

Genética e conservação de *Araucaria angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para análise da diversidade genética em populações naturais

Valdir Marcos Stefenon¹
Rubens Onofre Nodari^{2*}
Miguel Pedro Guerra²

¹ Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde – UNIPLAC – Lages, SC

² Departamento de Fitotecnia – CCA – UFSC

Rod. Admar Gonzaga – Itacorubi – C.P. 476 – 88040-900 – Florianópolis, SC

E-mail: nodari@cca.ufsc.br

* Autor para correspondência

Aceito para publicação em 28/07/2003

Resumo

Este trabalho teve como objetivo adaptar um protocolo para a extração de DNA a partir de acículas de *Araucaria angustifolia* e testar a capacidade informativa de marcadores RAPD para a análise da diversidade genética de populações naturais desta espécie. O método de extração foi padronizado a partir de oito protocolos testados e permitiu a obtenção de DNA com boa qualidade para as reações de RAPD. A razão OD_{260}/OD_{280} de 80% das amostras apresentou um valor entre 1,7 e 2,0 indicando que estas apresentaram baixa contaminação por proteínas. Os

marcadores RAPD demonstraram ser uma eficiente ferramenta para estudos genéticos, possibilitando a estimativa de um índice de diversidade genética (índice de Shannon $H=0,50$) superior ao obtido com marcadores isoenzimáticos ($H=0,29$) e PCR-RFLP ($H=0,0$), para a população natural de araucária do Parque Ecológico Municipal de Lages/SC.

Unitermos: Extração de DNA, *Araucaria angustifolia*, diversidade genética, marcadores moleculares, CTAB.

Abstract

This study was aimed at adapting a DNA extraction protocol by *Araucaria angustifolia* leaves, and testing the informative capacity of RAPD markers for genetics diversity analysis in natural populations of this species. The extraction method was standardized by eight tested protocols and it was possible to obtain good quality DNA for RAPD reactions. The OD_{260}/OD_{280} ratio ranged from 1.7 to 2.0 in 80% of the samples, indicating that they had a low level of protein contamination. The RAPD markers demonstrated their capacity as a useful tool to genetic studies, since the estimate of a genetic diversity (Shannon index $H=0.50$) higher than that obtained by other authors with isozyme markers ($H=0.29$) and PCR-RFLP ($H=0.0$) for the same natural population of the Ecological Municipal Park, Lages, Santa Catarina, Brazil.

Key words: DNA extraction, *Araucaria angustifolia*, genetic diversity, molecular markers, CTAB.

Introdução

Vários métodos de extração de DNA já são conhecidos e foram otimizados para diversas espécies vegetais. Entretanto,

pouco se tem estudado sobre a otimização de protocolos para espécies florestais nativas da região Sul do Brasil.

Um dos métodos mais empregados nos laboratórios de genética de plantas no Brasil é baseado na utilização do detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Este protocolo é utilizado para diversas espécies vegetais, com modificações específicas para cada uma. A extração de DNA de alta qualidade é um dos requisitos para a avaliação molecular de espécies de grande importância como é o caso do pinheiro brasileiro.

A *Araucaria angustifolia* é uma importante espécie vegetal da Floresta Ombrófila Mista no Sul do Brasil. Sua importância se expressa tanto no aspecto ambiental quanto econômico. Em função de seu alto valor econômico, esta espécie tem sido exaustivamente explorada, restando somente alguns remanescentes isolados em sua região natural de ocorrência. Essa exploração provoca também a erosão genética desta espécie florestal, devido à sua extração sem critérios de seleção ou manejo.

Populações naturais de araucária vêm sendo estudadas há vários anos através de características morfológicas (Kageyama e Jacob, 1980; Shimizu e Higas, 1980) ou de marcadores isoenzimáticos (Shimizu et al., 2000; Auler et al., 2002; Mantovani et al., 2002), buscando-se com isso, a caracterização da diversidade genética desta espécie.

Apesar destes marcadores possibilitarem a análise de características adaptativas e da diversidade genética, respectivamente, apresentam limitações, como a interferência ambiental para os marcadores morfológicos e o baixo número de locos acessados pelas isoenzimas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Marcadores baseados na análise direta do DNA, como os RAPDs, sigla em inglês para DNA polimórfico amplificado ao

acaso (Welsh e McClelland, 1990; Willians et al., 1990), apresentam a vantagem de não sofrerem interferência ambiental e possibilitarem amplo acesso ao genoma do organismo estudado, de maneira rápida e eficiente.

