

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS DE CURITIBANOS  
DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA, BIODIVERSIDADE E FLORESTAS  
CURSO DE ENGENHARIA FLORESTAL

Verônica Almeida

**Otimização de protocolo de extração de DNA para *Araucaria angustifolia* e *Ocotea porosa***

Curitibanos, SC

2024

Verônica Almeida

**Otimização de protocolo de extração de DNA para *Araucaria angustifolia* e *Ocotea porosa***

Trabalho de conclusão do Curso de Graduação em Engenharia Florestal do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Florestal.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Kelen Haygert Lencina

Curitibanos, SC

2024

Almeida, Ivonete Verônica

Otimização de protocolo de extração de DNA para  
Araucaria angustifolia e Ocotea porosa. / Ivonete Verônica  
Almeida ; orientador, Kelen Haygert Lencina, 2024.

51 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus  
Curitibanos, Graduação em Engenharia Florestal,  
Curitibanos, 2024.

Inclui referências.

1. Engenharia Florestal. 2. Extração de DNA. 3. Ocotea  
porosa. 4. Araucaria angustifolia. I. Lencina, Kelen  
Haygert . II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Graduação em Engenharia Florestal. III. Título.

Ivonete Verônica Almeida

## Otimização de protocolo de extração de DNA para *Araucaria angustifolia* e *Ocotea porosa*

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Engenharia Florestal” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia Florestal

Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, 10 de Junho de 2024.



Documento assinado digitalmente  
**MARCELO BONAZZA**  
Data: 21/06/2024 09:31:33-0300  
CPF: \*\*\*.641.899-\*\*  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Marcelo Bonazza, Dr.  
Coordenador (a) do Curso

### Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente  
**Kelen Haygert Lencina**  
Data: 20/06/2024 18:51:02-0300  
CPF: \*\*\*.476.600-\*\*  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof<sup>a</sup>. Kelen Haygert Lencina, Dr<sup>a</sup>.  
Orientador (a)  
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente  
**Gabriel Felip Gomes Olivo**  
Data: 21/06/2024 16:08:30-0300  
CPF: \*\*\*.855.059-\*\*  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Biólogo Gabriel Felip Gomes Olivo,  
Mestre Avaliador (a)  
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente  
**Gustavo Henrique Mozzer Regazolli**  
Data: 21/06/2024 11:30:25-0300  
CPF: \*\*\*.955.549-\*\*  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Engenheiro Florestal. Gustavo  
Henrique Mozzer Regazolli  
Avaliador (a)

Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus amados pais Ivone Almeida e Ivonei Almeida...

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a pessoa mais importante do mundo, mais incrível, resiliente, audaciosa, justa, ética, corajosa e principalmente caótica, sem mencionar que é dona de uma beleza exuberante, sendo assim agradeço a mim mesma! Pois foi por mim e para a minha própria evolução, que me dediquei, me esforcei, erre e aprendi, eu não desisti, mas falhei muitas vezes, porém eu venci a mim mesma.

Agradeço aos meus amados pais, por toda educação, ensinamentos, e proteção, minha existência aprecia a vossa existência, todo o bom exemplo que recebi em meus anos de vida me fizeram ser uma pessoa cada dia melhor, vocês dois são os melhores pais do mundo, e eu sei que fizeram muito por mim, e se estou aqui é porque me apoiaram nas minhas melhores decisões e me corrigiram nas piores. eu certamente escolheria vocês por mais mil vidas! Amarei infinitamente!

Agradeço profundamente a minha querida avó, madrinha, Lala, que me incentivou todos os dias da minha vida, mas durante a jornada acadêmica foi essencial, segurou minha mão, e disse incontáveis vezes “longe já estive, agora mais perto está” não desista! e por ela eu enfrentaria o mundo! Agradeço a minha amada irmã, por me ouvir e estar ao meu lado em todos os momentos, cuidou de mim quando adoeci, grata por me fazer rir, por termos bons momentos uma com a outra! Sou grata aos demais familiares como meu tio que sempre me ajudou em tudo que precisei, pelos incentivos e cuidado comigo.

Sou imensamente grata aos meus amigos, a começar por Leandro Candido que foi meu maior confidente da vida pessoal e acadêmica, o qual me ouviu e aconselhou por inúmeras vezes, e no momento de fragilidade acadêmica me ajudou imensamente, ele é uma das razões para eu ter continuado, se fez presente mesmo distante! Agradeço aos meus queridos amigos (Elton Kretzler - em memória) e Izabel Fleck, que por uma aposta me fizeram ingressar na faculdade, nossos momentos juntos foram profundamente importantes para mim, aprendi muito com vocês, agradeço a Ana Caroline Fleck que esteve ao meu lado por muitos anos e que foi muito especial na minha vida!

Agradeço ao meu caro amigo Ronaldo Nogueira que me ajudou e incentivou na entrada para UFSC, poeta este que me dedicou muitas mensagens de carinho e perseverança, além de poesia! Sou grata pelos conselhos e instruções que recebi de meus queridos chefes Dra Martha Bochi e Dr Adroaldo Bochi.

Aos amigos que fiz dentro da universidade, minha querida amiga Cintia Faquin, que me ajudou e apoiou em muitos momentos, me orientou em laboratório e se tornou uma grande amiga, doce, gentil e muito prestativa, assim como minha pequena “Gabirela” Messias e Vinicius Almeida, que foram sensacionais, estiveram ao meu lado, rimos, fizemos planos, passeamos por aí, eles foram meu conforto, afinidade e definição de amizade para além das estruturas UFSC! Agradeço ao meu querido amigo Gustavo Mozzer por todas as diversas conversas, sobre a vida, sobre o ser humano, grata por todo o carinho, sutileza e gentileza a mim empregados. Agradeço a minha amiga querida que esteve ao meu lado por anos e que foi essencial nessa caminhada, Janaína Oliveira, a qual me ouviu, e que partilhou de bons momentos comigo. Agradeço imensamente a Arielle K. Oliveira que esteve ao meu lado durante todo o percurso acadêmico, ela foi primordial, uma das pessoas mais doces e benevolentes que já conheci, foi de suma importância, aprendi a ser melhor com ela!

A minha querida Bee Alexia M. Oliveira, por partilhar toda sua essência e ternura comigo, por estar junto a mim em diversos momentos me ajudando e apoiando.

Ao meu querido amigo Paulo W. H. que por 10 anos se faz presente, que nossa amizade seja eterna, gratidão por todos os momentos vividos juntos. Ao William Matheus que ingressou comigo e fizemos uma linda história de amizade e perseverança juntos, grata por todo suporte.

Tenho profunda gratidão por todos os professores, por toda dedicação e conhecimento compartilhado, tenho imensa admiração por essa profissão, que nos ensina e nos encaminha a sermos pessoas melhores e mais capacitadas dentro da nossa área de interesse. Agradeço principalmente a minha orientadora Kelen H. Lencina, que é uma pessoa extraordinária, a qual me acolheu, ensinou, corrigiu com paciência e discernimento, grata pelos bons exemplos de conduta e ética e moral, o mundo te espera, com uma linda jornada pela frente, o sucesso começa aqui, mas será completo logo ali onde a felicidade faz morada!

Ao grupo MBF composto atualmente por Yanka, Matheus, Ingrid, Ana, Gabriela, Vinicius, Gustavo. meus mais sinceros agradecimentos por todo esforço e ajuda a mim dedicados, desejo a cada um de vocês uma jornada linda de muito sucesso.

Agradeço a todos os prestadores de serviço, técnicos, guardas de segurança, setor de limpeza, motoristas, bibliotecários, serviços terceirizados, secretária, entre outros.

Aos amores da minha vida Charlie, Yoshi e Catarina!

A DEUS, pois a ele toda honra e glória! É ele que me conduz às águas refrescantes e restaura as forças do meu ser, e mesmo que eu ande pelo vale da sombra e da morte não temerei mal algum pois ele estará comigo! E foi com ele que eu caminhei até aqui, foi ele quem me deu tantas pessoas maravilhosas para poder agradecer!

Foi um imenso prazer conhecer cada um de vocês, desejo uma linda jornada e uma ótima estadia por esse mundo, que a vida seja leve e linda, e que boas energias conspiram sempre a favor de cada um!

**MUITO OBRIGADA!!!**



*“Science never solve a problem without creating ten more”*

(George Bernard Shaw)

## RESUMO

É possível constatar que muitas espécies florestais se encontram em risco de extinção, como *Araucaria angustifolia* e *Ocotea porosa*, o que desencadeia problemáticas ambientais, sociais e econômicas. São imprescindíveis estudos que visam a conservação dessas espécies, os quais requerem que as populações remanescentes sejam monitoradas e delas obtidas amostras para a elaboração de estudos genéticos. Para isso é necessário que haja a disponibilidade de protocolos de extração de DNA específicos para cada espécie, com o objetivo de obter amostras com qualidade e quantidade requeridas para utilização em etapas mais avançadas como a PCR, visando o uso dos marcadores moleculares. Com essa finalidade, foi utilizado o protocolo CTAB padrão com adaptações cabíveis para cada espécie. Para *Araucaria angustifolia* foram avaliadas diferentes técnicas de maceração do material para extração de DNA (Tissuelyser em câmbio vascular seco, lima e lixa nos tecidos de alburno). Para *Ocotea porosa* foram avaliadas duas concentrações de CTAB (2 e 5%) e tempos de banho-maria (1 h e 1 h e 30 min). Posteriormente, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 0,8% com marcadores Lambda de peso conhecido (25, 50 e 100 ng/ $\mu$ L) e quantificadas através de espectrofotômetro NanoVue. Para *Araucaria angustifolia* a extração resultou em uma concentração média das amostras de 129 ng/ $\mu$ L para uso de câmbio em Tissuelyser, e para lima e lixa de 36,96 e 36,91 ng/ $\mu$ l, respectivamente. Além disso, a média para grau de pureza ficou acima de 1,8 para todos os testes. Para a espécie de *O. porosa*, as amostras extraídas em CTAB 2% em banho-maria por 1 h e 30 min foram mais expressivas do que as demais, com média de 116 ng/ $\mu$ l, porém para todos os testes as amostras obtiveram média de grau de pureza na faixa de 1,5 o que confere baixa qualidade das amostras.

**Palavras-chave:** Câmbio. Alburno. Concentração. CTAB.

## ABSTRACT

It can be seen that many forest species are at risk of extinction, such as *Araucaria angustifolia* and *Ocotea porosa*, which is causing environmental, social and economic problems. Studies aimed at conserving these species are essential and require the remaining populations to be monitored and samples obtained from them for genetic studies. This requires the availability of specific DNA extraction protocols for each species, in order to obtain samples of the quality and quantity required for use in more advanced stages such as PCR, with a view to using molecular markers. To this end, the standard CTAB protocol was used, with appropriate adaptations for each species. For *Araucaria angustifolia*, different material maceration techniques were evaluated for DNA extraction (Tissuelyser on dry vascular cambium, sanding file and sandpaper on sapwood tissues). For *Ocotea porosa*, two concentrations of CTAB (2 and 5%) and water bath times (1 h and 1 h and 30 min) were evaluated. The samples were then subjected to 0.8% agarose gel electrophoresis with Lambda markers of known weight (25, 50 and 100 ng/ $\mu$ L) and quantified using a NanoVue spectrophotometer. For *Araucaria angustifolia*, different material maceration techniques were evaluated for DNA extraction (Tissuelyser on dry vascular cambium, Sandpaper on sapwood tissues. For *Ocotea porosa*, two concentrations of CTAB (2 and 5%) and water bath times (1 h and 1 h and 30 min) were evaluated. The samples were then subjected to 0.8% agarose gel electrophoresis with Lambda markers of known weight (25, 50 and 100 ng/ $\mu$ L) and quantified using a NanoVue spectrophotometer. For *A. angustifolia*, the extraction resulted in an average sample concentration of 129 ng/ $\mu$ L for use in Tissuelyser exchange, and for sanding file and sandpaper of 36.96 and 36.91 ng/ $\mu$ L, respectively. In addition, the average purity grade was above 1.8 for all tests. For the *O. porosa* species, the samples extracted in 2% CTAB in a water bath for 1 h and 30 min were more expressive than the others, with an average of 116 ng/ $\mu$ l, but for all the tests the samples obtained an average purity level in the 1.5 range, which confers low quality on the samples.

