

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MÔNICA BOLSON

APLICAÇÃO DE *DNA BARCODING* EM ESPÉCIES VEGETAIS ARBÓREAS DA
FLORESTA OMBRÓFILA MISTA

CURITIBA

2012

MÔNICA BOLSON

APLICAÇÃO DE *DNA BARCODING* EM ESPÉCIES VEGETAIS ARBÓREAS DA
FLORESTA OMBRÓFILA MISTA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Botânica, no Curso de Pós-Graduação Botânica, Área de Concentração em Taxonomia e Diversidade (Fanerógamas e Pteridófitas), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane da Silva Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt

CURITIBA

2012



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BOTÂNICA

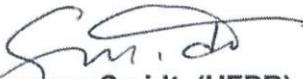


"APLICAÇÃO DE DNA *BARCODING* EM ESPÉCIES VEGETAIS ARBÓREAS DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA"

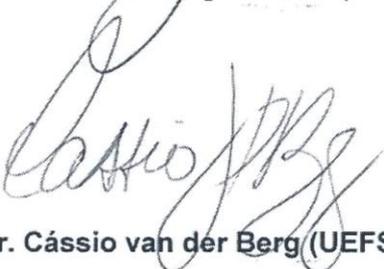
por

MÔNICA BOLSON

Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão
formada pelos Professores



Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt (UFPR) - PRESIDENTE



Prof. Dr. Cássio van der Berg (UEFS)



Prof. Dr. Renato Goldenberg (UFPR)

Curitiba, 02 de abril de 2012.

Dedico este trabalho aos meus
pais, Clóvis e Lorilda, por todo o
amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que este trabalho fosse concretizado, pessoas maravilhosas e especiais:

À Prof^a. Dr^a. Viviane Pereira da Silva pela orientação exemplar, por toda a confiança e os valerosos conselhos e ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt pela excelente co-orientação, pela sugestão do trabalho, e pelas ótimas oportunidades que proporcionou à minha formação, agradeço também pelas belas fotos.

Aos meus dois ORIENTADORES, meu muito obrigada, por acreditarem sempre e despertarem-me para a possibilidade de chegar lá...

À Prof^a Dr^a Sonia Marisa Hefler, que me encaminhou para o mundo da botânica, pelo incentivo e amizade.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Paraná.

À secretária Elizabeth R. Xisto (Beth), pela dedicação com os alunos e pelo bom humor.

Aos engenheiros florestais Christopher T. Blum e Marcelo L. Brotto pela ajuda com as coletas e identificações das espécies e por todas as fotos maravilhosas.

Aos funcionários do Museu Botânico Municipal que disponibilizaram sua coleção e pelo auxílio nas identificações das coletas.

À Marília N. Moreira pela elaboração do mapa e por toda a ajuda.

A Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Curitiba, ao Jardim Botânico Municipal de Curitiba e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela concessão das licenças de coleta.

Ao REUNI/ CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e a Fundação Araucária, ao CNPq e a Br-BOL pela ajuda financeira com o projeto.

À Elaine L. P. Nunes pelo treinamento no laboratório, pelo aprendizado e pela companhia, principalmente nas horas de cerão; e as demais companheiras do Laboratório de Filogenia e Genética da Conservação de Plantas, Patrícia, Carolina S, Carolina R. e Giovanna, pelos “quebra-galhos” do “lab” e pelas boas risadas.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Sistemática Vegetal, Tássia, Duane, Marizete, Julia, Cristiane, André, Cássio, Jovani, Carla, Ana Paula, Daniela, Suelen, Frederico e Fabrício, pela companhia e momentos de descontração.

À Marizete G. da Silva, querida amiga que tanto me apoiou neste mestrado, pelos bons momentos de convivência.

Aos meus pais, Clóvis e Lorilda Bolson, e a minha irmã Mariane Bolson, pelo amor, por sempre acreditarem em mim e pelo apoio no caminho que escolhi.

Aos meus tios, Flávio e Celita Fornari, pela acolhida e hospitalidade durante esses dois anos em Curitiba, pelo conforto nos momentos difíceis, pela colaboração, enfim, pelo aprendizado diário.

Ao meu namorado Guilherme A. Siega, pelo amor e carinho, por todo o incentivo, apoio, compreensão e pelo companheirismo incondicional.

A Deus por ter me guiado, e iluminado todos os anos de minha vida, e por ter me concedido a graça de realizar este trabalho.

A todos, enfim, o meu muito obrigada!

RESUMO

O Brasil, por abrigar uma das maiores biodiversidades do mundo, recentemente se juntou aos demais países comprometidos com a geração de informação molecular das mais variadas espécies de organismos do planeta. Dentro deste contexto, o presente estudo testou a aplicabilidade da técnica de *DNA Barcode* em plantas. Esta ferramenta molecular, que utiliza sequências de regiões específicas do DNA para a identificação de espécies, foi aqui testada em espécies arbóreas e as com potencial madeireiro da Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária), a partir das regiões *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* (DNA plastidial) e *ITS* (DNA nuclear). Os resultados deste trabalho são apresentados em dois capítulos. O primeiro aborda a aplicação do *DNA Barcoding* em 131 espécies arbóreas (988 sequências de 304 indivíduos), como auxílio a inventários florísticos, e mostraram que o maior sucesso de identificação correta das espécies foi em *ITS* e *trnH-psbA* e a combinação destas duas regiões. As análises filogenéticas obtidas de NJ, mostrara que a árvore mais bem resolvida e suportada foi da combinação *trnH-psbA+ITS*, com 71% das espécies monofiléticas. Deste modo, recomenda-se a combinação das regiões *trnH-psbA* e *ITS* como ferramenta molecular no auxílio a inventários florísticos do estrato arbóreo da Floresta com Araucária no Sul do Brasil. O segundo capítulo trata da aplicação da técnica como recurso forense na identificação das principais espécies com potencial madeireiro. A partir de 33 espécies foram obtidas 367 sequências de 112 indivíduos. Entre todas as regiões e as diferentes combinações, *ITS* foi a mais eficiente para a correta identificação das espécies, sendo que a combinação *trnH-psbA+ITS* mostrou desempenho semelhante. As análises filogenéticas obtidas a partir de Neighbor-Joining, Máxima Verossimilhança e Máxima Parcimônia mostraram, baseando-se na média da porcentagem de espécies monofiléticas, melhor desempenho em *ITS*, *trnH-psbA+ITS* e *matK+trnH-psbA+rbcL*. Analisando a praticidade da técnica, indicamos *ITS* como *barcode* dessas espécies, por se tratar de uma única região com o melhor sucesso de identificação e melhor resolução de espécies monofiléticas na árvore gerada pelo método mais prático (Neighbor-Joining). A partir dos resultados obtidos neste estudo, a técnica de *DNA Barcode* demonstrou ser uma ferramenta útil na identificação da maioria das espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Mista.

Palavras-chave: Identificação de espécies. Flora arbórea. Floresta com Araucária.
Marcadores moleculares.

ABSTRACT

Covering one of the greatest biodiversity in the world, Brazil recently joined the other countries committed on the generation of molecular information of many different species around the planet. In this context, this study tested the applicability of DNA Barcoding in plants. This molecular tool, that uses sequences of DNA from specific regions for species identification, was tested on tree species from “Floresta Ombrófila Mista” (Araucaria Forest), applying *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* (plastid DNA) and *ITS* (nuclear DNA) DNA regions. The results are presented in two chapters. In the first approach, the DNA Barcoding was applied on 131 tree species (988 sequences of 304 individuals), as an auxiliary framework for floristic inventories. The technique showed that the most correct success species identification was obtained by *ITS* and *trnH-psbA* and by the combination of this two regions. The phylogenetic analysis using NJ showed the best resolved and supported tree was obtained by the combination *trnH-psbA+ITS*, with 71% of monophyletic species. In this way, it is recommended the combination of regions *trnH-psbA* e *ITS* as a molecular tool for barcoding in floristic inventories of tree layer of Araucaria Forest in the South Brazil. The second chapter concerns the technical application of barcodes as a forensic resource for identifying the main species with wood potential use. For a set of 33 species were produced 367 sequences from 112 individuals. Among all DNA regions and the different combinations, *ITS* was the most efficient for correct species identification, and the combination *trnH-psbA+ITS* showed similar performance. The phylogenetic analysis using Neighbor-Joining, Máxima Verossimilhança and Máxima Parcimônia showed that the best performance was obtained with *ITS*, *trnH-psbA+ITS* e *matK+trnH-psbA+rbcL*, based on the average percentage of monophyletic species. Considering the technical practicality, we indicate *ITS* as barcode of this species, because this single region presents the greatest success of identification and the best resolution of monophyletic species in a tree obtained from the most practical method (Neighbor-Joining). In conclusion, the DNA Barcoding seems to be a useful tool for identification the majority of the tree species Ombrophilous Mixed Forest.

Key-words: Species identification. Tree flora. Araucaria Forest. Molecular markers.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO I: IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES ARBÓREAS DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE <i>DNA BARCODE</i>	25
Resumo	27
Introdução	29
Material e Métodos	32
Área de estudo e coleta das amostras	32
Extração de DNA, amplificação e sequenciamento.....	33
Alinhamento das sequências e análises	34
Resultados	37
Sequenciamento de DNA	37
Variação intraespecífica e interespecíficas	37
Sucesso de identificação das regiões <i>barcode</i>	38
Reconstrução filogenética	38
Discussão	40
Agradecimentos	44
Referências Bibliográficas	45
APÊNDICES	60
CAPÍTULO II: APLICAÇÃO DE <i>DNA BARCODING</i> EM ESPÉCIES MADEIRÁVEIS DA FLORESTA COM ARAUCÁRIA	86
Resumo	88
Introdução	90
Material e Métodos	92
Área de estudo	92
Coleta das amostras	93
Extração de DNA, amplificação e sequenciamento.....	94
Alinhamento das sequências e análises	95
Resultados	97
Sucesso de sequenciamento	97
Avaliação das divergências intraespecífica e interespecífica	98
Performance das regiões <i>barcode</i> na identificação das espécies.....	98
Teste de monofiletismo baseado em árvores filogenéticas	99
Discussão	100
Agradecimentos	104
Referências Bibliográficas	107
APÊNDICES	129
CONSIDERAÇÕES FINAIS	143

INTRODUÇÃO

O Brasil, considerado um dos países que abrigam a maior diversidade mundial, vem sofrendo acelerada perda de espécies em todos os seus biomas. A Mata Atlântica, considerada um dos principais biomas brasileiros, inclui uma grande variedade de fitofisionomias e composições em toda a região leste do país (METZGER, 2009) compreendendo uma diversidade de espécies maior que a floresta amazônica, com muitas espécies endêmicas (COLOMBO; JOLY, 2010; WERNECK *et al.*, 2011).

A área original da Mata Atlântica é estimada em 150 milhões de ha, restando atualmente apenas cerca 11% de vegetação (RIBEIRO *et al.*, 2009), sendo esta pequena porcentagem encontrada principalmente em pequenos remanescentes biologicamente empobrecidos, e que continuam sob pressão antrópica (STEHMANN *et al.*, 2009).

Entre suas composições florestais, destaca-se a Floresta Ombrófila Mista (FOM) (FIGURA 1), conhecida também como Floresta com Araucária ou Pinheiral (VELOSO *et al.*, 1991), que passou por uma drástica redução da área de distribuição de suas espécies vegetais, sendo considerada um dos ecossistemas mais ameaçados do país. Encontrada especialmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, a oeste da Serra do Mar, em altitudes médias de 500 a 600 m (HUECK, 1972), a FOM sofreu uma diminuição da cobertura vegetal devido ao uso crescente da terra. Tal diminuição deriva do desmatamento para a ocupação agrícola, a implantação de pastagem, associados à práticas inadequadas ao uso do solo; e a extração da madeira sem manejo, principalmente da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (pinheiro-do-paraná), espécie originalmente dominante e símbolo da região, e da *Ocotea porosa* (Nees & C. Mart.) Barroso (imbuia) (KOZERA *et al.*, 2006).