O presente trabalho teve como objetivo padronizar um protocolo para a extração de DNA a partir de acículas de *A. angustifolia*, baseado no detergente CTAB, bem como testar a capacidade informativa de marcadores RAPD para a análise da diversidade genética, em uma população natural de *A. angustifolia*.

Material e Métodos

Extração de DNA

Acículas de plantas adultas da população natural do Parque de Campos de Jordão/SP (n=50) e do Parque Ecológico Municipal de Lages/SC (n=30), foram coletadas, acondicionadas em sílica gel ou em caixas térmicas com gelo e transportadas até o laboratório. A extração de DNA foi realizada imediatamente após a chegada do material vegetal ao laboratório. As amostras provenientes de Campos de Jordão tiveram metade das acículas mantidas a -20°C por um período de uma semana a três meses, para posterior extração do DNA.

Os protocolos descritos por Murray e Thompson (1980), Rogers e Bendich (1985), Hattori et al. (1987), Doyle e Doyle (1990), Cheng et al. (1997), Ferreira e Gratappaglia (1998), Romano e Brasileiro (1999) e Stefenon e Nodari (2001), foram testados, para a padronização de um protocolo para *A. angustifolia*. Etapas de centrifugação em gradiente de cloreto de céσιο e de cromatografia, citadas por alguns protocolos, foram excluídas dos testes realizados.

O protocolo padronizado constou da maceração de 150 mg de acículas, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas em gral

de porcelana, até resultar em pó fino. Imediatamente, acrescentou-se 1,5 mL de tampão de extração [20 mg/mL de CTAB; 87 mg/mL de NaCl; 20 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético); 12,1 mg/mL de Tris-HCl pH 8,0; 20 mg/mL de PVP; 1 mL de 2-mercaptoetanol]. O material de cada tubo foi dividido em dois microtubos de 2 mL (gerando uma duplicata para cada amostra) e mantido em banho-maria (60°C) por 40 a 60 min. invertendo-se a cada 15min. para homogeneização. Decorrido o tempo, os tubos foram deixados sobre a bancada até atingir a temperatura ambiente, aos quais foram acrescentados 600 mL de CIA [clorofórmio:álcool isoamílico 24:1]. Por inversão durante 3 min. o material foi homogeneizado e depois centrifugado a 13.600 g por 5 min. a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para dois novos microtubos de 2 mL, aos quais foi acrescentado 5 mL de RNase A (10 µg/mL), seguido de homogeneização. Após essa etapa, o material foi mantido na estufa a 34°C por 40 min. Após a adição de 600 µL de CIA, os tubos foram homogeneizados por 3 min. e centrifugados a 13.600 g por 5 min. à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para dois microtubos de 1,5 mL, adicionando-se a seguir 50 µL de solução de CTAB 10% [100 mg/mL de CTAB; 81,2 mg/mL NaCl] a 60°C. Após a homogeneização, adicionou-se 600 µL de CIA, invertendo-se os tubos por 3min que foram então centrifugados a 13.600 g por 5 min. à temperatura ambiente. Transferiu-se o sobrenadante para dois novos microtubos de 1,5 mL, adicionando 2/3 do volume de isopropanol -20°C e os tubos incubados a -20°C por 30 min. e na seqüência centrifugados a 4.000 g por 5 min. à temperatura ambiente. Após descartar o sobrenadante, foi adicionado 1 mL de etanol 95% ao precipitado, seguido de incubação a -20°C por 10 min. Os tubos foram centrifugados a 5.100 g por 5 min. (temperatura ambiente) e o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco à temperatura ambiente. Aos tubos contendo DNA, adicionou-se 100 µL de TE [10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA], que foram mantidos à temperatura ambiente por 12-16 horas e, então, armazenados a -20°C, até o momento do uso.

O DNA extraído foi resolvido em eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com solução de 0,02% de brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta T2202 (Sigma, NY, USA), conforme descrito por Sambrook et al. (1989). A quantidade de DNA obtido para cada amostra foi estimada pela comparação com DNA de Fago Lambda com concentrações conhecidas de 20, 50, 100 e 200 ng/ μ L. Para se determinar a pureza do DNA obtido, realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-1203 (Shimadzu, Columbia, USA) em 260 e 280 nm (Sambrook et al., 1989), com três repetições para cada amostra.