**Keywords:** Cambium. Sapwood. Concentration. CTAB.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Indivíduo em remanescente florestal (A), sementes (B) e madeira de <i>Araucaria angustifolia</i> (C).....	19
Figura 2 - Indivíduo em remanescente florestal (A), sementes (B) e madeira (C) de <i>Ocotea porosa</i> .....	21
Figura 3 - Tecidos presentes na madeira: casca, câmbio, alburno e cerne.....	25
Figura 4 - Indivíduo de <i>Araucaria angustifolia</i> selecionado (A) para coletas de baguetas à altura do peito (B). Perfuração preenchida com massa de vidraceiro (C).....	27
Figura 5 - Esquema representativo do protocolo de extração utilizado para espécie de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	29
Figura 6 - Coleta das folhas de <i>Ocotea porosa</i> com auxílio de podão (A); Medição do diâmetro à altura do peito da espécie (B); Folhas coletadas e colocadas em tubos tipo Falcon (C).....	30
Figura 7 - Esquema representativo do protocolo de extração utilizado para espécie de <i>O. porosa</i> .....	31
Figura 8 - Aplicação das amostras em gel de agarose (A). Sistema de Fotodocumentação (B). Software de Fotodocumentação (C).....	32
Figura 9 - Aparelho utilizado para quantificação das amostras (A). Procedimento para quantificação das amostras de DNA (B).....	33
Figura 10 - Amostras de DNA extraídas de câmbio vascular (A), de alburno submetidos à lima (B) e alburno submetido à lixamento (C) em gel de agarose com padrões de três concentrações de DNA Lambda.....	35
Figura 11 - Amostras de DNA extraídas tecido foliar, CTAB 2% 1h (A), CTAB 2% 1h30 (B) CTAB 5% 1h (C) e CTAB 5% 1h 30 (D).....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantificação de DNA para amostras de diferentes tecidos de madeira e submetidas a diferentes macerações, e análise descritiva de dados.....	37
Tabela 2 - Quantificação de DNA para amostras de imbuia em diferentes concentrações CTAB, para tempos diferentes de cozimento, e análise descritiva de dados.....	42

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBF Instituto Brasileiro de Florestas

FOM Floresta Ombrófila Mista

PCR Polymerase chain reaction- Reação em Cadeia da Polimerase

DNA Deoxyribonucleic Acid - Ácido Desoxirribonucleico

CTAB Cetyl trimethylammonium bromide - brometo de cetil trimetil amônio

RAPD Random Amplified Polymorphic DNA - DNA Polimórfico Amplificado Aleatório

AFLP Amplified Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado.

TE Tris-EDTA.- Tampão TE

PVP Polypyrrolidone - Polivilpirrolidona -

PVPP Polyvinylpolypyrrolidone - Polivinilpirrolidona

μl- microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo Geral .....	17
1.1.2	Objetivos Específicos .....	17
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>18</b>
2.1	DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze .....	18
2.2	DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE <i>Ocotea porosa</i> Nees & Mart. Barroso .....	19
2.3	IMPORTÂNCIA DE ESTUDOS MOLECULARES PARA ESPÉCIES EM EXTINÇÃO.....	21
2.4	EXTRAÇÃO DE DNA .....	22
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1	COLETA DAS AMOSTRAS DE <i>Araucaria angustifolia</i> .....	26
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA <i>Araucaria angustifolia</i> .....	28
3.3	COLETA DAS AMOSTRAS DE <i>Ocotea porosa</i> .....	30
3.4	EXTRAÇÃO DE DNA <i>Ocotea porosa</i> .....	30
3.5	QUANTIFICAÇÃO EM GEL DE AGAROSE E QUANTIFICAÇÃO EM NANOVUE .....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>34</b>
4.1	<i>Araucaria angustifolia</i> .....	34
4.2	<i>Ocotea porosa</i> .....	38
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Brasileiro de Florestas (IBF), a Mata Atlântica é considerada um dos biomas mais ricos do mundo, em virtude de sua alta biodiversidade de espécies animais e vegetais. Entretanto, atualmente, devido às altas taxas de exploração, tem-se apenas 12% das florestas originais, resultando em extinção e ameaça de muitas espécies.

Dentro desse bioma existem formações vegetais que se destacam, como a Floresta Ombrófila Mista (FOM), a qual é caracterizada pela dependência de um sistema de chuvas regulares no Sul do Brasil. Para Vibrans (2013), esta é a formação vegetal que apresenta a maior pressão antrópica da região, considerando que possui a maior extensão no Estado de Santa Catarina, embora permeie menos de 25% da extensão original.

Dentre as espécies que fazem parte desse tipo de formação vegetal, é possível citar a *Araucaria angustifolia* e *Ocotea porosa*, ambas espécies florestais representativas e que desempenham um papel fundamental no desenvolvimento econômico e cultural nas regiões de abrangência da Floresta Ombrófila Mista.

*Araucaria angustifolia*, conhecida popularmente como araucária, é considerada a única espécie conífera de ênfase econômica do Brasil (Wendling, 2019), da qual é possível se obter diferentes produtos e subprodutos, principalmente a comercialização de pinhão e madeira (Soares & Mota, 2004). Já *Ocotea porosa* (imbuia), possui madeira de boa qualidade sendo responsável pelo desenvolvimento econômico e cultural da região (Marchesan, 2006).

Nesse sentido, ao se considerar especialmente as espécies em ameaça de extinção, os estudos que visam avaliar, resgatar e conservar a diversidade genética das populações remanescentes são essenciais. Segundo Silva *et al.* (2014), os estudos moleculares são importantes contribuintes para delinear estratégias de conservação de espécies e estabilidade dos recursos genéticos (Silva *et al.*, 2014). Na área da biotecnologia é possível acompanhar o desenvolvimento de diferentes produtos por meio de técnicas bioquímicas e moleculares (Fagundes *et al.* 2012).

Os principais estudos moleculares utilizados com esses objetivos são com marcadores moleculares de DNA, que correspondem às informações presentes no genoma das espécies, trazendo maior confiabilidade nas considerações. Para esses estudos a obtenção de amostras de DNA com qualidade e em quantidade suficiente são essenciais para o sucesso das análises moleculares por meio de marcadores moleculares. Portanto, são necessários cuidados desde a coleta e armazenamento das amostras, até o uso de protocolos eficientes de extração para determinadas espécies.



Atualmente os estudos ligados a extração de DNA das espécies em estudo são escassos principalmente ao que se refere a extração de DNA de material lenhoso em *Araucaria angustifolia*, para a qual os protocolos se restringem à utilização de tecido foliar e sementes. Já para *Ocotea porosa* é possível observar uma lacuna ainda maior no que se refere à extração de DNA, não sendo encontradas referências sobre o tema.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar possíveis maneiras de otimização em protocolos de extração de DNA nas espécies florestais, *Araucaria angustifolia* e *Ocotea porosa*, para uso em estudos moleculares.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Analisar diferentes protocolos de extração de DNA para espécies florestais *Araucaria angustifolia* e *Ocotea porosa* em literatura, com inferência de possíveis otimizações.
- Avaliar a eficiência de adaptações de métodos para otimização de protocolos de extração de DNA para as espécies de interesse.
- Sugerir novas possibilidades de estudos para a melhoria de protocolos de extração de material genético.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze

*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze é pertencente ao gênero *Araucaria*, ordem Pinales, de classe Pinopsida e família das Araucariaceae, a qual se encaixa no grupo das gimnospermas, abrangendo por volta de 20 espécies (Mill *et al.* 2017). Segundo Koch e Corrêa (2002), consiste na espécie de maior relevância do grupo das gimnospermas, sendo encontrada principalmente na região Norte da Argentina e Sul do Brasil (Figura 1).

*Araucaria angustifolia* é popularmente denominada como araucária, pinheiro Paraná ou ainda como pinheiro-brasileiro, inicialmente era encontrada em grandes áreas contínuas da região Sul do país, em que se estendiam para outras localidades, principalmente para regiões frias de Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais (Wendling, 2017). Até o início do século XX dados revelavam que as Matas de Araucária cobriam por volta de 182.000,00 km<sup>2</sup> em planaltos brasileiros (Hueck, 1972).

A madeira de araucária é destinada para diferentes finalidades como indústria moveleira, setor de construção civil, e confecções de ferrovias, pois sua madeira é considerada resistente e maleável (Zanette *et al.*, 2017). Além disso, a madeira também pode ser utilizada como madeira serrada e roliça, na indústria de papel e celulose ou ainda para fins energéticos, outro uso econômico relevante é para o aproveitamento não madeireiro, através da comercialização de pinhão (Zanoni *et al.*, 2021).

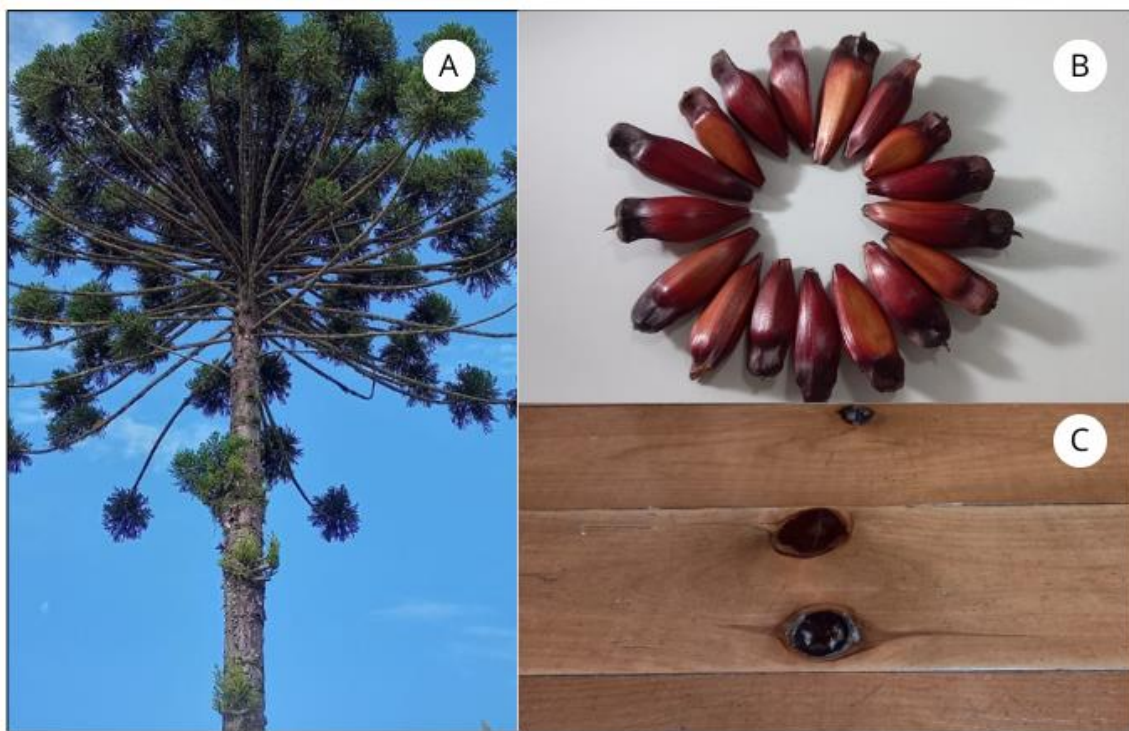
Entre os séculos XVIII e XIX a espécie exerceu papel fundamental no que se refere ao desenvolvimento econômico (Auer *et al.*, 2021). Entretanto, devido ao uso excessivo e a exploração massiva da madeira durante o século XX, a cultura entrou para a Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção, sendo condicionada como espécie “Em perigo” através da Portaria MMA nº 443, de 17 de dezembro de 2014 (Silva *et al.*, 2021). Conseqüentemente, as restrições de corte resultaram em um declínio da sua produção e utilização, por consequência promoveram atrasos significativos principalmente em setores de silvicultura, manejo e melhoramento florestal genético (Silva *et al.* 2021).

Devido às restrições de uso madeireiro, o enfoque principal se tornou a produção de pinhão, produto não madeireiro (Beninca *et al.*, 2019). O pinhão consiste na semente comestível, sendo muito utilizada na gastronomia da região, além de atuar efetivamente no desenvolvimento de comunidades, viabilizando a geração de renda e contribuindo com a

conservação dos remanescentes (Stelmach *et al.*, 2023). Segundo dados do IBGE (2022), a produção econômica de produtos florestais não madeireiros registrou um acréscimo de 1,9 % em relação a anos anteriores, o que resultou em R\$2,3 bilhões, em que a cultura do pinhão foi responsável por 2,7 % desse total.

Atualmente, muitos trabalhos foram desenvolvidos visando a conservação da espécie. Montagna (2012), descreve a importância das unidades de conservação na manutenção da diversidade genética de araucária no Estado de Santa Catarina. Wrege *et al.* (2021) estudaram metodologias para a caracterização ambiental e genética de populações de araucária, com aplicação para sua conservação e uso sustentável, com a perspectiva de incentivar a criação de normas e leis que visem e garantam isso.

Figura 1 - Indivíduo em remanescente florestal (A), sementes (B) e madeira de *Araucaria angustifolia* (C).



Fonte: A autora, 2024.

## 2.2 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE *Ocotea porosa* Nees & Mart. Barroso

A espécie *Ocotea porosa* Nees & Mart. Barroso, pertence à classe Magnoliopsida, ordem Magnoliales e à família das Lauraceae. Popularmente conhecida como imbuia, canela-preta, ou ainda canela-imbuia (Figura 2) a espécie pode ser encontrada em muitos Estados brasileiros como Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina, para

este último Estado considerada como árvore símbolo (Scipioni, 2019).

Trata-se de uma das espécies mais longevas dentre as espécies encontradas em Matas de Araucária, além de ser característica da Floresta Ombrófila Mista (Carvalho, 2003). Segundo Lorenzi (1992), a madeira de imbuia é designada para usos nobres, podendo ser empregada para a fabricação de móveis de luxo, ou ainda em construção civil como acabamentos, pisos, revestimentos, forros, esquadrias, laminados, ou estruturas de peso como pontes e moirões, além disso, é importante para a avifauna, sendo utilizada em reflorestamentos.

Devido à alta qualidade e exuberância da madeira, a espécie sofreu e ainda sofre a exploração indiscriminada, razão esta que também a colocou na Lista Nacional Oficial da Flora Brasileira como espécie ameaçada de extinção, com a denominação “Em perigo” de extinção manifestada pela portaria nº 443, de 2014, por meio do Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2014).

