femininas todos os anos.
- b) Árvores produzindo somente flores masculinas em alguns anos e flores masculinas e femininas, conjuntamente, em outros

- c) Árvores masculinas que, a partir de uma determinada época, passaram a produzir somente flores femininas.

### 2.3.1. Características Morfológicas Associadas ao Sexo das Plantas

Pesquisas feitas com *Chorophora excelsa* indicaram uma correlação entre o sexo e a forma da copa das árvores (LAWTON, 1955). Também foi observado que as árvores femininas têm a copa mais larga do que as masculinas em *Ginkgo biloba* (LLOYD e WEBB, 1977) e em *Juniperus communis* (PAULEY, 1949).

Em *Populus sp.* é possível determinar o sexo das árvores através da coloração de suas folhas (BUGALA, 1951). Em *Populus tremula* L. o comprimento dos pecíolos das folhas foi de 20 a 25% maior nas árvores masculinas (IL'IN, 1969). No entanto, em *Populus tremuloides* Michk., o ângulo de inserção dos galhos não diferiu significativamente entre os sexos (EINSPAHR, 1960), e nenhuma relação foi encontrada entre o sexo e a forma do tronco e o tipo de ramificação de *Populus deltóides* Marsh (FARMER JR, 1964).

BANDEL e GURGEL (1967) testaram as seguintes hipóteses visando diferenciar morfológicamente os dois sexos em araucária:

- a) As árvores femininas teriam os galhos da copa mais inclinados que nas árvores masculinas, possivelmente por causa do peso das pinhas. Esta inclinação dos galhos mais inferiores da copa seria bem abaixo da linha horizontal imaginária.
- b) As árvores femininas apresentariam uma rotação dos galhos motivados pelo peso das pinhas, e o sentido da rotação da inserção das acículas nos galhos de uma árvore feminina seria na direção anti-horária, e na masculina na direção horária.
- c) Os galhos das árvores femininas apresentariam mais acículas e mais ramos do que as masculinas; deste modo, uma árvore feminina quando observada por baixo, apresentaria uma copa mais densa de que uma árvore masculina.

No entanto, os autores não detectaram nenhuma distinção morfológica na araucaria em função do o sexo, não confirmando nenhuma das hipóteses formuladas.

### 2.3.2. Características Fisiológicas Ligadas ao Sexo de Planta

LLOYD e WEBB (1977); SALISBURY e ROSS (1969); postularam que o sexo de populações de angiospermas dióicas seja determinado através do balanço de auxina e giberelina, durante a diferenciação do botão floral. De acordo com esses autores, alto conteúdo de giberelina indica uma tendência de formar plantas masculinas. Essa forma de diferenciação não teria aplicação prática na araucaria, pois seria necessário esperar o início da formação do botão floral e, nesse, não haveria necessidade de métodos indiretos para a diferenciação.

Entre outros métodos testados, podem ser destacados:

- a) Maior atividade (1,4 a 4,2 vezes) da peroxidase nas folhas de árvores femininas de *Populus tremula* do que nas árvores masculinas e maior oxidação de suas enzimas, especialmente a polifenoloxidase, nas madeiras de alburno de árvores femininas, quando comparadas às masculinas (KOCANVSHIJ, 1968).
- b) Maior (15 a 20%) taxa de fotossíntese em árvores masculinas que nas árvores femininas de *Populus tremula* (FEDOROV, 1970).
- c) Mais antocianina nos caules nas plantas masculinas que nas femininas em *Silene alba* (NIGTEVECHT, 1966).

### 2.3.3. Propriedades Físicas da Madeira

Entre as propriedades físicas da madeira, a densidade básica é considerada uma das mais importantes, porque é usada como referência na determinação da qualidade da madeira. Também a umidade se constitui em valioso índice, pois dela depende grande parte das propriedades de resistência da madeira (KOLLMANN, 1959). Devido a isto, algumas pesquisas foram desenvolvidas para testar a possível variabilidade dessas propriedades físicas entre as madeiras de árvores femininas e masculinas, visando determinar se há diferenças entre os sexos.

Em *Populus tremula*, os valores da densidade e do teor de umidade de amostras de madeira de árvores masculinas foram entre 5 a 10% mais alto que em árvores femininas (RANGELOV, 1969). No entanto, estudos de densidade da madeira ao nível de DAP, no sentido medula-casca, não apresentaram diferenças significativas entre as amostras de árvores masculinas e femininas de araucaria (AMARAL et al., 1971; BANZATTO et al., 1969).

### 2.3.4. Relação entre Proporção de Sexo e Mortalidade

O índice de mortalidade parece estar ligado ao sexo em algumas espécies. LLOYD e WEBB (1977); PUTWAIN e HAPPER (1972), relatam maior mortalidade entre indivíduos masculinos de *Rumex acetosa* que entre os femininos. O mesmo foi observado com *Silene Alba* e *S. dioica* por LLOYD e WEBB (1977). Em contraste, o índice de mortalidade das plantas femininas foi mais elevado do que o das plantas masculinas em *Asparagus officinalis*, *Potentilla fruticosa* e *Juniperus communis* (LLOYD e WEBB, 1977). O grande índice de mortalidade de plantas femininas de *A. officinalis* deveu-se ao fato de que as plantas masculinas produzem mais biomassa que as femininas, aumentando as condições de sobrevivência.

### 2.3.5. Relação entre Sexo e o Crescimento em DAP e em Altura

Hipóteses levantadas por vários pesquisadores, tentam comprovar a relação entre o sexo e o crescimento em DAP e em altura nas espécies dióicas. FARMER (1964), em pesquisas com *Populus deltoides*, verificou que nas árvores do sexo masculino apresentam crescimento significativamente maior que árvores femininas. O mesmo fato foi constatado com *Taxus baccata*, *Ginkgo biloba* e espécies do gênero *Aciphylla* (LLOYD e WEBB, 1977). Em contraste, árvores femininas de *Populus tremula*, *Silene roemeri* e *Antennaria dioica* tiveram maior incremento em altura e em DAP que as masculinas (LLOYD e WEBB, 1977). Em *Petasites nivens*, as plantas femininas apresentaram maior altura que as masculinas somente após o início da floração (LLOYD e WEBB, 1977).

No entanto, não foram detectadas diferenças no crescimento em altura e DAP entre árvores masculinas e femininas de araucaria (PINTO, 1979).

### 2.3.6. Proporção de Plantas Femininas e Masculinas em Espécies Dióicas

As pesquisas sobre a proporção do sexo em espécies dióicas revelam que a proporção teórica esperada, de 1:1, nem sempre se verifica na prática. Em povoamentos naturais de *Fraxinus americana* e de *Populus tremuloides*, a proporção do sexo não diferiu significativamente de 1:1, tanto em populações naturais como nos cruzamentos controlados (LOYD e WEBB, 1977).

Já CAREV (1969), estudando a proporção do sexo em povoamentos naturais de *Populus tremula*, encontraram uma relação de 1: 4,5 e 1: 2,5 entre árvores femininas e masculinas, respectivamente. Amostragens mostraram uma significativa preponderância de indivíduos masculinos em populações selvagens de *Petasites*



*japonicus* (LOYD e WEBB, 1977), e em populações naturais de *Silene otites* (GRANT, 1975).

Os escassos levantamentos sobre a proporção de sexo em araucaria, tanto em povoamentos naturais como em plantações não desbastadas, revelam maior porcentagem de plantas masculinas sobre as femininas. Um levantamento realizado por BANDEL e GURGEL (1967) em vinte povoamentos naturais não desbastados, nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo; revelou uma proporção estatisticamente significativa de 52,4% de árvores masculinas e 47,6% para as femininas. O sexo dessas árvores foi identificado pela visualização dos seus órgãos florais, desconsiderando aquelas árvores que não foram possíveis de identificação.

### 2.3.7. Características Cromossômicas

Estudos citológicos também têm sido realizados para detectar diferenças nas características cromossômicas de árvores masculinas e femininas em espécies dióicas (MITTWOCH, 1967). Há evidências de que, em algumas espécies dióicas, a produção de flores, assim como a época do início da floração, está associada com as diferenças cromossômicas entre os sexos. Em *Rumex*, subgênero *Acetona*, e em *Silene alba*, os cromossomos de plantas femininas e masculinas são diferenciados, mas a maioria das plantas dióicas, não apresentam diferenciação cromossômica entre os sexos. (LOYD e WEBB, 1977).

Em araucária, cujo número de cromossomos é de  $2n= 26$ , não foram observados os possíveis cromossomos sexuais ou alguma estrutura cromossômica que possibilitem a distinção dos sexos (BANDEL, 1970).

### 2.3.8. Determinação de Sexo com o uso de Marcadores Moleculares:

Com os avanços das técnicas da biotecnologia, torna-se cada vez mais possível desvendar processos fisiológicos e morfológicos das plantas, que estão intimamente ligados à sua genética. Cromossomos, genes, seqüências de pares de base, todos interagindo uns com os outros e estes com o ambiente. Os marcadores moleculares permitem que fragmentos de DNA, independente da espécie e clonados para sua posterior utilização.

O mecanismo de determinação de sexo em espécies dióicas ainda não é conhecido, mas muitos trabalhos já foram realizados, no sentido de identificar genes, ou seqüências de pares de base que estão ligados à determinação do sexo.

O uso de marcadores moleculares tipo RAPD permitiu a determinação de um fragmento específico de DNA de plantas masculinas em *Atriplex garrettii* (Chenopodiaceae), uma espécie dióica e diplóide, na qual não foram detectados cromossomos sexuais heteromórficos através de análises citogenéticas (RUAS et al., 1998). Nesse estudo, foram testados 150 primers; com amostras de 10 plantas adultas masculinas e 10 plantas adultas femininas; para a formação de dois “bulks” usados na comparação das bandas por polimorfismo, ou seja, verificação da presença da banda nos indivíduos masculinos e ausência nos indivíduos femininos. Resultados semelhantes foram observados em *Asparagus officinalis* L. (JIANG e SINK, 1997).

Em *Pistachia vera*, HORMAZA et al. (1994) observaram que as bandas estavam presentes nos indivíduos femininos e ausentes nos masculinos. Semelhantes resultados foram observados com *Myristica fragans* (Myristicaceae), uma espécie arbórea e dióica, e que é possível distinguir o sexo da planta somente após seis a oito anos de idade (SHIBU et al., 2000).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. IDENTIFICAÇÃO DE SEXO

O material vegetativo, constituído de folhas jovens, de indivíduos adultos, foi coletado nas áreas da Empresa Celulose Irani S.A. localizada em Campina da Alegria, distrito do município de Vargem Bonita, no Estado de Santa Catarina. A área de coleta era constituída de uma população natural de araucaria, sem registro de exploração, situada a 26° 53' de latitude Sul, e 51° 6' longitude Oeste, 1050 m de altitude acima do nível do mar (FIGURA 6).

FIGURA 6. ÁREA DE COLETA DO MATERIAL VEGETATIVO DE PLANTAS FEMININAS E MASCULINAS DE *Araucaria angustifolia*, EM CAMPINA DA ALEGRIA, SC.



Foram amostradas 20 árvores (10 árvores adultas masculinas e 10 femininas), as quais, tiveram o sexo previamente identificado pelos funcionários da Empresa e confirmadas na ocasião da coleta.



### 3.2. COLETA DO MATERIAL VEGETATIVO

O material foi coletado com auxílio de uma espingarda calibre 12 (FIGURA 7 e 8). Foi estabelecida uma distância de 100 m entre as árvores a serem coletadas. O método foi bastante rápido e eficiente para obtenção de grande quantidade de folhas jovens (FIGURA 9).

FIGURA 7. TIRO NO TERMINAL DOS RAMOS



FIGURA 8. ESPINGARDA CALIBRE 12

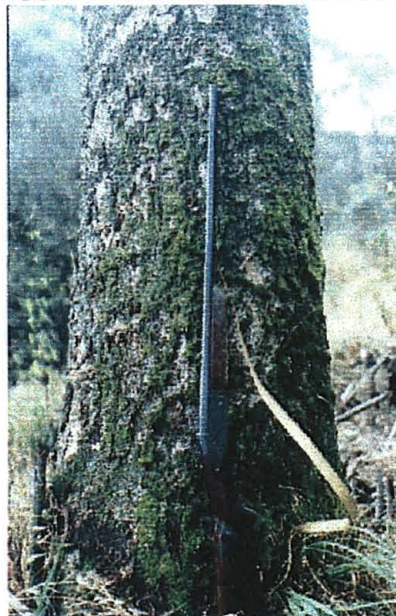


FIGURA 9. COLETA DE FOLHAS JOVENS.



O material foi identificado e colocados em sacos plásticos, mantidos em caixa de isopor com gelo até sua posterior armazenagem em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3. EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA, foram utilizadas as técnicas MATAB, SDS e CTAB (TABELA 1).

