

Marcadores Moleculares no Melhoramento Genético de Araucária

Caracterização da diversidade genética em *Araucaria angustifolia*

Valdir Marcos Stefenon

Biólogo – Mestre em Biotecnologia

Depto. de Ciências Biológicas e da Saúde – UNIPLAC

gene_mol@hotmail.com

Rubens Onofre Nodari

Eng. Agrônomo – Doutor em Genética

Departamento de Fitotecnia – CCA – UFSC

Ilustrações cedidas pelos autores

Introdução

A exploração florestal foi uma importante alavanca para o desenvolvimento econômico do Sul do Brasil desde o início do século XX, com intensidade crescente nas décadas de 1950 a 1970 (Guerra et al., 2002).

A principal espécie explorada nesse ciclo foi a *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., única representante da Família *Araucariaceae* no Brasil e principal espécie que compõe a floresta ombrófila mista ou mata de araucária (Guerra et al., 2002). No Brasil, a distribuição natural dessa espécie se dá em amplas áreas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, e em alguns pontos mais elevados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Reitz e Klein, 1966).

Todavia, a alta qualidade de sua madeira para os mais diversos fins, desde a construção civil até a produção de celulose e de papel, fez com que essa espécie fosse exaustivamente explorada, tendo como consequência uma drástica redução das grandes reservas de *A. angustifolia* no sul do país.

Além dessa exploração desordenada, o avanço das fronteiras agrícolas foi outro fator responsável pela redução das populações naturais dessa importante espécie florestal.

Em função desses acontecimentos, a araucária encontra-se hoje na Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção (IBAMA, 2002) e os remanescentes de floresta ombrófila mista estão reduzidos a fragmentos isolados de diversos tamanhos.

Em alguns desses fragmentos, estima-se que grande parte da diversidade genética tenha sido perdida (Schögl,

2000; Auler et al., 2002), fato que inviabiliza a regeneração natural da espécie, devido à endogamia acentuada e à redução do fluxo gênico entre suas populações.

Nos últimos anos, diversas discussões a respeito desse tema vêm apontando para a necessidade de se desenvolver o melhoramento genético dessa conífera, com vista a regenerar a Floresta de Araucária e disciplinar os plantios com finalidade lucrativa, seja pela exploração da madeira, seja pela venda das sementes comestíveis ou de outros subprodutos.

Entretanto, antes de os programas de melhoramento genético serem implementados, é necessário que se conheça a diversidade genética existente entre as populações remanescentes e dentro delas. Esses estudos são importantes para que se interprete o efeito da fragmentação dos remanescentes sobre a estrutura genética das populações: informação essencial para o planejamento de programas de melhoramento.

Esse conhecimento, além de reduzido, tem sido produzido basicamente a partir de marcadores morfológicos (Shimizu e Higas, 1980; Monteiro e Spelz, 1980; Kageyama e Jacob, 1980) e isoenzimas (Shimizu et al., 2000; Auler et al., 2002; Mantovani et al., 2002).

Considerando a utilização de marcadores RAPD (Williams et al., 1990; Welsh e McClelland, 1990) e AFLP (Vos et al., 1995) para estudos genéticos em diversas espécies florestais, o objetivo deste estudo foi determinar a capacidade informativa desses marcadores para a caracterização da diversidade genética de populações naturais de *A. angustifolia*.

Material e Métodos:

Material vegetal e Extração de DNA

O material vegetal utilizado neste estudo foi composto por amostras foliares de trinta indivíduos adultos de uma população natural do Parque Ecológico Municipal de Lages, Estado de Santa Catarina, coletados e acondicionados em sacos plásticos que continham sílica gel. Inicialmente, foram testados sete protocolos para extração de DNA vegetal com base na utilização do detergente CTAB. Com esses testes, chegou-se à conclusão de que era necessário otimizar um protocolo específico para a espécie, a fim de eliminar os compostos contaminantes do DNA presentes nas folhas de araucária (principalmente proteínas e polifenóis) e a fim de evitar a liofilização do material vegetal.