Reações de RAPD

Quarenta iniciadores para reações RAPD (kits A e F, Operon Technologies) foram testados, para a seleção de marcadores polimórficos. As reações de RAPD foram realizadas em um termociclador PTC-100 (MJ Research, CT, USA), em um volume de 13 μ L, contendo uma concentração final de tampão de PCR 1X; 2,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs (desoxinucleotídeos trifosfatados); 1 U de *Taq* DNA polimerase; 0,8 mg/mL de BSA (soro albumina bovina); 0,4 μ M de iniciador e 1,2 ng/ μ L de DNA. O ciclo de amplificação foi composto por uma etapa de 4 min. a 92° C, seguido de 35 ciclos de 92° C por 45 s., 35° C por 45 s. e 72° C por 1:30 min., finalizando com 3 min. a 72° C. Junto às amostras a serem amplificadas via PCR, foram adicionados dois controles negativos: um sem DNA e um sem iniciador. Ao DNA amplificado foram acrescidos 3 μ L de tampão de carregamento [2,5 mg/mL de azul de bromofenol; 400 mg/mL de sacarose; 0,02 mg/mL de brometo de etídeo; 12,1mg/mL de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA pH 8,0] e o produto da amplificação foi resolvido em gel de agarose 1,5%, corado com 0,02% de brometo de etídeo, em aparato de eletroforese horizontal submersa, com tampão de cuba TBE 1X [54 mg/mL de Tris-HCl; 27,5 mg/mL de ácido bórico; 0,01 M de EDTA pH 8,0]. A visualização das bandas

foi feita em transiluminador de luz ultravioleta e os resultados registrados em filme polaroid preto e branco.

As bandas resultantes das reações de RAPD foram avaliadas quanto a sua ausência ou presença no gel, construindo-se uma matriz binária para os dados correspondentes às bandas polimórficas. Para a determinação do índice de similaridade de Jaccard, agrupamento das plantas pelo método UPGMA e construção do dendograma correspondente, foi utilizado o programa NTSYSpc 2.02 (Rolf, 1990). A diversidade genética foi estimada pelo índice de Shannon (1948), determinado por $-S \sum p_i \ln(p_i)$, considerando cada banda como um loco com dois alelos.

Resultados e Discussão

Coleta e acondicionamento das amostras

A quantidade do DNA extraído a partir de acículas acondicionadas em sílica gel ou em caixas térmicas com gelo, mostrou-se equivalente na análise dos géis de agarose. Porém, em materiais acondicionados em caixas térmicas com gelo e armazenados a -20°C por uma semana a três meses, observou-se sinais de degradação do DNA. A utilização de sílica gel agiliza o trabalho de coleta no campo e pode ser um fator diferencial em casos de armazenamento do material vegetal por um período mais longo, reduzindo os riscos de degradação, uma vez que promove uma ligeira desidratação deste e conseqüente conservação (Stefenon e Nodari, 2001).

Extração do DNA

Os oito protocolos de extração de DNA testados foram utilizados como base para a síntese e padronização de um protocolo, descrito na seção Material e Métodos, e utilizado para

extrair DNA de amostras que foram submetidas às reações de amplificação com iniciadores decâmeros.

Os principais metabólitos contaminantes das amostras de DNA de *A. angustifolia* são os compostos fenólicos (Fonseca et al., 2000), as proteínas (Mazza e Bittencourt, 2000) e os polissacarídeos. Diferentes protocolos usam diferentes componentes para evitar a presença destes contaminantes na solução de DNA final.

Dentre os protocolos testados para a extração de DNA de araucária, alguns não continham PVP no tampão de extração enquanto outros continham esse composto em concentração de 1%. Esses protocolos acabaram por gerar precipitados de DNA de coloração escura. Rogers e Bendich (1985) citam a necessidade de utilizar PVP para a purificação do DNA extraído em algumas espécies, as quais apresentam precipitados escuros quando este composto não é acrescido ao tampão de extração. Precipitados escuros de DNA são formados devido à ligação covalente de polifenóis oxidados ao DNA (Peterson et al., 1997) e podem ser evitados pela utilização de altas concentrações de PVP e 2-mercaptoetanol no tampão de extração (Wang et al., 1996; Cheng et al., 1997).