TABELA 1. CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES PARA EXTRAÇÃO DE DNA

Método	Reagentes	Concentração
MATAB	MATAB	2%
	B-mercaptoetanol	0,2%
	Clorofórmio Isoamílico	(24:1) (v/v)
	Isopropanol	100%
	Etanol	70%
SDS	EDTA	0,5 M
	Tris-HCl	1,0 M
	NaCl	50 mM
	Acetato de potássio	5M
	B-mercaptoetanol	0,2%
	Proteinase k	0,2%
	Isopropanol	70%
	Etanol	70 %
CTAB	EDTA	20 mM
	Tris-HCl	100 mM
	NaCl	1,4 M
	TE	10 mM
	Clorofórmio Isoamílico	(24:1) (v/v)
	Proteinase k	0,2%
	RNase	0,2%
	Isopropanol	100%
	Etanol	70 %

A técnica CTAB descrito por FERREIRA e GRATAPAGLIA (1998) modificada para araucária (MAZZA e BITENCOURT, 2000), consiste nas seguintes etapas: (Esquema Ilustrativo na FIGURA 10).

- a) Separar as folhas manualmente.
- b) Macerar 0,3 a 0,4 g de cada amostra, com o auxílio de pistilo e almofariz com nitrogênio líquido, até obter um “pó” bem fino e transferir para tubos de Eppendorff de 1,5 mL. A maceração mecânica: utilizada para romper as paredes e membranas celulares do tecido.

- c) Adicionar em cada tubo 850  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (CTAB), previamente aquecido à 65° C, pH 8,0 e misturar por inversão. Tecido vegetal é ressuspenso em um tampão de extração, contendo algum detergente, antioxidantes, EDTA e agente tamponante, visando à solubilização de membranas lipoprotéicas e desnaturação de proteínas enquanto o DNA é protegido da ação de enzimas de degradação. Para evitar a ação de DNAses, que podem degradar o DNA, os tampões de extração possuem pH por volta de 8,0, enquanto o pH ótimo para ação de DNAses endógenas fica por volta de 7,0.
- d) Incubar em banho Maria a 65° C por 45min, agitando a cada 15 min. Esta temperatura facilita a solubilização e homogeneização de suspensão.
- e) Após atingir temperatura ambiente, adicionar 500 $\mu\text{L}$  de CIA, na capela de exaustão de gases. Centrifugar a 13000rpm por 10 min, para separar as fases, orgânica e aquosa. Transferir o sobrenadante para outro tubo. Nesta etapa, lipídeos, proteínas e a maioria dos polissacarídeos são retidos na fase orgânica (inferior).
- f) Adicionar 3  $\mu\text{L}$  de RNase e deixar em gelo por 40 min, para degradar o RNA.
- g) Adicionar 3  $\mu\text{L}$  de proteinase, e deixar em banho-maria por 45 min a 37° C, para degradar proteínas indesejáveis.
- h) Adicionar 600  $\mu\text{L}$  de CIA e centrifugar 13000rpm por 10 min.
- i) Transferir o sobrenadante e adicionar 800  $\mu\text{L}$  de etanol P.A. gelado, misturando até a precipitação do DNA. O DNA na presença do álcool forma um precipitado visível que pode ser “pescado” ou sedimentado por centrifugação e deixar no freezer -20° C por 60 min.
- j) Com auxílio de um bastão de vidro, pescar o DNA e lavá-lo com etanol 70% por 30 min e com etanol 95% por mais 30 min.
- k) Deixar secar bem o pellet e ressuspendê-lo em TE. 100  $\mu\text{L}$

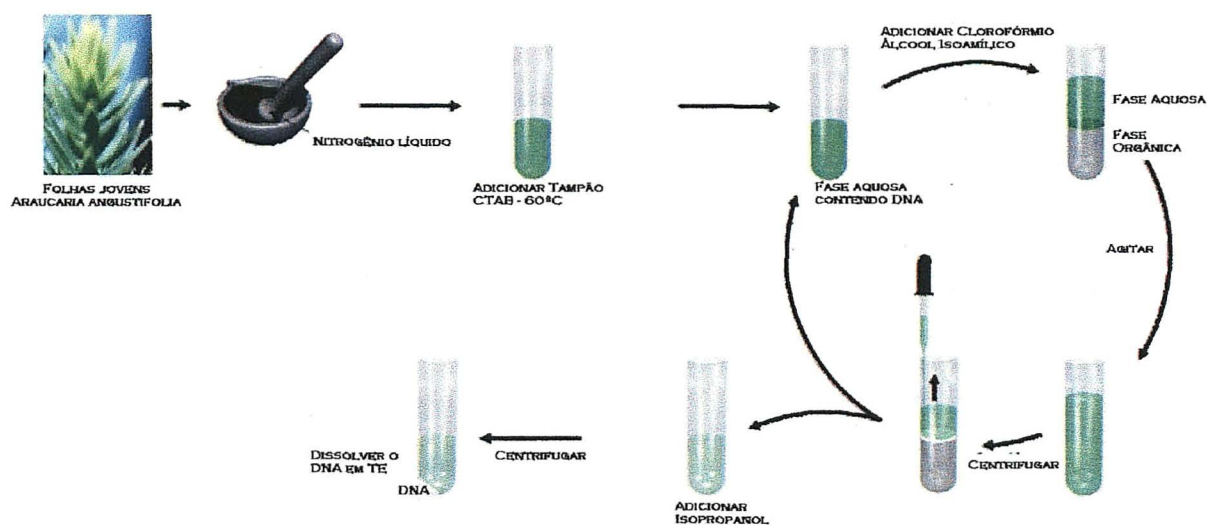
#### Técnica do “MATAB”:

- a) Separar as folhas e macerar com nitrogênio líquido, até obter um pó fino
- b) Adicionar 1,5 mL de MATAB + 5  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol
- c) Transferir para um tubo de ependorff e Incubar a 60°C em Banho-Maria por 25 min
- d) Adicionar 500  $\mu$ L de álcool clorofórmio isoamílico (24:1), agitar e esperar atingir temperatura ambiente
- e) Centrifugar 6.000 a 12.000 rpm e retirar o sobrenadante
- f) Adicionar 600  $\mu$ L de isopropanol, na proporção 1:1, misturar e colocar no congelador por 15 min.
- g) Retirar a massa formada de DNA e lavar com álcool 70%
- h) Adicionar 800  $\mu$ L de Buffer por 20 min em temperatura ambiente
- i) Secar e diluir em 100  $\mu$ L de TE e deixar na geladeira.

#### Método do “SDS”:

- a) Separar as folhas e macerar com nitrogênio líquido, até obter um pó fino
- b) Acrescentar 1,5 mL do tampão de extração com proteinase k e incubar por duas horas a 37°C
- c) Acrescentar 500  $\mu$ L de SDS 20% com mais 20  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol
- d) Deixar em banho-maria 68°C a 20 min e acrescentar 500  $\mu$ L de acetato de Potássio 1%
- e) Centrifugar por 5 min, remover o sobrenadante e precipitar com isopropanol e lavar com etanol 70% e diluir em TE

FIGURA 10. EXTRAÇÃO DE DNA (ADAPTADO) IN: BRASILEIRO, A.C.M. e CARNEIRO V.T.C. MANUAL DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS. BRASÍLIA, EMBRAPA - CENARGEM, p. 169, 1998.



### 3.4. PURIFICAÇÃO DO DNA

O método utilizado para a purificação do DNA foi o descrito por FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1998), que consiste nas seguintes etapas:

- Acrescentar às amostras 100  $\mu$ L de NaCl 1,0 mM, 100  $\mu$ L de EDTA 1mM e 200 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril.
- Centrifugar a 14000 rpm por 10 min, adicionar um volume de Isopropanol gelado e centrifugar a 12 rpm por 10 min.
- Retirar o sobrenadante e lavá-lo em álcool 70% de 2 a 3 vezes.
- Deixar secar o pellet e acrescentar TE aos tubos.

### 3.5. QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Após a obtenção de um DNA puro, este foi quantificado utilizando-se um fluorômetro DyNA Quant – 200 da marca Hoefer Pharmacia. Para a quantificação, foi utilizada uma solução de leitura, composta de água biodestilada estéril, TNE 1:10 e 10  $\mu$ L Hoescht.



### 3.6. APLICAÇÃO DO RAPD

Foram montados dois “bulks” (um feminino e um masculino) com 10 indivíduos cada. Para montagem do “bulk” utilizou-se a técnica descrita por WILLIAMS et al. (1990) e modificada por TRANSUE et al.(1994) - Esquema Ilustrativo (FIGURA 11). Para reações de amplificação utilizando RAPD normalmente são utilizados um total de 15  $\mu\text{L}$ , distribuídos entre os reagentes: água bidestilada estéril, tampão 10X, dNTPs, “primer”, Taq polimerase e o DNA.

Para as reações de amplificação de RAPD deste trabalho, foram usadas 15  $\mu\text{L}$ ; 7,4  $\mu\text{L}$  de água bidestilada estéril, 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10X, 1,5  $\mu\text{L}$  de dNTPs, 1,7  $\mu\text{L}$  de “primer”, 2 $\mu\text{L}$  de DNA (10ng/ $\mu\text{L}$ ) e 0,9 $\mu\text{L}$  de Taq polimerase. Contudo, foram testadas concentrações diferentes antes de se optar por esta (TABELA 2).

TABELA 2. CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES PARA REAÇÃO DE PCR

Método de extração	Reação para RAPD	Reagente - Quantidade para 1 reação ( $\mu\text{L}$ )						
		H2O	Tampão	dNTP	Primer	Taq	DNA	Total
MATAB	Enzima da Biotols*	7,30	1,50	1,70	1,80	0,70	2,00	15,00
SDS	Enzima da Biotols*	7,30	1,50	1,70	1,80	0,70	2,00	15,00
CTAB	Enzima da Biotols*	7,30	1,50	1,70	1,80	0,70	2,00	15,00
	Enzima da Biottols	6,80	1,50	1,70	2,00	1,00	2,00	15,00
	Enzima da Biottols	6,55	1,50	1,70	2,00	1,25	2,00	15,00
	Enzima da Pharmacia*	8,10	1,60	0,50	0,50	1,00	1,30	13,00
	Enzima da Pharmacia	7,64	1,50	1,70	2,00	0,16	2,00	15,00
	Enzima da Pharmacia	7,40	1,50	1,70	2,00	0,40	2,00	15,00
	Enzima da Pharmacia	7,40	1,50	1,70	1,70	0,9	2,00	15,00

\* Protocolo estabelecido pelo fornecedor

As amostras foram amplificadas em termociclador PTC da MJ Research, que envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada por meio da elevação da temperatura de 94°C a 4min, para anelamento do “primer”, a temperatura é rapidamente reduzida para 38°C a 1,5 min e em seguida, elevada a 72°C a 1,45 min para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3’ dos “primers” – a polimerização. Essa extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência alvo,

de maneira que uma cópia desta seqüência é feita neste processo. Este ciclo é repetido 48 vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, são produzidos mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüências alvo. Foram testados aproximadamente 500 “primers” todos da marca Operon (TABELA 3).

TABELA 3. “PRIMERS” TESTADOS. EM “BULKS”