Contudo, mesmo havendo proibições para sua exploração, essa espécie desperta interesse, sendo considerada uma das espécies mais valiosas para a indústria moveleira e construção civil da região, principalmente pelas características da madeira como resistência contra degradação por xilófagos e lenho pesado (Vivian *et al.* 2021). A espécie *Ocotea porosa* apresenta importância para o desenvolvimento econômico e cultural da região Sul do Brasil (Santos *et al.* 2015).

Quanto ao seu comportamento silvicultural, observa-se que a espécie possui dificuldades na germinação de sementes, o que dificulta a conservação e a regeneração natural da espécie (Parisotto, *et al.*, 2009). As sementes de imbuia apresentam um tegumento rígido que confere às sementes dormência tegumentar (Lorenzi, 1992). De acordo com Baskin & Baskin (2014), as sementes da espécie requerem tratamentos de superação de dormência para facilitar o processo de germinação. Entretanto, pouco se conhece quanto ao crescimento e produção (Weber, 2018).

É importante salientar que *Ocotea porosa* é uma espécie nativa, representativa da FOM que se apresenta ameaçada de extinção, necessitando assim de estudos voltados à conservação genética e ao pré-melhoramento, os quais irão cooperar para futuros programas de melhoramento genético da espécie (Simeone *et al.*, 2008).

Os estudos desenvolvidos por Bittencourt (2007), através da caracterização da estrutura genética interna e aspectos da autoecologia de uma população natural de imbuia, buscaram contribuir para a conservação genética da espécie. Os padrões genéticos populacionais são úteis na definição da variabilidade genética de diferentes magnitudes, portanto requerendo maneiras diferentes de atuar em relação à conservação (Newton *et al.*, 1999). Ainda, Daros (2006)

desenvolveu estudos sobre o sistema reprodutivo e estrutura genética de uma população de *Ocotea porosa*, visando fortalecer estratégias de conservação para a espécie.

Figura 2 - Indivíduo em remanescente florestal (A), sementes (B) e madeira (C) de *Ocotea porosa*.



Fonte: MBF, 2024.

### 2.3 IMPORTÂNCIA DE ESTUDOS MOLECULARES PARA ESPÉCIES EM EXTINÇÃO

Os marcadores moleculares consistem em sequências de DNA distribuídas aleatoriamente pelo genoma das espécies e que podem revelar diferenças entre indivíduos relacionados, bem como podem ser utilizados para o estudo de diversidade genética de populações, construção de mapas genéticos, determinação de características quantitativas multigênicas, na genotipagem e haplotipagem, entre outras aplicações (Rudd *et al.* 2005). Se observa o surgimento de novas metodologias de genética molecular, aumentando assim, a efetividade de programas conservacionistas e a utilização de recursos genéticos vegetais, contribuindo com informações complementares na manutenção de bancos de germoplasma e estratégias de conservação (Faleiro, 2007).

Pela capacidade de fazer inferências e de exploração do polimorfismo de DNA, os marcadores moleculares demonstram o avanço de maior relevância para a genética molecular, A partir dos anos 1980, a biologia molecular apresentou um crescimento notável, em que a

manipulação do DNA se tornou corriqueira e aplicável para diferentes espécies (Oliveira *et al.*, 2021).

As informações genéticas referentes a populações arbóreas naturais são incipientes na literatura, justamente por se tratar de populações com elevada complexidade e diversidade, evidenciando dificuldades nas amostragens e escolha das metodologias aplicadas. Entretanto, tais informações são fundamentais para a compreensão da genética estrutural das populações, as quais encontram-se, em sua grande maioria, em processo avançado de fragmentação florestal, sendo, por sua vez, essenciais para delinear as estratégias de conservação, melhoramento genético, manejo das espécies, recuperação de áreas degradadas e gestão florestal (Kageyama *et al.* 2003; Tambarussi, 2013).

Na década de 90 deu-se início a publicações da caracterização de diversidade genética para *Araucaria angustifolia* com a utilização de marcadores moleculares de DNA do tipo AFLP e RAPD, chegando posteriormente ao desenvolvimento de primers microssatélites da espécie (Silva, 2020). Os estudos iniciais foram realizados por Mazza (1997), utilizando marcador molecular RAPD, o qual detectou a presença de similaridade genética entre populações de posições geográficas distantes, mas de baixa magnitude. Posteriormente, Schmidt *et al.* (2007) confeccionaram através de bibliotecas enriquecidas 29 primers para microssatélites em *Araucaria angustifolia*.

Já para as Lauraceas, mesmo compreendendo espécies de grande relevância florestal, ainda se tem uma lacuna expressiva pela falta de informações do ponto de vista genético. Uma das razões possíveis é a dificuldade de localização das plantas nos remanescentes florestais, tornando a coleta de amostras inviável (Hammel, 1986). Outro limitador é a dificuldade em identificar e classificar as espécies dessa família, devido aos poucos estudos referentes à genética de populações (Contim *et al.*, 2018). Para a *Ocotea porosa* não foram encontradas informações sobre estudos moleculares na literatura.

#### 2.4 EXTRAÇÃO DE DNA

Uma das etapas primordiais para os estudos moleculares é a obtenção de amostras de DNA em quantidade e qualidade adequada, especialmente quando se tem por objetivo o uso das técnicas que envolvem Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), por se tratar de uma técnica sensível e que requer DNA com bom padrão de qualidade a fim de garantir bons resultados (Miranda *et al.*, 2019). Isso se deve ao fato da qualidade, quantidade e estabilidade das amostras de DNA dependerem de inúmeros fatores, como espécie e metodologia utilizada (Faleiro *et al.*

2003).

No que diz respeito aos protocolos de extração de DNA, deve-se atentar a sua capacidade de rompimento de membranas e paredes celulares, interrompimento da viabilidade das DNAses, capacidade de promover a separação de ácidos nucleicos, proteínas e de polissacarídeos, além de proteger o DNA contra compostos fenólicos pois estes provocam sua oxidação (Kestring *et al.*, 2010).

Sabe-se da existência de diferentes tipos de protocolos de extração de DNA vegetal e suas adaptações, porém o mais utilizado para esse fim é proposto por Doyle & Doyle (1987) e adaptado por Romano & Brasileiro (1999). Esse protocolo é caracterizado pela utilização do detergente Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB), que a depender da espécie, pode observar o cumprimento das exigências requeridas para uma boa extração de DNA, como: I - por meio da maceração e utilização de CTAB se obtém a quebra das membranas; II - através da utilização de clorofórmio juntamente a processos de centrifugação se promove a separação de polissacarídeos entre outras substâncias, e III - com a utilização das substâncias de isopropanol e do tampão Tris EDTA (TE) proporciona a fase de precipitação e ressuspensão.

O banho-maria, é o equipamento que permite aquecimento de água com regulagem de temperatura também tem um papel fundamental nos protocolos de extração de DNA, de acordo com o Instituto de Estudos Brasileiros (IEB), com a agitação molecular causada pelo aumento de temperatura, facilitando a ação do detergente (CTAB), promovendo o desarranjo de fosfolipídios presente nas membranas além de provocar a desnaturação das enzimas DNAses, as quais degradam o DNA, portanto dificultariam o processo de extração.

Porém, as metodologias podem sofrer modificações e adaptações para atender as necessidades da espécie de interesse. De acordo com Mazza *et al.* (2000), essas modificações podem ser sutis, estando atreladas em metodologias básicas, como por exemplo adição de uma substância antioxidante, ou ainda desproteinizantes, os quais podem otimizar a o processo de obtenção de amostras de DNA, especialmente em espécies que produzem, altas concentrações de metabólitos secundários.

Muitos protocolos podem ser utilizados para a extração de DNA, com diferentes metodologias, porém é muito comum que essas modificações ocorram nas concentrações de CTAB (Irfan *et al.*, 2013). Alguns estudos também enfatizam a diferença entre concentrações de CTAB, como os promovidos por Zanetti *et al.*, (2019) para a extração de DNA da espécie de *Ochroma pyramidale*, nas concentrações 3% e 4% no qual foi possível constatar diferença significativa para a concentração de 4% nas extrações realizadas.

Um dos fatores iniciais a serem considerados é a escolha do material vegetal para

extração do DNA. Sabe-se que a ação em tecidos verdes ou frescos, como folhas, sementes, raízes e outros tecidos considerados “vivos” é menos complexo e mais frequentemente utilizado em estudos moleculares. Entretanto, conforme Mazza (2000), muitas vezes a coleta de tecidos “vivos” é inviável, como ocorre em diversas espécies arbóreas, é possível enfrentar alguns contratempos quanto a isso, pois muitas vezes se trata de populações naturais, que se encontram em áreas de difícil acesso, indivíduos de grandes dimensões, e a coleta desses tecidos pode estar restrita a determinados estágios reprodutivos da planta, ou ainda senescência foliar.

Por outro lado, tecidos lenhosos, especialmente secos, apresentam maior complexidade e dificuldade para a extração do DNA (Abe *et al.* 2011; Rachmayanti, 2009). Para Finkeldey *et al.* (2010), o uso da madeira como fonte de DNA apresenta dificuldades relacionadas às seguintes características:

- ❖ Física: ao utilizar materiais lenhosos, são necessários processos mecânicos para a fragmentação da madeira e obtenção de DNA, e isso pode ocasionar a desnaturação devido ao aquecimento do material por meio do atrito;
- ❖ Química: a madeira possui muitos componentes fenólicos e esses podem ser prejudiciais em técnicas de PCR;
- ❖ Biológica: tecidos lenhosos sofrem, frequentemente, ataques de xílofagos que podem provocar a destruição do DNA, bem como, contaminar o DNA vegetal com DNA intruso;
- ❖ Envelhecimento: com o tempo o DNA no interior das células passa a se degradar, permanecendo na faixa de madeira morta.

De acordo com Jiao *et al.* (2014), a madeira possui naturalmente compostos que são substâncias inibidoras da fase de amplificação da PCR, podendo resultar em falhas nesse procedimento, principalmente em madeiras armazenadas por longos períodos. Além disso, o autor ressalta a deficiência de protocolos capazes de promover o isolamento de DNA de boa qualidade com a remoção total desses componentes. Entretanto, esses compostos não estão apenas em tecidos lenhosos, sendo encontrados também em tecidos foliares. Como descrito por Couch & Fritz (1990), os compostos polifenólicos e terpenóides são liberados quando ocorre a lise celular, processo que se intensifica em folhas mais velhas. Esses compostos se ligam ao DNA de maneira irreversível, e posteriormente evitam a digestão por endonucleases de restrição ou ainda a amplificação por meio da PCR.

Salienta-se que a depender da faixa lenhosa conforme a figura 3, da qual se coleta as amostras, é possível verificar diferença na quantidade de DNA extraído. Alburno fresco possui



quantidades satisfatórias de DNA, podendo ser comparado com folhas, pois nele residem células parenquimáticas ativas. Por outro lado, o cerne recém coletado não apresenta quantidade significativa de DNA por se tratar de uma região de tecido morto (Jiao *et al.*, 2014). Ademais, como descrito por Colpaert *et al.* (2005), a região de câmbio também pode apresentar DNA de alta qualidade, principalmente se for fresco em comparativo com material de folhas.

Figura 3 - Tecidos presentes na madeira: casca, câmbio, alburno e cerne.



Fonte: A autora, 2024.

Outros cuidados devem ser tomados para obtenção de bons resultados em protocolos de extração de DNA, de acordo com Oliveira *et al.*, (2007), é de fundamental importância o uso de luvas, com o objetivo de evitar a degradação dos ácidos nucleicos pelo contato com enzimas nucleases produzidas pelo corpo humano e liberadas especialmente pelas mãos as quais podem degradar as amostras.

A qualidade das amostras é avaliada em géis de agarose, seguida de sua quantificação e confecção de soluções de trabalho de acordo com as concentrações exigidas pelo protocolo empregado (Costa, 2001). A priori, as amostras de trabalho consistem em alíquotas pequenas para evitar que o material sofra repetidos ciclos de descongelamento e a degradação de DNA, além disso, é fundamental a utilização de amostras de DNA de qualidade, em que o armazenamento em temperaturas entre  $-20$  a  $-80^{\circ}\text{C}$  pode determinar a manutenção da qualidade das mesmas em mais frágeis ou perecíveis até o momento de seu uso em estudos moleculares. (Oliveira *et al.* 2007).

É imprescindível a disposição de soluções de estoque previamente preparadas e armazenadas em frascos bem vedados e identificados com nome e data, as quais são utilizadas em um prazo máximo de até 6 meses para manter a viabilidade (Costa, 2001). O descarte de todo e qualquer material utilizado em laboratório deve ser realizado em recipientes adequados e identificados com seu conteúdo. A manipulação desses materiais deve ser feita de modo a evitar exposição excessiva, sendo recomendado o uso de capelas e ambientes bem arejados (Sperotto, 2014).

Ao trabalhar com amostras é interessante que se tenha um ambiente exclusivo para facilitar o processo, deve-se atentar ao fato que o DNA apresenta como característica uma alta afinidade por vidrarias, podendo ser adsorvido na companhia de alguns sais, sendo assim esse tipo de material deve ser evitado no decorrer da extração, além disso o material plástico utilizado deve ser novo, e previamente autoclavado, e nunca deverá ser reutilizado, a fim de evitar riscos de contaminação, e promover amostras de qualidade (Oliveira *et al.*, 2007).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE *Araucaria angustifolia***

As amostras de araucária são provenientes de dois fragmentos da Floresta Ombrófila Mista localizados em Campo Belo do Sul, pertencente à Empresa Florestal Gateados. Foram selecionados 15 indivíduos com distância de aproximadamente 100 m com o objetivo de diminuir o grau parental entre as amostras (Figura 4).