Considerando a presença de polifenóis nos tecidos de araucária, a adição de PVP em concentração de 2%, juntamente com 2-mercaptoetanol 1%, possibilitou a inibição da oxidação dos polifenóis e auxiliou na eliminação destes compostos, gerando precipitados de DNA incolores na precipitação com isopropanol. Essa característica do precipitado pode ser avaliada como ausência de polifenóis e melhor qualidade do DNA extraído.

Após três extrações orgânicas com clorofórmio (CIA) e uma etapa de lavagem com solução de CTAB 10% utilizada para a eliminação de polissacarídeos da amostra (Rogers e Bendich, 1985 e 1988), a razão OD_{260}/OD_{280} apresentou valores entre 1,7 e 2,0 em 80% das amostras, indicando que a contaminação das

amostras com proteínas foi mínima (Sambrook et al., 1989). Para cada amostra de DNA, foram realizadas três leituras no espectrofotômetro e a partir da média desses valores, realizou-se o cálculo da razão OD_{260}/OD_{280} . Estas repetições eliminam, ao menos em parte, erros relacionados à preparação das amostras e leitura no espectrofotômetro.

Quando o DNA extraído passou por somente uma ou duas extrações com clorofórmio, os dados de espectrofotometria indicaram uma maior contaminação com proteínas, com valores médios de 1,2 para a razão OD_{260}/OD_{280} . Como não se procedeu a adição de proteinase K ao tampão de extração, pode-se inferir que as proteínas foram desnaturadas pelo 2-mercaptoetanol e eliminadas pela extração orgânica repetida três vezes.

Utilizando-se o protocolo padronizado para a espécie, a quantidade de DNA obtido nas extrações, estimado em gel de agarose (Figura 1), foi entre 33,3 e 400 mg, com um valor médio de 147,3 mg de DNA por g de tecido.

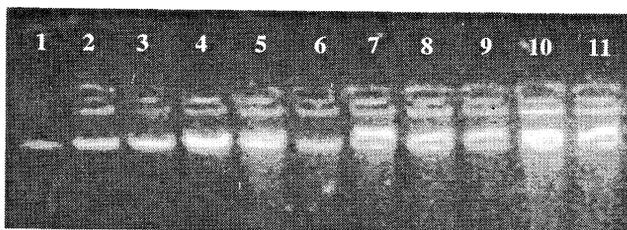


FIGURA 1: Amostras de DNA quantificadas em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio 0,02%. Linhas 1 a 4: DNA lambda com concentração de 20, 50 100 e 200 ng/mL, respectivamente. Linhas 5 a 11: DNA extraído a partir de acículas de araucária, utilizando-se o método descrito no presente trabalho.

Um método de extração de DNA otimizado para *A. angustifolia* foi descrito por Mazza e Bittencourt (2000). Este protocolo apresenta uma etapa de liofilização do material por um período de 72 horas, seguido de duas etapas de extração orgânica com clorofórmio e precipitação com etanol absoluto,

70% e 95%, respectivamente, utilizando-se trinta minutos para cada lavagem. Apesar dos resultados satisfatórios quanto à quantidade e qualidade do DNA obtido (valor médio de 110,65 mg de DNA por g de tecido e 77% das amostras com razão OD_{260}/OD_{280} entre 1,7 e 2,0), o método é moroso e demanda de longo tempo para tratamento prévio do material vegetal.

Uma vez que estudos da diversidade genética de populações naturais utilizam-se de um grande número de plantas amostradas, um protocolo de extração que proporcione uma rápida obtenção de DNA é desejável, para a otimização do processo de análise. O método apresentado no presente trabalho elimina a etapa de liofilização e permite a precipitação do DNA com isopropanol (30 min.) e etanol 95% (10 min.), possibilitando a extração de DNA de 30 amostras em um período de oito horas de trabalho.