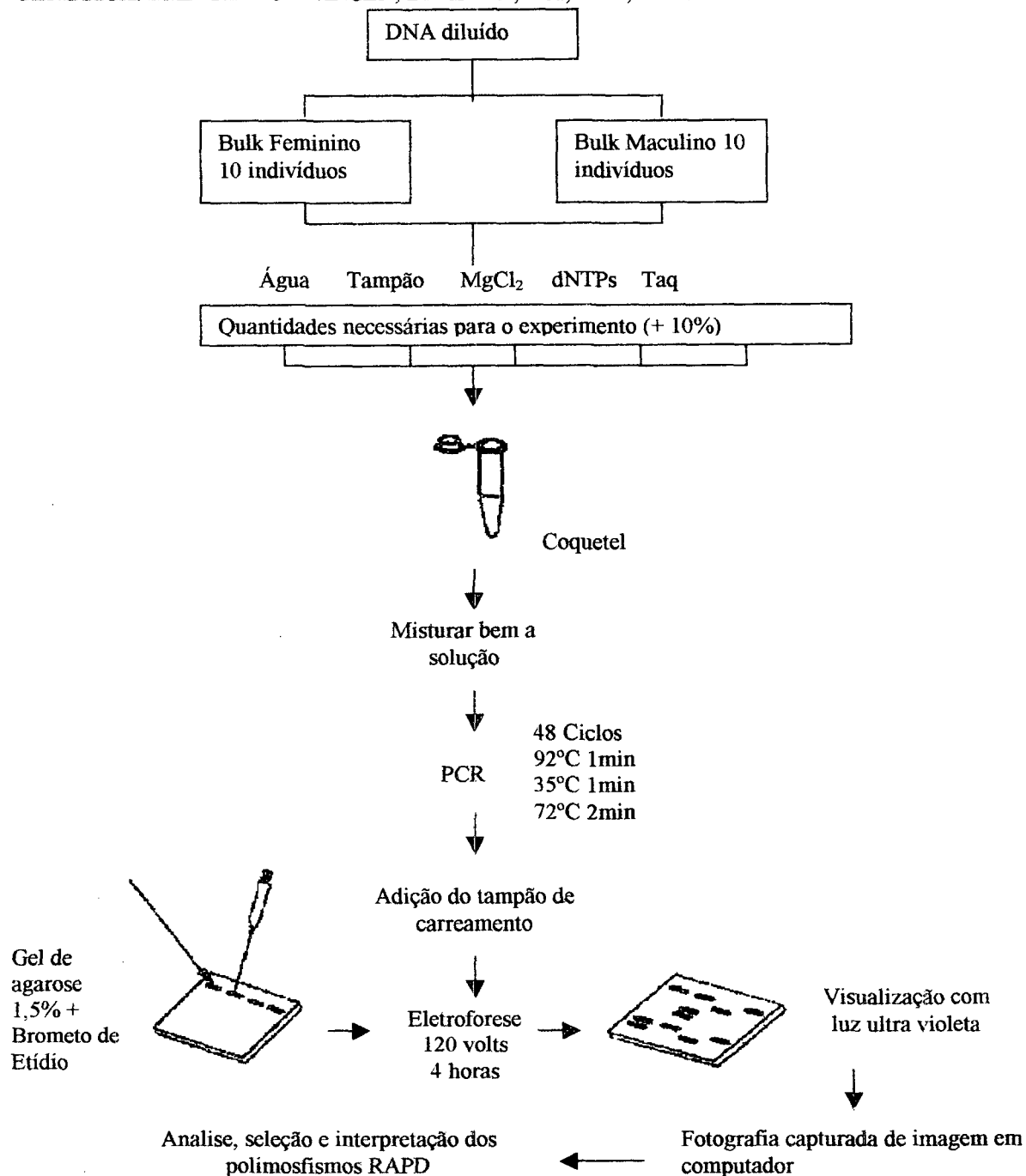
Primer	Número
OPAE	1-8; 11-20
OPAF	1 ao 20
OPO	1 ao 20
OPP	1 ao 20
OPAB	1-17; 19; 20
OPAA	1-6; 12-16; 18; 19
OPA	1 ao 20
OPAC	2-4; 7; 9; 12-19
OPAU	1 ao 20
OPAD	1 ao 20
OPAS	1 ao 20
OPAG	1; 2; 4; 6-8
OPW	1 ao 20
OPAV	1 ao 20
OPE	1 ao 20
OPAR	1 ao 20
OPAW	1 ao 20
OPS	1-10; 12-20
OPT	1; 2; 4-20
OPAM	1 ao 20
OPAK	1 ao 20
OPJ	1-12; 14-20
OPR	1-13; 15-20
OPX	1 ao 20
OPAJ	1-4; 6-20
OPAL	1; 2; 4-20
OPAT	1 ao 7
<b>Total</b>	<b>489</b>

### 3.7. ELETROFORESE

Após a preparação do gel de agarose Metaphor com Brometo de etídio, as amostras foram coradas com Bromofenol azul e colocadas no gel para a separação das bandas por diferença de peso molecular. Foi utilizado tampão TAE na cuba de

eletroforese em uma voltagem de 100 V por aproximadamente 2 h e 30 min., e fotografado sob luz ultravioleta.

FIGURA 11. ESQUEMA DE REAÇÃO DE PCR/BULKES - ADAPTADO. IN: FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **INTRODUÇÃO AO USO DE MARCADORES RAPD EM ANÁLISE GENÉTICA**. EMBRAPA-CENARGEN, BRASÍLIA, 3 ed, P. 48, 1998.



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA.

Método	Resultados	
	DNA TOTAL	REAÇÃO DE PCR
MATAB	Bandas irregulares	Sem constatação
SDS	Bandas irregulares	Sem constatação
CTAB	Bandas definidas e nítidas	Bandas definidas e nítidas

O método de extração MATAB, não foi eficiente na extração de folhas jovens de araucária. Não foi verificado um DNA totalmente limpo, pelo fato do DNA estar com um aspecto gelatinoso e excessivamente viscoso. O rompimento da célula também libera polissacarídeos, os quais são de difícil separação do DNA e inibem muitas DNapolimerases e enzimas de restrição. O co-isolamento de polissacarídeos pode ser facilmente detectado pelo aspecto do DNA descrito acima. No gel de agarose, para verificar a qualidade do DNA total, as bandas estavam muito irregulares. Isto significa que há uma grande fragmentação do DNA ou o método não foi eficiente para remover as impurezas ligadas à fita do mesmo. Foi realizada então, a purificação do DNA com NaCl 1,4 mM, método citado como padrão para reações de RAPD (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998), constatando que o DNA estava muito fragmentado.

No método do SDS, foi detectado o mesmo problema acima descrito, e além do aspecto gelatinoso e viscoso do DNA, apresentava coloração mais escura. A contaminação por polifenóis pode ser evidenciada pela coloração do DNA, que tende a ficar marrom. O escurecimento devido à oxidação dos polifenóis em compostos quinônicos. Estes, são fortes agentes oxidantes que danificam DNAs e proteínas (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998).

Em ambos os casos, as amostras foram submetidas à reação de PCR, como não foi detectada a presença de bandas no gel de agarose ficando confirmada a não obtenção do DNA. Compostos polifenólicos e terpenóides liberados durante a destruição celular, principalmente de tecidos de folhas maduras, aderem irreversivelmente ao DNA, inibindo a digestão com endonucleases de restrição e/ou amplificação via PCR (LLODHI et al., 1994). A contaminação por DNAses endógenas pode ser constatada pela visualização do DNA genômico em gel de agarose, que neste caso aparece bem degradado.(BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998).

Essa degradação pode ser atribuída tanto, à maceração do tecido, neste caso mecânica, que pode ter excedido na ação sob as paredes celulares degradando toda a célula; quanto, à ação dos reagentes em uma intensidade maior do que a que a fita suporta ou, ainda, a baixa eficiência dos reagentes ao isolamento de compostos aderidos ao DNA.

O método que se mostrou eficiente na extração e purificação do DNA de broto de araucária inclui CTAB a 2% no tampão de extração descrito por MULLIS (1990) e modificado por MAZZA e BITTENCOURT (2000), com subseqüentes tratamentos clorofórmio:isoamílico (24:1). De 1g de tecido fresco, foram extraídos cerca de 150 ng/ $\mu$ L de ácidos nucléicos com alto peso molecular. Foi possível visualizar uma massa de DNA quando adicionado o etanol, ainda na fase de extração. As bandas, de DNA total e da reação de PCR, foram bem nítidas e definidas (TABELA 4).

A técnica do CTAB caracteriza-se por utilizar o detergente catiônico no tampão de extração, o diferencial nas outras técnicas de extração de DNA de tecidos vegetais jovens de indivíduos adultos. Uma das grandes vantagens deste método é que não exige preparação prévia do tecido e é adaptável a vários tipos de tecidos (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998). O protocolo do CTAB foi bem sucedido nos gêneros: *Schefflera* (Araliaceae), *Macadamia* (Protaceae), *Dysoxylum* (Meliaceae), *Flindersia* (Rutaceae), *Sarcopteryx* (Sapindaceae), *Acacia*

(Mimosaceae), *Melicope* (Rutaceae) (SCOTT e PLAYFORD, 1996), *Eucalyptus*, *Citrus*, *Pinus*, *Brassica*, milho, arroz, dendê, espécies arbóreas leguminosas nativas (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998), *Phoenix dactylifera* L. (AITCHITT et al., 1993), *Musa* e *Ipomea* (GAWEL e JARRET, 1991), entre muitas outras.

Os reagentes e a maneira de como é conduzida a extração, bem como a conservação do DNA, favorecem na reação de PCR. Foram testadas duas marcas de enzimas, pelo acesso, disponibilidade e preço. O DNA extraído das amostras pelo método CTAB, mostrou integridade em sua estrutura, e a amplificação com ambas as enzimas. Contudo, as bandas ficaram mais diferenciadas com a enzima da Pharmacia, a uma quantidade de um volume de 0,9 $\mu$ L. A enzima é de suma importância na etapa de extensão do DNA.

Na quantificação do DNA, foi utilizado um fluorômetro, que determinou uma variação aproximada de 20 a 250 ng/ $\mu$ L. Uma quantidade alta, quando comparada com outras espécies como milho, café, eucaliptos, etc. Porém o número de bandas é consideravelmente menor que o das espécies citadas. Considerando a araucária uma árvore com cromossomos grandes (n= 13) vistos nitidamente ao microscópio ótico, na objetiva 100X (BANDEL, 1970), a frequência das seqüências repetitivas deve ser muito alta.

Para cada espécie um tipo de protocolo deve ser estabelecido, afim que o processo de PCR seja eficiente e a interpretação dos dados por meio do gel de agarose, seja o mais confiável possível (TABELA 5). A composição da mistura de reagentes para a amplificação: 7,4  $\mu$ L de água bidestilada estéril, 1,5  $\mu$ L de tampão 10X, 1,5  $\mu$ L de dNTPs, 1,7  $\mu$ L de “primer”, 2 $\mu$ L de DNA (10ng/ $\mu$ L) e 1 unidade de Taq polimerase, totalizando 15 $\mu$ L. Os “primers” ou oligonucleotídeos iniciadores para o ensaio RAPD consistem em 10 bases de seqüência arbitrária com um mínimo de 50% de conteúdo GC.

TABELA 5. DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES PARA REAÇÃO DE PCR.

MÉTODO	REAÇÃO	RESULTADOS
MATAB	R 1	Não amplificou
SDS	R 1	Não amplificou
CTAB	R 1	Bandas muito fortes e sem distinção
	R 2	Bandas muito fracas e sem distinção
	R 3	Bandas muito fracas e sem distinção
	R 4	Bandas muito fortes e sem distinção
	R 5	Bandas muito fracas e sem distinção
	R 6	Bandas muito fracas e sem distinção
	R 7	Bandas bem definidas e nítidas

R 1. Enzima da Biotols, protocolo estabelecido pelo fornecedor

R 2. Enzima da Biotols, Primer = 2,00  $\mu$ L, Taq = 1,00  $\mu$ L

R 3. Enzima da Biotols, Primer = 2,00  $\mu$ L, Taq = 1,25  $\mu$ L

R 4. Enzima da Pharmacia, protocolo estabelecido pelo fornecedor

R 5. Enzima da Pharmacia, Primer = 2,00  $\mu$ L, Taq = 0,16  $\mu$ L

R 6. Enzima da Pharmacia, Primer = 2,00  $\mu$ L, Taq = 0,40  $\mu$ L

R 7. Enzima da Pharmacia, Primer = 2,00  $\mu$ L, Taq = 1,00  $\mu$ L

Dos 500 primers testados, 78 primers mostraram marcadores potenciais na identificação de sexo, que mostram bandas em um dos “bulks”, ou no “bulk” formados por indivíduos femininos ou por masculinos, com 94 e 79 bandas distintas, respectivamente. Totalizando 1640 bandas (TABELA 6).

Cada “primer” que mostrou no “bulk” a probabilidade de ser um marcador potencial para o sexo, foi testado com os DNAs de 10 plantas masculinas e com 10 plantas femininas. Não ocorreu a confirmação de um marcador associado ao sexo masculino ou feminino, mostrando que as bandas verificadas nos “bulks” eram polimorfismo próprio de cada planta.

TABELA 6. CONTAGEM DAS BANDAS NOS "PRIMERS" TESTADOS EM "BULKS"

Primer	Número	Polimorf.	M	F	Nº Total de bandas
OPAE	1-8; 11-20	3 e 5	3	1	53
OPAF	1 ao 20	5,15 e 16	4	2	65
OPO	1 ao 20	1, 4 e 18	3	0	70
OPP	1 ao 20	0	0	0	72
OPAB	1-17; 19; 20	6	0	1	61
OPAA	1-6; 12-16; 18; 19	18	0	2	27
OPA	1 ao 20	6, 9, 10, 18 e 19	5	7	66
OPAC	2-4; 7; 9; 12-19	3, 4, 7 e 9	1	2	37
OPAU	1 ao 20	4, 7 e 8	2	2	82
OPAD	1 ao 20	2, 6, 13 e 16	8	7	86
OPAS	1 ao 20	3, 6, 11 e 19	6	5	63
OPAG	1; 2; 4; 6-8	0	0	0	17
OPW	1 ao 20	2 e 5	3	2	70
OPAV	1 ao 20	7 e 18	1	2	59
OPE	1 ao 20	5, 10, 13, 17 e 18	5	6	93
OPAR	1 ao 20	1, 2 e 5	2	2	71
OPAW	1 ao 20	3, 8, 9, 10 e 11	8	6	61
OPS	1-10; 12-20	6, 9 e 13	4	2	65
OPT	1; 2; 4-20	7, 13 e 20	13	14	70
OPAM	1 ao 20	1, 2, 3, 6, 10 e 20	2	4	61
OPAK	1 ao 20	5, 17 e 18	1	8	68
OPJ	1-12; 14-20	1, 4 e 6	2	3	49
POR	1-13; 15-20	0	0	0	60
OPX	1 ao 20	2, 3, 4 e 17	2	0	73
OPAJ	1-4; 6-20	6, 8 e 10	2	8	51
OPAL	1; 2; 4-20	4 e 6	1	1	60
OPAT	1 ao 7	1, 2, 3 e 5	1	7	30
<b>Total</b>	<b>489</b>	<b>78</b>	<b>79</b>	<b>94</b>	<b>1640</b>



O RAPD foi a técnica utilizada para amplificar segmentos de DNA, com o objetivo de encontrar marcadores ligados a determinação de sexo em espécies dióicas. A dioicida é encontrada em apenas aproximadamente em 4% das angiospermas. Em contraste com a situação encontrada na maioria dos animais um cromossomo sexual controla esse mecanismo, heteromorfismo cromossômico é uma exceção em espécies de plantas dióicas.