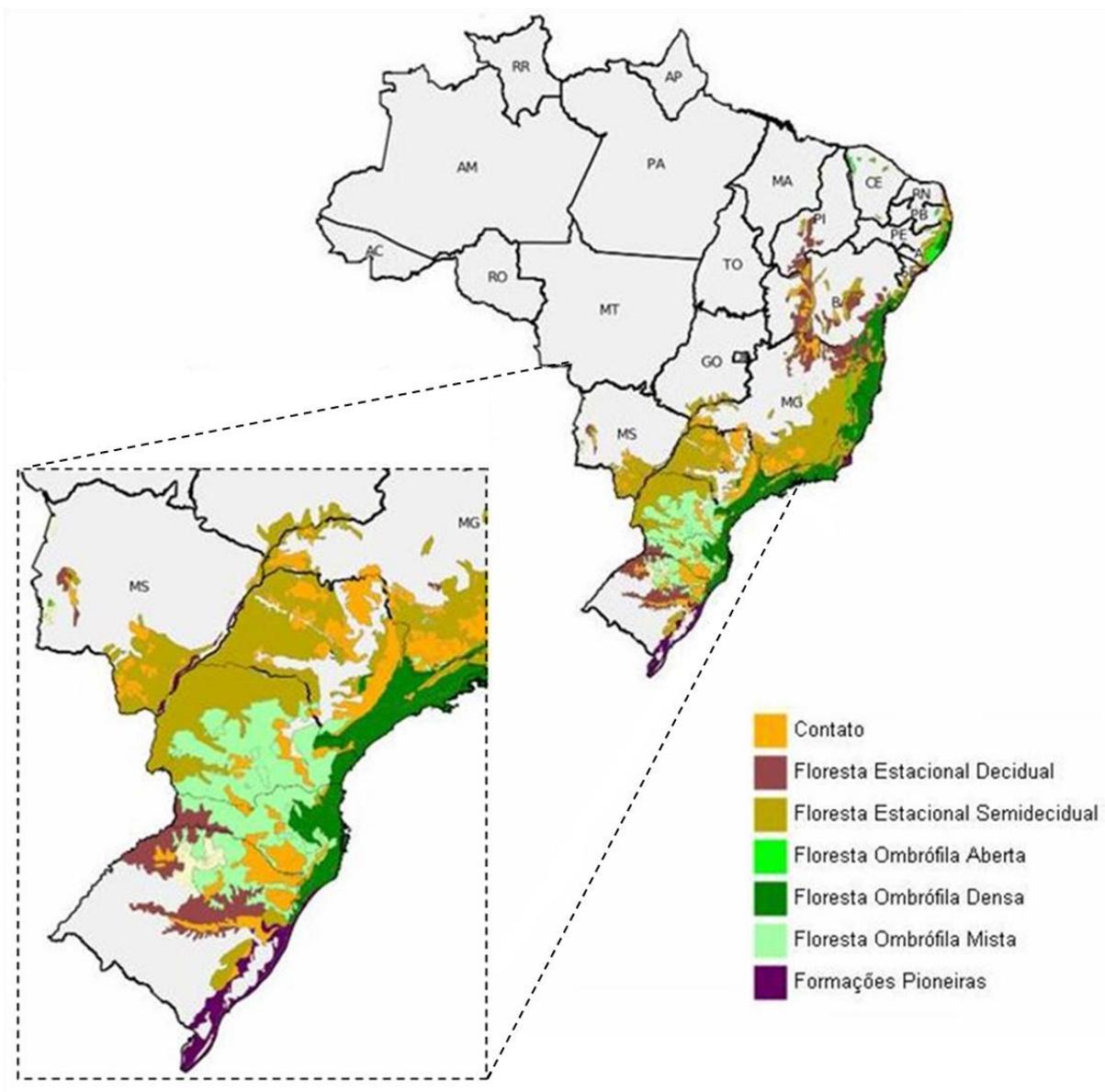


FIGURA 1 - ÁREA DE DOMÍNIO DA MATA ATLÂNTICA, DESTACANDO A FLORESTA OMBRÓFILA MISTA.

FONTE: FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA (2008), MODIFICADO PELA AUTORA.

Buscando estratégias para a conservação da biodiversidade do planeta, têm se discutido e elaborado ao longo das últimas décadas, alternativas aplicáveis e passíveis de serem adotadas por instituições públicas de ensino e pesquisa no Brasil. Isto torna nosso país capaz e com o compromisso de inventariar sua biodiversidade, criando estratégias para mantê-la devidamente documentada. Uma das principais formas de atuação é a implantação de coleções biológicas, adotadas como patrimônio público e mantidas permanentemente para a conservação *ex-situ*

tanto de organismos vivos, como de amostras fixadas ou através de bancos de DNA total dos organismos de interesse (van den BERG, 2005).

Os bancos de DNA total de plantas são algo bastante recente, iniciados nos últimos 25 anos, e têm como principal finalidade a estocagem de material genético para assegurar a preservação da informação genética dos organismos para diferentes finalidades. Várias metodologias podem ser empregadas a partir de dados genéticos associados aos bancos de DNA e de sequências nucleotídicas levando-se em conta a diversidade de técnicas moleculares e a gama de aplicações que podem ser desenvolvidas. A aplicabilidade pode ser em longo prazo, como na bioprospecção de genes de interesse biotecnológico, médico ou farmacêutico, ou em curto prazo, como na conservação da informação genética de plantas de interesse econômico ou na utilização de técnicas para a identificação forense de espécimes amostrados na natureza (HEBERT *et al.*, 2003; van den BERG, 2005).

Recentemente têm sido desenvolvidas técnicas moleculares denominadas "*DNA Barcode*" ou "códigos de barra de DNA" (HEBERT *et al.*, 2003), que consiste em um sistema único e universal com o objetivo de identificar todos os organismos à nível específico, utilizando-se sequências de regiões específicas do DNA. A partir disso, é possível implantar uma biblioteca referência de sequências de DNA, produzidas a partir de espécimes previamente identificados. Esta biblioteca permite a identificação de outros indivíduos da mesma espécie a partir de qualquer tecido vivo ou conservado, de forma rápida e precisa, aumentando a nossa capacidade de inventariar a diversidade de organismos na natureza (van den BERG, 2005).

Uma região ideal para o código de barras de DNA deve atender alguns critérios: sequência com comprimento curto, facilitando a amplificação; facilmente sequenciada; suficientemente variável para separar espécies irmãs; e apresentar sítios conservados para o desenvolvimento de *primers* universais (FORD *et al.*, 2009; NEWMASTER; FAZEKAS; RAGUPATHY, 2006).

A técnica de *DNA Barcode* em animais já é um recurso bastante estabelecido com a utilização de uma parte da sequência do gene da subunidade I da citocromo oxidase (COI) do DNA mitocondrial (HEBERT *et al.*, 2003), fragmento com comprimento aproximado de 650 pares de bases (pb) (HEBERT; GREGORY, 2005). A escolha desta região se deve ao fato de ser amplamente distribuída entre os animais e possuir alto número de cópias por célula, além de apresentar sequências nucleotídicas conservadas com variação suficiente entre espécies, para que elas

possam ser discriminadas, mas com variação mínima quando se compara indivíduos da mesma espécie (HOLLINGSWORTH; GRAHAM; LITTLE, 2011; NEWMASTER; FAZEKAS; RAGUPATHY, 2006).

Em plantas, a baixa taxa de variação nas sequências dos genes mitocondriais levou diversos grupos de pesquisa, denominados *Plant Working Group for Barcode* (PWG) do *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), a testar diferentes regiões promissoras (HEBERT; GREGORY, 2005). Inicialmente, foi estabelecido que somente as regiões *matK* e *rbcL*, do genoma plastidial (cpDNA), deveriam ser utilizadas como *barcode* em plantas e que a adição de outras regiões não aumentavam significativamente a resolução considerando o esforço desnecessário para sequenciamento de mais regiões (LAHAYE *et al.*, 2008; CBOL - PLANT WORKING GROUP, 2009).

O gene *matK* que codifica a proteína maturase K é um dos mais variáveis encontrados nas Angiospermas, com aproximadamente 1570 pb de comprimento. Tem sido utilizado com frequência em estudos filogenéticos no nível de Ordem e Família, devido sua alta taxa evolutiva, sendo recomendado em alguns casos para Gêneros e Espécies (YU; XUE; ZHOU, 2011). Para o *barcode* o segmento utilizado compreende aproximadamente 790 pb (STOECKLE *et al.*, 2011). *rbcL*, gene codificante de uma proteína altamente conservada, a ribulose-1,5-bisfosfato ou Rubisco, tem um comprimento aproximado de 1400 pb (FORD *et al.*, 2009), porém nesta técnica utiliza-se uma porção menor com aproximadamente 550 pb (STOECKLE *et al.*, 2011). Sua escolha como *barcode* está relacionada por ser um gene quase comum entre as plantas e pela sua utilização histórica em estudos filogenéticos (FORD *et al.*, 2009).

No entanto, a baixa resolução para a identificação molecular no nível de espécie e problemas com a amplificação de *matK* levou o CBOL recomendar a inclusão de uma região complementar, *trnH-psbA* (KRESS *et al.*, 2005). De acordo com Štorchová e Olson (2007) o espaçador intergênico não-transcrito, *trnH-psbA*, facilmente amplificado e sequenciado com apenas um par de *primers* na maioria dos taxa, apresenta alta variação de nucleotídeos, com comprimento entre 200-500 pb na maioria das espécies de Angiospermas e Gimnospermas, o que pode dificultar o alinhamento das sequências. Uma característica atípica foi encontrada por Shaw *et al.* (2005) nos gêneros *Trillium* e *Pseudotrillium*, que observaram fragmentos com até 1077 pb nesta região. No geral, sendo uma região relativamente curta, *trnH-psbA*

apresenta um número baixo de PICs (Caracteres Potencialmente Informativos), isso torna difícil a distinção de espécies relacionadas (SHAW *et al.*, 2007). No entanto, estes mesmos autores concordam com a inclusão desta região como candidato para o *barcode*, pois fazem referência à necessidade da inclusão de mais marcadores, especialmente de cpDNA, nesta técnica.

Alguns pesquisadores recomendaram ainda a inclusão do espaçador interno transcrito (*ITS*) do DNA nuclear ribossômico como um bom ponto de partida para teste em *DNA Barcoding* com várias amostras de Angiospermas (KRESS *et al.*, 2005; YAO *et al.*; 2010), pois também é amplamente utilizado em estudos filogenéticos e de sistemática mostrando-se eficiente na discriminação de espécies. Mais recentemente, Hollingsworth (2011) também indicou a adição desta região para o *DNA Barcode* de plantas, comentando que a inclusão de uma região com herança biparental pode ser um fator que contribui para o aumento do sucesso na discriminação das espécies, quando comparada com os marcadores plastidiais que são predominantemente herdados por linhagem materna. Transcritos como uma única unidade, os genes 18S e 26S codificam, respectivamente, as subunidades pequena e grande do ribossomo, e são separados por um gene menor (5,8S) (JUDD *et al.*, 2009). Entre estes três genes é que se encontram os espaçadores internos transcritos (*ITS1* e *ITS2*), regiões selecionadas como candidatas ao *barcode*. A aplicação deste marcador para a identificação molecular de plantas medicinais teve resultados satisfatórios na diferenciação de várias espécies (GAO *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2010).

O uso de sequências *barcode* como alternativas moleculares para a identificação de espécies é feito através da comparação entre sequências do material de interesse, podendo este ser colhido em qualquer estágio da vida do indivíduo, com aquelas depositadas em bancos de sequências obtidas de amostras bem identificadas e que possuem material testemunho acessível. Tais técnicas podem ser utilizadas como um recurso forense na confirmação de espécies utilizadas como comida, chás ou de uso medicinal tradicional, auxiliar o reconhecimento das espécies de plantas apreendidas em explorações indevidas, no transporte de espécies controladas. Em termos científicos, podem auxiliar também em inventários florísticos e delimitações taxonômicas em complexo de espécies, onde nem sempre é possível a coleta de indivíduos completos para a identificação taxonômica a partir de padrões morfológicos (JANZEN, 2003; HEBERT *et al.*, 2003).