Reações de RAPD e análise da diversidade genética

As reações de RAPD apresentaram melhores resultados com aumento nas concentrações de dNTPs, magnésio e DNA no coquetel descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). O ciclo de PCR descrito por Mazza (1997) foi otimizado por inclusão de uma etapa inicial de desnaturação, por redução nos tempos de desnaturação, ligação dos iniciadores e extensão e pelo acréscimo de um período final de extensão de 5 minutos. A figura 2 apresenta o padrão de bandas obtido com o iniciador OPA17 na população estudada.

Dos quarenta iniciadores testados, quatro (OPA04, OPA09, OPA17, OPF16) apresentaram polimorfismo (10%), gerando um total de onze marcadores RAPD polimórficos para a população de araucárias do PEM de Lages.

Trabalhando com marcadores RAPD para análise da diversidade genética entre seis populações naturais de araucária e utilizando a técnica de análise de *Bulks*, Mazza (1997) obteve

14% de iniciadores polimórficos (5 em 36). O nível de polimorfismos é dependente não só do número de indivíduos amostrados, mas também do número de populações (Brown e Marshall, 1995). Assim, a comparação entre os níveis de polimorfismo obtidos, 10 e 14% respectivamente, não é apropriada, uma vez que no presente trabalho foram usados 30 indivíduos de uma única população, enquanto no trabalho realizada por Mazza (1997) foram utilizados seis *bulks* populacionais formados com um número não mencionado de indivíduos.

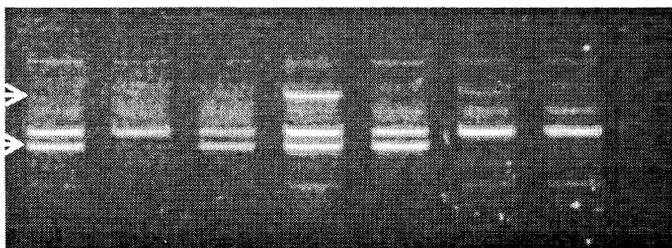


FIGURA 2: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio 0,02%, demonstrando o padrão de bandas obtidas em reação RAPD com o iniciador OPA17 (Operon Technologies). Colunas 1 a 7: diferentes genótipos de araucária, apresentando polimorfismo em duas bandas identificadas pelas setas (®). Coluna 8: controle negativo da PCR (sem DNA).

Esse número de iniciadores polimórficos pode ser considerado baixo, quando comparado com o nível de polimorfismo de locos isoenzimáticos, que varia entre 20% e 80%, com uma média de 42,6% (Shimizu et al., 2000; Auler et al., 2002; Mantovani et al., 2002). Apesar de marcadores isoenzimáticos e RAPD não serem necessariamente equivalentes para comparação com relação ao polimorfismo, Auler et al. (2002) demonstraram também que populações com maior grau de degradação apresentam menor polimorfismo para locos isoenzimáticos.

Todavia, outros trabalhos têm apresentado um baixo polimorfismo para marcadores RAPD em espécies lenhosas

(Chong et al., 1994; Barrett et al., 1997), o que pode ser uma característica comum para algumas espécies florestais.

Dessa forma, o nível de degradação da população de araucárias do PEM de Lages, aliada a características próprias da espécie podem ser o fator responsável pelo baixo polimorfismo obtido, quando comparado com outras espécies vegetais como *Picea abies* (Bucci e Menozzi, 1995) e *Pinus* spp. (Kubisiak et al., 1995), que apresentaram 77,6 e 59,7, respectivamente.

Estudos de análise da diversidade genética da mesma população, realizados com marcadores isoenzimáticos (Auler et al., 2002) e PCR-RFLP (Schögl, 2000), apresentaram valores de diversidade, estimados a partir da heterozigosidade observada, iguais a 0,058 e zero, respectivamente. A partir dos dados originais, o índice de diversidade genética de Shannon foi determinado para esses dois marcadores. A diversidade genética para marcadores isoenzimáticos foi $H=0,29$, enquanto para marcadores PCR-RFLP foi $H=0,0$. Para os marcadores RAPD, o índice de diversidade de Shannon foi $H=0,50$, valor superior ao obtido com os outros dois marcadores, para a mesma população.