Em *Silene*, o indivíduo masculino é caracterizado pelos cromossomos sexuais XY e o feminino XX, é o gênero onde o sistema de dioicida é similar a maioria dos animais. (HORMAZA et al., 1994). A presença do cromossomo sexual foi relatada também em outras angiospermas dióicas, como: *Humulus*, *Rumex* e *Cannabis*, ainda assim, a presença deste cromossomo heteromórfico é controversa (HORMAZA et al., 1994). Na maioria dos casos, a proporção do sexo em plantas dióicas é controlada por pela expressão de um ou mais loci, como em: *Asparagus*, *Vitis*, *Spinacia* e *Merculialis*.

Das espécies estudadas com mais detalhes, a determinação de sexo é dificultada pela presença de alelos adicionais ou fatores que podem modificar o efeito da maioria dos genes que determinam o sexo (DURAN e DURAN, 1990). Diferentes métodos para determinar diferenças entre indivíduos masculinos e femininos têm sido realizados. A melhor forma para entender o mecanismo da expressão gênica é estudar diferenças em nível de DNA. (HORMAZA et al., 1994).

Em *Pistacia vera*, supõe-se que o fragmento de DNA, identificado via RAPD, esteja associado com a expressão sexual na espécie. Devendo ressaltar que em *P. vera* (HORMAZA et al., 1994) foi realizada a extração de DNA de folhas jovens de indivíduos adultos, com a técnica do CTAB; utilizando uma progênie vinda de dois indivíduos femininos aparentados e polinizadas pelo mesmo indivíduo masculino, assim diminuindo distâncias genéticas. Foram testados dois “bulks”, mais de 900 “primers” até descobrir apenas um marcador específico para plantas femininas, o que conclui que a região do genoma envolvido na determinação do sexo, não é muito grande e provavelmente um único ou poucos genes envolvidos.

Outra possibilidade, é que o gene que controla a expressão sexual está presente em uma região genômica não muito freqüente em eventos de recombinação, que em primeiro momento pode ser diferenciador dos cromossomos sexuais (HORMAZA et al., 1994).

Em *Asparagus officinalis* L., também foi realizada a extração de DNA de folhas jovens de indivíduos adultos; utilizando indivíduos femininos e masculinos aparentados (meio irmãos). Foram testados “bulks”, com 760 “primers”, onde apenas um “primer” específico para plantas masculinas revelou dois marcadores associados à expressão sexual, que foram clonados e feito uma “sonda” SCAR, deste marcador. Evidências genéticas indicam que a determinação de sexo em *A. officinalis* é controlada por um único gene dominante, localizado no par cromossômico L5 dos indivíduos masculinos. A observação da recombinação e a viabilidade do genótipo dominante, sugeriu que a dioicida em *A. officinalis*, poder ter sido derivada relativamente recente, em termos de evolução das espécies. Já para a espécie *Myristica fragrans* Houtt., foi identificado o marcador associado à expressão sexual entre 60 “primers” testados, específico em indivíduos femininos.

A espécie *Pistacia vera*, *Myristica fragrans*, *Asparagus officinalis*, assim como em outras espécies, apresentam perfeita dioicida, estruturas reprodutivas femininas e masculinas bem distintas em indivíduos adultos, assim como a araucária.

A araucária além de não ter distinção de características morfológicas e fisiológicas, não possui cromossomos sexuais ou diferenças no cariótipo, que possam diferenciar indivíduos femininos dos masculinos.

Um número maior de marcadores RAPD deverão ser obtidos, com o objetivo de encontrar o marcador sexual em araucária, testar em indivíduos aparentados a fim de minimizar a variabilidade genética e identificar somente características relevantes, para isso se faz necessário utilizar um número maior de primers.

## 5. CONCLUSÃO

A obtenção de DNA de boa qualidade a partir de brotos de árvores adultas de araucária somente foi possível a partir do método que envolveu o uso CTAB 1% e purificação com a presença de NaCl. Os outros métodos, SDS e MATAB, não foram eficientes para remover as substâncias ligadas à fita do DNA, conseqüentemente não foi possível dar a seqüência aos procedimentos seguintes até a visualização do DNA genômico em gel de agarose. A contaminação por DNAses endógenas, metabólitos secundários, polifenólicos e terpenóides, endonucleases, polissacarídeos, etc., pode ser constatada pela visualização do DNA, que neste caso apareceu degradado.

Dos 500 primers testados, 78 “primers” revelaram marcadores potenciais na identificação de sexo. Apresentou bandas, ou no “bulk” formados por indivíduos femininos, ou, por masculinos. A técnica mostrou ser eficiente para se detectar polimorfismo na espécie, embora este seja pequeno.

Não houve a confirmação do marcador molecular tipo RAPD, no que diz respeito à expressão sexual quando as plantas foram testadas individualmente. O polimorfismo está em nível de indivíduos e não em razão do sexo da planta, como era esperado.

Para a técnica de RAPD existem mais de 1000 “primers”, então é possível encontrar o marcador com “primers” de RAPD em araucária utilizando esta mesma técnica, outra hipótese é que o marcador seja encontrado por meio de marcadores AFLP que revelam uma grande quantidade de polimorfismo, maior que em RAPD.

Não há diferenças significativas entre indivíduos masculinos e femininos para que se possa chegar ao marcador sexual utilizando RAPD com os “primers”

amplificados até o momento. Uma vez que foram testados aproximadamente 500 “primers”, o que se conclui é que: a(s) região(ões) do genoma envolvido(s) na determinação do sexo, não é muito grande e provavelmente um único ou poucos genes envolvidos na expressão sexual, outra possibilidade, é que o gene que controla a expressão sexual está presente em uma região genômica não muito freqüente em eventos de recombinação.

Caso o marcador seja encontrado, por meio de RAPD ou AFLP, este deve ser isolado do gel, seqüenciado e com as seqüências fazer dois “primers” de SCAR, com as seqüências terminais do marcador. Com os “primers” de SCAR vai ser possível identificar o sexo em um gel de agarose ou de poliacrilamida.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITCHITT, M.; AINSWORTH, C.C.; THANGAVELU, M. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, n. 4, p. 317-319, 1993.

AKIMOTO, J.; FUTUHARA, T.; KIKUZAWA, K. Sex ratios and variation in a functionally androecious species, *Schizopepon bryoniaefolius* (Cucurbitaceae). **American Journal of Botany**, v. 86, p. 880-8921, 1999.

AMARAL, A.C.B.; FERREIRA, M.; BANDEL, G. Variação da densidade básica da madeira produzida pela *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze no sentido medula-casca em árvores do sexo masculino e feminino. **IPEF**, Piracicaba, n. 2/3, p. 119-127, 1971.

BACKES, A. Condicionamento climático e distribuição geográfica de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze no Brasil – II. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 49, p. 31-51, 1999.

BANDEL, G. **O pinheiro brasileiro, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** Piracicaba, São Paulo, 1966. 68p.

BANDEL, G. Os Cromossomos da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. E da *Araucaria araucana* (Molina) Kovich. **O solo**, Piracicaba/SP, ano.LXII, n. 2, p. 60-72, 1970.

BANDEL, G. e GURGEL, J.T.A. Proporção de sexo em Pinheiro Brasileiro - *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Silvicultura**, São Paulo, v. 6, p. 209- 220, 1967.

BANZATTO, A.C.; et alli. Variação da densidade básica da madeira de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **O Solo**, n. 2, p. 43-45. 1969.

BAWA, K.S. e OPLER, P.A. Dioscism in tropical Forest trees. **Evolution**, n. 29, p. 167-179. 1975.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas.** Viçosa : UFV, 1997. 547p.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 32, p. 314-331. 1980.

BRASILEIRO, A.C.M. e CARNEIRO V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, Embrapa - Cenargem, 1998. 309p.

BUGALA, W. Sex determination of poplars from the colour of the leaves. **Roczn. Dendrol. Polsk. Tow. Bot.**, n. 7, p. 195-197. 1951.

CAREV, A.P. Sexual dimorfism of aspen. **Moskva**, n. 2, p. 76-78. 1969.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 70-78, 1994.

CHEN, D.M. e FILIPPIS, L.F. Application of genomic DNA and RAPD-PCR in genetic analysis and fingerprinting of various species of woody trees. **Australian Forestry**, v. 59, n. 1, p. 46-55. 1996.

DABO, S.M.; MITCHELL Jr., E.D.; MELCHER, U. A method for the isolation of nuclear DNA from cotton (*Gossypium*) leaves. **Analytical Biochemistry**, v. 210, p. 34-38. 1993.

DE HOOGH, R.H. & DIETRICH, A.B. **Avaliação de sítio para *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. em povoamentos artificiais**. Brasília, PRODEF, 1977.

DEICHMANN, V.O. **Noções sobre sementes e viveiros florestais**. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 1967. 196p.

DI STILIO, V.S.; KESSELI, R.V.; MULCAHY, D.L. A Pseudoautosomal Random Amplified Polymorphic DNA marker for the Sex chromosomes of *Silene dioica*. **Genetics**, v. 149, p. 2057-2062, ago, 1998.

DOYLE, J.J. e DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 9, p. 11-15, 1987.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.; HORTORIUM, L.H.B. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, 1991.

DULSON, J.; KOTT, L.S.; RIPLEY, V.L. Efficacy of bulked DNA samples for RAPD DNA fingerprinting of genetically complex *Brassica napus* cultivars. *Euphytica*, v. 102, p. 65-72, 1998.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and a rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, v. 19, p. 1349, 1991.

EISPAHR, D.W. Sex ratio in quaking aspen possible sex related characteristics. *Word For. Congr.*, Seattle, n. 2, p. 747-750. 1960.

FEDOROV, N.I. e RAPTUNOVIC, E.S. The photosynthetic activity of male and female aspen trees. *Lesoned. Moskva*. v. 1, p. 46-51, 1970.

FARMER Jr, R.E. Sex ratio and sex-related characteristics in eastern cottonwood. *Silvae genética*, v. 13, n. 4, p. 116-118, 1964.

FINKELDEY, R.E. Sex ratio in quaking aspen and possible sex-related characteristics. *Silvae Genetica*, v. 13, n. 4, p.116-118, 1998.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 3ª edição, 1998. 220p.

FRANKEL, O.H.; BROWN, H.D.; BURDON, J.J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge University Press, 1998. 299p.

FUPEF. **Inventário florestal do Pinheiro no sul do Brasil**. Curitiba - PR, 1978. 327p.

GAWEL, N.J. e JARRET, R.L. A modified CTAB extraction procedure for *Musa* and *Ipomea*. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 9, n. 3, p. 262-266, 1991.

GOLFARI, L. Coníferas aptas para repoblaciones forestales en el estado de São Paulo. *Silvicultura em São Paulo*. v. 6. p. 7-62, 1967.

GRANT, V. **Genetics of flowering plants**. New York, Columbia University Press, 1975, 514p.

GRATTAPAGLIA, D.; O'MALLEY, D.; DVORAK W. Phylogenetic analysis of central american and mexican pines using RAPD marks on bulked DNA samples. In: **Proceedings of the IUFRO conference "Breeding Tropical Trees"**, Cartagena and Cali, Colombia, v. 2, p. 02-08, 1992.

GREGORIUS, H.R. Umweltbelastung und anpassungsfähigkeit von baumpopulationem. *Silvae Genética*, v. 34, p. 230-241, 1983.

GURGEL FILHO, O.A. Silveira da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: IUFRO Meeting on forestry problems of the genus *Araucaria*, Curitiba, FUPEF, v. 1, p. 29-68, 1980.

HADRYS, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, n. 1, p. 55-63, 1992.

HARRI, L. **Árvores brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.** Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 3. ed., v. 1, p. 35, 2000.

HERTEL, R.J.G. **Estudo sobre a *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** Curitiba, Instituto de História Natural, 1966. 24p.

HONGTRAKUL, V.; HUESTIS, G.M.; KNAPP, S.J. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor. Appl. Genet.*, v. 95, p. 400-407. 1997.

HORMAZA, J.I.; DOLLO, L.; POLITO, V.S.; Identification of a RAPD marker linked to Sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis; *Theor Appl Genet*, v. 89, p. 9-13. 1994.

HUECK, K. Verbreitung und standortansprüche der brasilianischen Araukarie (*Araucaria angustifolia*). *Forstwiss. Centralblatt*, n. 70, p. 272-289. 1952.

IL'IN, A.M. Determining the sex of aspen by the leaves. *Lesover. Moskva*. v. 6, p. 66-71, 1969.

JIANG, C. e SINK, K. C. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus *M* in asparagus. *Euphytica*, v. 94, p. 329-333, 1997.

JEFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, v. 316, p. 76-79. 1985.