Vários trabalhos se utilizaram desta técnica testando diferentes regiões para diversas finalidades. Na tentativa de se resolver delimitações taxonômicas, se destacam a identificação de espécies de Cycadales (SASS *et al.*, 2007), espécies do gênero *Berberis* (ROY *et al.*, 2010), espécies irmãs do complexo *Acacia* (Fabaceae) (NEWMASER; RAGUPATHY, 2009) e, espécies de Cactaceae do México que sofrem pressão de coleta (YESSON *et al.*, 2011). Em implicações econômicas, pode-se mencionar a identificação de chás (STOECKLE *et al.*, 2011) e espécies venenosas (BRUNI *et al.*, 2010). E, na identificação de espécies de diferentes ecossistemas neotropicais, cita-se a identificação de espécies tropicais do Panamá (KRESS *et al.*, 2009), de espécies arbóreas da Amazônia (GONZALEZ *et al.*, 2009), e os cadastrados no Consórcio de Identificação Genética de Plantas Neotropicais (ArBOL) que ainda se encontram em andamento, como espécies arbóreas da Mata Atlântica no sul da Bahia (SUGANUMA; van den BERG, dados não publicados), espécies endêmicas da Caatinga (van den BERG, dados não publicados), árvores neotropicais (Lauraceae, Sapotaceae, *Inga*) (MADRILHÁN, dados não publicados), e Flora de México (SALAZAR, dados não publicados).

Para verificar o sucesso da técnica na determinação da variabilidade intra e interespecífica e na identificação das espécies em que o a *DNA Barcoding* foi testado foram utilizadas as mais variadas metodologias. De acordo com Srivathsan e Meier (2011), o método original proposto por Hebert *et al.* (2003), na identificação das espécies através do COI, envolveu a construção de árvores de Neighbor-Joining (NJ) com base no modelo de distância Kimura 2-parâmetros (K2P). Este modelo mesmo sendo introduzido para o código de barras de DNA em animais foi empregado também para os trabalhos com marcadores moleculares em espécies vegetais.

As primeiras pesquisas que abrangeram grupos de plantas específicos, como por exemplo, Newmaster *et al.* (2007) (espécies da família Myristicaceae), Newmaster e Ragupathy (2009) (espécies de *Acacia*) e, Ragupathy *et al.* (2009) (espécies de gramíneas do gênero *Tripogon*), utilizaram o método simples de distância-*p* para avaliar a variação intra e interespecífica dos grupos estudados, sendo a relação dos agrupamentos das espécies verificado através da análise de Escalonamento Multidimensional Não Métrica (NMDS), usando a média Bray-Curtis para matrizes de distância. Lee *et al.* (2010) utilizaram esta mesma metodologia

para gerar as árvores filogenéticas no estudo com uma espécie nativa de canela (*Cinnamomum osmophloeum* Kaneh.).

Starr, Naczi, Chouinard (2009) realizaram análises de agrupamentos das espécies gerando árvores através do Método da Média Aritmética Não Ponderada (UPGMA) baseado na distância K2P. Gonzalez *et al.* (2009) avaliaram, para cada marcador molecular utilizado o agrupamento das espécies, com K2P, gerando árvores de NJ com e Máxima Verossimilhança (ML) usando PhyML (GUINDON; GASCUEL, 2003). Outros autores passaram a seguir esta mesma metodologia, como Bruni *et al.* (2010), Chen *et al.* (2010), Gao *et al.* (2010), Pang *et al.* (2011). Kelly, Ameka e Chase (2010) fizeram ainda análises de Máxima Parsimônia (MP) e Inferência Bayesiana (IB).

No entanto, Srivathsan e Meier (2011) demonstraram que o uso do modelo K2P já foi inicialmente mal justificado e não se sabe ao certo porque este modelo foi primeiramente proposto, não existindo razões óbvias para sua inclusão em *DNA Barcoding*. Mas, acreditam que o uso generalizado seja devido, em parte, à popularidade do Sistema de Dados do Código de Barras da Vida (sigla em inglês BOLD), que recomenda este parâmetro. Análises comparando K2P e a simples distância-*p* revelaram que o primeiro método não aumenta significativamente as taxas do sucesso de identificação das espécies, demonstrando ser eficiente somente para sequências com grandes divergências interespecíficas, não distinguindo espécies estritamente relacionadas, sendo este o principal desafio do *barcode* (SRIVATHSAN; MEIER, 2011).

Para avaliar o sucesso da técnica na identificação das espécies Meier *et al.* (2006) propuseram um critério alternativo com o programa TaxonDNA, que apresenta os testes '*Best Match*', '*Best Close Match*' e '*All Species Barcode*'. Este programa vem sendo utilizado em vários trabalhos mostrando ser eficiente nesta tarefa (NEWMMASTER, 2007; NEWMMASTER; RAGUPATHY, 2009; GONZALEZ *et al.*, 2009; KELLY; AMEKA; CHASE, 2010).

Alguns trabalhos fundamentais para o desenvolvimento de estratégias na conservação da biodiversidade, como auxílio a programas de inventário florístico, já foram realizados envolvendo a identificação de plantas tropicais com *DNA Barcoding*. Kress *et al.* (2009) testaram as regiões *matK*, *rbcL*, e *trnH-psbA* em 296 espécies de árvores, arbustos e palmeiras encontradas na Ilha Barro Colorado no Panamá, resultando em mais de 98% de identificações corretas. As três regiões

foram suficientes para reconstruir de forma confiável as relações evolutivas entre os táxons sendo congruentes com o APG II. No entanto, Gonzalez *et al.* (2009) testaram oito marcadores (*rbcLa*, *rpoC1*, *rpoB*, *matK*, *ycf5*, *trnL*, *psbA-trnH*, *ITS*) em espécies arbóreas da Amazônia, tentando ainda, aplicar a técnica na identificação dos indivíduos juvenis, e concluíram que nenhum marcador molecular plastidial, individual ou combinado a outros, apresentou bom desempenho na correta identificação das espécies estudadas (<70%). Estes autores argumentam ainda que capacidade do *DNA Barcoding* é limitada na identificação das espécies, restringindo sua prática em inventários em larga escala.

Recentemente, foi estruturado no Brasil um grupo de pesquisa denominado Br-BOL (Rede Brasileira de Identificação Molecular da Biodiversidade), composto por várias instituições que agregam diferentes pesquisadores e especialistas sobre a fauna e flora dos principais biomas, de modo a formar uma rede de banco de sequências abrangendo a maior diversidade biológica possível. Esta iniciativa objetiva inserir o Brasil entre os países comprometidos com a geração de informação molecular das mais variadas espécies de organismos do planeta. Uma de suas linhas de pesquisa envolve o estabelecimento de *barcodes* para plantas terrestres brasileiras.

O presente trabalho faz parte de um dos planos de ação do Grupo de Trabalho de Plantas Terrestres da rede Br-BOL e aplicou a técnica de *DNA Barcode* para definir os padrões moleculares para identificação de espécies arbóreas e as com potencial madeireiro da FOM. Isso foi possível, a partir da implantação de um banco de DNA total de plantas e uma biblioteca de sequências produzidas com espécimes previamente identificados e devidamente tombados no herbário da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

A partir deste trabalho seria possível transferir os resultados da pesquisa para uma aplicabilidade direta, como por exemplo, na identificação forense de amostras de plantas apreendidas de espécies nativas ameaçadas pela exploração de madeira ilegal, ou para a certificação da exploração regulamentada de madeira. Tais aplicações são possíveis uma vez que os *barcodes* mostraram ser uma importante ferramenta de auxílio a inventários florísticos das áreas florestais remanescentes de FOM. Além disso, este estudo agrega importância à coleção do herbário do Departamento de Botânica da UFPR – UPCB, pois os *vouchers* de *barcode* serão doados ou permutados com herbários de referência, como os nacionais, Herbário da

Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), Herbário Maria Eneyda P. K. Fidalgo (SP) e Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB); e internacionais, New York Botanical Garden (NY) e Royal Botanic Gardens - Kew (K), valorizando assim o acervo do herbário da UFPR.

Esta dissertação está dividida em dois capítulos complementares:

I: Identificação de espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Mista através da técnica de *DNA Barcode*

II: Aplicação de *DNA Barcoding* em espécies madeiráveis da Floresta com Araucária

REFERÊNCIAS

BRUNI, I.; MATTIA, F. D.; GALIMBERTI, A.; GALASSO, G.; BANFI, E.; CASIRAGHI, M.; LABRA, M. Identification of poisonous plants by DNA Barcoding approach. **International Journal of Legal Medicine**, v.124, p.595–603, 2010.

CHEN, S. L.; YAO, H.; HAN, J. P.; LIU, C.; SONG, J. Y.; SHI, L. C.; ZHU, Y. J.; MA, X. Y.; GAO, T.; PANG, X. H.; LUO, K.; LI, Y.; LI, X.W.; JIA, X. C.; LIN, Y. L.; LEON, C. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. **PLoS ONE**, v.5, 2010.

COLOMBO, A. F.; JOLY, C. A. Brazilian Atlantic Forest *lato sensu*: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.70, p.697-708, 2010.

CONSORTIUM FOR THE BARCODE OF LIFE (CBOL) - Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v.106, n.31, p.12794-12797, 2009.

FORD C. S.; AYRES, K. L.; TOOMEY, N.; HAIDER, N.; STAHL, J. V. A.; KELLY, L. J.; WIKSTROM, N.; HOLLINGSWORTH, P. M.; DUFF, R. J.; HOOT, S. B.; COWAN, R. S.; CHASE, M. W.; WILKINSON, M. J. Selection of candidate coding DNA Barcoding regions for use on land plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.159, p.1-11, 2009.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. Mapas SOS Mata Atlântica, Atlas Remanescentes. 2008. Disponível em: <mapas.sosma.org.br>. Acesso em 13 jan. 2012.

GAO, T.; YAO, H.; SONG, J. Y.; LIU, C.; ZHU, Y. J.; MA, X. Y.; PANG, X. H.; XU, H. X.; CHEN, S. L. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. **Journal of Ethnopharmacology**, v.130, p.116-121, 2010.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, v.52, p.696–704, 2003.

GONZALEZ, M. A.; BARALOTO, C.; ENGEL, J.; MORI, S. A.; PÉTRONELLI, P.; RIÉRA, B.; ROGER, A.; THÉBAUD, C.; CHAVE, J. Identification of Amazonian trees

with DNA barcodes. **PLoS ONE**, v.4, p.74-83, 2009.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; de WAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.270, p.313-322, 2003.

HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. The promise of DNA Barcoding for taxonomy. **Systematic Botany**, v.54, p.852-859, 2005

HOLLINGSWORTH, P. M. Refining the DNA barcode for land plants. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v.108,n.49, p.19451-19452, 2011.

HOLLINGSWORTH, P. M.; GRAHAM S. W.; LITTLE, D. P. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. **PLoS ONE**, v.6, n.5, e19254.doi:10.1371/journal.pone.0019254. 2011

HUECK, K. **As florestas da América do Sul**. Editora da Universidade de Brasília e Editora Polígono SA, São Paulo. 466 p., 1972.

JANZEN, D. H. How to conserve wild plants? Give the world the power to read them. In: KRUPNICK, G.; KRESS, J. **Plant Conservation: A Natural History Approach**, 2003.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético**. 3ª ed. Artmed: Porto Alegre, 632p. 2009.

KELLY, L. J.; AMEKA, G. K.; CHASE, M. W. DNA Barcoding of African Podostemaceae (river-weeds): A test of proposed barcode regions. **TÁXON**, v. 59, n. 1, p. 251-260, 2010.