Matas de araucária, principalmente onde os indivíduos estão bem desenvolvidos as plantas atingem diâmetros maiores e alturas expressivas, dificultando a coleta de material foliar nas copas além disso, pode se tornar uma tarefa complexa e perigosa, considerando fatores como mata fechada, declividade do terreno, pedregosidade, instabilidade dos galhos da espécie, entre outros fatores, sendo necessário a extração de material genético por meio de outras fontes como baquetas de madeira.

Para cada planta de interesse, foi retirada a casca externa e coletada uma bagueta com auxílio de um vazador de metal e martelo na altura de 1,30 m do solo. Após a retirada do material, a perfuração foi lavada com hipoclorito de sódio comercial e preenchida com massa de vidraceiro para evitar possíveis contaminações.

Figura 4 - Indivíduo de *Araucaria angustifolia* selecionado (A) para coletas de baguetas à altura do peito (B). Perfuração preenchida com massa de vidraceiro (C).



Fonte: Lencina, 2023.

As amostras foram alocadas em tubos tipo Falcon contendo em seu interior aproximadamente 20 g de sílica em gel, com finalidade de promover a desidratação e a preservação do material, devendo ser substituída sempre que necessário e na mudança de cor da sílica. O material amostral permaneceu condicionado em temperatura de 4°C até o processamento. A bagueta contém uma porção de alburno, localizada morfologicamente internamente ao câmbio vascular, sendo este segundo o material ideal para extração de DNA.

O câmbio vascular foi retirado com auxílio de um bisturi, sendo quebrado por meio de equipamento macerador de tecidos *Tissuelyser*. Essa etapa foi conduzida no laboratório EMBRAPA Florestas, localizado no município de Colombo (PR). Foram realizadas quatro repetições de cada amostra de câmbio armazenado em microtubos de 2,0 mL, em que uma delas foi mantida na EMBRAPA e três armazenadas na UFSC até a extração de DNA. O alburno foi então sujeito à moagem com uso de lima e lixa de grão 60, considerada grossa, também preparada uma repetição armazenada em microtubos de 2,0 mL. Os tratamentos para esta espécie foram então três formas de obtenção das amostras lenhosas (câmbio vascular em *Tissuelyser*, alburno em lima e alburno em lixa), as quais foram analisadas qualitativamente.

### 3.2 EXTRAÇÃO DE DNA *Araucaria angustifolia*

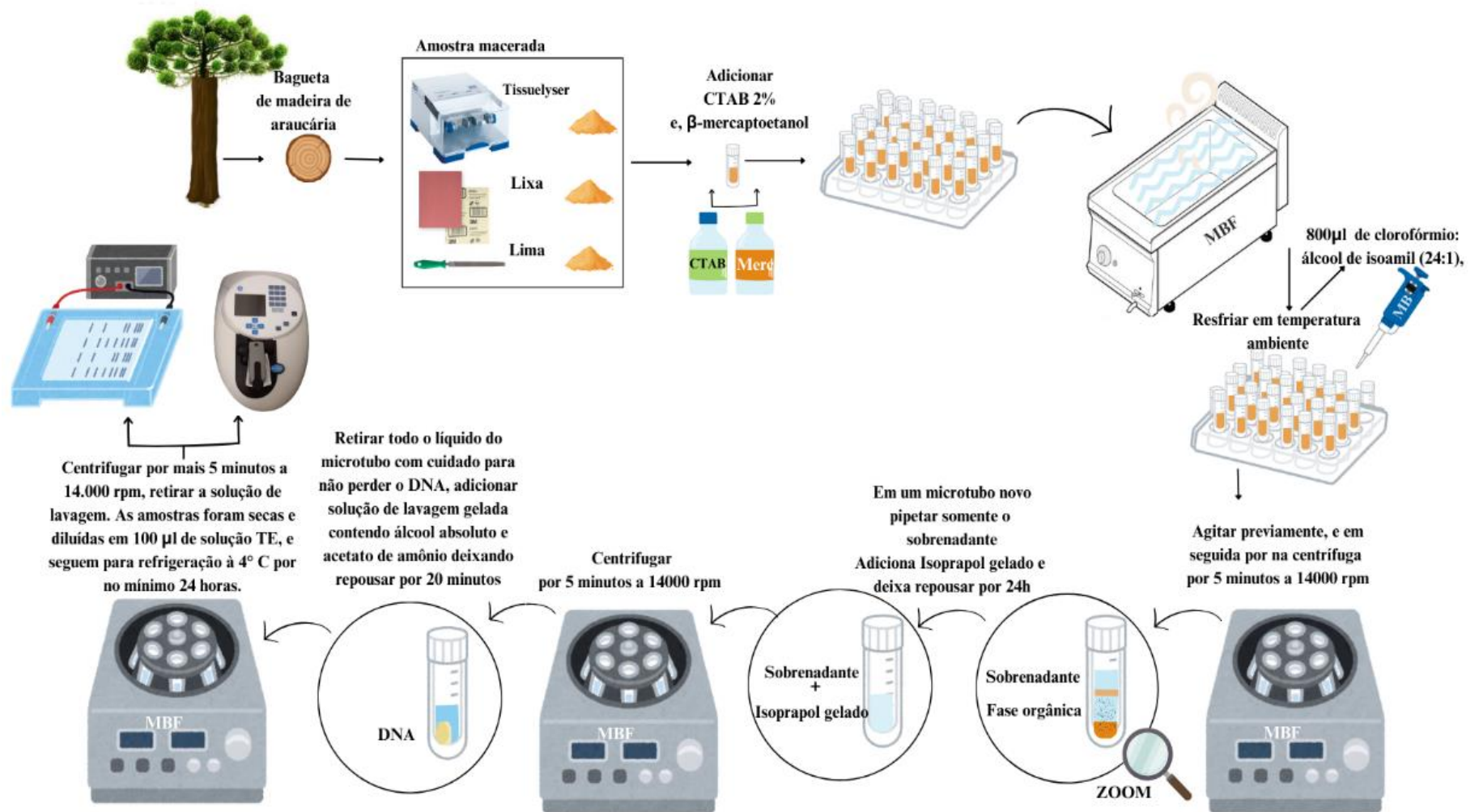
Para a extração de DNA (Figura 5) foram utilizadas aproximadamente 0,2 g de material vegetal seco nos microtubos. Em seguida foi adicionado 800  $\mu\text{L}$  de tampão CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM TRIS-HCL PH 8), 13  $\mu\text{L}$  de  **$\beta$ -mercaptoetanol** e mantido em banho-maria em temperatura de 65°C por um período de incubação de 1 hora com agitação das amostras a cada 10 minutos para melhor homogeneização das mesmas.

Após esse período no banho-maria, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente, e em cada eppendorf foi adicionado 800  $\mu\text{L}$  de solução de clorofórmio e álcool de isoamil (24:1), em que as amostras agitadas em agitador de microtubos, para a formação de uma emulsão, na qual foi possível visualizar três camadas. A primeira aquosa, denominada de sobrenadante, é onde o DNA se encontra, sendo então a camada mais importante.

Os tubos seguiram para a centrífuga por 5 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente. Após esse procedimento, aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  sobrenadante foi realocada em microtubos novos, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado, e agitado de maneira sutil apenas para que o DNA sofresse precipitação onde foi possível visualizar uma pequena camada esbranquiçada. Posteriormente, as amostras foram mantidas a -10°C por um período de 24 horas.

Prontamente passada às 24 horas, deu-se início a uma nova centrifugação por mais 5 minutos a 14.000 rpm para decantação do pellet de DNA, retirando-se o isopropanol dos microtubos com cuidado. Em seguida, acrescentou-se 500  $\mu\text{L}$  de solução de lavagem gelada contendo álcool absoluto e acetato de amônio deixando repousar por 20 minutos para a remoção dos sais residuais, e novamente centrifugadas por mais 5 minutos a 14.000 rpm para retirar a solução de lavagem. As amostras foram secas e diluídas em 100  $\mu\text{L}$  de solução TE, e as amostras seguiram para refrigeração à 4° C por 24 horas (Figura 5). Todas as manipulações envolvendo volumes em microlitros foram realizadas com auxílio de micropipetas.

Figura 5 - Esquema representativo do protocolo de extração utilizado para *Araucaria angustifolia*.



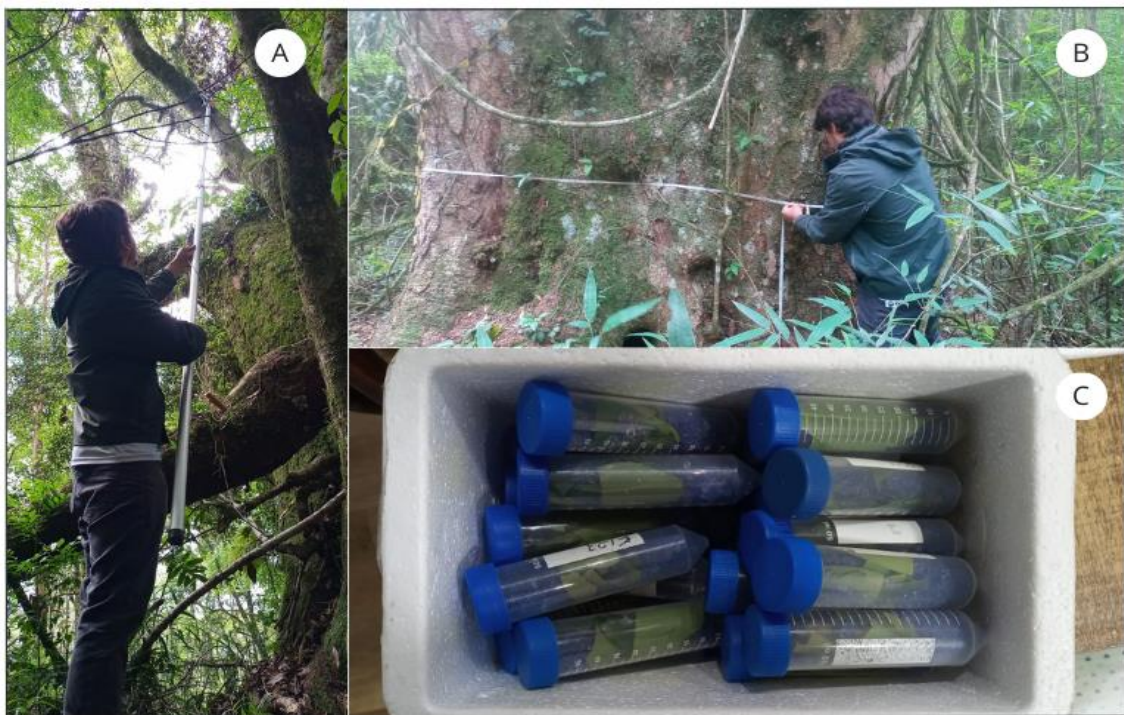
Fonte: A autora, 2024.

### 3.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE *Ocotea porosa*

A coleta de *Ocotea porosa* foi realizada no município de Frei Rogério, Santa Catarina, em fragmentos de Floresta Ombrófila Mista. As plantas selecionadas apresentavam no mínimo 100 m de distância entre elas, sendo coletadas 12 amostras. Ao que se refere à região de coleta, os remanescentes apresentam plantas bem desenvolvidas, com alturas e diâmetros expressivos, o que torna os fragmentos e as populações raras, muitas vezes localizadas em áreas de difícil acesso.

De cada planta selecionada coletou-se as folhas da copa, as quais foram armazenadas em tubos tipo Falcon contendo em seu interior, aproximadamente, 20 g de sílica em gel, para manter a integridade amostral como aparente na figura 6.

Figura 6 - Coleta das folhas de *O. porosa* com auxílio de podão (A); medição do diâmetro à altura do peito da espécie (B); folhas coletadas e colocadas em tubos tipo Falcon (C).



Fonte: Lencina, 2023.

### 3.4 EXTRAÇÃO DE DNA *Ocotea porosa*

A extração de DNA desta espécie foi por meio de tecidos foliares, os quais foram maceradas em gral com pistilo após congelamento em nitrogênio líquido, o qual possibilitou

uma moagem uniforme, em que as folhas se tornaram pó. Essa etapa inicial seguiu de maneira rápida e ágil para evitar a oxidação das amostras, em um tempo máximo de até 3 minutos figura 7. Após macerada, cada amostra foi transferida para quatro microtubos com capacidade de 2,0  $\mu\text{L}$  em uma quantidade de 0,2 g. Posteriormente, foi inserido 650  $\mu\text{L}$  de tampão CTAB em duas concentrações (2% de CTAB ou 5% de CTAB) de demais componentes na mesma concentração (1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM TRIS-HCL PH 8), e levadas para banho-maria em temperatura de 65°C. Metade das amostras de cada concentração de CTAB foram mantidas em banho-maria por 1 h, enquanto a outra metade foi mantida por 1h e 30 minutos. Assim, foram avaliados quatro tratamentos (concentrações de CTAB e tempos de banho-maria). Durante o banho-maria, as amostras passaram por agitações a cada 10 minutos (Figura 7).