KAGEYAMA, P.Y; DIAS, I.de. S. Aplicação da genética em espécies florestais nativas. In: **Congresso Nacional sobre Essências Nativas.** Campos do Jordão. Anais... Campos do Jordão: Instituto Florestal, v. 16A, n. 2, p. 782-791, 19



KAGEYAMA, P.Y.; JACOB, W.S. Variação genética entre e dentro de populações de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: **IUFRO Meeting on Forestry Problems of the genus *Araucari***, v. 1., Curitiba, FUPEF, p. 83-86, 1980.

KIDWELL, K.K. e OSBORN, T.C. Simple plant DNA isolation procedure. In: BECKMANN, J.S. e OSBORN, T.C. **Plant genomes: methods for genetic and physical mapping**. London: Kluwer Academic Publishers, 1992.

KOCANVSKIJ, S.B. Certain physiological feature of male and female aspen trees. *Lesoved, Moskva*, v. 2, p. 14-23, 1968.

KOLLMANN, F. **Tecnologia de la madeira e sus aplicaciones**. Madrid, Instituto Florestal de Investigaciones y Experiências y Servicio de la madera, 1969. 675p.

LAMPRECHT, H. **Silvicultura nos trópicos**. Ed GTZ, Eschborn, 1990. 343p.

LAWTON, R.M. The relationship between crown form and sex in *Chlorophorm excelsea* (Welw.) Benth. And Hook. **F. Emp. For. Rev.**, n. 34, v. 2, p. 192-193, 1955.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy*, v. 55, p. 265-343, 1995. In LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 44, p. 388-396, 1989.

LLOYD, D.G. e WEBB, C.J. Secondary sex characters in plants. **The Botanical Review**, v. 43, n. 2, apr-jun, 1977.

LODHI, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molec. Biol. Repórter**, v. 12, p. 6-13, 1994.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras – Manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Instituto Plantarum, Nova Odessa/SP, 3 ed., v. 1, p. 35, 2000.

MATTOS, A. **O pinheiro brasileiro**. São Paulo, Grêmio Politécnico, 1972. 200 p.

MAZZA, M.C.M. e VASCONCELOS, M.J.V. Extração e purificação de DNA de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1996. (não publicado).

MAZZA, M. C. M. Use of RAPD markers in the study of genetic diversity of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. populations in Brazil. **Recent Advances in Biotecnologi for Tree Conservation and Management: Proceeding of na IFS Workshop, Florianópolis - SC**, p. 103-111, 1997.

MAZZA; M.C. M. & BITTENCOURT, J.V.M. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Embrapa, n. 41, p. 12-17, jul-dez, 2000.

MELLO, C.; LEITE, E.J. **Levantamento do volume madeireiro, composição florística e dinâmica da regeneração natural da reserva de Caçador, estação experimental de Caçador, SC**. Departamento de Eng<sup>a</sup> Agrônômica, UNB. Brasília. 1987.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I. e KESSELI, R.V. Identification of markers linked to diseases resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating population. **Proc. Natl. Acad. USA**, v. 88, p. 9828 – 9832, 1991.

MILACH, S.C.K. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. *In*: BORÉM, A.; *et al.* **Biossegurança, Proteção de Cultivares, Acesso aos Recursos Genéticos e Propriedade Industrial na Agropecuária**, Viçosa, p. 43-58. 1998.

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 1998. 141p.

MITTON, J.B.; LINHART, Y.B., STURGEON, K.B.; HAMRIK, J.L. Allozyme polymorphism detected in mature needle tissue of ponderosa pine. **J. Heredity**, v. 70, n. 2, p. 86-89, 1979.

MITTWOCH, U. **Sex cromossomes**. New York, Academi Press Inc. London Ltda. 1957. 306p.

MONTEIRO, R.F.R.; SPELTZ, R.M.; GURGEL, J.T.A. Comportamento silvicultural de 24 raças geográficas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., no Paraná. **Sivicultura**, São Paulo, v. 16a, n. 2, p. 814-824. 1982

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed reaction. **Methods Enzymol.**, n. 255, p. 335-350, 1987.

MULLIS, K.B. The polimerase chain in an anemic mode: How to avoid cold oligodioxiribonuclear fusion. **PCR Meth. Appl.**, n. 1, p. 1-4, 1991

NIGTEVECHT, G. van. Genetic studies in dioecious *Melandrium*. *Genética*, v. 37, p. 281-306, 1966.

NOGUEIRA, A.C. **Reação do crescimento radial da *Araucaria angustifolia* (B.) Ktze em florestas naturais que sofreram corte seletivo.** Tese de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 1989.

OLIVEIRA, B. As regiões de ocorrência normal de *Araucaria angustifolia*. *Anuário Brasileiro de Economia Florestal*. v. 1, n. 1, p. 185-199. 1948.

OHMORE, T.; MURATA, M.; MOTOYOSHI, F. Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the Tm-1 locus in tomato. *Theor Appl. Genet.*, v. 92, p. 151-156. 1996.

PARAN, I. e MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, v. 85, p. 985-993, 1993.

PAULEY, S.S. Forest tree genetics research: *Populus* L. *Econ. Bot.*, v. 3, p. 299-33-, 1949.

PINTO, S.A.A. **Influência da dioicida no diâmetro e na altura de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. e suas implicações na formação de áreas de produção de sementes na região de Quedas do Iguaçu.** Dissertação de Mestrado, em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 1979. 61p.

PITCHER, J.A. Report on an FAO project to establish international provenance trials of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Forest Genetic Resources, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, n. 4, 1975.

PUTWAIN, P.O. e HAPPER, J.L. Studies in the dynamics of plant population. *Journal Ecology*, v. 60, p. 113-129, 1972.

RANGELOV, K. Comparative studies of certain physical properties of wood of male and female aspens. *Gorskostop. Nanka, Sofija*, v. 6, n. 4, p. 105-110, 1969.

RAPAPORT, C.A.; LASCOUX, M.; GULBERG, U.; Sex determination and sex ratio in the dioecious shrub *Salix viminalis* L., *Theor Appl. Genet.*, v. 94, p. 493-497. 1997.

- REITZ, P.R. e KLEIN, R.M. Araucariaceas. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, 2 ed., 1966. 62p.
- ROMANO, E. e BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas. **Revista Biotecnologia**, ano II, n. 9, jul/ago, 1999.
- SHIMOLA, C. Contribuição ao estudo do ciclo biológico da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Experientiae**, v. 2, p; 519-540, 1962.
- RUAS, C.F. **Citogenetic and molecular studies in genus *Atriplex* L. (Cenopodiaceae)**. Dissertation presented to the Department os Botany and Range Science. Brigham Young University, 1996. 113p.
- RUAS, C. F.; *et al.* Male-specific DNA in the dioecius species *Atriplex garrettii* (Chenopodiaceae). **American Journal of Botany**, v. 85, p. 162-166, 1998.
- SALISBURY, F.B. e ROSS, C. **Plant phisiology**. Belmont, Califórnia, Wadsworth Pupliching Company. 1969. 747 p.
- SANQUETTA, C. R. e TETTO, A. F. **Pinheiro-do-Paraná : lendas e realidades**. FUPEF, Curitiba- PR, 2000. 112p.
- SCOTT, K.D. e PLAYFORD, J. DNA extraction technique for PCR in rain Forest plnt species. **Biotechniques**, v. 20, n. 6, p. 976-978, jun, 1996.
- SCUTT, C. P.; LI, I.; ROBERTSON, S. E.; WILLIS, M. E.; GILMARTIN, P. M. Sex determination in dioeciuous *Silene latifolia*. **Plant Physiology**, v.114, p.969-979, 1997.
- SHIBU, M. P. et al. Identification of Sex-specific DNA markers in the dioecius tree, nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). **Plant Genetic Resouces Newsletter**, n. 121, p. 59-60, 2000.
- SHIMIZU, J.Y. e HIGA, A.R. Variação genética entre procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. na região de Itapeva-SP, estimada até o 6º ano de idade. In: **IUFRO Meeting on Forestry Problems of the Genus *Araucaria***, Curitiba, FUPEF, v. 1, p. 78-82, 1980.
- SHIMIZU, J. Y.; OLIVEIRA, Y. M. M. de. Distribuição, variação e usos dos recursos genéticos da araucária no Sul do Brasil.. **Circular Técnica**, n. 04, Curitiba: EMBRAPA-URPFCS, 1981. 9p.

SOUZA, V. A.; **Pupolation genetic studies in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** Dissertação de Mestrado, Faculty of Forest Science and Forest Ecology, Göttingen, Germany, 2000. 161p.

TINGEY, S.V.; DEL TUFO, J.P.; Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers, **Plant Physiology**, v. 101, p. 349-352. 1993.

TINGEY, S.V.; RAFALSKI, A.; WILLIAMS, J.G.K. Genetic analysis with RAPD markers. **Join Plant Breeding Symposia Series**, Minneapolis, Minnesota, p. 3-8, 1992.

TRANSUE, D.K.; FAIRBANKS, D.J.; ROBINSON, L.R.; ANDENSEN, W.R. Species identification by RAPD analysis of grain amaranth genetic resources. **Crop Science**, v. 34, p. 1385-1389. 1994

WILLIAMS, J.G.K.; *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Theor. Applied. Genet.**, v. 83, p. 6531-6535. 1990.

WONG, K.C. e SUN, M. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orquidaceae). **American Journal of Botany**, v. 86, p. 1406-1413. 1999.