KOZERA, C.; DITTRICH, V. A. de O.; SILVA, S. M. Fitossociologia do componente arbóreo de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista Montana, Curitiba, PR, BR. **Floresta**, Curitiba, v.36, n.2, mai/ago, 2006.

KRESS, W. J.; WURDACK, K. J.; ZIMMER, E. A.; WEIGT, L. A.; JANZEN, D. H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v.102, p.8369–8374, 2005.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L.; JONES, F. A.; SWENSON, N.G.; PEREZ, R.; SANJUR, O.; BIRMINGHAM, E. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v.106, p.18621–18626, 2009.

LAHAYE, R.; van der BANK, M.; BOGARIN, D.; WARNER, J.; PUPULIN, F.; GIGOT, G.; MAURIN, O.; DUTHOIT, S.; BARRACLOUGH, T. G.; SAVOLAINEN, V. DNA Barcoding the floras of biodiversity hotspots, 2008. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0709936105. Acesso em: 10 fev. 2010.

LEE, S C.; CHIOU, S. J.; YEN, J. H; LIN, T. Y.; HSIEH, K. T.; YANG, J. C. *DNA Barcoding Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. Based on the Partial Non-Coding ITS2 Region of Ribosomal Genes. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.18, n.2, p.128-135, 2010.

MADRIÑÁN, S. Dados não publicados. Códigos de Barras de ADN de arboles Neotropicales (Lauraceae, Sapotaceae, *Inga*). Disponível em: <http://arbol.uniandes.edu.co/Proyectos.html>. Acesso em 10 dez. 2010.

METZGER, J. P. Conservation issues in the Brazilian Atlantic forest. **Biological Conservation**, v.142, p.1138-1140, 2009.

NEWMMASTER, S. G.; FAZEKAS, A. J.; RAGUPATHY, S. DNA Barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique**, v.84, p.335-341, 2006.

NEWMMASTER, S. G.; FAZEKAS, A. J.; STEEVES, R. A. D.; JANOVEC, J. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p.480-490, doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.02002, 2007.

NEWMMASTER, S. G.; RAGUPATHY, S. Testing Plant Barcoding in a Sister Species Complex of Pantropical Acacias (Mimosoideae, Fabaceae). **Molecular Ecological Resources**, v.9, p.172–180, 2009.

PANG, X.; SONG, J.; ZHU, Y.; XU, H.; HUANG, L.; CHEN, S. Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification. **Cladistics**, v.27, p. 165–170, 2011.

RAGUPATHY, S.; NEWMMASTER, S. G.; MURUGESAN, M.; BALASUBRAMANIAM, V. DNA Barcoding discriminates a new cryptic grass species revealed in an ethnobotany study by the hill tribes of the Western Ghats in southern India.

Molecular Ecology Resources, v. 9, p. 164-171, doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02641, 2009.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J. & HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v.142, p.1144-1156, 2009.

ROY, S.; TYAGI, A.; SHUKLA, V.; KUMAR, A.; SINGH, U. M.; CHAUDHARY, L. B.; DATT, B.; BAG, S. K.; SINGH, P. K.; NAIR, N. K.; HUSAIN, T.; TULI, R. Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: A case study with Indian *Berberis* species. **PLoS ONE**, v.5, n.10, 2010.

SALAZAR, G. Dados não publicados. Código de barras de la flora de México. Disponível em: <http://arbol.uniandes.edu.co/Proyectos.html>. Acesso em 10 dez.2010.

SASS, C.; LITTLE, D. P.; STEVENSON, D. W.; SPECHT C. D. DNA Barcoding in the Cycadales: Testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads. **PLoS ONE**, p.2, 2007.

STARR, J. R.; NACZI, R. F.; CHOUINARD, B. N. Plant DNA barcodes and species resolution in sedges (*Carex*, Cyperaceae). **Molecular Ecology Resources**, v.9, p.151-63, 2009.

SHAW, J.; LICKEY, E. B.; BECK, J. T.; FARMER, S. B.; LIU, W.; MILLER, J.; SIRIPUN, K. C.; WINDER, C. T.; SCHILLING, E. E.; SMALL, R. L. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany**, v.92, n.1, p.142–166, 2005.

SHAW, J.; LICKEY, E. B.; SCHILLING, E. E.; SMALL, R. L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms. The tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**, v.94, p.275-288, 2007.

SRIVATHSAN, A.; MEIER, R. On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. **Cladistics**, v.27, p.1–5, 2011.

STOECKLE, M. Y.; GAMBLE, C. C.; KIRPEKAR, R.; YOUNG, G.; AHMED, S.; LITTLE, D. P. Commercial Teas Highlight Plant DNA Barcode Identification. **Scientific Reports**, v.1, n.42, doi:10.1038/srep00042, 2011.

STEHMANN, J. R.; FORZZA, R. C.; SALINO, A.; SOBRAL, M.; COSTA, D. P.; KAMINO, L. H. Y. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 516 p., 2009.

ŠTORCHOVÁ, H.; OLSON, M. S. The architecture of the chloroplast *trnH-psbA* noncoding region in angiosperms. **Plant Systematics and Evolution**, v.268, p.235–256, 2007.

SUGANUMA, E.; van den BERG, C. Dados não publicados. Barcoding de um fragmento megadiverso da Mata Atlântica sul bahiana. Disponível em: <http://arbol.uniandes.edu.co/Proyectos.html>. Acesso em 10 dez. 2010.

van den BERG, C. Banco de DNA de Plantas: notas técnicas. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**, 2005. Disponível em: www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1744. Acesso em 10 fev. 2010.

van den BERG C. Dados não publicados. Barcoding de espécies endêmicas da Caatinga. Disponível em: <http://arbol.uniandes.edu.co/Proyectos.html>. Acesso em 10 dez. 2010.

VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A. L. R.; LIMA, I. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, 1991.

WERNECK, M. de S.; SOBRAL, M. E. G.; ROCHA, C. T. V.; LANDAU, E. C.; STEHMANN, J. R. Distribution and Endemism of Angiosperms in the Atlantic Forest. **Natureza & Conservação**, v.9, n.2, p.188-193, 2011.

YAO, H.; SONG, J.; LIU, C.; LUO, K.; HAN, J.; LI, Y.; PANG, X.; XU, H.; ZHU, Y.; XIAO, P.; CHEN, S. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. **PLoS ONE**, v.5, n.10, e13102.doi:10.1371/journal.pone.0013102, 2010.

YESSON, C.; BÁRCENAS, R. T.; HERNÁNDEZ, H. M., De La LUZ RUIZ-MAQUEDA, M.; PRADO, A.; RODRÍGUEZ, V. M.; HAWKINS, J. A. DNA barcodes for Mexican Cactaceae, plants under pressure from wild collecting. **Molecular Ecology Resources**, v.11, p.775–783, 2011.

YU, J.; XUE, J. H.; ZHOU, S. L. New universal *matK* primers for DNA Barcoding angiosperms. **Journal of Systematics and Evolution**, v.49, p.176-181, 2011.

**CAPÍTULO I: IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES ARBÓREAS DA FLORESTA
OMBRÓFILA MISTA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE *DNA BARCODE***

(Artigo segundo normas da revista *TAXON - International Association for Plant Taxonomy* -
http://www.iapt-taxon.org/index_layer.php)

**Identificação de espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Mista através da técnica de
*DNA Barcode*¹**

Mônica Bolson², Eric C. Smidt², Christopher T. Blum³ & Viviane da Silva-Pereira²

1 Parte da dissertação de mestrado da primeira autora

2 Laboratório de Filogenia e Genética da Conservação de Plantas, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Curitiba, Paraná, 81531-990, Brasil

3 Engenheiro Florestal, Dr., Sociedade Chauá, Curitiba, Paraná, 82130 010, Brasil

Autor para correspondência: monicabolson@gmail.com

Título resumido: DNA Barcoding da Floresta Ombrófila Mista

Resumo

O *DNA barcode* é uma ferramenta molecular que utiliza sequências de regiões específicas do DNA para a identificação de espécies. Pode ser empregada como recurso forense, no auxílio a inventários florísticos e em delimitações taxonômicas em complexo de espécies. Visando a padronização da técnica como uma alternativa facilitadora em inventários florísticos para a Floresta Ombrófila Mista testou-se a aplicabilidade das quatro regiões indicadas para o *barcode* de plantas em espécies arbóreas típicas desta formação. Foram obtidas sequências nucleotídicas das regiões codificantes *matK* e *rbcL* e o espaçador intergênico não-transcrito *trnH-psbA* do DNA plastidial, e a região *ITS* (espaçadores ITS1 e ITS2 e o gene 5.8S) do DNA nuclear, previamente indicadas como adequadas ao *barcoding* de plantas. Foram geradas 988 sequências utilizadas, que abrangeram 304 indivíduos, pertencentes a 131 espécies e a 42 famílias. As divergências intraespecífica e interespecífica estimadas a partir da distância-*p* mostraram haver variações significativas no potencial de identificação das espécies entre as regiões e diferentes combinações entre elas. O maior sucesso de identificação correta das espécies para as regiões individuais foi em *ITS* e *trnH-psbA* e a combinação destas duas regiões. A partir de análises filogenéticas foram obtidas árvores de Neighbor-Joining das espécies com mais de um indivíduo, para todas as quatro regiões *barcode* e quatro diferentes combinações entre elas. Entre todas, a árvore mais bem resolvida e suportada foi da combinação das regiões *trnH-psbA*+ *ITS*, com 71% das espécies monofiléticas. Embora a utilização destas regiões tenha sido parcialmente limitada na diferenciação das espécies de Lauraceae, uma das famílias mais representativas da FOM, este estudo demonstra que o *DNA Barcoding* é uma ferramenta útil na identificação da maioria das espécies arbóreas desta formação. Deste modo, recomenda-se o sequenciamento combinado das regiões *trnH-psbA* e *ITS* como ferramenta molecular no auxílio a inventários florísticos

dos estrato arbóreo da Floresta com Araucária no Sul do Brasil.

Palavras-chave Br-BOL, *DNA Barcoding*, Espécies arbóreas, Floresta com Araucária, Marcador molecular, Neotrópico.

INTRODUÇÃO

A Floresta Ombrófila Mista (FOM), conhecida também como Floresta com Araucária, é um dos ecossistemas associados do bioma Mata Atlântica e se distribui principalmente entre os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo (Veloso & al., 1991). Nos estados do sul, o limite inferior das matas de Araucária situa-se entre 500 a 600 m, chegando a 1200 m na Serra da Mantiqueira e no Itatiaia no sudeste (Hueck, 1972).

A destruição desta formação florestal iniciou-se por volta de 150 anos atrás, principalmente com a extração da madeira sem manejo, pois esta era a única forma disponível de combustível e material de construção de casas nas áreas rurais durante muitas décadas (Reitz & al., 1979). O desmatamento para a ocupação agrícola e a instalação de empreendimentos agropecuários, práticas inadequadas ao uso do solo (Kozera & al., 2006) e, mais recentemente, o intenso cultivo de soja e a expansão dos reflorestamentos com espécies exóticas, como pínus e eucalipto, são as práticas que aceleraram a remoção da cobertura vegetal nativa da FOM (Câmara, 2005).

Os fragmentos que ainda restam de Mata Atlântica na região Sul continuam a deteriorar-se devido à retirada de lenha, ao corte ilegal de madeira e à introdução de espécies exóticas (Câmara, 2005). No entanto, mesmo com a intensa exploração, este bioma ainda retém uma importante diversidade biológica.

A composição arbórea da FOM foi estimada por Leite (1994) em mais de 350 espécies, no entanto Isernhagen & al. (2002) apresentaram 244 espécies arbustivo-arbóreas como resultado da compilação de listagens encontradas em 162 bibliografias de trabalhos de fitossociologia florestal desenvolvidos no Paraná. Esta formação apresenta somente dois gêneros nativos de coníferas, *Araucaria* Juss. e *Podocarpus* L'Hér. ex Pers. que são

explorados como fonte de madeira com finalidades similares, como na construção civil, na indústria moveleira, na carpintaria e marcenaria em geral (Inoue & al., 1984).