Aproximadamente 150 mg de folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas completamente em gral de porcelana. Ao pó resultante, acrescentou-se 1,5 mL de tampão de extração [CTAB 2%; NaCl 1,5 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM; PVP 2%; 2-mercaptoetanol 1%]. O material foi transferido para tubos *ependorf* de 2 mL e mantido em banho-maria (60°C) por 40 min. A cada 15 minutos, o material foi homogeneizado por inversão. Após essa etapa, o material foi deixado sobre a bancada até alcançar a temperatura ambiente, quando lhe foram acrescentados, em cada tubo, 600 µL de CIA [clorofórmio: álcool isoamílico 24:1]. O material foi homogeneizado durante três minutos, por inversão, e centrifugado a 13.000 RPM, por 5 min. A porção aquosa que continha o DNA foi transferida para dois novos tubos e foram acrescentados a ela 5 µL de RNase A (10 µg/mL). Após 40 min, a 34°C, realizou-se uma segunda extração orgânica com CIA. Após a centrifugação (13.000 RPM, por 5 min), a porção aquosa foi transferida para novos tubos, aos quais adicionaram-se 50 µL de solução de CTAB 10% [CTAB 10%; NaCl 1,4 M], a 60°C. Após a homogeneização, realizou-se uma terceira extração orgânica com CIA. A porção aquosa foi transferida para novos tubos e o DNA foi precipitado pela adição de 2/3 do volume de álcool isopropílico gelado (-20°C). O material foi mantido por 30 min a -20°C e, posteriormente, centrifugado a 7.000 RPM, por 5 min. O álcool isopropílico foi descartado e o DNA

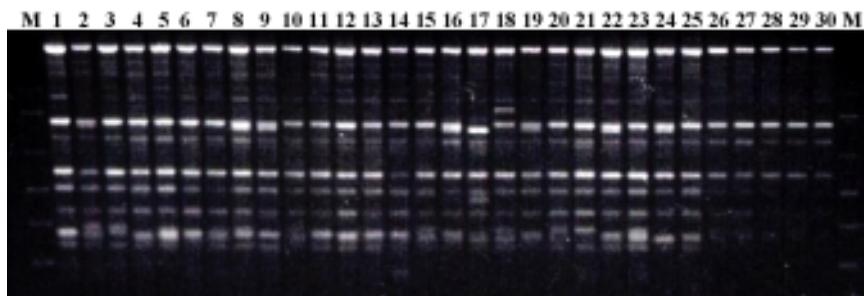


Figura 1: Polimorfismo revelado em marcadores RAPD em *A. angustifolia*, entre os trinta indivíduos da população do Parque Ecológico Municipal de Lages, utilizando o iniciador OPA04. Linhas 1 a 30: indivíduos da população. M= marcador de peso molecular 1kb.

desidratado novamente com 1 mL de álcool etílico 95%. O material permaneceu por 10min a -20°C e centrifugado a 8.000 RPM, por 5 min. O álcool etílico foi descartado e deixou-se o precipitado secar a temperatura ambiente. O DNA foi diluído em 100 µL de TE, a temperatura ambiente, por um período de 12 a 16 horas, e armazenado a -20°C.

A concentração de DNA foi determinada pela comparação com quantidades conhecidas de DNA de fago lambda (20, 50, 100 e 200 ng/µL), após eletroforese em gel de 0,8% de agarose, corado com solução de 0,02% de brometo de etídio. A leitura espectrofotométrica da razão OD260/OD280 foi utilizada para determinar a pureza das amostras frente à contaminação por proteínas.