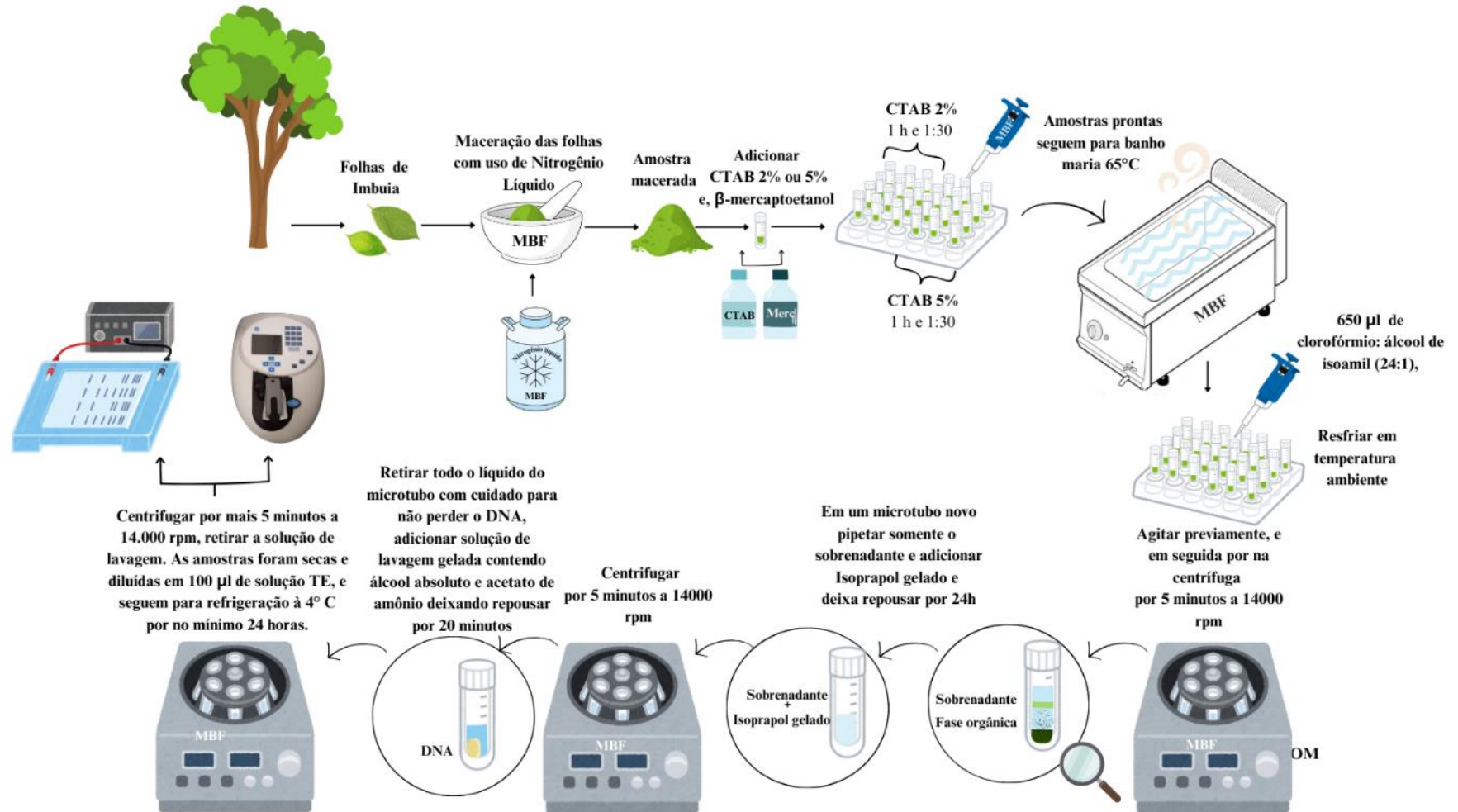
As demais etapas até a obtenção de amostras concentradas para quantificação seguiram os mesmos procedimentos anteriormente citados no tópico 3.2.

### 3.5 QUANTIFICAÇÃO EM GEL DE AGAROSE E QUANTIFICAÇÃO EM NANOVUE

Para quantificação em gel de agarose foram utilizados 200 ml de TBE e 1,6 g de gel agarose, resultando na concentração de 0,8%. A mistura seguiu ao micro-ondas até ser homogeneizada e em seguida passou por resfriamento em temperatura ambiente. Assim que o gel atingiu temperatura de aproximadamente 40°C despejou-se na forma de acrílico com o pente de 52 poços lentamente para evitar a formação de bolhas no gel como apresentado na (Figura 8) Após polimerização do gel, os pentes foram removidos e as amostras aplicadas em volume de 2  $\mu\text{L}$  de DNA, adicionado 2  $\mu\text{L}$  de GelRed e 3  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol.

Além disso, utilizou-se amostras de DNA Lambda como referência, nas concentrações de 25 ng/ $\mu\text{L}$  ( $\lambda 25$ ), 50 ng/ $\mu\text{L}$  ( $\lambda 50$ ) e 100 ng/ $\mu\text{L}$  ( $\lambda 100$ ). A cuba de eletroforese foi abastecida com 2 L de TBE (Tris- borato-EDTA), e a corrida eletroforética durou por volta de 40 minutos em voltagem de 90 volts.

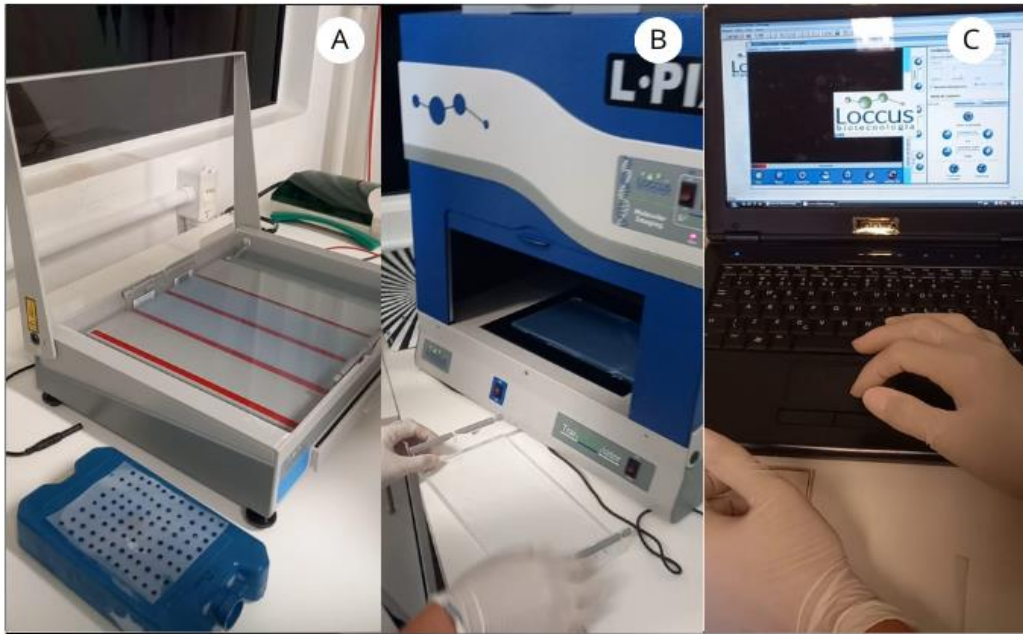
Figura 7 - Esquema representativo do protocolo de extração utilizado para *Ocotea porosa*.



Fonte: A autora, 2024



Figura 8 - Aplicação das amostras em gel de agarose (A). Sistema de Fotodocumentação (B). Software de Fotodocumentação (C).



Fonte: A autora, 2024.

A quantificação das amostras se deu com a utilização do equipamento de espectrofotometria NanoVue (Figura 9). Para essa avaliação utilizou-se 2  $\mu\text{L}$  das amostras de trabalho, sendo obtido os valores da concentração em  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , bem como a relação 260/280 que indica a qualidade da amostra.

Figura 9 - Aparelho utilizado para quantificação das amostras (A). Procedimento para quantificação das amostras de DNA (B).



Fonte: A autora, 2024.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 *Araucaria angustifolia*

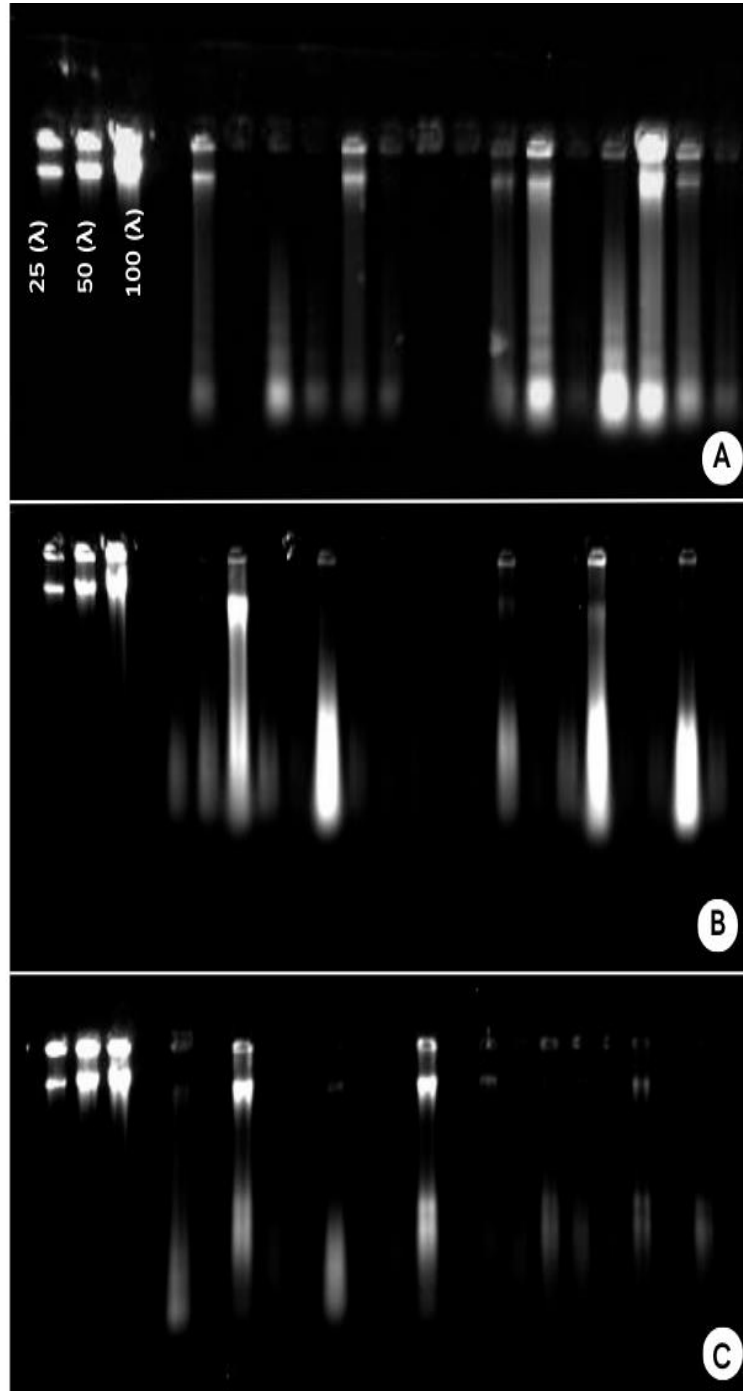
Com base na figura 10, observa-se as amostras de DNA de *Araucaria angustifolia* extraída de câmbio e alburno (material seco). Aparentemente a utilização de câmbio vascular resulta em maior quantidade de DNA extraído, com 40%, podendo ser explicado pela região do tecido amostrado. Quando comparado ao DNA Lambda (25, 50 e 100 ng/ $\mu$ L), as amostras apresentam concentração de aproximadamente 25 ng/uL. Já quando utilizado o alburno, a maceração por lima (Figuras B) resultou na obtenção de duas amostras de DNA 13,33%, enquanto a maceração com lixa resultou na obtenção de quatro (26,66%). Quando comparado ao DNA Lambda (25, 50 e 100 ng/uL) as amostras apresentam concentração de, aproximadamente, 25 ng/uL.

Por outro lado, estudos desenvolvidos por Jiao *et al.* (2012) utilizando lâminas de barbear para fragmentação de DNA, revela que amostras de madeira seca de tecido alburno, para a espécie *Cunninghamia lanceolata* não apresentaram DNA genômico em gel, pois a madeira sofreu degradação severa. Para o mesmo estudo foi possível observar que em tecido de alburno fresco o DNA genômico foi expressivo em gel com 40,9% das amostras, isso mostra uma capacidade maior das amostras de *Araucaria angustifolia* em manter DNA, mesmo que seca e estocada por determinado período, principalmente as amostras de câmbio.

Em consenso com o presente estudo, Macedo *et al.* (2016) revela que amostras *Araucaria angustifolia*, *Cedrela fissilis* e *Eucalyptus* sp. em tecido de câmbio vascular, analisados em gel de agarose com Lambda (20, 50 e 100 ng/ul) demonstram quantidade de DNA isolado maior em tecido fresco, e uma quantidade significativamente inferior em tecido seco, com Lambda entre 20 e 50 ng/ul para todas as espécies, e apresentaram maiores níveis de impureza comparados aos tecidos frescos.