A *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, popularmente conhecida como pinheiro-brasileiro ou pinheiro-do-paraná, forma um estrato dominante e contínuo nesta unidade fitogeográfica (Roderjan & al., 2002), e está associada a várias outras espécies, especialmente da família Lauraceae. Espécies desta família são elementos bastante característicos da FOM com muitos táxons próximos e alguns complexos de espécies, como nos gêneros *Ocotea* Aubl. e *Nectandra* Rol. ex Rottb., onde a identificação taxonômica clássica não é uma tarefa trivial para não-especialistas.

Na região de abrangência da FOM, no estado do Paraná, podem-se citar alguns trabalhos que forneceram informações para o conhecimento da composição florística de diferentes comunidades vegetacionais, como Cervi & al., 1989; Isernhagen & al., 2002; Liebsch & Acra, 2002; Rondon Neto & al., 2002; Barddal & al., 2004; Goldenberg, 2004; Seger & al., 2005; Watzlawick & al., 2005; Kozera & al., 2006; Cordeiro & Rodrigues, 2007; Nascimento & al., 2007; Blum, 2008; Reginato & al., 2008; Carvalho & al., 2009; Liebsch & al., 2009; Liebsch & Mikich, 2009; e Selusniaki & Acra 2010. Apesar dos vários estudos realizados na Mata Atlântica, podemos considerá-la ainda insuficientemente conhecida, sendo que a documentação da diversidade vegetal no Brasil tem sido realizada através de ações isoladas em diferentes instituições de pesquisa (Stehmann & al., 2009).

Na FOM várias famílias destacaram-se pelo número de espécies, a partir destes trabalhos, como Myrtaceae (38), Lauraceae (22), Fabaceae (15), Solanaceae (13), Asteraceae (9), Melastomataceae (8) e Salicaceae (8), sendo que várias espécies também ocorrem em mais de uma formação (Isernhagen & al., 2002). Além de Lauraceae é importante ressaltar que esta formação abriga também outras famílias representantes dos grupos basais como Canellaceae, Winteraceae, Monimiaceae e Annonaceae.

O *barcode* é uma alternativa molecular para a identificação de espécies através da comparação entre sequências do material de interesse com aquelas depositadas em bancos de sequências de DNA obtidas de amostras bem identificadas e que possuem material testemunho acessível (Janzen, 2003; Hebert & al., 2003). Esta técnica pode ser utilizada em inventários florísticos, onde nem sempre é possível a coleta de indivíduos completos para a identificação taxonômica a partir de padrões morfológicos, e delimitações taxonômicas em complexo de espécies.

Atualmente, para plantas, foi estabelecido como *barcode* a combinação de fragmentos das regiões codificadoras *matK* (gene maturase K) e *rbcL* (parte do gene da enzima ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase) (Lahaye & al., 2008; CBOL Plant Working Group, 2009) e o espaçador intergênico não-transcrito *trnH-psbA* (Kress & al., 2005; Shaw & al., 2007; Štorchová & Olson, 2007) do DNA plastidial, e o espaçador interno transcrito *ITS* (ITS1, 5,8S e ITS2) (Kress & al., 2005; Yao & al., 2010; Hollingsworth, 2011), do DNA nuclear.

Vários trabalhos se dedicaram a explorar esta técnica testando diferentes regiões para identificação de vários grupos de plantas, em diversos ecossistemas neotropicais, como as espécies tropicais do Panamá (Kress & al., 2009), espécies arbóreas da Amazônia (Gonzalez & al., 2009), espécies arbóreas da Mata Atlântica no sul da Bahia (Suganuma & van den Berg, dados não publicados), espécies endêmicas da Caatinga (van den Berg, dados não publicados), árvores Neotropicais (Lauraceae, Sapotaceae, *Inga*) (Madriñán, dados não publicados) e Flora do México (Salazar, dados não publicados).

Este estudo tem como objetivo avaliar a aplicabilidade da técnica de “código de barras de DNA” e estabelecer os protocolos de uso desta técnica para a identificação de espécies arbóreas características da Floresta Ombrófila Mista (FOM). Especificamente, disponibilizar um banco de sequências das espécies estudadas em um sistema nacional de

sequências para *barcode* e realizar um estudo da variação genética intraespecífica e interespecífica de grupos com problemas de identificação na taxonomia clássica e com representatividade na flora arbórea da FOM.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e coleta das amostras. - As espécies arbóreas características da Floresta Ombrófila Mista foram coletadas, entre março de 2010 e outubro de 2011, em parques e bosques urbanos da cidade de Curitiba e em fragmentos florestais presentes em regiões do entorno, e em outros municípios do estado do Paraná (Apêndice 1).

A partir de estudos que levantaram as espécies arbóreas características da FOM, mencionados acima, foi possível direcionar a coleta de amostras. Das 217 espécies levantadas, a amostragem para o *barcode* incluiu 111 espécies, sendo que Lauraceae contribuiu com o maior número de espécies (20%), seguida de Myrtaceae (10%), Melastomataceae (5,4%), e Asteraceae (4,5%), sendo, portanto, as quatro famílias mais representativas neste estudo.

As espécies foram coletadas em campo e, quando possível, com mais de um indivíduo amostrado por espécie e em populações diferentes. Todo o material foi depositado no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB) e identificado por especialistas e por comparação com o acervo depositado no UPCB e no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM). Duplicatas serão enviadas à herbários nacionais, como HUEFS, SP e RB; e internacionais, como NY e K.

As amostras de tecido foliar foram armazenadas em freezer -20°C ou em sílica-gel (Chase & Hills, 1991). O DNA total extraído foi armazenado em ultrafreezers (-80°C).

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento. - Para a extração de amostras de DNA utilizou-se a metodologia baseada no protocolo de CTAB 2X de Doyle & Doyle (1987). Antes do armazenamento, a qualidade da amostra para futura referência foi verificada através de visualização em gel de agarose corado com brometo de etídio, utilizando um controle de massa e peso molecular (*DNA mass ladder*). O material extraído foi depositado no Banco de DNA Total de Plantas da UFPR (UPCB-DNA), vinculado aos *vouchers* depositados no UPCB.

As amplificações de PCR dos fragmentos indicados como *DNA Barcode* foram realizadas em reações de 30µl constituídas de tampão 1X, 2,5mM de MgCl², 0,2mM de dNTPs, 0,5mM de cada *primer*, 10ng de BSA, 2,0 unidades de Taq DNA polimerase e 20-50ng de DNA genômico.

A regiões *matK* e *rbcL* (cpDNA) foram amplificadas com os *primers matK 3F_Kim f* (5'CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G 3') e *matK 1R_Kim r* (5'ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC 3') (Ki-Joong Kim, *pers. comm.*) ou *matK 5R* (GTT CTA GCA CAA GAA AGT CG) e *matK 2.1F* (CCT ATC CAT CTG GAA ATC TTA G) (Ford & al., 2009); e *rbcLa_f* (5'ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC 3') (Levin & al., 2003) e *rbcLa_r* (5'GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG 3') (Kress & Erickson, 2007), respectivamente. A amplificação destes três pares de *primers* foi realizada seguindo o mesmo programa: 1 min. pré-melt a 94°C e 40 ciclos de 30 seg. de desnaturação a 94°C, 40 seg. de anelamento a 53°C, 40 seg. de extensão a 72°C, seguido por extensão final a 72°C por 5 min.

O espaçador *trnH-psbA* (cpDNA) foi amplificado com os *primers trnHf_05* (5' CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC 3') (Tate & Simpson, 2003) e *psbA3 f* (5' GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C 3') (Sang & al., 1997). A amplificação foi realizada seguindo o programa: 3 min. de pré-melt a 95°C e 35 ciclos de 30 seg. de desnaturação a

95°C, 1 min. de anelamento a 55°C, 1,5 min. de extensão a 72°C seguido por extensão final a 72°C por 4 min.

A região *nrITS* foi amplificada com os *primers ITS92* (5' AAG GTT TCC GTA GGT GAA 3') e *ITS75* (5' TAT GCT TAA ACT CCA CGG G 3') (Desfeaux & al., 1996), ou os *primers ITS18_F* (Kass & Wink, 1997, modificado por Beyra-Matos & Lavin, 1999) e *ITS26_R* (Kass & Wink, 1997). Para a amplificação destes *primers* utilizou-se o mesmo programa de PCR: 1 min. de pré-melt a 94°C e 40 ciclos de 30 seg. de desnaturação a 94°C, 40 seg. de anelamento a 51°C, 40 seg. de extensão a 72°C, seguido por extensão final a 72°C por 5 min.

Todas as amplificações foram purificadas com PEG 20% e verificadas em eletroforese horizontal em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio. A reação de sequenciamento foi feita com o kit Big Dye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems, California, USA) através da empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coreia do Sul—<http://dna.macrogen.com>). Os mesmos *primers* utilizados para amplificação foram utilizados para a reação de sequenciamento. Todas as sequências obtidas neste estudo serão submetidas ao GenBank através do programa Sequin (National Center Biotechnology Information 2011), seguindo todas as recomendações deste banco de sequências público, ao sistema *Barcode of Life Database* (BOLD) e à rede nacional de identificação molecular Br-BOL *Brazilian Barcode of Life* (Apêndice 3).

Alinhamento das sequências e análises. - As sequências *forward* e *reverse* foram editadas e as fitas consenso obtidas utilizando-se o programa Staden Package (Staden & al., 2003). Para garantir maior confiabilidade das sequências, todas as extremidades de ambas as regiões foram eliminadas. O alinhamento múltiplo e a matriz das sequências foram editados a partir do programa Clustal W (Thompson & al., 1994) implementado no programa MEGA5 (Tamura & al., 2011), com os parâmetros usuais, sendo as matrizes

conferidas manualmente. Para facilitar o alinhamento das matrizes dos dois espaçadores (*trnH-psbA* e *ITS*), as sequências foram organizadas conforme a classificação dos taxa dada pelo APG III (2009).

Adicionalmente, foram inseridas, até o dia 14 de janeiro de 2012, todas as sequências das espécies ocorrentes na FOM encontradas no GenBank. Esta busca totalizou 50 sequências de *matK*, 38 de *trnH-psbA*, 25 de *rbcL* e 91 de *ITS*, sendo as mesmas inseridas na matriz de cada região.

A presença de ‘*barcoding gap*’ entre as distâncias intraespecíficas e interespecíficas foi avaliada através de gráficos de frequências com base nas distâncias-*p* pareadas obtidas a partir do programa TaxonDNA (Meier & al., 2006).

Para avaliar o sucesso da técnica e das regiões do código de barras de DNA na identificação das espécies utilizou-se o teste ‘*best close match*’ do TaxonDNA, onde um valor limite foi calculado separadamente para cada matriz e a frequência relativa de todas as distâncias intraespecíficas foi traçada para determinar um valor limite abaixo de 95% (Meier & al., 2006). Neste teste as sequências podem ser classificadas como, “correta”, quando as distâncias genéticas entre a sequência alvo e demais sequências da mesma espécie se enquadram em 95% do limite calculado; “ambígua”, quando uma sequência se encontra na faixa desta porcentagem, mas se assemelha a outra espécie; “incorreta” quando uma sequência alvo não encontra uma sequência da mesma espécie dentro no limite; e “incongruente”, quando a sequência não se encontra na faixa de 95% do limite calculado (Pettengill & Neel, 2010).

Os parâmetros foram configurados para comparar todas as sequências com pelo menos 300 pb em comum. Este teste determina a correspondência mais próxima de uma sequência em comparação com todas as outras em um conjunto de dados alinhados, e estabelece um limite de similaridade, baseado na distribuição de frequência das distâncias

intraespecífica e interespecífica.