Reações RAPD

Para reações RAPD, foram utilizados seis iniciadores comercializados pela Operon Technologies® (OPA04, OPA09, OPA17, OPC06, OPF16, OPAN15). O coquetel da reação consistiu de tampão de PCR 1X, 3,8 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 0,4 µM de iniciadores, 1 U de *Taq* DNA polimerase e 1,5 ng/µL de DNA. As reações de PCR foram desenvolvidas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) em um volume de 13 µL. O programa utilizado foi composto de uma etapa inicial de desnaturação (4 min. a 92°C), seguida de 35 ciclos de amplificação (45 s. a 92°C; 45 s. a 35°C; 1 min e 15 s. a 72°C), e terminada com uma etapa final de alongação das cadeias de DNA (3 min a 72°C). Os produtos amplificados foram separados por eletroforese horizontal submersa em tampão TBE 1X, em gel de 1,5% de agarose, corado com solução de 0,02% de brometo de etídio. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta e os géis fotografados com filme *Polaroid* preto e branco.

Reações AFLP

Sete combinações de iniciadores para reações AFLP foram selecionadas aleatoriamente no kit AFLP® Analysis System I / Life Technologies® (E-ACG+M-CAC, E-ACT+M-CAA, E-ACA+M-CTT, E-ACG+M-CAG, E-AAG+M-CTG, E-ACC+M-CAT e E-ACC+M-CAC) e as reações foram desenvolvidas de acordo com o protocolo de Vos et al. (1995), com pequenas modificações. Inicialmente, realizou-se a restrição do DNA com as enzimas *Eco*RI e *Mse*I, durante duas horas, a 36°C. A ligação dos oligonucleotídeos adaptadores foi realizada por 2 horas, a 20°C, em um volume de 25 µL. Na etapa seguinte (pré-amplificação), o DNA foi amplificado com a utilização de iniciadores com uma base seletiva (*Eco*RI-A e *Mse*I-C). O DNA pré-amplificado foi diluído em uma razão de 1:25 e amplificado novamente, utilizando-se iniciadores com três bases seletivas (*Eco*RI-ANN e *Mse*I-CNN). As etapas de restrição enzimática, de ligação dos adaptadores e de amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.). Os produtos amplificados foram separados por eletroforese vertical em tampão TBE 1X, em gel de 6% de poliacrilamida. As bandas foram visualizadas após coloração com nitrato de prata.

Para a coloração, os géis foram fixados com solução de 0,5% de ácido acético + 5% de etanol, por 10 min., e com solução de 1% de ácido nítrico, por três minutos. Posteriormente, foram impregnados com solução de nitrato de prata 0,2%, durante trinta minutos. Após esse tempo, uma solução de 3% de carbonato de sódio + 0,2% de formaldeído foi utilizada para a revelação das bandas, durante o tempo necessário. As revelações foram finalizadas com a utilização de uma solução de 5% de ácido acético. Após cada

etapa, os géis foram lavados durante 20 segundos com água destilada. Todos os tratamentos foram realizados sob leve agitação. Após a secagem dos géis em temperatura ambiente, as bandas foram visualizadas sob luz branca e os géis fotografados com máquina digital.

Caracterização da Diversidade Genética e Capacidade Informativa

Os índices de diversidade estimados foram: a similaridade genética, o número médio de bandas, a porcentagem de bandas polimórficas e a diversidade genética. Os padrões de bandas obtidos com os marcadores RAPD e AFLP foram analisados e para eles construiu-se uma matriz binária, que identificava sua presença ou sua ausência, codificadas por 1 ou 0, respectivamente. A partir dessa matriz de dados, com o auxílio do *software* NTSYS-pc 2.02 (Rohlf, 1990), foi determinado o índice de similaridade genética de Jaccard entre os indivíduos e pelo método de agrupamento UPGMA (método das médias das distâncias), foram gerados, separadamente e de maneira agrupada, os dendrogramas para marcadores RAPD e AFLP. Para determinação da diversidade genética, foi utilizado o índice de Shannon, dado pela fórmula $H = -\sum p_i \ln(p_i)$, onde p_i corresponde à frequência de cada alelo (Lewontin,