É possível observar nas bandas da figura 10, para todas as amostras, o arraste vertical, segundo Costa *et al.* (2012) isso pode ser degradação do DNA, quanto maior for o arraste na banda maior é o nível de degradação, recomenda-se nesses casos, refazer os testes com máximo cuidado ao manusear as amostras, além da necessidade de optar se possível por material fresco e ou novas adaptações nos protocolos utilizados. Ou ainda pode ser alta presença de RNA nas amostras o que requer o uso de RNAses para diminuir esse efeito (Costa *et al.* 2012).

Figura 10 - Amostras de DNA extraídas de câmbio vascular (A), de alburno submetidos à lima (B) e alburno submetido à lixamento (C) em gel de agarose com padrões de três concentrações de DNA Lambda (25, 50 e 100 ng/ul).



Fonte: A autora, 2024.

De acordo com o manual NanoDrop Technologies 2007, considera-se uma concentração de DNA acima de 100 ng/ $\mu$ L como um valor ótimo, e a relação de absorvância de DNA 260 nm e para proteínas de 280 nm dentro desse índice acata-se valores acima de 1,8 como sendo de maior qualidade (pureza), e abaixo de 1,6 de menor qualidade.

Pela quantificação em NanoVue, todas as amostras apresentaram quantidades de DNA, mesmo que pequenas, em todos os tipos de tecidos vegetais (Tabela 1), demonstrando concentração média de 129 ng/ $\mu$ L para TissueLyser e concentração média similar entre lima e lixa (36,96 e 36,91 ng/ $\mu$ L) respectivamente. Portanto as amostras de câmbio (TissueLyser) foram as que melhor corresponderam em valor ótimo, acima de 100 ng/ $\mu$ L. A relação média acima de 1,8 foi obtida para todas as três macerações, aferindo maior qualidade das amostras.

É possível observar que as amostras de câmbio submetidas ao TissueLyser são melhores, diante da quantificação em NanoVue. Esse comportamento se repete para análise em gel de agarose a 0,8%. Entretanto as amostras de lima e lixa em gel apresentaram uma pequena diferença em que a lima foi menos expressiva que a lixa, esse comportamento não é visível na quantificação (Tabela 2), pois a média de concentração de ambas não se difere. O desvio padrão observado para as concentrações, evidencia que as amostras de lixa possuem os dados mais homogêneos dentre as demais.

De acordo com Moredjo (2015), a técnica de maceração através do uso de nitrogênio líquido para a madeira seca de *Caryocar glabrum*, na quantificação de DNA, demonstrou resultados expressivos, com concentração de 119 (ng/ $\mu$ L) e grau de pureza de 1,4. Já Schardosin (2015), fez uso de ralador curvo para obter amostras de madeira seca de diferentes espécies, e obteve concentração máxima de 108,3 (ng/ $\mu$ L) e com 1,72 de grau de pureza. Em que os valores de concentração e grau de pureza são menores que a média encontrada para câmbio vascular com uso de TissueLyser para o presente estudo.

Fatima (2018), ao quantificar DNA genômico (NanoDrop) para amostras de madeira de tecido alburno obteve rendimento 0,26 - 0,244  $\mu$ g/ $\mu$ L com grau de pureza de 1,7 - 1,8 o que também foi possível observar por meio de bandas em gel de agarose. Para Verbylaite et al, (2010) as análises desenvolvidas para comparação de dez protocolos de extração de DNA de madeira de Álamo Europeu (*Populus tremula* L.) identificaram em testes com uso protocolo CTAB, concentração entre 19 - 63 ng/ $\mu$ L e grau de pureza entre 1,24 - 1,48 demonstrando no estudo valores pouco expressivos na quantificação, o estudo não revela o tecido utilizado. Para ambos os estudos demonstraram que os níveis de concentração e pureza foram mais baixos que os encontrados para *Araucaria angustifolia* (Tabela 2).

Jiao (2012) ressalta que as amostras que passam por tratamento de secagem, ou passam por períodos de estocagem podem sofrer degradação do material genômico. Como observado, ao testar diferentes adaptações de protocolos, em diferentes espécies, para amostras de madeira, seja câmbio vascular ou alburno, amostras secas, ou armazenadas por longos períodos, podem apresentar baixa concentração de DNA e alto grau de impureza ou baixa qualidade nas quantificações, evidenciando que em estudos com amostras de madeira fresca os resultados serão promissores.

Tabela 1 - Quantificação de DNA para amostras de diferentes tecidos de madeira e submetidas a diferentes macerações e análise descritiva de dados.

Amostra	Câmbio-Tissuelyser		Alburno – Lima		Alburno - Lixa	
	Conc.ng/µl	Rel. (260/280)	Conc. ng/µl	Rel. (260/280)	Conc.ng/µl	Rel. (260/280)
SJM1	30	1,92	18,5	1,92	62,5	1,76
SJ3M3	68	1,7	21.0	1,95	7,6	2,4
SJS 10	40	1,53	16.0	1,36	92,5	1,79
SJS11	91,5	1,86	17,5	1,92	11,7	2
SJ57	275,5	1,92	18,5	1,75	8,1	1,32
SJ58	117,5	1,94	99.0	1,94	19,5	1,97
SJ59	153	1,84	14	1,87	50	2,1
J53	231,5	1,9	9,6	1,83	20	1,77
J54	64,5	1,84	9,5	2	82	1,78
J55	121,5	1,89	7,2	2	14	1,78
J56	87,5	1,92	9,7	1,88	12,2	1,8
JM1	114	1,91	43	1,75	9,5	1,48
MJM2	49,5	1,86	12,9	1,77	58	1,78
FM1	312	1,91	18,5	1,83	79,5	1,6
FS1	179	1,9	239,5	1,83	26,5	1,71
Média	129	1,86	36,96	1,84	36,91	1,8
Erro padrão	22,25	0,03	15,62	0,04	7,9	0,07
Desvio padrão	86,19	0,11	60,5	0,16	30,61	0,25
Variância	7428,5	0,01	3660,03	0,02	936,93	0,06
Mínimo	30	1,53	7,2	1,36	7,6	1,32
Máximo	312	1,94	239,5	2	92,5	2,4
Contagem	15	15	15	15	15	15
N.C (95,0%)	47,73	0,06	33,5	0,09	16,95	0,14

Conc = Concentração de DNA; Rel = Relação entre DNA e proteína (260/280); N.C= Nível de confiança a 95%

#### 4.2 *Ocotea porosa*

Por meio da (Figura 11), é possível observar as amostras de *O. porosa*, em gel de agarose a 0,8% e comparação com DNA Lambda (25, 50 e 100 ng/μL), as quais obtiveram quantidade de DNA extraído, mesmo que de maneira sutil. As amostras foram submetidas a diferentes porcentagens de CTAB (2 e 5%) em tempos de banho maria (1h e 1h e 30 min). Na (Figura 11 A), observa-se que 75% das amostras apresentam DNA isolado, com concentração de aproximadamente 25 ng/μL. Já as amostras contidas da (Figura 11 B), também demonstraram que 75% das amostras contêm DNA entre 25 e 50 ng/μL. Para as amostras presentes na (Figura 11 C), percebe-se que a quantidade de amostras com DNA isolado diminuiu, com 58,33% das amostras contendo material genético, em concentração similar à 25 ng/μL. E para a (Figura 11 D), é nítido o decréscimo na quantidade de amostras que tiveram o DNA isolado, sendo apenas de 41% com concentração próxima de 25 ng/μL.

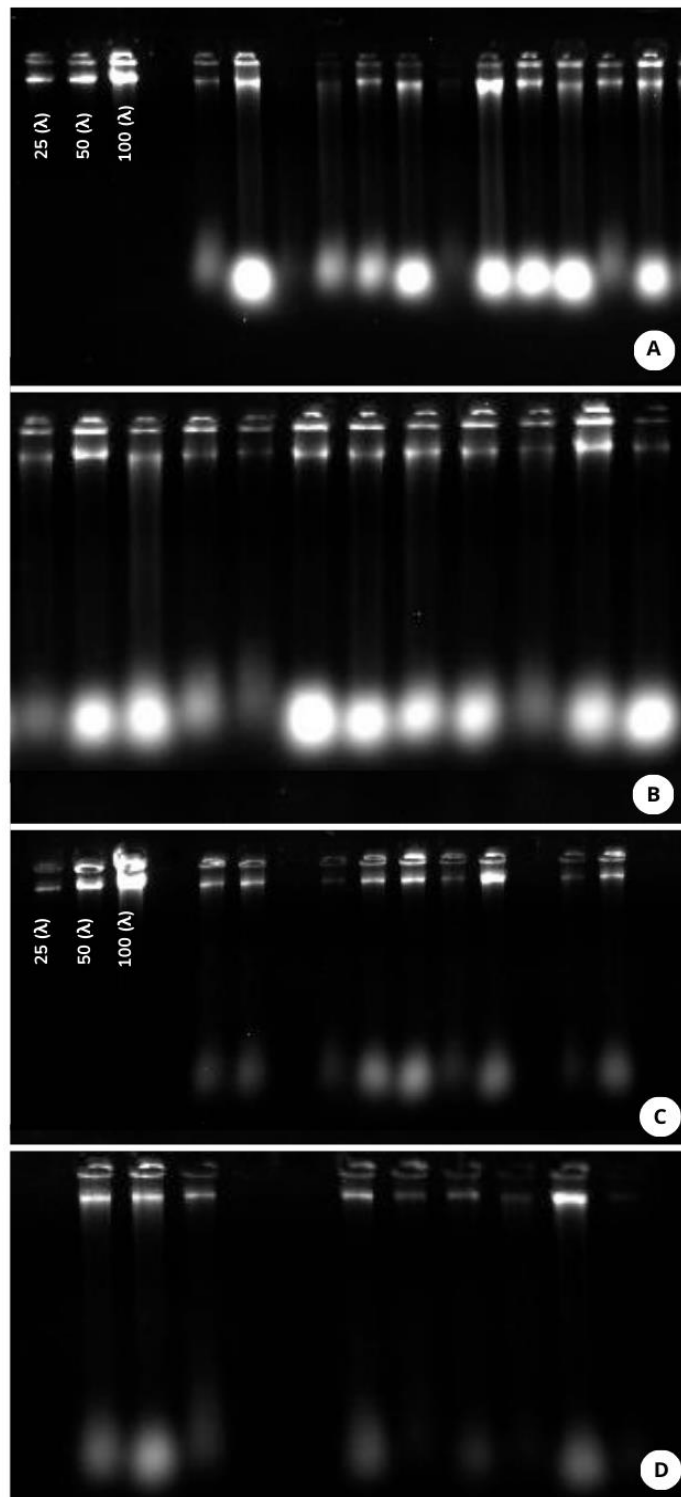
De acordo com estudos de Chiari *et al.* (2009), que compararam três protocolos, dois deles com concentração CTAB diferentes 2 e 2,8% e terceiro com adição de acetato de amônia, para a espécie *Stylosanthes guianensis*, todos analisados em gel de agarose a 0,8% exibiram integridade do DNA sem arraste das bandas, todos os protocolos se mostraram promissores. Ao contrário do observado para imbuia que apresentou maior afinidade para o protocolo CTAB 2% em banho-maria de 1h e 30 min.

Schmitt, *et al.* (2014) observaram para espécie *Curcuma longa*. (L) que as concentrações de CTAB de 2 e 5% resultaram em uma concentração de DNA expressiva para 5%, e pouco expressivas para as concentrações de 2%. Já Danner *et al.* (2011), constataram em gel eficiência do uso de protocolo com a utilização de CTAB 2% para folhas de espécies de *Plinia cauliflora*, não aferindo degradação ou contaminação das amostras. O que se difere do presente estudo, pois mesmo ao obter melhores concentrações na utilização de CTAB 2% as amostras apresentaram altos níveis de degradação nas bandas em gel, o que pode ser provocado pelo tempo de armazenamento, DNAsés, polissacarídeos ou compostos fenólicos.

Conforme estudos de Faleiro *et al.* (2003), ao analisarem dez espécies nativas do Cerrado brasileiro, observaram em gel de agarose a 0,8% utilizando protocolo CTAB 2,8% obtiveram concentração máxima para as espécies de macaúba, barbatimão e araticum. O estudo ainda demonstrou em análises de quantificação, que a máxima concentração foi obtida pela espécie macaúba com 590 ng/μL e grau de pureza 1,68. Assim, é possível perceber nesse estudo que algumas espécies demonstraram comportamento diferente entre análise realizadas em gel e análises quantitativas, como por exemplo da espécie de faveira. Esse mesmo comportamento

foi observado em presente estudo, no qual algumas amostras em gel se diferem da quantificação em NanoVue, a banda 12 (Figura 11 D), com a amostra 12 da Tabela 2. Uma possível explicação pode ser o manuseio indevido ou excessivo das amostras.

Figura 11 - Amostras de DNA extraídas tecido foliar, CTAB 2% 1h (A), CTAB 2% 1h30 (B) CTAB 5% 1h (C) e CTAB 5% 1h 30 (D).



Fonte: A autora, 2024.