Apesar da vantagem de serem marcadores co-dominantes, que permitem caracterizar uma população quanto às frequências alélicas e genotípicas, uma limitação pertinente aos locos isoenzimáticos é o baixo número de locos acessado (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Marcadores PCR-RFLP utilizados por Schögl (2000) para a caracterização da diversidade genética de populações naturais de araucária pela análise direta do DNA também apresentaram limitação, pois apenas parte da região genômica do cloroplasto foi acessada. Estas limitações podem ser superadas pelos marcadores RAPD, que apesar de sua característica dominante, possibilitam o acesso ao genoma total de cada indivíduo, gerando mais informação que esses dois outros marcadores.

Todavia, deve-se ressaltar que qualquer planejamento estratégico de recuperação de áreas degradadas, conservação de remanescentes ou melhoramento genético de *A. angustifolia* não deve limitar-se à utilização de poucos marcadores, como os apresentados no presente estudo, mas sim utilizar o máximo possível de informação.

Tomando como base uma similaridade genética aleatória de 50% no dendograma correspondente à população estudada (Figura 3), sete grupos de plantas foram obtidos. Três sub-grupos apresentaram 100% de semelhança (1, 4 e 11; 13, 26 e 27; 15 e 18), enquanto a planta 30 apresentou a menor similaridade (24%) com relação às demais.

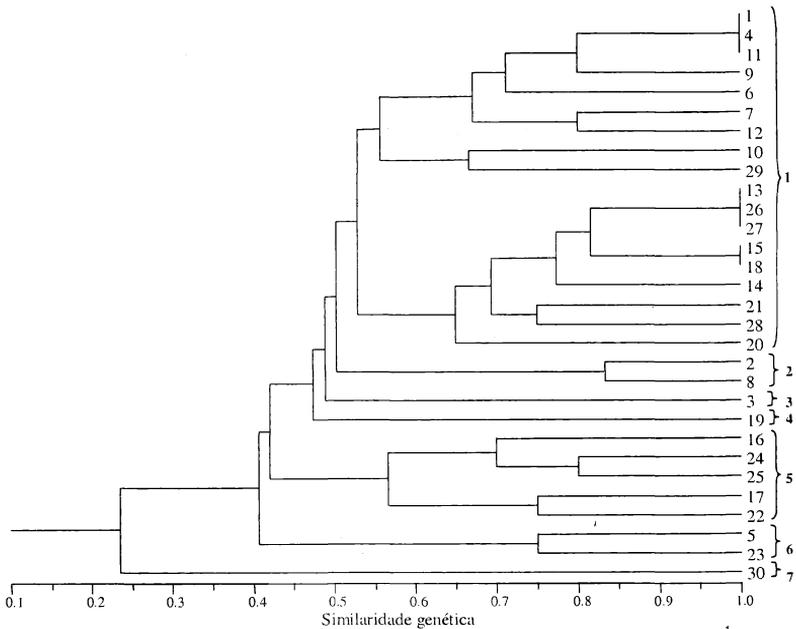


FIGURA 3: Dendrograma baseado no coeficiente de similaridade genética de Jaccard e agrupamento UPGMA, da população natural de *Araucaria angustifolia* do PEM de Lages (n=30), a partir de onze marcadores RAPD. (Coeficiente de correlação cofenética = 0,7)

A partir destes dados, pôde-se constatar que os marcadores RAPD apresentam uma capacidade informativa importante, por permitir o acesso a uma ampla região genômica. Mesmo sendo marcadores dominantes, os dados gerados permitem que, utilizando-se o índice de Shannon, se obtenha de um valor numérico para a diversidade genética muito próximo do valor de heterozigiosidade, determinado por marcadores co-dominantes (Lewontin, 1972).

Agradecimentos

Ao CNPq, UNIPLAC e FUNCITEC pelo apoio financeiro e à Prefeitura do Município de Lages pelo apoio na obtenção das amostras vegetais do Parque Ecológico Municipal.

Referências Bibliográficas

- Auler, N. M. F.; Reis, M. S.; Guerra, M. P.; Nodari, R. O. 2002. The genetics conservation of *Araucaria angustifolia*: I: genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, **25** (3): 329-338.
- Barrett, C.; Lefort, F.; Douglas, G. C. 1997. Genetic characterisation of oak seedlings, epicormic, crown and micropropagated shoots from matures tree by RAPD and microsatellite PCR. **Scientia Horticulturae**, **70**: 319-330.
- Brown, A. H. D.; Marshall, D. R. 1995. A basic sampling strategy: theory and practice. In: Guarino, L.; Ramanatha Rao, V. & Reid, R. (eds). **Collecting plant genetic diversity: technical guidelines**. CAB International, Oxon, UK, p. 75-91.
- Bucci, G.; Menozzi, P. 1995. Genetic variation of RAPD markers in a *Picea abies* Karst. population. **Heredity**, **75**: 188-197.