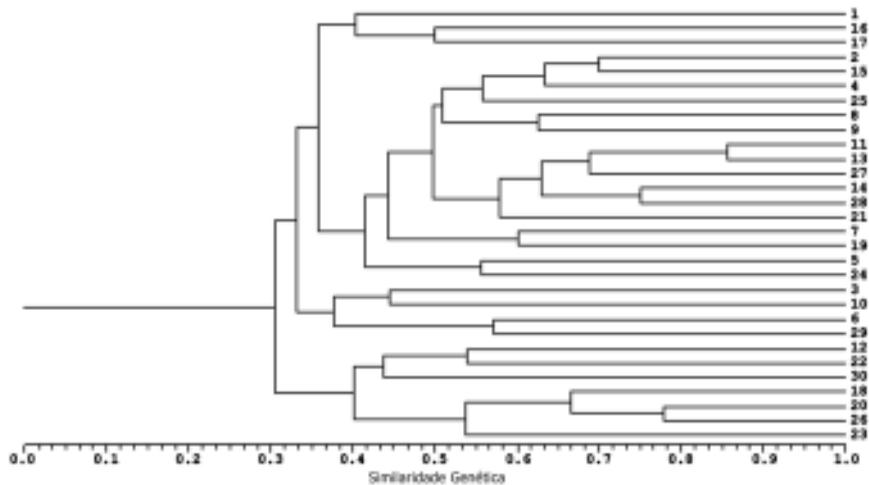


Figura 2: Dendrograma de similaridade genética entre indivíduos, estimado pelo índice de Jaccard para a população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages, gerado a partir de 18 marcadores RAPD ($r=0,83$).

1970). Como ambos os marcadores apresentam característica dominante, considerou-se cada banda amplificada como sendo um loco com dois alelos, presente ou ausente no gel.

Para determinar a capacidade informativa dos marcadores RAPD e AFLP, foram utilizados para a comparação dados gerados a partir de marcadores isoenzimáticos (Auler et al., 2002) e PCR-RFLP (Schögl, 2000) provenientes da mesma população. Devido à diferente natureza dos marcadores, o índice de diversidade de Shannon foi determinado para todos os dados e usado como parâmetro de comparação.

Resultados e Discussão:

A partir dos seis iniciadores utilizados para as reações RAPD, foram obtidos dezoito marcadores polimórficos, de um total de 62 bandas amplificadas, com uma média de 11,16 bandas amplificadas por iniciador. A média de bandas polimórficas foi de 3,0 por iniciador, com uma porcentagem média de 26,9%. O índice de diversidade de Shannon foi igual a 0,53 (Tabela 1). A figura 1 apresenta o padrão de bandas obtido com o iniciador OPA04, para reações RAPD.

As sete combinações empregadas para as reações AFLP revelaram 62

Tabela 1: Iniciadores utilizados nas reações RAPD e respectivos índices de diversidade genética para a população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages.

Iniciadores	Número total de bandas	Bandas polifórmicas		Índice de diversidade (H)
		Quantidade	%	
OPA4	12	03	25,0%	0,58
OPA9	13	02	15,4%	0,59
OPA17	06	01	16,7%	0,58
OPC6	09	03	33,3%	0,52
OPF16	13	05	38,5%	0,56
OPAN15	09	04	44,4%	0,43
Médias para marcadores RAPD	11,16	3,0	26,9 %	0,53

Tabela 2: Combinações de iniciadores utilizados nas reações AFLP e respectivos índices de diversidade genética para a população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages.

Iniciadores	Número total de bandas	Bandas polimórficas		Índice de diversidade (H)
		Quantidade	%	
E-AGC + M-CAC	90	4	4,4%	0,65
E-ACT + M-CAA	100	10	10,0%	0,45
E-ACA + M-CTT	60	3	5,0%	0,68
E-ACG + M-CAG	100	21	21,0%	0,55
E-AAG + M-CTG	80	6	7,5%	0,56
E-ACC + M-CAT	105	7	6,6%	0,55
E-ACC + M-CAC	90	11	12,2%	0,50
Médias para marcadores AFLP	89,3	8,8	9,8%	0,54

marcadores polimórficos, em um total de 625 bandas amplificadas. A média de bandas totais amplificadas foi de 89,3 e de bandas polimórficas foi de 8,8 por combinação de iniciadores. A porcentagem média de bandas polimórficas foi de 9,8%. Para marcadores AFLP, o índice de diversidade de Shannon foi de 0,54 (Tabela 2).