Podemos analisar com base na Tabela 2 as concentrações de DNA obtidas, por meio de protocolos de extração com diferentes concentrações CTAB (2 e 5%). Para uma análise estatística descritiva, é possível compreender que de modo geral as amostras se diferem, aquelas condicionadas em um tempo de cozimento em banho-maria de 1h em uma concentração CTAB 2% foram melhores que as amostras em um mesmo tempo de cozimento, com concentração CTAB 5%. Já as amostras submetidas na concentração CTAB 2% em tempo de 1h e 30 minutos, foram melhores que as amostras CTAB 5% para o mesmo tempo, salienta-se a concentração CTAB 2% em 1h e 30 minutos demonstrou resultados mais expressivos dentre as demais, além disso é possível observar na Tabela 2 que a média da relação (260/280) ficou pouco acima de 1,50 o que confere grau de pureza baixo.

Conforme estudos de Da Cas *et al.* (2016), ao submeterem a espécie de *Ocotea odorifera* a dois protocolos adaptados de extração de DNA genômico, ambos utilizando CTAB a 2%, com isso foi possível observar que o protocolo descrito por Mazza (2000), obteve concentração máxima de 42 ng/ $\mu$ l e uma média de 20 ng/ $\mu$ l e para a razão 260/280 de 1,70 em 83% das amostras. Por outro lado, o protocolo descrito por Mega (2011), apresenta uma concentração máxima de DNA de 865 ng/ $\mu$ l e uma média de 174 ng/ $\mu$ l, com grau de pureza (razão) de 1,86. O que ressalta que os resultados obtidos podem ser expressivos a depender das modificações impostas aos protocolos de extração, para a espécie de *Ocotea odorifera*, o protocolo que influi nos melhores resultados possui adição de PVPP. Corroborando com o presente estudo, pois sabe-se que a modificação da porcentagem de CTAB não causou eficiência na concentração ou pureza das amostras, demonstrando a necessidade de mitigar problemas com polifenóis, proteínas e polissacarídeos.

Benzaquem (2009), comprova por meio de estudos do gênero *Aniba*, que ao adaptar o protocolo CTAB 2% Doyle & Doyle (1987), com adição extra de PVP para o momento de maceração, e adição de 10 mg/ml de proteína (K), obteve-se resultados promissores, DNA de boa qualidade em boas quantidades, visualizados em gel de agarose e comprovados em quantificação por espectrofotometria Nanodrop. Para o mesmo autor essas modificações ajudam a evitar a oxidação fenólica das amostras, em que elas possuem elevadas concentrações de polissacarídeos, permitindo a purificação de Lauraceas, pois apresentarem essas características de modo geral.



Tabela 2 - Quantificação de DNA para amostras de imbuia em diferentes concentrações CTAB, para tempos diferentes de cozimento em banho-maria, e análise descritiva de dados.

Amostras	22% 1h		% 1h30		5% 1h		5% 1h30	
	Conc. ng/μl.	Rel. (260/280)	Conc. ng/μl	Rel. (260/280)	Conc. ng/μl.	Rel. (260/280)	Conc. ng/μl	Rel. (260/280)
FI 02	59	1,55	87	1,51	131,5	1,57	90	1,51
FI 03	91	1,52	119	1,61	79,5	1,44	84,5	1,55
FI 04	107	1,51	138	1,51	102,5	1,47	111,5	1,55
FI 05	132	1,64	106	1,49	66,5	1,62	76,5	1,5
FI 06	94	1,45	110,5	1,48	86	1,39	108,5	1,58
FI 07	82	1,51	95,5	1,55	40	1,63	81,5	1,37
FI 11	97,5	1,53	118	1,61	92,5	1,43	92	1,49
FI 13	110	1,56	136	1,67	114,5	1,47	70,5	1,38
FI 14	151	1,64	113,5	1,47	84	1,54	116,5	1,62
FI 15	113	1,48	158	1,7	23,5	1,83	94	1,5
FI 16	120,5	1,65	114,5	1,32	135	1,59	140	1,7
FI 17	126,5	1,61	101	1,5	109,5	1,47	92	1,67
Média	106,96	1,55	116,42	1,54	88,75	1,54	96,46	1,54
Erro padrão	7,08	0,02	5,7	0,03	9,73	0,03	5,64	0,03
Desvio padrão	24,52	0,07	19,73	0,1	33,72	0,12	19,53	0,1
Variância	601,16	0	389,45	0,01	1137,11	0,01	381,38	0,01
Mínimo	59	1,45	87	1,32	23,5	1,39	70,5	1,37
Máximo	151	1,65	158	1,7	135	1,83	140	1,7
Contagem	12	12	12	12	12	12	12	12
N.C (95,0%)	15,58	0,04	12,54	0,06	21,43	0,08	12,41	0,06

Conc = Concentração de DNA; Rel = Relação entre DNA e proteína (260/280); N.C= Nível de confiança a 95%

## 5 CONCLUSÃO

Para as amostras de *Araucaria angustifolia* conclui-se que é possível extrair DNA de amostras cambiais maceradas em TissueLyser, bem como por meio de alburno macerado com lima e lixa, embora com concentrações bastante variáveis. Ademais, é importante salientar que embora as médias do grau de pureza tenham ficado acima de 1,8 as amostras em gel demonstraram RNA expressivo no arraste, o qual requer a utilização de RNAses para mitigar esse efeito.

Para as amostras de *Ocotea porosa*, o CTAB 2% com o cozimento em banho-maria de 1 h e 30 minutos resultam em concentrações mais expressivas. O grau de pureza das amostras obteve uma média pouco acima de 1,50 para todas as adaptações avaliadas, o que confere baixa pureza ou qualidade das amostras, havendo a necessidade de empregar novos estudos para suprir as necessidades da espécie.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabe-se que a maceração de madeira é difícil, pois a depender da escolha da técnica, pode acarretar problemas amostrais, tais como a degradação do DNA por exemplo, porém para presente estudo foi empregado o uso de lixa em caso de não haver aparatos apropriados como TissueLyser, pois a lixa cumpre bem seu papel de maceração, a média das concentrações para esse caso foi baixa, porém isso pode ter ocorrido pelo uso de tecido alburno seco, o que pode ter inferido em resultados subestimados. Recomenda-se novos testes com o uso dessa técnica, por outro lado não se recomenda o uso de lima para a maceração, mesmo que as médias de concentrações (lima e lixa) não tenham se diferido entre elas, pois essa técnica é mais onerosa, e apresenta amostras com aspecto escurecido devido ao seu material de composição.

Além disso, recomenda-se o uso de material de câmbio vascular e alburno fresco, na ausência da possibilidade de trabalhar com tecidos frescos, aconselha-se o uso apenas de câmbio vascular seco, pois em tecido de alburno seco a quantidade de DNA é pouco expressiva, com nível elevado de grau de impurezas, portanto requer adaptações nos protocolos para minimizar tais efeitos.

Já ao que se refere a adaptação de protocolo para *Ocotea porosa* salienta-se a necessidade de interferir em outras vias que não o CTAB 2% pois, as amostras não demonstraram eficiência ao utilizar CTAB 5%, portanto ao se tratar de uma espécie que produz naturalmente uma quantidade maior de polissacarídeos e polifenóis recomenda-se o uso de substâncias como (PVP) que evitem a manifestação dessa oxidação por polifenóis.

## REFERÊNCIAS

- ABE, H. U.; WATANABE, K.; YOSHIDA, K.; KURODA & C. ZHANG. Changes in organelle and DNA quality, quantity, and distribution in the wood of *Cryptomeria japonica* over long-term storage. **IAWA Journal**. p. 263–272, 2011.
- AUER, C.G.; SANTOS, A.F. dos. Doenças em araucárias In: SOUSA, V. A. de; FRITZSONS, E.; PINTO JUNIOR, J. E.; AGUIAR, A. V. de (ed). **Araucária: pesquisa e desenvolvimento no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, cap. 8, p. 149-160. 2021.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. 2 ed. **Academic Press**. p.1585, 2014.
- BHAT V.; DWIVEDI K.K.; KHURANA JP, Sopory SK Apomixis: An enigma with potential applications. **Current Science**, p.1879-1893, 2005.
- BITTENCOURT R. Caracterização da estrutura genética interna e aspectos da auto-ecologia de uma população natural de imbuia (*Ocotea porosa* - Lauraceae) [Dissertação de Mestrado]. Florianópolis: **Universidade Federal de Santa Catarina**; 83 p. 2007.
- BENZAQUEM, D.C. **Estudo do polimorfismo genético de espécies do gênero Aniba (Lauraceae) utilizando marcadores ISSRs**. Dissertação apresentada a Universidade do Estado do Amazonas como parte da exigência do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais. Manaus. 2009.
- BENINCA, C. **Amido da semente da *Araucaria angustifolia*: caracterização e efeito das modificações química e física e da incorporação de extratos da casca de pinhão nas suas propriedades**. p.167.2019. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2019.
- CARVALHO, P.E.R. Espécies Arbóreas Brasileiras. 1ed. Brasília: **Embrapa** DF. 2003. 1044p.
- CENTRO DE APRENDIZAGEM EM REDE. Protocolo 09: Ciência na mão: Protocolo otimizado para extração de DNA vegetal. Disponível em: <<https://publica.ciar.ufg.br/ebooks/educacao-do-campo/livro2/p2-09.html>> Acesso em 22 de abril de 2024.
- CHIARI, L.; VALLE, J.V.R.; RESENDE, R. M. S. Comparação entre três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis*. **Embrapa Gado de Corte-Circular Técnica**, v. 36, p. 1-6, 2009. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/853311/1/CT36.pdf>> Acesso em 15 de abril de 2024.
- COLPAERT, N.; CAVERS, S.; BANDO, E.; CARON, H.; GHEYSEN, G. AND LOWE, A.J. Sampling tissue for DNA analysis of trees: trunk cambium as an alternative to canopy leaves. **Silvae Genetica** 54: 265-269. 2005.
- CONTIM, L. A. S.; & CONTIM, L. S. R. A tecnologia produtiva do pau-rosa (*Aniba*

*rosaeodora* Ducke) como aliada ao desenvolvimento sustentável da região amazônica. **Inclusão Social**, v. 12, n. 1, p. 109-207, 2018.

COSTA, M.R. & MOURA, E.F. **Manual de extração de DNA**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89. p.24, 2001.

COSTA, M. D. R.; BONFIM, K.; & do NASCIMENTO, S. V. **Biologia molecular aplicada aos recursos genéticos**. Encontro Amazônico de Agrárias. Ano: 04, Nº 02, Março de 2012 – ISBN: 978-85-7295-078-7. 2012.

COUCH, J.A.; FRITZ, P.J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.8, p.8-12, 1990.

DAROS, T. L. **Sistema reprodutivo e estrutura genética de uma população natural de imbuia (*Ocotea porosa*) (Nees & C. Mart.) Barroso—Lauraceae**. Tese de Doutorado. Dissertation, Universidade Federal do Paraná. 2006.

DA CAS, L.; CORAZZA, T.; DA LUZ, L.; & MANTOVANI, A. **Comparação de dois métodos de extração de DNA genômico de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer**. UDESC.2016 Disponível em <[https://www1.udesc.br/arquivos/id\\_submenu/2550/35.comparacao\\_de\\_dois\\_metodos\\_de\\_ext\\_racao\\_de\\_dna\\_genomico\\_de\\_ocotea\\_odorifera\\_vell.\\_rohwer.pdf](https://www1.udesc.br/arquivos/id_submenu/2550/35.comparacao_de_dois_metodos_de_ext_racao_de_dna_genomico_de_ocotea_odorifera_vell._rohwer.pdf)>

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid isolation DNA procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemical Bulletin, Irvine*, v. 19, p. 11 - 15, 1987.

FAGUNDES, W. A.; SALOMÓN, G. R.; TARACIUK, O. C.; & CRISÓSTIMO, A. L. Biotecnologia—extração de DNA. **Anais...** do 5º Salão de Extensão e Cultura da UNICENTRO 29 a 31 de maio de 2012.

FALEIRO, F.G. Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina: **Embrapa Cerrados**, 102p. 2007.

FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R.; KARIA, C.T. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: **Embrapa Cerrados**, 2003. 6 p. (Comunicado Técnico, 92).

FATIMA, T. et al. An effective wood DNA extraction protocol for three economic important timber species of India. **American Journal of Plant Sciences**, v. 9, n. 02, p. 139, 2018.

FINKELDEY, R.; LEINEMANN, L.; GAILING, O. Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1251-1258, 2010.

HAMMEL, B. E. New species and notes on Lauraceae from the caribbean lowlands of Costa Rica. **J. Arnold Arbor.** 67: 123-136. 1986.

HAURESKO, C.; CORREIA, R. L.; & GOMES, M. F. V. B. 2017. A relação entre a conservação ambiental da floresta com araucárias e os sistemas faxinais no Paraná. **Revista Pegada**, 18(1), 131-151. <[https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P\\_mma\\_148\\_2022\\_altera\\_anexos\\_P\\_mma\\_443\\_444\\_445\\_2014\\_atualiza\\_especies\\_ameacadas\\_extincao.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf)> Acesso em: 22 de abril de 2024.

HUECK, K.. As florestas da América do Sul: ecologia, composição e importância econômica. São Paulo: **Polígono**, 1972.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da extração vegetal e da silvicultura (PEVS): **IBGE**, 2022 <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/37963-valor-de-producao-da-silvicultura-e-da-extracao-vegetal-cresce-11-9-e-atinge-recorde-de-r-33-7-bilhoes#:~:text=Os%20dados%20s%C3%A3o%20da%20Produ%C3%A7%C3%A3o,%2C%20variando%20%2C%25.>>> Acesso em: 23 de maio de 2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS IBF. **Bioma Mata Atlântica**. Disponível em: <https://www.ibflorestas.org.br/?s=mata+atl%C3%A2ntica+> Acesso em: 22 de abril de 2024.