Para avaliar se as amostras de diferentes indivíduos formam um agrupamento específico monofilético, foram utilizadas as abordagens filogenéticas, incluindo métodos de distância com a utilização de distância-*p* pareada, como recomendado por Srivathsan e Meier (2011) e algoritmo Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987). O suporte dos ramos resultantes foi obtido através *bootstrap* como método de re-amostragem, utilizando 1000 réplicas. Ambas as análises foram realizadas através do programa MEGA5 (Tamura & al., 2011). Analisaram-se somente as espécies com mais de um indivíduo, gêneros com mais de uma espécie, e família com mais de um gênero.

As análises foram conduzidas separadamente para cada região e combinadas da seguinte maneira: regiões codificantes (*matK* + *rbcL*) e, regiões não-codificantes (*trnH-psbA* + *ITS*), neste dois casos considerando apenas as espécies que possuíam sequências de ambas as regiões; regiões do genoma plastidial (*matK* + *rbcL* + *trnH-psbA*); e as quatro regiões combinadas (*matK* + *rbcL* + *trnH-psbA* + *ITS*), nestas duas últimas combinações, considerou-se apenas as espécies que possuíam sequências de pelo menos duas ou três regiões, respectivamente. Nas análises filogenéticas as árvores de *matK*, *rbcL* e *trnH-psbA* foram enraizadas com *Araucaria angustifolia*, a principal espécie de Gimnosperma características da FOM. Uma vez que não foi possível amplificar e nem obter no GenBank uma sequência de *ITS* das espécies de Gimnospermas da FOM, para esta região foi utilizado o grupo formado pelas famílias basais (Canellaceae ou Winteraceae ou Lauraceae).

RESULTADOS

Sequenciamento de DNA. - Neste estudo, 304 indivíduos, pertencentes a 131 espécies e a 42 famílias, foram amostrados para compor o primeiro banco de sequências para o *barcode* da Floresta Ombrófila Mista. Incluindo os quatro marcadores, 794 sequências foram obtidas do material amostrado em campo, combinadas com as 204 sequências disponíveis no GenBank. As quatro regiões do DNA indicadas para o código de barras foram testadas e as reações de PCR padronizadas para a maioria das espécies arbóreas da FOM. Um viés taxonômico no sucesso de amplificação foi verificado em *matK*, sendo que os pares de *primers* testados neste estudo, não conseguiram amplificar a região alvo das espécies representantes das Gimnosperma e da família Melastomataceae, e apresentou baixa taxa de amplificação na Ordem Malpighiales. *ITS* também não se mostrou eficiente na amplificação em Gimnosperma. Sequências de alta qualidade foram obtidas para *rbcL*, com mais de 98% das amostras sequenciadas (Tabela 1), sendo o menor sucesso em *ITS* (73%).

Varição intraespecífica e interespecífica. – A partir do alinhamento múltiplo de todas as sequências observou-se que *matK* foi o maior fragmento com 799 pb, e *trnH-psbA* o menor com 488,1 pb. Com o cálculo da frequência de cada base nucleotídica, obteve-se também a média de cada base nitrogenada para cada região (Tabela 2).

A porcentagem de sítios variáveis variou de 40% (*rbcL*) a 88% (*ITS*) (Tabela 2). As regiões também variaram em relação às distâncias intraespecíficas e interespecíficas. As mais conservadas foram *rbcL*, *matK* e a combinação desta duas regiões, sendo que a porcentagem de diferenciação das espécies da FOM, baseada na distância-*p*, respectivamente variaram de 0%-4,5% e 0%-8,0% para as duas últimas regiões *barcode* (Fig. 1), sendo que a variação intraespecífica se sobrepôs a interespecífica. *trnH-psbA* foi a

região que apresentou maior variação (0%-65%) dentro das espécies, se sobrepondo também a variação interespecífica (Fig. 1 e 2). Esta mesma região e *ITS* foram as mais variáveis entre as espécies da FOM (0%-50%) (Fig. 1 e 2).

O *barcoding gap* entre as distâncias intraespecíficas e interespecíficas foi determinado pelos gráficos da distribuição da variação da distância-*p* das quatro regiões individuais e as quatro combinações. As regiões *matK*, *trnH-psbA* e *ITS* e a combinação *matK* + *rbcL* apresentaram igual ou maior variabilidade genética dentro das espécies. A variação interespecífica das demais regiões (*rbcL*) e combinações (*trnH-psbA* + *ITS*, *matK* + *rbcL* + *trnH-psbA*, *matK* + *rbcL* + *trnH-psbA* + *ITS*) não se mostrou significativamente superior a intraespecífica (Fig. 1 e 2).

Sucesso de identificação das regiões *barcode*. – O teste ‘*best close match*’ do programa TaxonDNA foi calculado com um valor limite para cada região que variou de 5,03% (*matK*) a 41,52% (*ITS*) (Apêndice 2). O maior sucesso de identificação correta das espécies para as regiões individuais foi em *ITS* (58%) e *trnH-psbA* (57%) com resultados semelhantes, seguido de *matK* (54%) e *rbcL* (49%) (Fig. 3, Apêndice 2). A combinação de *trnH-psbA*+*ITS* obteve sucesso idêntico das duas regiões individuais, identificando corretamente 58% das amostras, enquanto a combinação das quatro regiões identificou 43% (Fig. 3, Apêndice 2). Os dois espaçadores não-codificantes individuais e ambos combinados mostraram-se os mais eficientes no sucesso de identificação. A combinação de *matK*+*rbcL* foi a que apresentou a menor taxa de identificação correta e o maior percentual de identificação incorreta. As identificações ambíguas foram relativamente baixas, abaixo de 5%, para a maioria das regiões *barcode*, no entanto *matK* e *rbcL* apresentaram percentuais diferentes, 11% e 23%, respectivamente.

Reconstrução filogenética. - A análise filogenética, para a verificação do número de espécies monofiléticas, foi obtida através de árvores de NJ para todas as regiões e as

combinações aqui testadas. Cada árvore gerada diferiu na topologia e no grau de resolução (Fig. 4). Avaliando no nível específico, *rbcL* foi a região individual que apresentou melhor desempenho, com 58% das espécies monofiléticas, seguida de *matK* e *ITS* (Fig. 4). No entanto, a árvore mais bem resolvida e suportada foi a gerada a partir das combinação das regiões *trnH-psbA* e *ITS* a que apresentou a melhor topologia, com 71% das espécies monofiléticas (Fig. 4), coincidindo com o sucesso de identificação através do TaxonDNA.

No nível de gênero, a combinação *trnH-psbA* + *ITS* (72%) também teve o melhor desempenho, seguido de *matK+rbcL* e a região individual *ITS*, com desempenhos iguais (67%). Na árvore que apresentou a melhor topologia e resolução na diferenciação das espécies da FOM (*trnH-psbA* + *ITS*), os gêneros que se destacaram com maior suporte (>95%) foram *Allophylus* L., *Casearia* Jacq., *Ilex* L., *Maytenus* Molina, *Miconia* Ruiz & Pav., *Piptocarpha* R.Br., *Sebastiania* Spreng. e *Symplocos* Jacq. No entanto, *Campomanesia* Ruiz & Pav. e *Myrcia* DC. ex Guill. (Myrtaceae), *Cinnamomum* Schaeff. e *Ocotea* (Lauraceae) foram os únicos gêneros, dos 16 incluídos nesta árvore, que não formaram agrupamentos monofiléticos com suas espécies, embora suas respectivas famílias tenham se apresentado como monofiléticas com valores de suporte significativos, acima 95%. A combinação *matK+rbcL* foi a que apresentou 100% de suporte de famílias monofiléticas, das 8 incluídas na análise. A região individual *matK* mostrou a segunda melhor resolução (92%), devido somente pela família Lauraceae não se apresentar monofilética, pois o único representante de *Cryptocarya aschersoniana* Mez se agrupou com *Mollinedia clavigera* Tul., espécie da família Monimiaceae, que pertencente a mesma ordem de Lauraceae (Laurales). *trnH-psbA* foi a região que apresentou o pior desempenho monofilético em todos os níveis taxonômicos avaliados.

DISCUSSÃO

A aplicação da técnica de *DNA Barcode* nas espécies arbóreas da FOM teve resultados variados entre as quatro regiões propostas para plantas e as quatro combinações testadas neste estudo. As regiões do DNA plastidial, *rbcL*, *matK* e *trnH-psbA*, tiveram os melhores desempenhos no sequenciamento dos indivíduos, com 98%, 88% e 82% respectivamente. Embora o número de amostras sequenciadas não tenha sido o mesmo para todas as regiões, as lacunas de amostragem foram pequenas o suficiente para não afetar significativamente as abordagens combinadas dos diferentes marcadores moleculares empregados. Assim como para a flora arbórea da FOM, outros estudos envolvendo floras também obtiveram resultados satisfatórios no sequenciamento de *rbcL* (Kress & al., 2009, Gonzalez & al., 2009, Kress & al., 2010, Ebihara & al., 2010). *ITS* obteve o menor desempenho no sequenciamento das amostras (73%), mostrando-se menos eficiente também no sequenciamento de espécies arbóreas da Amazônia da Guiana Francesa, com 41% de sucesso (Gonzalez & al. 2009).

Kress & al. (2010) e Gonzalez & al. (2009), que trabalharam somente com espécies arbóreas tropicais, complementaram que *matK* apresentou baixo desempenho no sequenciamento, aproximadamente 70% de sucesso, em um universo de 198 indivíduos de 100 espécies de Porto Rico (Kress & al., 2010) e de 182 indivíduos de 132 espécies da Guiana Francesa (Gonzalez & al., 2009). Sass & al. (2007), Roy & al. (2010) e Wang & al. (2010) também relataram uma baixa frequência de amplificação para *matK*. Esses resultados contrariam o sucesso de amplificação e sequenciamento encontrado com diferentes pares de *primers*, *matK-2.1f/matK-5r* (Starr & al., 2009), *390F/pod2R* (Kelly & al., 2010), *390F/matK 1326* (Bruni & al., 2010).

Para as espécies arbóreas da Floresta com Araucária, o fragmento *matK*, mesmo se mostrando eficiente no sequenciamento a partir da utilização de dois pares de *primers* alternativos, não apresentou sucesso na amplificação para as únicas espécies de Gimnosperma desta formação florestal. Li & al. (2011) questionaram a universalidade dos pares de *primers* de *matK* propostos pelo CBOL Plant Working Group (2009), pois também obtiveram baixa amplificação para as 57 espécies de Gimnosperma testadas da China. Um novo par de *primers* (*Gym_F1A/Gym_R1A*) foi assim proposto como universal para este grupo, pois amplificou 97,5% das amostras, inclusive espécies de *Araucaria* e *Podocarpus*. Entretanto, não amplificou para espécies de *Ephedra* L. (Gnetales: Ephedraceae), único dos 40 gêneros amostrados para esta família. Os autores esperam que este marcador molecular apresente melhor desempenho na amplificação de espécies de Gimnosperma, não só chinesas, mas como do mundo todo.

Li & al. (2011) apontaram ainda, um par de *primers* universal para Gimnosperma (*1F/724R*) para a outra região plastidial codificante, *rbcL*, que teve um ótimo desempenho (100%) na amplificação das 57 espécies. Apesar disso, para as espécies representantes deste grupo da FOM, *Araucaria angustifolia* e *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., o par de *primers* indicado pelo CBOL obteve boa performance, amplificando e sequenciando todos os indivíduos.

O alinhamento das sequências das regiões codificantes foi realizado com facilidade, no entanto o espaçador intergênico *trnH-psbA* mostrou uma alta variação de tamanho entre as espécies da FOM, sendo necessários alguns esforços para o alinhamento desta região (Lahaye & al., 2008, Starr & al., 2009, Roy & al., 2010).