Quando os dois tipos de marcadores foram analisados conjuntamente, o total de bandas amplificadas foi de 687, com 80 bandas polimórficas, que correspondiam a 11,6%. As médias de bandas totais e polimórficas amplificadas foram de 52,8 e 6,15 por iniciador, respectivamente. A diversidade genética determinada pelo índice de Shannon foi de 0,54 (Tabela 3).

Marcadores isoenzimáticos (Auler et al., 2002) empregados na mesma população acessaram uma diversidade genética de Shannon de $H=0,29$, ao passo que marcadores PCR-RFLP de DNA de cloroplastos (Schögl, 2000) detectaram um único haplótipo na população, correspondendo a uma diversidade virtualmente inexistente. Nesse caso, marcadores RAPD e AFLP mostraram-se altamente eficientes, detectando uma diversidade genética quase duas vezes maior (1,8 x) que aquela determinada por isoenzimas.

Apesar de caracterizar-se pela análise da molécula de DNA da mesma forma que as técnicas RAPD e AFLP, a técnica PCR-RFLP aplicada a genomas de cloroplastos não possibilitou a detecção de diversidade nesta população. Já as técnicas RAPD e AFLP não demonstraram limitações para acessar a diversidade genética em populações altamente exploradas, como a utilizada nesta pesquisa.

Quando os valores obtidos no presente trabalho são comparados a outros estudos que utilizaram as técnicas RAPD e AFLP, estes podem ser considerados baixos. Contudo, há de se considerar que os estudos com isoenzimas e PCR-RFLP utilizados como parâmetro para a comparação também apresentaram valores baixos para essa população, quando comparados a ou-

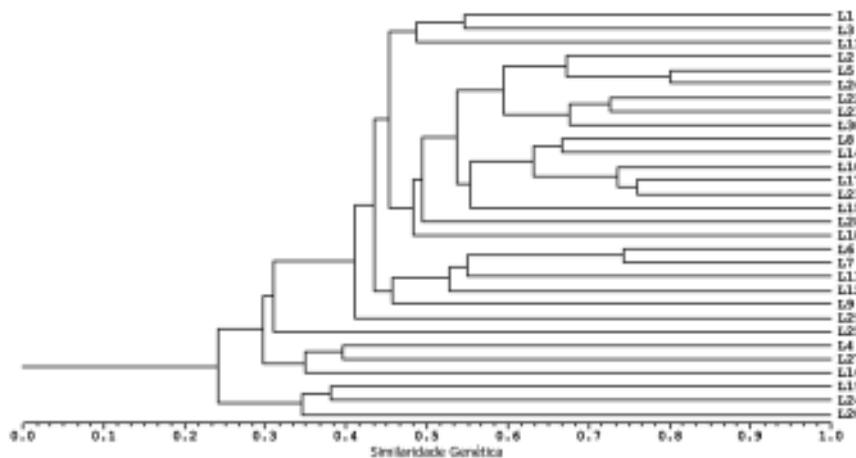


Figura 3: Dendrograma de similaridade genética entre indivíduos, estimado pelo índice de Jaccard para a população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages, gerado a partir de 64 marcadores AFLP ($r=0,83$).