INSTITUTO DE ESTUDOS BRASILEIROS (IEB). **Extração de DNA recomendações**. Disponível em <<https://www.ieb.usp.br/wp-content/uploads/sites/512/2019/08/extra%C3%A7%C3%A3o-professor.pdf>> Acesso em: 25 mai. 2024.

IRFAN, M., TING, Z. T.; YANG, W.; CHUNYU, Z.; QING, M.; LIJUN, Z., & FENG, L. Modification of CTAB protocol for maize genomic DNA extraction. **Research Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 41-45, 2013.

JIAO, L., YIN, Y., XIAO, F., SUN, Q., SONG, K., & JIANG, X.. Comparative analysis of two DNA extraction protocols from fresh and dried wood of *Cunninghamia lanceolata* (Taxodiaceae). **IAWA Journal**. p. 441–456. 2012.

JIAO, L., YIN, Y., CHENG, Y., & JIANG, X. DNA barcoding for identification of the endangered species *Aquilaria sinensis*: comparison of data from heated or aged wood samples. **Holzforschung**, v. 68, n. 4, p. 487-494, 2014.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B., CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; & VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, v.64, p.93-107, 2003.

KALIL, A. N.; LOPES, A. J., MARZOLLO, L. G.; BORTOLETO, A. S.; HIRANO, E., & STURION, J. A. **Pré-melhoramento de populações de imbuia**. **Pesquisa Florestal**

**Brasileira**, Colombo, n. 57, p. 61-68, jul./dez. 2008. Nota Científica

KESTRING, RIGONI. D.; SICOLI. C.S. Otimização de protocolo para extração do DNA de endosperma de sementes de *Araucaria angustifolia*. **Anais...V Evimat**. Colombo, PR. 2010.

KOCH, Z.; CORRÊA, M.C. **Araucária: A Floresta do Brasil Meridional** Curitiba: Olhar Brasileiro, 2002, 148 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 1992.

MACEDO, L.; DE LACERDA, A. E. B.; BANDEIRA, L. F.; COELHO, A. S. G., SOCCOL, C. R.; & BITTENCOURT, J. V. M. Sampling of forest species for genetic studies: vascular cambium storage and efficiency. **Advances in Forestry Science**, v. 3, n. 1, p. 7-12, 2016.

MARCHESAN, R.; MATTOS, P. P.; BORTOLI, C.; ROSOT, N. C. **Caracterização física, química e anatômica da madeira de *Ocotea porosa* (Nees & C. Mart.) Barroso**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 3p. (Comunicado Técnico, 161).

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

MAZZA, M. Use of RAPD markers in the study of genetic diversity of *Araucaria angustifolia* (Bert.) populations in Brazil. **International Foundation for Science**, Florianópolis, 1997.

MEGA, N. O.; REVERS, L. F. Desenvolvimento de um método rápido, eficiente e de baixo custo para a extração de DNA de artrópodos. **Ciência Rural** (UFSM), v. 41, p. 1563-1670, 2011.

MILL, R. R.; RUHSAM, M.; THOMAS, P. I.; GARDNER, M. F.; HOLLINGSWORTH, P. M. *Araucária goreensis* (araucariaceae), a new monkey puzzle from new caledonia, and nomenclatural notes on araucária muelleri. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 74, n. 2, p. 123-139, 2017.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, Portaria MMA n° 148, **Atualização da Lista Oficial das Espécies Ameaçadas de Extinção**. Disponível em: <[https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P\\_mma\\_148\\_2022\\_altera\\_anexos\\_P\\_mma\\_443\\_444\\_445\\_2014\\_atualiza\\_especies\\_ameacadas\\_extincao.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf)> Acesso em 13 abril de 2024.

MIRANDA R.S.; DE MENEZES, I.C.; VIEIRA, E.TORRES F. **Otimização do protocolo de extração de DNA para espécies do gênero *Piper* nativas da Amazônia**. 2019.<<https://publica.ciar.ufg.br/ebooks/educacao-do-campo/livro2/p2-09.html>> Acesso em: 23 de abril de 2024.

MONTAGNA, T.; FERREIRA, D. K.; STEINER, F.; DA SILVA, F. A. L. S.; BITTENCOURT, R.; DA SILVA, J. Z.; & DOS REIS, M. S. A importância das Unidades de Conservação na manutenção da diversidade genética de Araucária (*Araucaria angustifolia*) no estado de Santa Catarina. **Biodiversidade Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 18-25, 2012.

NANODROP TECHNOLOGIES, INC. ND-1000 Spectrophotometer V3.5 User's **Manual**. **Wilmington**, USA, 2007. 61p.

NEWTON, A.C.; ALLNUTT, T.R.; GILLIES, A.C.M.; LOWE, A.J. & Ennos, R.A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution** 14:140-145. 1999.

DUARTE, W. M., CALDEIRA, D. S. A. Karsburg, I. V. (2021). Principais marcadores moleculares. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, 2021.

OLIVEIRA, M. D. S.; REGITANO, L. D. A., ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCÍNIO, E. D., PARMA, M. M.; & BELICUAS, S. N. J. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. **Embrapa**, 2007. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>> Acesso em: 19 mai. 2024.

OLIVEIRA, A.J.; DE OLIVEIRA, T.C.; DOS SANTOS, A.A.C.; SIQUEIRA, T.A.; DUARTE, W.M.; CALDEIRA, D.S.A.; & KARSBURG. Principais marcadores moleculares. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e562101523633-e562101523633, 2021.

PARISOTTO, E. A.; HORST, L. A.; CARVALHO, V. M. Germinação de semente de imbuia (*Ocotea porosa* (Nees) L. Barroso) sob diferentes tipos de solo, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual do Centro-Oeste. **CEDETEG**, Guarapuava PR. 2009.

RACHMAYANTI, Y. Isolation of DNA from unprocessed and processed wood of Dipterocarpaceae. Department of Forest Genetics and Forest Tree Breeding. **Faculty of Forest Sciences and Forest Ecology**. University of Göttingen, Alemanha, 2009.

REGITANO, LC de A. Introdução à análise de marcadores moleculares. 2001.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. **Extração de DNA de plantas**. **Biotecnologia**, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.

ROQUE, R. H. **Efeitos de diferentes intensidades de corte seletivo sobre a diversidade e estrutura genética de uma população natural de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae) acessada por marcadores microssatélites**. 2023. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023. doi:10.11606/T.11.2023.de-05062023-155614. Acesso em: 2024-05-13.



ROQUE, R. H. **Effects of selective logging on genetic diversity of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Ktze.** 2019. DOI:10.13140/RG.2.2.10350.36161 Acesso em: 2024-05-05

RUDD, S.; SCHOOF, H.; MAYER, K. PlantMarkers- a database of predicted molecular markers from plants. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. suppl-1, p. D628-D632, 2005.

SANTOS, A. T. DOS.; MATTOS, P. P. DE.; BRAZ, E. M.; ROSOT, N. C. Determinação da época de desbaste pela análise dendrocronológica e morfométrica de *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso em povoamento não manejado. **Revista Ciência Florestal**, v. 25, n. 3, p. 699-709, 2015.

STELMACH, J. C.; BERRETA, M.D.S.R.; PRINTES, R. C.; & TAGLIARI, M. S. M. (2023). O resgate da conservação do pinheiro brasileiro (*araucaria angustifolia*) pela produção precoce do pinhão: Uma proposta baseada numa experiência de plantio de enxertia com a técnica de borbulhia em são francisco de paula, RS. **Para Onde!?**, 17(1), 172-199.

SCHARDOSIN, F. Z. **Identificação botânica de amostras de madeiras baseado na região do ITS (rDNA) associado à anatomia da madeira.** Dissertação (mestrado). Curitiba, 118p. 2015.

SCHMIDT, A. B. CIAMPI, A. Y.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Molecular Ecology Notes**, 7, n. 2, p. 340-342, 2007.

SCHMITT, K. F. M.; SILVA, B. M.; ROSSI, A. A. B.; SANDER, N.; SILVA, C. J. Estabelecimento e otimização de protocolo para extração e amplificação de DNA em tecido foliar de *Curcuma longa* (L). **Enciclopédia Biosfera, Goiânia**, v. 10, n. 19, p. 1560- 1568, 2014.

SCIPIONI, M. C. Troncos de árvores monumentais como indicadores de degradação florestal no sul do Brasil. **Ciência Florestal, Santa Maria**, v. 29, n. 4, p. 1712-1725, 2019.

SILVA, B. M.; DALBOSCO, E. Z.; BOTINI, N.; FARIA, R. B.; ROSSI, A. A. B. Protocolo para extração de DNA genômico de *Anacardium giganteum* W. Hancock Ex. Engl. (Anacardiaceae). **Enciclopédia Biosfera, Goiânia**, 2014.

SILVA, P. I T. **Desenvolvimento e utilização de um array de genotipagem de SNPs na genética de populações e melhoramento genético de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze.** Tese (doutorado)—Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, 2020.

SILVA, S. R.; SILVA, DR de F. **Produção técnico-científica sobre *Araucaria angustifolia* publicada com a participação da Embrapa: síntese quantitativa de 40 anos (1981-2020).** 2021.

SIMEONE, M., & KALIL FILHO, A. N. **Composição química e usos da semente de**

**imbuia nativa do município de Colombo, PR.** Comunicado Técnico (CNPQ). Colombo. PR: Embrapa Florestas. p.3.2008. ISSN: 1517-5030

SOARES, T.S.; MOTA, J.H. Araucária – o pinheiro brasileiro. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v.3, p.1-8, 2004.

SPEROTTO, R.A. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. **Editora da Univates**. Lajeado-RS, 2014.

TAMBARUSSI, E. V. **Contemporary gene flow, mating system, and spatial genetic structure in a Jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* Mar. Kuntze) fragmented populations by microsatellite marker.** Tese de doutorado. “Luiz de Queiroz” College of agriculture, Piracicaba-SP, 121 p. 2013.

VERBYLAITE, R.; BEISYS, P.; RIMAS, V.; & KUUSIENE, S. J. B. F. Comparison of ten DNA extraction protocols from wood of European aspen (*Populus tremula* L.). **Baltic Forestry** 16: 35–42. 2010.

VIBRANS, A.C.; MCROBERTS, E.; MOSER, P. & NICOLETTI, A.L. Using satellite image-based maps and ground inventory data to estimate the area of the remaining Atlantic forest in the Brazilian state of Santa Catarina. **Remote Sensing of Environment** 130: 87-95. 2013.

VIVIAN, M. A.; SCIPIONI, M. C.; NASCIMENTO, T. D.; & ROSA NETO, O. Imbuia multissecular: caracterização morfológica das fibras da madeira de *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso no sentido radial. (Ancient imbuia tree: morphological characterization of wood fibers from *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso in the radial direction) **Ciência Florestal**, v. 31, p. 2002-2022, 2021.

WEBER, V.P.; FINGER, C.A.G.; COSTA, E.A.; ZIMMERMANN, A.P.L.; LONGHI, R.V. Modelagem linear generalizada para descrever o incremento em área transversal de árvores individuais de Imbuia. **Floresta**, v. 48, n. 1, p. 123–132, 2018.

WENDLING, I.; MEDER, R.; WARBURTON, P.; MAGALHAES, W. L. E. Near infrared spectroscopy as a tool for predicting growth habit and gender of *Araucaria angustifolia*. **Australian Forestry**, v. 82, n. 3, p. 151-156, 2019.

WENDLING, I.; ZANETTE, F. Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios. Brasília: **Embrapa**, p.159, 2017.

WREGGE, M.; SOARES, M.; DE SOUSA, V. A., FRITZSONS, E.; DE AGUIAR, A. V.; BOGNOLA, I.; & MATTOS, M. D. F. **Metodologia para a caracterização ambiental e genética de populações de araucária para sua conservação e uso sustentável.** Colombo: Embrapa Florestas, p.23, 2021.

YOSHIDA, K. A.; KAGAWA, T.; IGASAKI, M.; NISHIGUCHI & Y. MUKAI. **Influence of the position in xylem, storage period and heat treatment on the efficiency of DNA extraction and on the quality of DNA from wood.** Bull. For. Prod. Res. Inst. 5: 289–298 (in Japanese). 2006.

ZANETTE, F.; DANNER, M. A.; CONSTANTINO, V., & WENDLING, I. Particularidades e biologia reprodutiva de *Araucaria angustifolia*. In: WENDLING, Ivar; ZANETTE, Flávio (org.). Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios. Brasília, DF: **Embrapa**, 2017. p. 15-39.

ZANETTI, G. T.; FIGUEREDO, P.; ANDRADE, J.; HOOGERHEIDE, E. S. S. Protocolo para Extração de DNA Genômico de *Ochroma pyramidale*. **Journal of Agronomic Sciences**, Maringá, v. 8, p. 73-84, 2019.

ZANONI, P.; DA SILVEIRA, A. C.; DE LIMA, E. A., DE MATTOS, P. P.; CURTO, R. D. A., MAGALHAES, W., & LAZZAROTTO, M. Uso dos produtos da araucária: madeira e coprodutos. In: SOUSA, V. A. de; FRITZSONS, E.; PINTO JUNIOR, J. E.; AGUIAR, A. V. de (ed.). Araucária: pesquisa e desenvolvimento no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 2021. cap. 17, p. 337-360 2021.