**AXEXOS**

FIGURA 12. SÉRIE OPERON OPAA

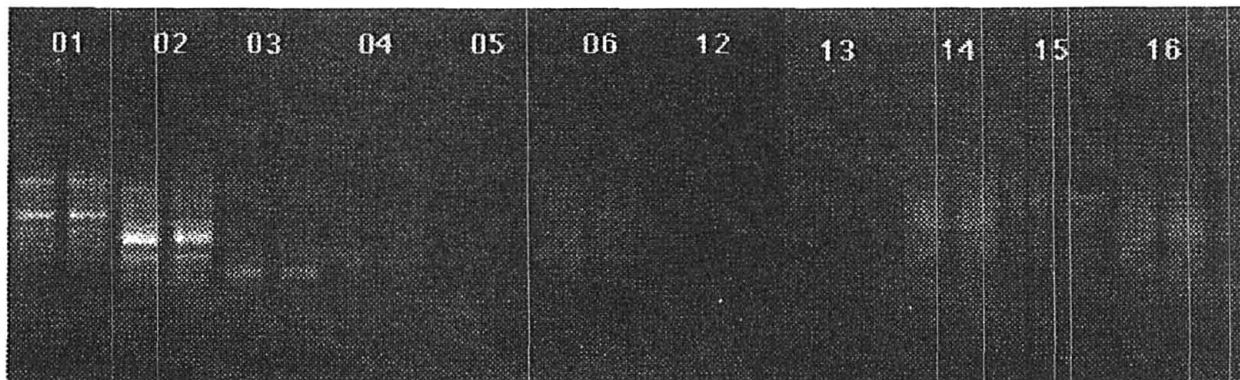


FIGURA 13. SÉRIE OPERON OPAB

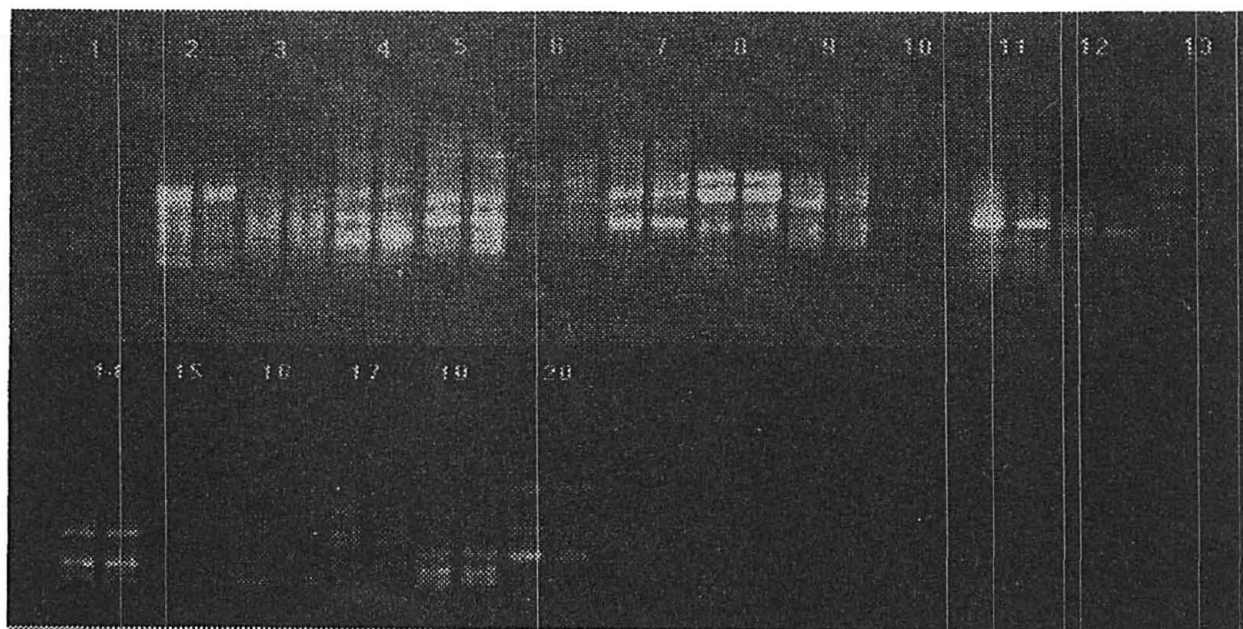


FIGURA 14. SÉRIE OPERON OPAS, OPAC E OPAG

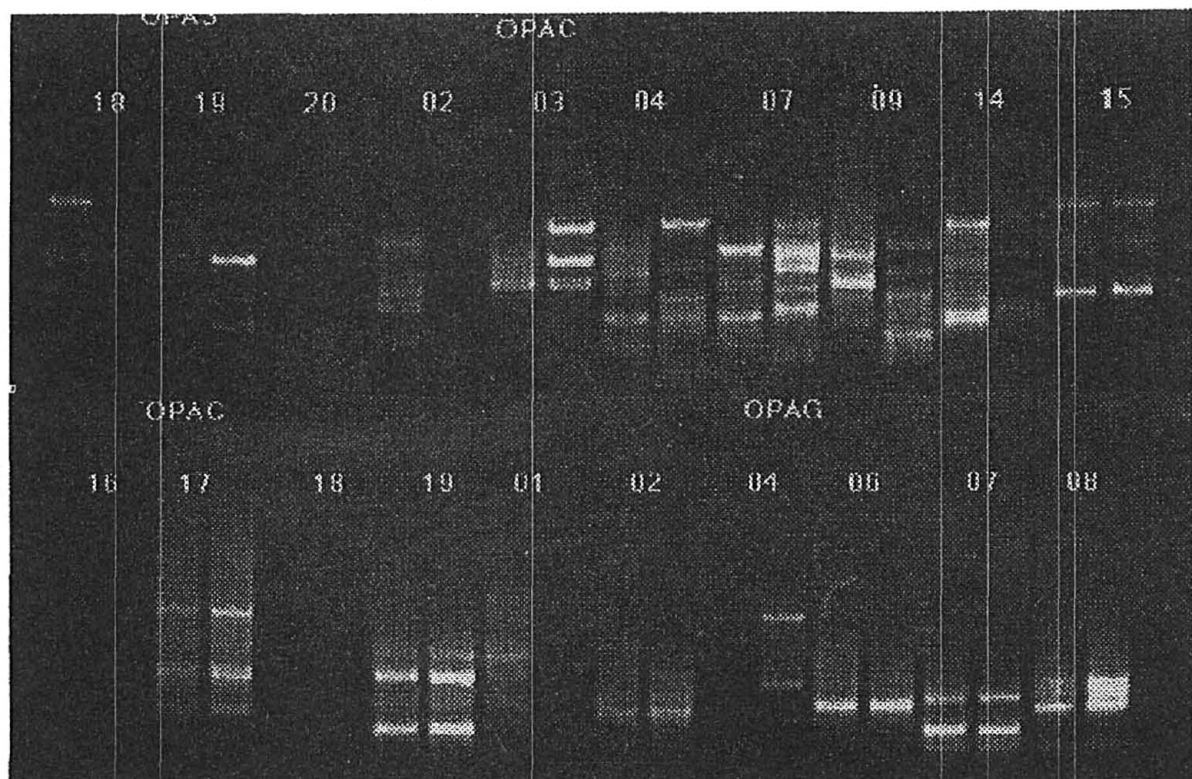


FIGURA 15. SÉRIE OPERON OPAJ.

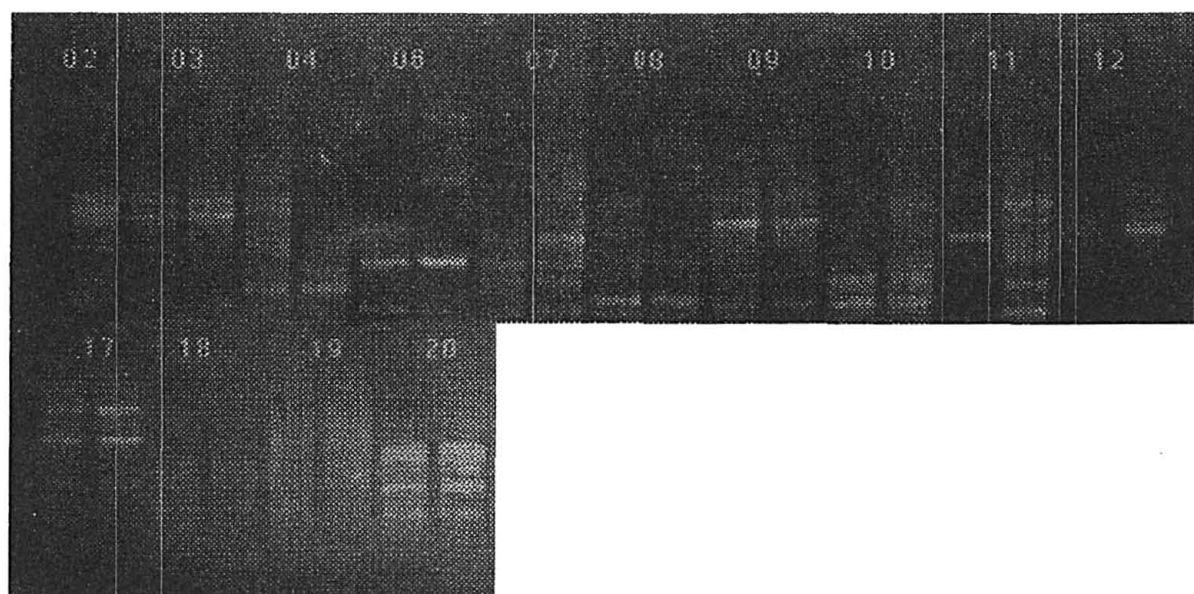




FIGURA 16. SÉRIE OPERON OPAL.

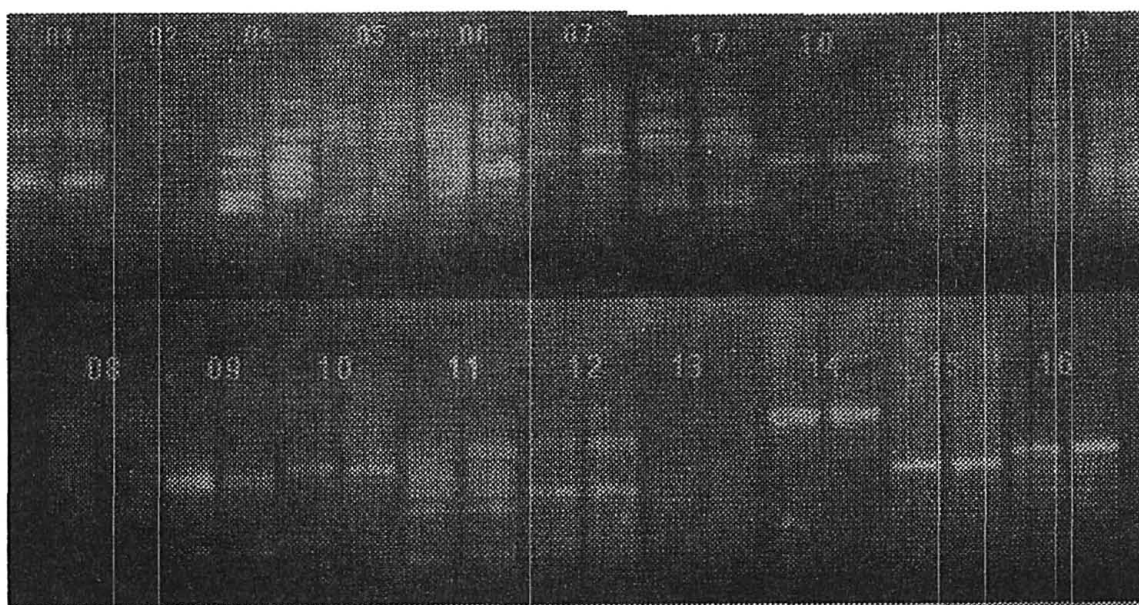


FIGURA 17. SÉRIE OPERON OPAT

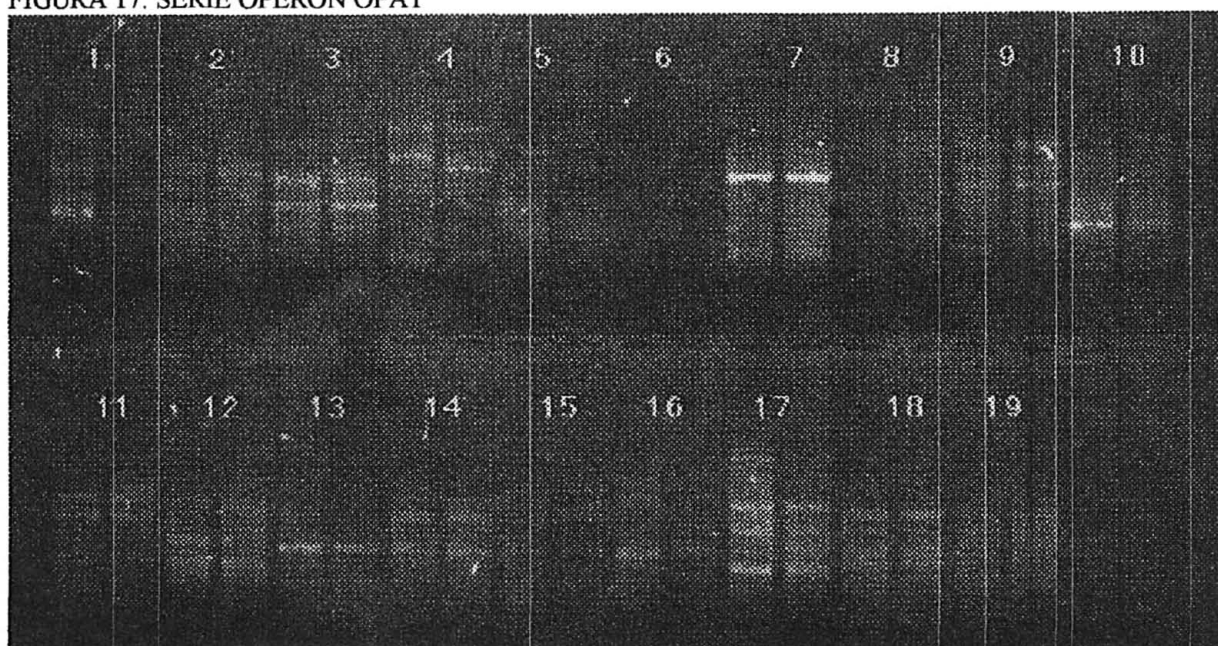


FIGURA 18. SÉRIE OPERON OPAT.