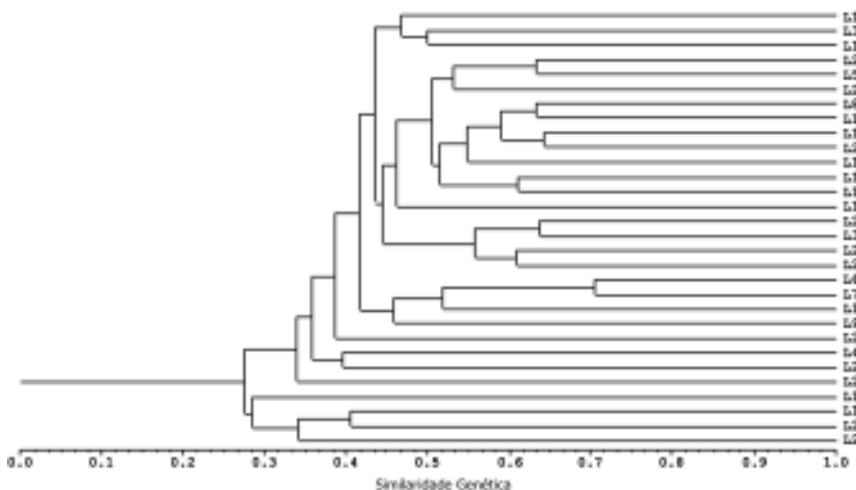


Figura 4: Dendrograma de similaridade genética entre indivíduos, estimado pelo índice de Jaccard para a população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages, gerado a partir de 18 marcadores RAPD e 62 marcadores AFLP agrupados ($r=0,80$).

tras populações de *A. angustifolia* analisadas antes.

Por outro lado, uma criteriosa seleção de combinações de iniciadores permite que a técnica AFLP apresente um polimorfismo muito maior (Stefenon, 2003).

A similaridade genética foi analisada em função dos três dendrogramas gerados: um, a partir dos 18 marcadores RAPD polimórficos (Figura 2), o segundo, a partir dos 62 marcadores AFLP polimórficos (Figura 3) e o terceiro, a partir dos 80 marcadores RAPD e AFLP polimórficos agrupados (Figura 4).

A maior similaridade genética entre indivíduos foi de 86% (indivíduos L11 e L13), com marcadores RAPD; 81 % (indivíduos L5 e L26), com marcadores AFLP e 71% (indivíduos L6 e L7), com o agrupamento dos dois tipos de marcadores. Nesse ponto, percebe-se que o maior número de marcadores permite uma maior discriminação entre os indivíduos analisados.

A comparação entre os três dendrogramas permite ainda perceber que, no agrupamento dos marcadores, o maior número de bandas

Tabela 3: Médias para os índices de diversidade genética estimados para a população de *A. angustifolia* do Parque Ecológico Municipal de Lages, a partir de marcadores RAPD e AFLP.

Marcadores	Número total de bandas	Bandas polimórficas		Índice de diversidade (H)
		Quantidade	%	
Médias para marcadores RAPD	11,16	3,0	26,9%	0,53
Médias para marcadores AFLP	89,3	8,8	9,8%	0,54
Médias RAPD + AFLP	52,8	6,15	11,6%	0,54

AFLP fez com que o dendrograma ficasse muito semelhante ao gerado unicamente dos marcadores AFLP.

Utilizando-se um valor máximo de 50% para a similaridade genética entre os indivíduos, o dendrograma gerado a partir de marcadores RAPD (Figura 2) dividiu-se em doze grupos. A maior similaridade genética foi observada entre os indivíduos L11 e L13, com 86% de similaridade e o ponto de união de todos os grupos apresenta 30,5% de similaridade.

O dendrograma gerado de marcadores AFLP (Figura 3) dividiu-se em quinze grupos, utilizando-se 50% como similaridade máxima; o ponto de união de todos os grupos apresenta 24% de similaridade. Com esses marcadores, a similaridade genética entre pares de indivíduos variou de 24% a 81%.

Deve-se considerar que existe uma relação entre o número dado a cada planta e sua proximidade geográfica, sendo mais próximos geograficamente os indivíduos cujos números são mais próximos. Dessa forma, pode-se observar que os argumentos de plantas são aleatórios, formados por indivíduos dispersos pelo Parque, em uma área de 2,34 km². Esse dado sugere que indivíduos geograficamente, os quais podem ser aparentados, não apresentam grande similaridade genética.