Cheng, F. S.; Brown, S. K.; Weeden, N. F. 1997. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. **HortScience**, **32** (5): 921-922.

Chong, D. K. X.; Yang, R.; Yeh, F. C. 1994. Nucleotide divergence between populations of trembling aspen (*Populus tremuloides*) estimated with RAPDs. **Current Genetics**, **00**: 374-376.

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, **12** (1): 13-15.

Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. 1998. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares**. 3ª ed. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, Brasil, 220 pp.

Fonseca, F. N.; Ferreira, A. J. S.; Sartorelli, P.; Lopes, N. P.; Floh, E. I. S.; Handro, W.; Kato, M. J. 2000. Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, **55**: 575-580.

Hattori, J.; Gottlob-McHugh, S. G.; Johnson, D. A. 1987. The isolation of high-molecular-weight DNA from plants. **Analytical Biochemistry**, **165**: 79-74.

Kageyama, P. Y.; Jacob, W. S. 1980. Variação genética entre e dentro de progênes de uma população de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **IUFRO: Meeting on Forestry Problems of Genus Araucaria**, Curitiba, Brasil, p. 83-86.

Kubisiak, T. L.; Nelson, W. L.; Nance, W. L.; Stine, M. 1995. RAPD linkage mapping in a longleaf pine x slash pine F1 family. **Theoretical and Applied Genetics**, **90**: 1119-1127.

Lewontin, R. C. 1972. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, **6**: 381-390.

Mantovani, A.; Morellato, L. P. C.; Reis, M. S. 2002. 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.

Mazza, M. C. M. 1997. Use of RAPD markers in the study of genetic diversity of *Araucaria angustifolia* (Bert.) populations in Brazil. **International Foundation for Science**, Florianópolis, Brasil, p. 103-111.

Mazza, M. C. M.; Bittencourt, J. V. M. 2000. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisas Florestais Colombo**, **41**: 12-17.

Murray, M. G.; Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, **8** (19): 4321-4325.

Peterson, D. G.; Boehm, K. S.; Stack S. M. 1997. Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), a plant containing high levels of polyphenolic compounds. **Plant Molecular Biology Reporter**, **15** (2): 148-153.

Rogers, S. O.; Bendich, A. J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. **Plant Molecular Biology**, **5**: 69-79.

Rogers, S. O.; Bendich, A. J. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. **Plant Molecular Biology Manual**, **A 6**: 1-10.

Rolf, F. J. 1990. **NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis**. Applied Biostatistics inc., New York, USA, 139 pp.

Romano, E.; Brasileiro, A. C. M. 1999. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia Ciência Desenvolvimento**, **2** (9): 40-43.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**. v. 3. 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, 215 pp.

Schlögl, P. S. 2002. **Análise da diversidade genética em regiões não codificadoras de DNAs de cloroplastos em *Araucaria angustifolia* por PCR-RFLP.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 64pp.

Shannon, C. E. 1948. A mathematical theory of communication. **The Bell System Technical Journal**, **27**: 379 - 423.

Shimizu, J. Y.; Higas, A. R. 1980. 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, p. 78-82.

Shimizu, J. Y.; Jaeger, P.; Sopchaki, S. A. 2000. Variabilidade genética em uma população remanescente de araucária no Parque Nacional do Iguaçu, Brasil. **Boletim de Pesquisas Florestais Colombo**, **41**: 18-36.

Stefenon, V. M.; Nodari, R. O. 2001. Extração de DNA para estudos genéticos em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Uniplac: Revista de Divulgação Científica e Cultural**, **4** (1-2): 115-131.

Wang, X. D.; Wang, Z. P.; Zou Y. P. 1996. An improved procedure for the isolation of nuclear DNA from leaves of wild grapevine dried with silica gel. **Plant Molecular Biology Reporter**, **14** (4): 369-373.

Welsh, J.; McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, **18** (24): 7213-7218.

Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, **18** (22): 6531-6535.