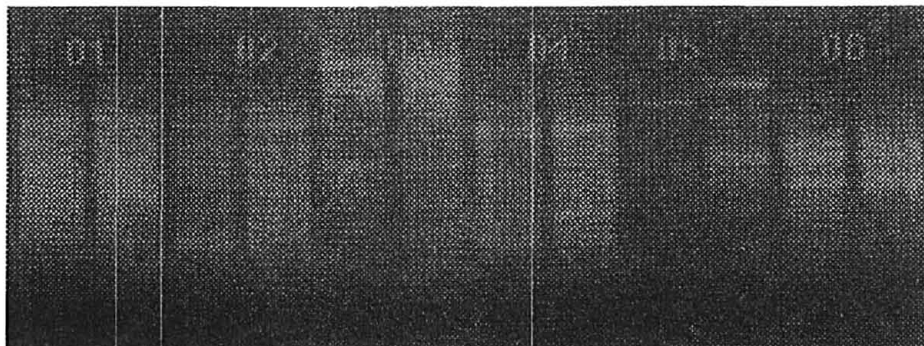


FIGURA 19. SÉRIE OPERON OPAS

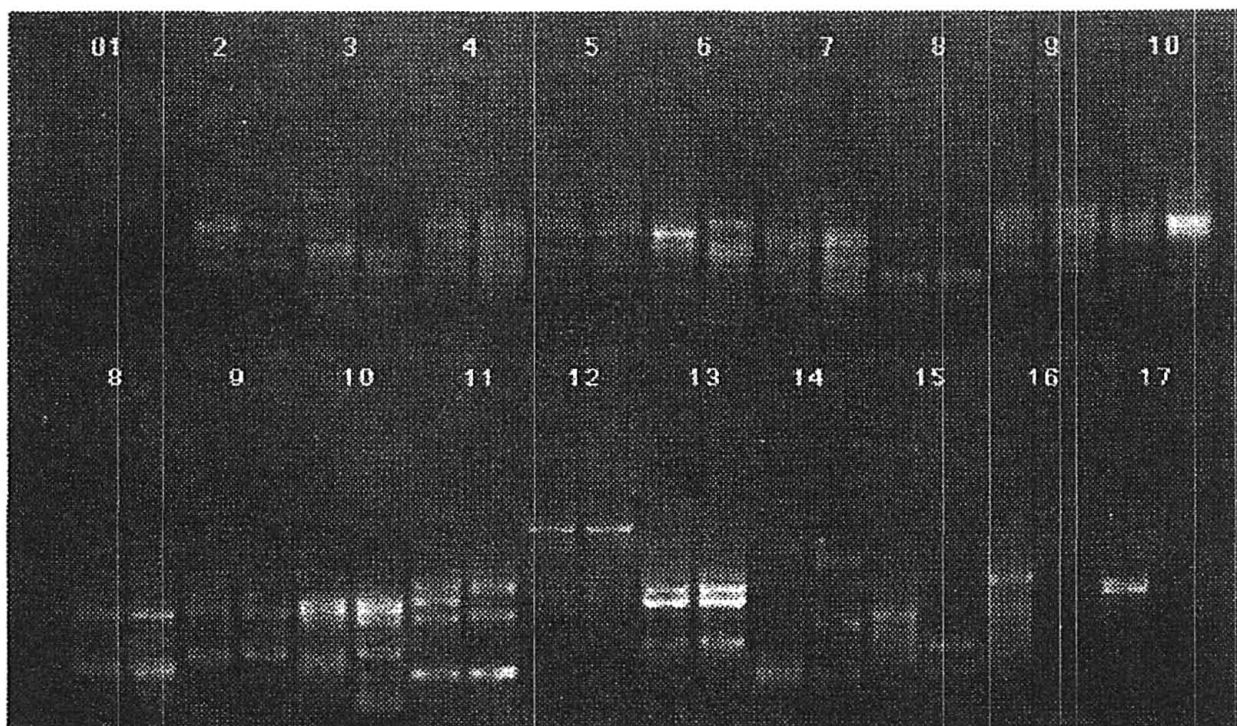


FIGURA 20. SÉRIE OPERON OPAK

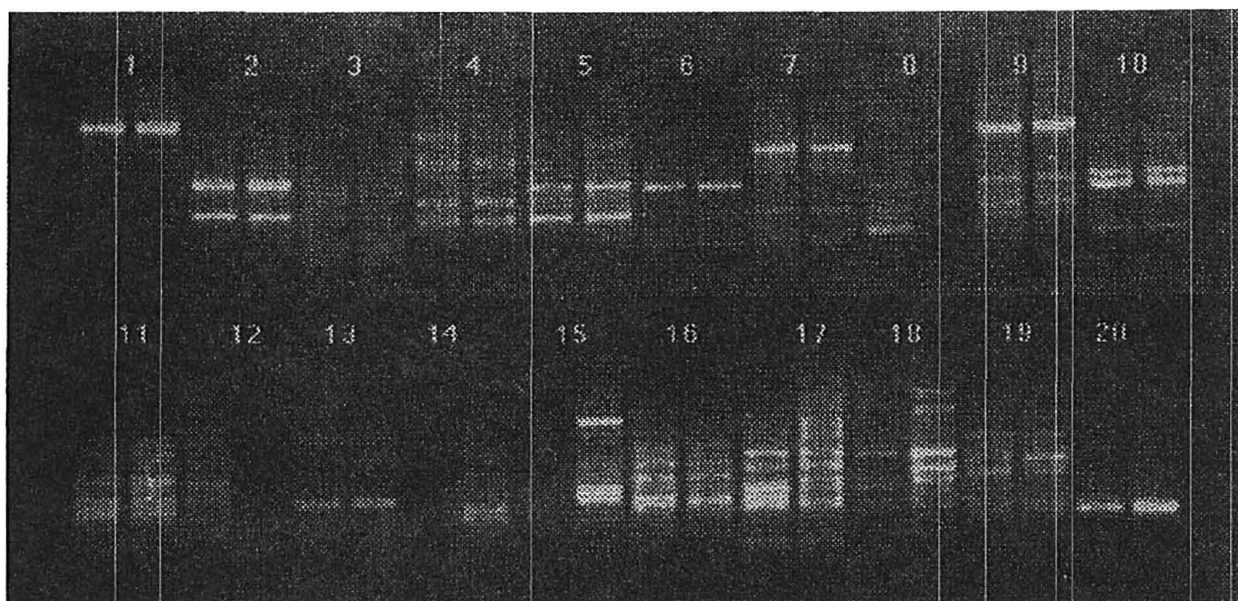


FIGURA 21. SÉRIE OPERON OPAU.

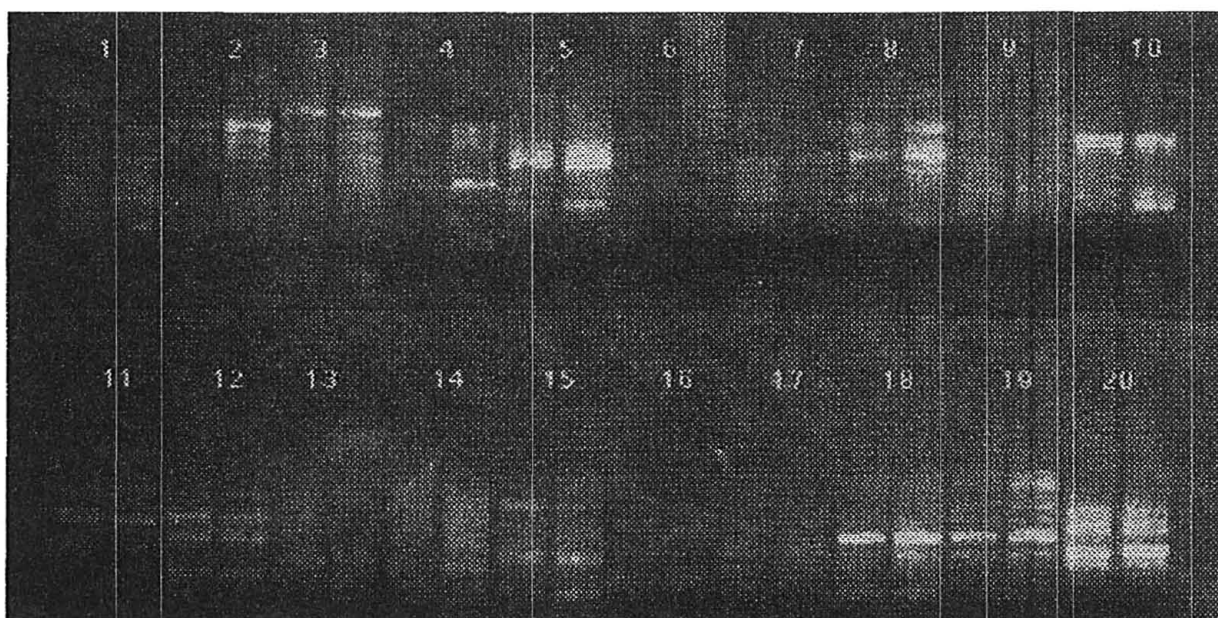




FIGURA 22. SÉRIE OPERON OPS.

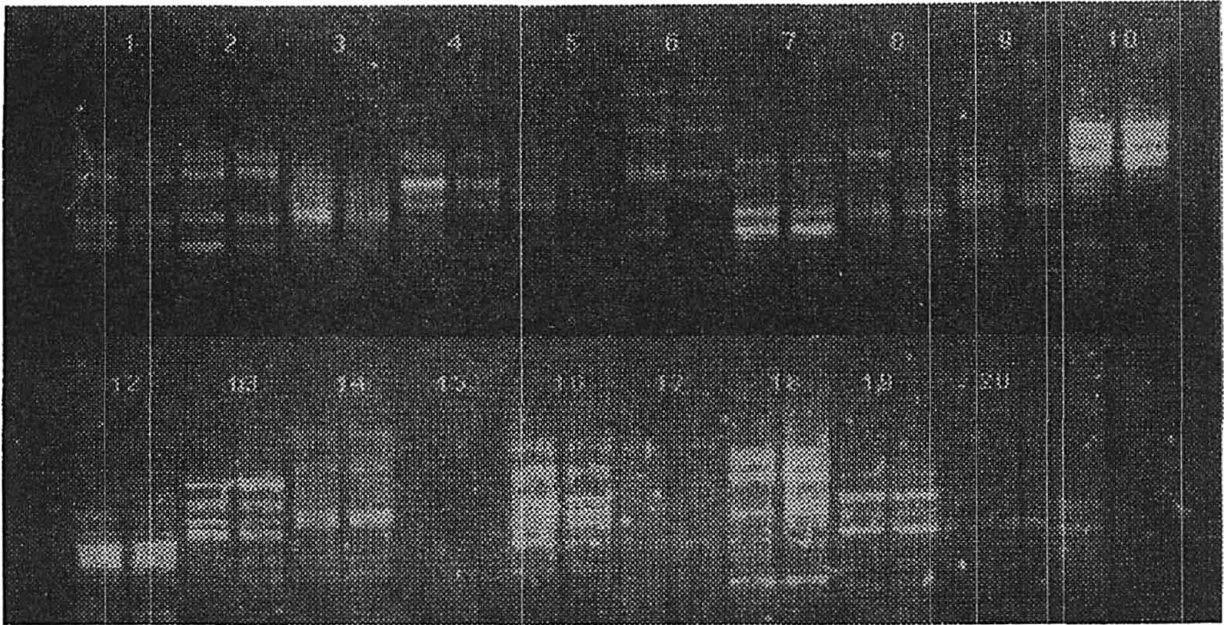


FIGURA 23. SÉRIE OPERON OPT.

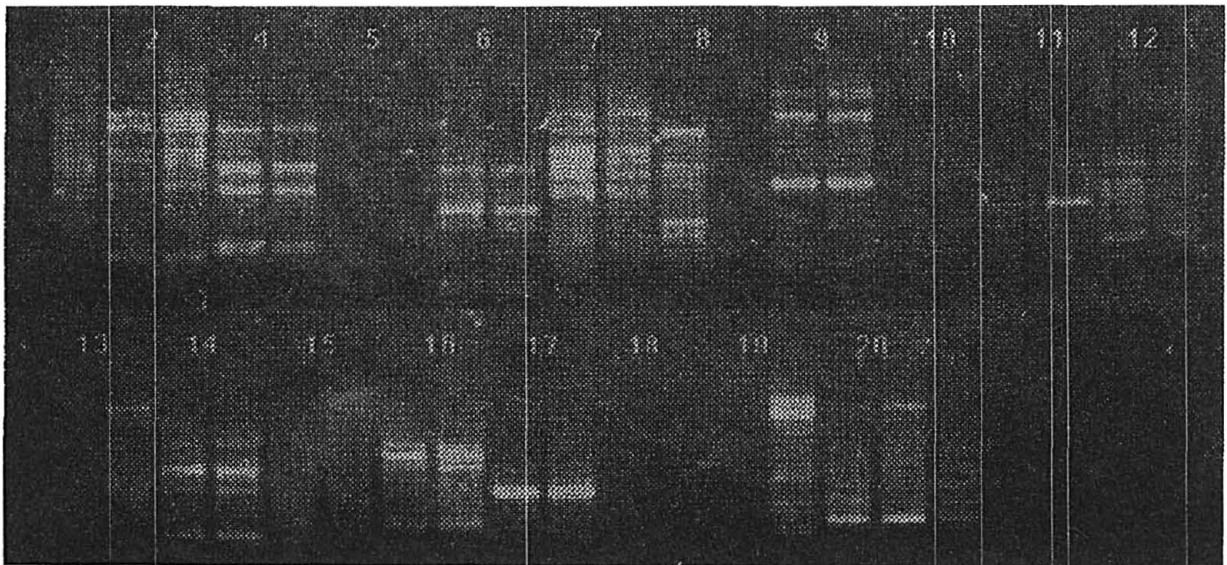


FIGURA 24. SÉRIE OPERON OPAM.

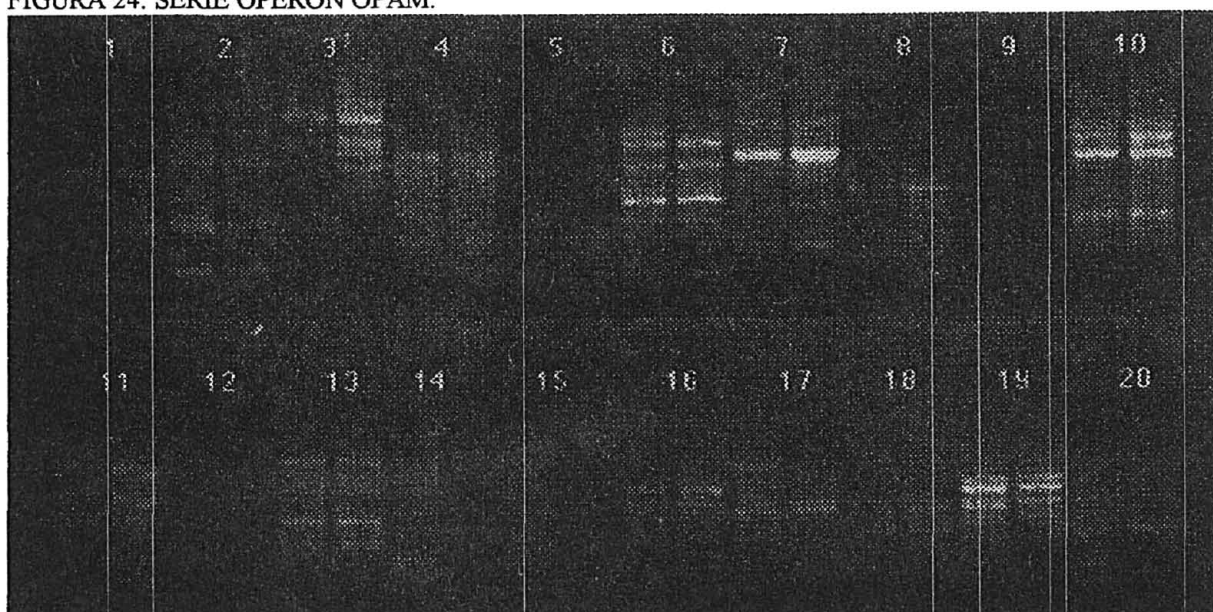


FIGURA 25. TESTE INDIVIDUAL COM PRIMERS OPAM 01, OPAM 20, OPAK 05, OPAM 10, OPX 02, 03 E 04.