Considerações Finais

Um aspecto importante a ser considerado é que a *A. angustifolia* provavelmente possui uma grande diversidade genética antes da exploração ocorrida durante o ciclo da madeira no sul do Brasil (Auler et al., 2002).

Dessa forma, antes de qualquer previsão de melhoramento genético é essencial conhecer a diversidade genética existente nas populações remanescentes, para possibilitar a seleção de plantas e sementes a serem utilizadas, tanto para a produção de mudas, quanto para cruzamentos controlados.

A exemplo do ocorrido no Parque Ecológico Municipal de Lages, durante o ciclo da madeira, a seleção promovida pelo homem até o momento, foi a retirada dos melhores fenótipos, em detrimento dos demais.

Devido ao acesso aleatório a amplas regiões genômicas praticamente livres da ação da seleção natural, as técnicas RAPD e AFLP geram um gran-

de número de marcadores virtualmente neutros. Neste caso, dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que essas técnicas apresentam-se como poderosas ferramentas para a caracterização da diversidade genética dos remanescentes de *A. angustifolia*, com vistas ao melhoramento genético da espécie.

Agradecimentos

Ao CNPq, UNIPLAC e FUNCITEC pelo apoio financeiro e à Prefeitura do Município de Lages, pelo apoio na obtenção do material vegetal.

Referências Bibliográficas

- AULER, N.M.F.; REIS, M.S.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. The genetics conservation of *Araucaria angustifolia*: I: genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptive variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 25 (3):329-338, 2002.
- GUERRA, M.P.; SILVEIRA, V.; REIS, M.S.; SCHNEIDER, L. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). in: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: Ed. SENAC São Paulo, 2002. p.85-101.
- IBAMA. **Lista Oficial de Flora ameaçada de extinção**. Disponível em <<http://www2.ibama.gov.br/flora/extincao.htm>> acessado em 21/06/02
- KAGEYAMA, P.Y.; JACOB, W.S. Variação genética entre e dentro de progênies de uma população de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **IUFRO: Meeting on Forestry Problems of Genus Araucaria**, Curitiba, Brasil. 1980, p.83-86.
- LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, 6: 381-390, 1972.
- MANTOVANI, A.; MORELLATO, L.P.C.; REIS, M.S. Variação genética em uma população de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (*Araucariaceae*). **Anais do 48.º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia, Brasil, cd-rom, 2002.
- MONTEIRO, R.F.R.; SPELZ, R.M. Ensaio de 24 progênies de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **IUFRO: Meeting on Forestry Problems of Genus Araucaria**, Curitiba, Brasil, 1980, p.181-200.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M. **Araucariáceas**. Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí. 1966, 62p.
- ROHLF, F.J. 1990. **NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis**. Applied Biostatistics inc. New York. 1990, 139p.
- SCHLÖGL, P.S. **Análise da diversidade genética em regiões não codificadoras de DNAs de cloroplastos em *Araucaria angustifolia* por PCR-RFLP**. Florianópolis, 2000. [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina]
- SHIMIZU, J.Y.; HIGAS, A.R. Variação genética entre procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. na região de Itapeva-SP, estimada até o 6.º ano de idade. **IUFRO: Meeting on Forestry Problems of Genus Araucaria**, Curitiba, Brasil, 1980 p.78-82.
- SHIMIZU, J.Y.; JAEGER, P.; SOPCHAKI, S.A. Variabilidade genética em uma população remanescente de araucária no Parque Nacional do Iguacu, Brasil. **Boletim de Pesquisas Florestais Colombo**, (41):18-36, 2000.
- STEFENON, V.M. **Adaptação e otimização de protocolos para a extração de DNA e para marcadores moleculares em *Araucaria angustifolia***. Florianópolis, 2003. [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina]
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VANDELEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acid Research**, 23:4407-4414, 1995.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 18(24):7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18(22):6531-6535, 1990.