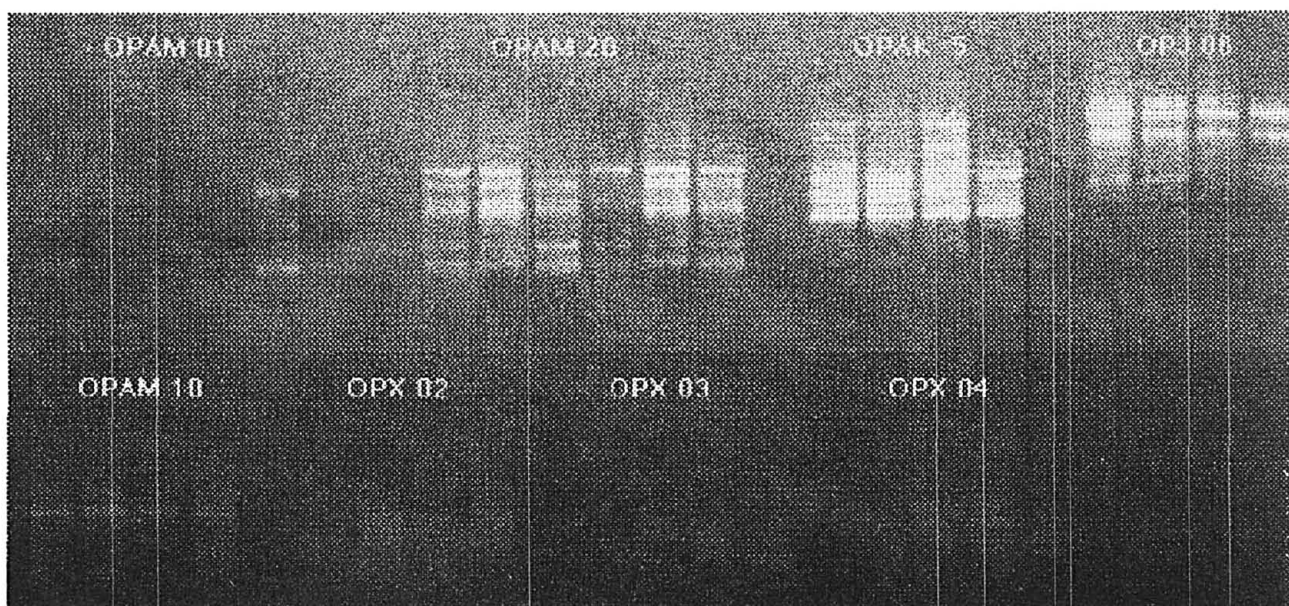


FIGURA 26. TESTE INDIVIDUAL COM PRIMERS OPAB 06, OPA 18, 19 E 09, OPAD 02, 06, 13 E 16, OPAS 03 E 06.

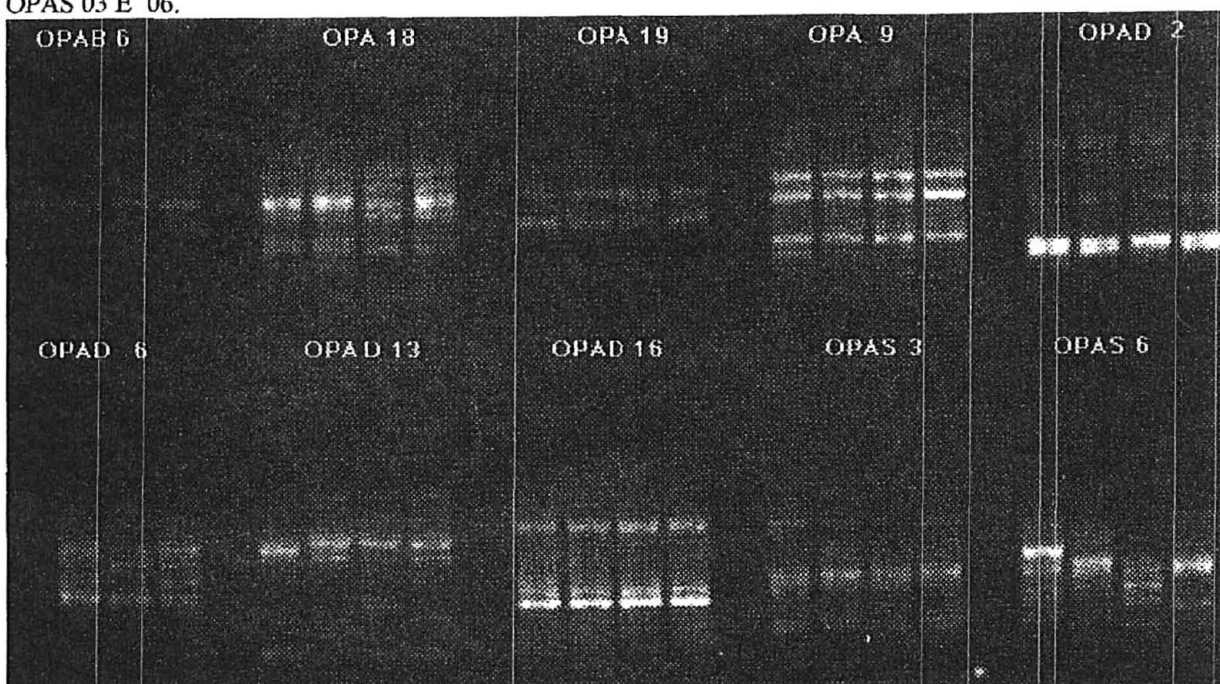


FIGURA 27. TESTE INDIVIDUAL COM PRIMERS OPAS 11, OPAC 03, 04, 07 E 09.

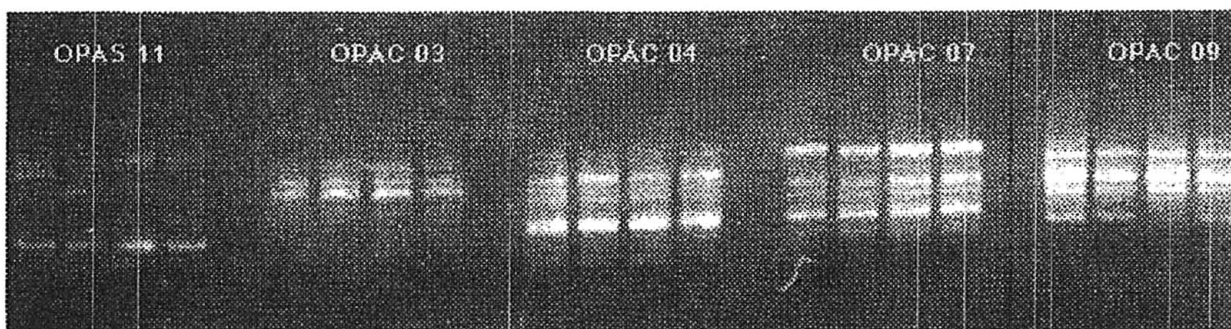


FIGURA 28. TESTE INDIVIDUAL COM PRIMERS OPAF 05 E 16, OPAE 05, OPO 04 E 18.

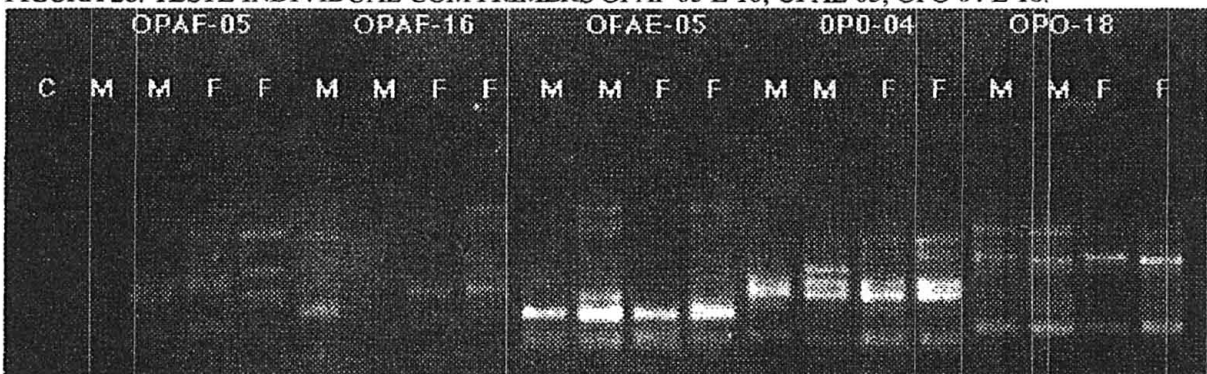




FIGURA 29. TESTE INDIVIDUAL COM PRIMERS OPAR 01, 02 E 05, OPAW 03, 08, 09, 10 E 11, OPS 06 E 09.

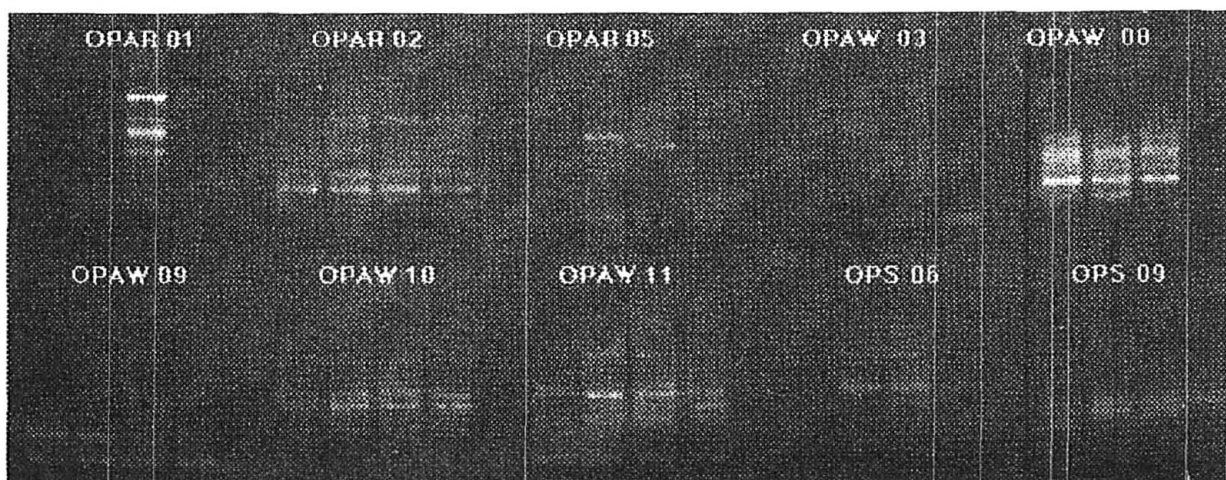


FIGURA 30. TESTE INDIVIDUAL COM PRIMERS OPAK 17 E 18, OPJ 01.

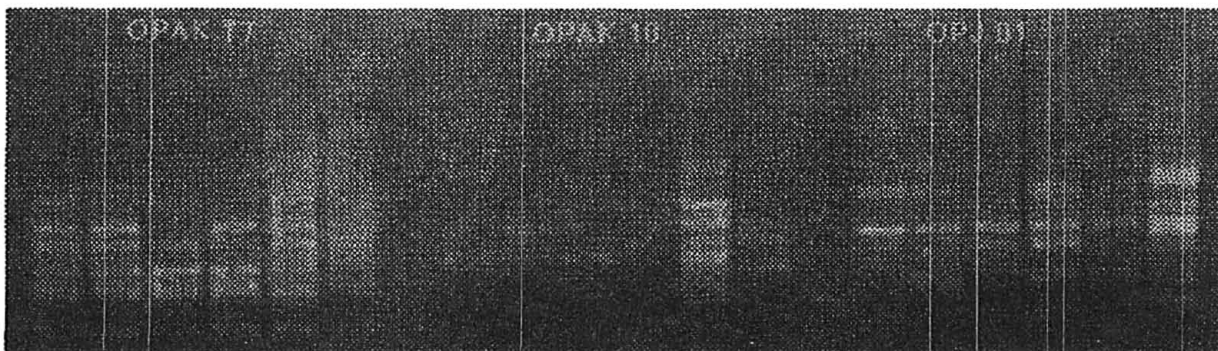


FIGURA 31. TESTE INDIVIDUAL COM PRIMERS OPW 02 E 05, OPE 05 E 10, OPAV 07 E 18, OPE 13, 17 E 18, OPAR 4