A variação interespecífica da região *rbcL* e das combinações *trnH-psbA* + *ITS*, *matK* + *rbcL* + *trnH-psbA* e *matK* + *rbcL* + *trnH-psbA* + *ITS* foram as únicas que não apresentaram sobreposição em relação a variação intraespecífica das mesmas, no entanto,

essas regiões não apresentaram a distribuição das variações de distância relativamente bem separada, assim como encontrado no *COI* de animais (Meyer & Paulay, 2005). Uma das possíveis explicações para o fracasso à falta de variação entre as espécies é que a amostragem final deste estudo não incluiu várias amostras para a maioria das espécies, e várias espécies por gênero. Neste último caso, é devido à maioria dos taxa encontrados na FOM serem monoespecíficos ou apresentarem poucas espécies por gênero para esta formação, e não sendo, portanto, uma deficiência na amostragem do presente estudo. Estes dois fatores são componentes críticos para qualquer estudo com *DNA Barcoding* (Fazekas & al. 2008).

Individualmente os fragmentos *matK* e *rbcL*, segundo o teste de monofiletismo demonstraram o melhor desempenho como *barcode* para a flora arbórea da FOM, ao contrário dos resultados obtidos pelo teste ‘*best close match*’. *ITS* e *trnH-psbA* apontaram ser os mais eficientes na identificação das espécies neste último teste, com aproximadamente 58% de sucesso. No entanto, estes fragmentos não apresentaram o mesmo desempenho para o teste de monofiletismo. Isso demonstra que as regiões individualmente não são eficientes para a distinção das espécies arbóreas da FOM, contrariando a identificação de outros grupos de espécies tropicais a partir das regiões *matK* e *trnH-psbA*, com valores próximos a 100% cada (Kress & al., 2009, Kress & al., 2010). Já Gonzalez & al. (2009), mesmo utilizando um grande conjunto de dados para espécies arbóreas amazônicas, mostraram que a identificação correta entre as regiões dos códigos de barras de DNA testadas, não foi superior a 55% para *trnH-psbA*, 49% para *trnL* e 48% para *rbcL*.

Os resultados aqui apresentados demonstram que a combinação de todas as regiões, como proposto inicialmente, foi eficiente na identificação correta em cerca de 40% das espécies da FOM. Contudo, o melhor desempenho foi obtido com a combinação dos dois

espaçadores (*trnH-psbA+ITS*) tanto no teste de monofiletismo quanto no ‘*best close match*’. Independente da região ou dos testes, a melhor região *barcode* foi eficiente em aproximadamente 70% da amostragem. Assim como no nosso trabalho, esta taxa também não foi maior para a região com a melhor performance (*trnH-psbA*) na identificação das espécies amazônicas (Gonzalez & al., 2009).

No geral, a maioria das espécies se agrupou em seus respectivos gêneros e famílias. No entanto, assim como Fazekas & al. (2008), que analisou o monofiletismo das espécies através dos valores de suporte, demonstramos, baseando-se ainda no teste do TaxonDNA, que nenhuma das regiões individuais apresentou melhor desempenho do que as quatro combinações feitas com as mesmas, sendo portanto menos eficaz do que as combinações.

Os gêneros que apresentaram o maior número de espécies (*Nectandra*, *Ocotea*, *Miconia* e *Ilex*) não formaram grupos monofiléticos, em grande parte das espécies, na reconstrução dos oito cladogramas. Esse viés de gêneros com grande número de espécies pode ter influenciado os resultados, porém outro fator poderia ser a baixa ou nenhuma variação nas sequências das regiões testadas, principalmente nas codificantes do DNA plastidial, refletindo a falta de resolução em subconjuntos (Fazekas & al., 2009). Alguns genes podem ser insuficientes na distinção das espécies devido a sua lenta evolução em relação à taxa de especiação, contudo isso pode ser corrigido aumentando o número de regiões analisadas (Fazekas & al., 2009).

Além disso, para estes gêneros e demais espécies que não foram discriminadas, dependendo da região, a utilização das sequências *barcode* pode nos indicar problemas de taxonomia dos grupos, dúvidas na delimitação de espécies ou mesmo a presença de linhagens parafiléticas, sendo que na verdade, o parafiletismo, é um fenômeno generalizado em espécies e subespécies de plantas (Crisp & Chandler, 1996).

A utilização das regiões, *matK*, *trnH-psbA*, *rbcL* e *ITS*, foi parcialmente limitada na diferenciação das espécies de Lauraceae, uma das famílias mais representativas da FOM. Apesar disso, este estudo demonstra que o *DNA Barcoding* mostrou ser uma ferramenta útil para a identificação da maioria das espécies arbóreas da flora da FOM. Embora as regiões codificantes do DNA plastidial não tenham sido suficientemente variáveis para identificar e discriminar as espécies do presente estudo, as mesmas foram eficientes na discriminação das famílias. Este resultado é de grande importância em estudos que envolvam uma ampla amostragem, tendo implicações importantes em inventários florísticos e em aplicações ecológicas com espécies da Mata Atlântica. Deste modo, recomenda-se o sequenciamento combinado das regiões *trnH-psbA* e *ITS* como ferramenta molecular no auxílio a inventários florísticos do estrato arbóreo da Floresta com Araucária no Sul do Brasil.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária (Nº Prot. 19068), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e pela Rede de Brasileira de Identificação Molecular da Biodiversidade (Br-BOL). Mônica Bolson recebeu bolsa REUNI/ CAPES (Nº Edital 01/2010). Agradecemos a Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Curitiba, ao Jardim Botânico Municipal de Curitiba e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (Nº 23702-1) pela concessão das licenças de coleta; aos funcionários do MBM pelo auxílio nas identificações das coletas e a Marcelo L. Brotto pela coleta e identificação das amostras de Lauraceae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angiosperm Phylogeny Group III (APG III).** 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* 161: 105--121.
- Barddal M.L., Roderjan C.V., Galvão F. & Curcio G.R.** 2004. Fitossociologia do sub-bosque de uma Floresta Ombrófila Mista Aluvial, no município de Araucária, PR. *Cienc. Florest.* 14: 35--45.
- Beyra-Matos A. & Lavin M.** 1999 Monograph of *Pictetia* (Leguminosae: Papilionoideae) and review of the *Aeschynomeneae*. *Syst. Bot. Monogr.* 56: 1--3.
- Blum C.T.** 2008. Lista Preliminar de Espécies Vegetais da Floresta Ombrófila Mista no Paraná. FLORA PARANÁ, Sociedade Chauá. Disponível em: <www.chaua.org.br/fa>. Acesso em 29 ago. 2010.
- Bruni I., Mattia F.D., Galimberti A., Galasso G., Banfi E., Casiraghi M. & Labra M.** 2010. Identification of poisonous plants by DNA Barcoding approach. *Int. J. Legal. Med.* 124: 595--603.
- Câmara I.G.** 2005. Breve história da conservação da Mata Atlântica. Pp. 31--42 in: *Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas*. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica (Galindo-Leal C and Câmara IG, eds.). Conservação Internacional, Belo Horizonte.
- Carvalho J., Marques M.C.M., Roderjan C.V., Barddal M. & Sousa S.G.A.** 2009. Relações entre a distribuição das espécies de diferentes estratos e as características do solo de uma floresta aluvial no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 23: 1--9.

- CBOL Plant Working Group.** 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 12794--12797.
- Cervi A.C., Paciornik E.F., Vieira R.F. & Marques L.C.** 1989. Espécies vegetais de um remanescente de Floresta de Araucária (Curitiba, Brasil): Estudo preliminar I. *Acta Biol. Par.* 18: 73--114.
- Chase M.W. & Hills H.G.** 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40: 215--220.
- Cordeiro J. & Rodrigues W.A.** 2007. Caracterização fitossociológica de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista em Guarapuava, PR. *Rev. Arvore* 31(3): 545--554.
- Crisp M.D. & Chandler G.T.** 1996. Paraphyletic species. *Telopea* 6: 813--844.
- Desfeaux C., Maurice S., Henry J.P., Lejeune B. & Gouyon P.H.** 1996. The evolution of reproductive system in the genus *Silene*. *Philos. T. Roy. Soc. B* 263: 409--414.
- Doyle J. & Doyle J.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 810--815.
- Ebihara A., Nitta J.H. & Ito M.** 2010. Molecular species identification with rich floristic sampling: DNA Barcoding the pteridophyte flora of Japan. *PLoS ONE* 5:e15136.
- Fazekas A.J., Burgess K.S., Kesanakurti P.R., Graham S.W., Newmaster S.G., Husband B.C., Percy D.M., Hajibabaei M. & Barret, S.C.H.** 2008. Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. *PLoS ONE* 3(7): e2802. doi:10.1371/journal.pone.0002802.
- Fazekas A.J., Kesanakurti P.R., Burgess K.S., Percy D.M., Graham S.W., Barrett S.C.H., Newmaster S.G., Ibabaei H. & Husband B.C.** 2009. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Molec. Ecol. Resources* 9: 130--139.

- Ford C.S., Ayres K.L., Toomey N., Haider N., Stahl J.V.A., Kelly L.J., Wikstrom N., Hollingsworth P.M., Duff R.J., Hoot S.B., Cowan R.S., Chase M.W. & Wilkinson M.J.** 2009. Selection of candidate coding DNA Barcoding regions for use on land plants. *Bot. J. Linn. Soc.* 159: 1--11.
- Goldenberg R.** 2004. O gênero *Miconia* (Melastomataceae) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 18: 927--947.
- Gonzalez M.A., Baraloto C., Engel J., Mori S.A., Pétronelli P., Riéra B., Roger A., Thébaud C. & Chave J.** 2009. Identification of Amazonian trees with DNA barcodes. *PLoS ONE* 4(10): e7483.doi:10.1371/journal.pone.0007483.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. & De Waard J.R.** 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 270: 313--322.
- Hollingsworth P.M.** 2011. Refining the DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 108: 19451--19452.
- Hueck K.** 1972. *As Florestas da América do Sul*. Editora Polígono e Editora Universidade de Brasília, São Paulo.
- Inoue M.T., Roderjan C.V. & Kuniyoshi S.Y.** 1984. *Projeto madeira do Paraná*. Curitiba, FUPEF, 260p.
- Isernhagen I., Silva S.M., Rodrigues W. & Galvão F.** 2002. Listagem de espécies arbustivo-arbóreas citadas nos trabalhos de fitossociologia florestal no Paraná, Brasil: uma contribuição aos programas de recuperação de áreas degradadas (RAD). Pp.51--134 in: *A fitossociologia florestal no Paraná e os programas de recuperação de áreas degradadas: uma avaliação*. Piracicaba: Instituto de Pesquisa e Estudo Florestais.

- Janzen D.H.** 2003. How to conserve wild plants? Give the world the power to read them. in: Krupnick, G. & Kress, J. *Plant Conservation: A Natural History Approach*, 2003.
- Käss E. & Wink M.** 1997. Molecular phylogeny and phylogeography of *Lupinus* (Leguminosae) inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene and *ITS* 1+2 regions of rDNA. *Plant. Syst. Evol.* 208: 139--167.
- Kelly L.J., Ameka G.K. & Chase M.W.** 2010. DNA Barcoding of African Podostemaceae (river-weeds): A test of proposed barcode regions. *Taxon*, 59: 251--260.
- Kozera C., Dittrich V.A.O. & Silva S.M.** 2006. Fitossociologia do componente arbóreo de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista Montana, Curitiba, PR, BR. *Floresta* 36: 225--237.
- Kress J. & Erickson D.L.** 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*, 6: 1--10, (modified from Fofana B *et al.* [1997] *Belg J Bot* 129: 118--122).
- Kress W.J., Erickson D.L., Jones F.A., Swenson N.G., Perez R., Sanjur O. & Bermingham E.** 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106: 18621--18626.
- Kress W.J., Erickson D.L., Swenson N.G., Thompson J., Uriarte M. & Zimmerman J.K.** 2010. Advances in the Use of DNA Barcodes to Build a Community Phylogeny for Tropical Trees in a Puerto Rican Forest Dynamics Plot. *PLoS ONE* 5: e15409. doi:10.1371/journal.pone.0015409.

- Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A. & Janzen D.H.** 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102: 8369--8374.
- Lahaye R., van der Bank M., Bogarin D., Warner J., Pupulin F., Gigot G., Maurin O., Duthoit S., Barraclough T.G. & Savolainen V.** 2008. DNA Barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0709936105. Acesso em 10 fev. 2010.
- Leite P.F.** 1994. As diferentes unidades fitoecológicas da Região Sul do Brasil. Proposta de classificação. Dissertação, Universidade Federal do Paraná.
- Levin R.A., Wagner W.L., Hoch P.H., Nepokroeff M., Pires J.C., Zimmer E.A. & Sytsma K.J.** 2003. Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* data. *Amer. J. Bot.* 90: 107--115, (modified from Soltis P & al. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89: 449--451).
- Li Y., Gao L.M., Poudel R.C., Li D.Z. & Forrest A.** 2011. High universality of *matK* primers for barcoding gymnosperms. *J. Syst. Evol.* 49: 169--175.
- Liebsch D. & Acra L.A.** 2002. Riqueza de espécies de sub-bosque de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista em Tijucas do Sul, PR. *Cienc. Florest.* 14: 67--76.
- Liebsch D. & Mikich S.B.** 2009. Fenologia reprodutiva de espécies vegetais da Floresta Ombrófila Mista do Paraná, Brasil. *Revista Brasil. Bot.* 32: 375--391.
- Liebsch D., Mikich S.B., Possette R.F.S. & Ribas O.S.** 2009. Levantamento florístico e síndromes de dispersão em remanescentes de Floresta Ombrófila Mista na região centro-sul do estado do Paraná. *Hoehnea* 36: 233--248.
- Madriñán, S.** Dados não publicados. Códigos de Barras de ADN de arboles Neotropicales (Lauraceae, Sapotaceae, *Inga*). Disponível em: <http://arbol.uniandes.edu.co/Proyectos.html>. Acesso em 10 dez. 2010.

- Meyer C.P. & Paulay G.** 2005. DNA Barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *Plos Biol.* 3: 2229--2238.
- Meier R., Shiyang K., Vaidya G. & Ng P.K.L.** 2006. DNA Barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Syst. Biol.* 55: 715--728.
- Nascimento D.S., Maranhão L.T. & Hatschbach G.** 2007. Fitossociologia da vegetação fanerogâmica do Jardim Botânico Municipal de Curitiba, PR, Brasil. *R. Bras. Bioci.* 5: 240--242.
- National Center Biotechnology Information (NCBI).** 2011. "Sequin: A DNA Sequence Submission and Update Tool". Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/index.html>. Acessado em 07 jan 2012.
- Pettengill J.B. & Neel M.C.** 2010. An evaluation of candidate plant DNA barcodes and assignment methods in diagnosing 29 species in the genus *Agalinis* (Orobanchaceae). *Amer. J. Bot.* 97: 1391--1406.
- Reginato M., Matos F.B., Lindoso G.S., Souza C.M.F., Prevedello J.A., Morais J.W. & Evangelista P.H.L.** 2008. A vegetação na Reserva Mata Viva, Curitiba, Paraná, Brasil. *Acta Biol. Par.* 37: 229--252.
- Reitz R., Klein R.M. & Reis A.** 1979. *Madeiras do Brasil*. Florianópolis: Lunardelli, 320p.
- Roderjan C.V., Galvão F., Kuniyoshi Y.S. & Hatschbach G.G.** 2002. As unidades fitogeográficas do Estado do Paraná. *Ciência & Ambiente* 24: 75--92.
- Rondon Neto R.M., Kozera C., Andrade R.R., Cecy A.T., Hummes A.P., Fritzsos E., Caldeira M.V.W., Maciel M.N.M. & Souza M.K.F.** 2002. Caracterização florística e estrutural de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista, em Curitiba, PR – Brasil. *Floresta* 32: 3--16.

- Roy S., Tyagi A., Shukla V., Kumar A., Singh U.M., Chaudhary L.B., Datt B., Bag S.K., Singh P.K., Nair N.K., Husain T. & Tuli R.** 2010. Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: A case study with Indian *Berberis* species. *PLoS ONE* 5: e13674. doi:10.1371/journal.pone.0013674.
- Saitou N. & Nei M.** 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406--425.
- Salazar G.** Dados não publicados. Código de barras de la flora de México Disponível em: <http://arbol.uniandes.edu.co/Proyectos.html>. Acesso em 10 dez. 2010.
- Sang T., Crawford D.J. & Stuessy T.F.** 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Amer. J. Bot.* 84: 1120--1136.
- Sass C., Little D.P., Stevenson D.W. & Specht C.D.** 2007. DNA Barcoding in the Cycadales: Testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads. *PLoS ONE* 2: e1154. doi:10.1371/journal.pone.0001154.
- Seger C.D., Dlugosz F.L., Kurasz G., Martinez D.T., Ronconi E., Melo L.A.N., Bittencourt S.M., Brand M.A., Carniatto I., Galvão F. & Roderjan C.V.** 2005. Levantamento florístico e análise fitossociológica de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista localizado no município de Pinhais, Paraná-Brasil. *Floresta* 35: 291--302.
- Selusniaki M. & Acra L.A.** 2010. O componente arbóreo-arbustivo de um remanescente de Floresta com Araucária no município de Curitiba, Paraná. *Floresta* 40: 593--602.
- Shaw J., Lickey E.B., Schilling E.E. & Small R.L.** 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms. The tortoise and the hare III. *Amer. J. Bot.* 94: 275--288.

- Srivathsan A. & Meier R.** 2011. On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics* 27: 1--5.
- Staden R., Judge D.P. & Bonfield J.K.** 2003. Analysing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. In: Krawetz SA, Womble DD (eds.), *Introduction to Bioinformatics: A theoretical and practical approach*. Totawa: Human Press.
- Starr, J.R., Naczi, R.F. & Chouinard, B.N.** 2009. Plant DNA barcodes and species resolution in sedges (*Carex*, Cyperaceae). *Molec. Ecol. Resources* 9: 151--63.
- Stehmann, J. R.; Forzza, R. C.; Salino, A.; Sobral, M.; Costa, D. P. & Kamino, L. H. Y.** 2009. *Plantas da Floresta Atlântica*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 516 p.
- Štorchová H. & Olson M.S.** 2007. The architecture of the chloroplast *trnH-psbA* noncoding region in angiosperms. *Plant. Syst. Evol.* 268: 235--256.
- Suganuma E. & van den Berg C.** Dados não publicados. *Barcoding* de um fragmento megadiverso da Mata Atlântica sul bahiana. Disponível em: <http://arbol.uniandes.edu.co/Proyectos.html>. Acesso em 10 dez. 2010.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N. Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731--2739.doi:10.1093/molbev/msr121.
- Tate J.A. & Simpson B.B.** 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Syst. Bot.* 28: 723--737.
- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673--4680.

- van den Berg C.** Dados não publicados. Barcoding de espécies endêmicas da Caatinga. Disponível em: <http://arbol.uniandes.edu.co/Proyectos.html>. Acesso em 10 dez. 2010.
- Veloso H.P., Rangel-Filho A.L.R. & Lima I.C.A.** 1991 *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal*. Rio de Janeiro: IBGE.
- Wang W., Wu Y., Yan Y., Ermakova M., Kerstetter R. & Messing J.** 2010. DNA Barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. *Bmc Plant Biol.* 10: 205 doi:10.1186/1471-2229-10-205.
- Watzlawick L.F., Sanquetta C.R., Valério A.F. & Silvestre R.** 2005. Caracterização da composição florística e estrutura de uma Floresta Ombrófila Mista, no município de General Carneiro (PR). *Ambiência* 1: 229--237.
- Yao H., Song J., Liu C., Luo K., Han J., Li Y., Pang X., Xu H., Zhu Y., Xiao P. & Chen S.** 2010. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLoS ONE* 5: 10, e13102.doi:10.1371/journal.pone.0013102.

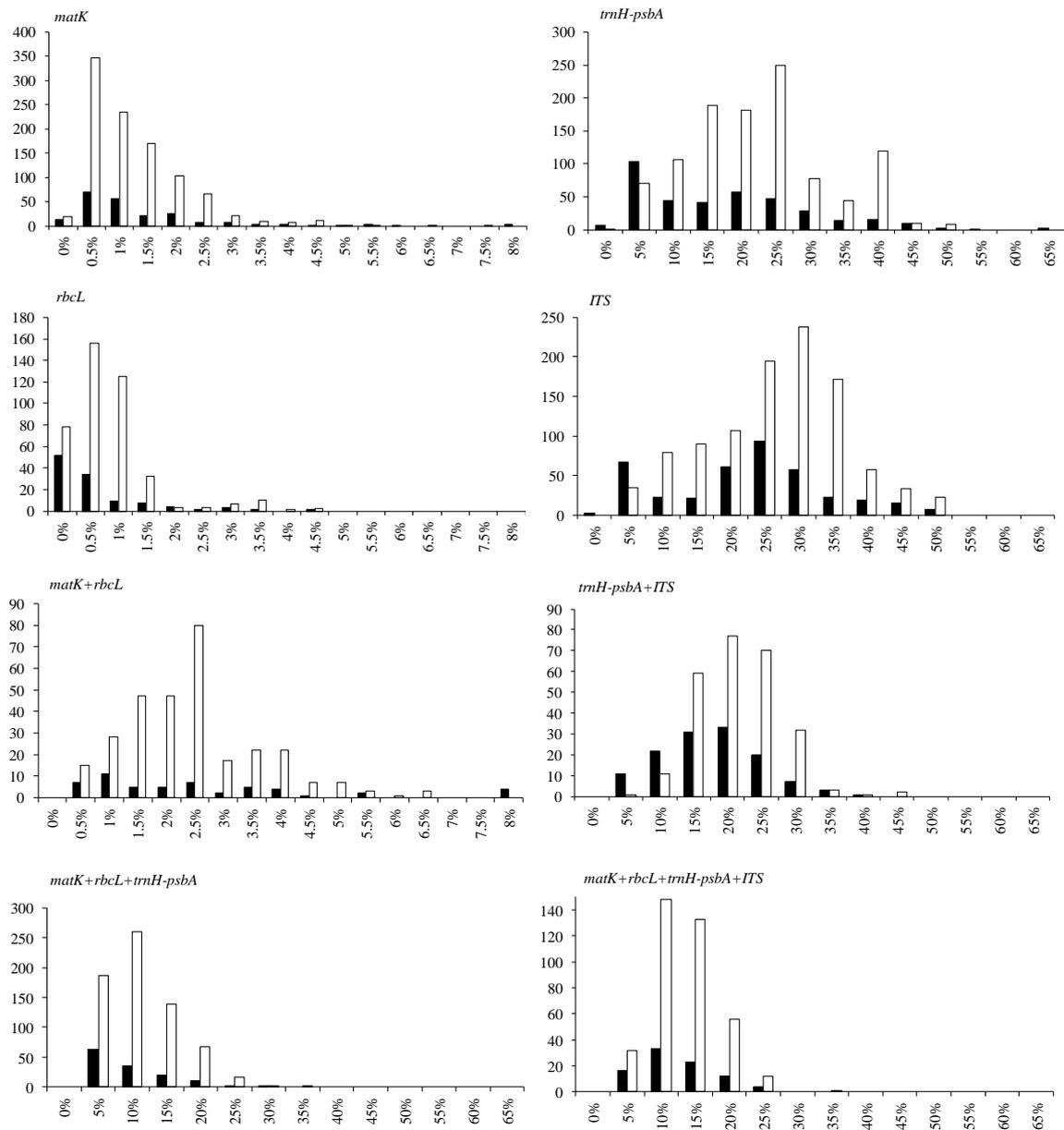


Fig. 1. Comparações das divergências intraespecíficas (barra preta) e interespecíficas (barra branca) das regiões individuais e combinadas. Eixo x corresponde a distância- p com base na variação de cada região. Eixo y é o número de ocorrências.

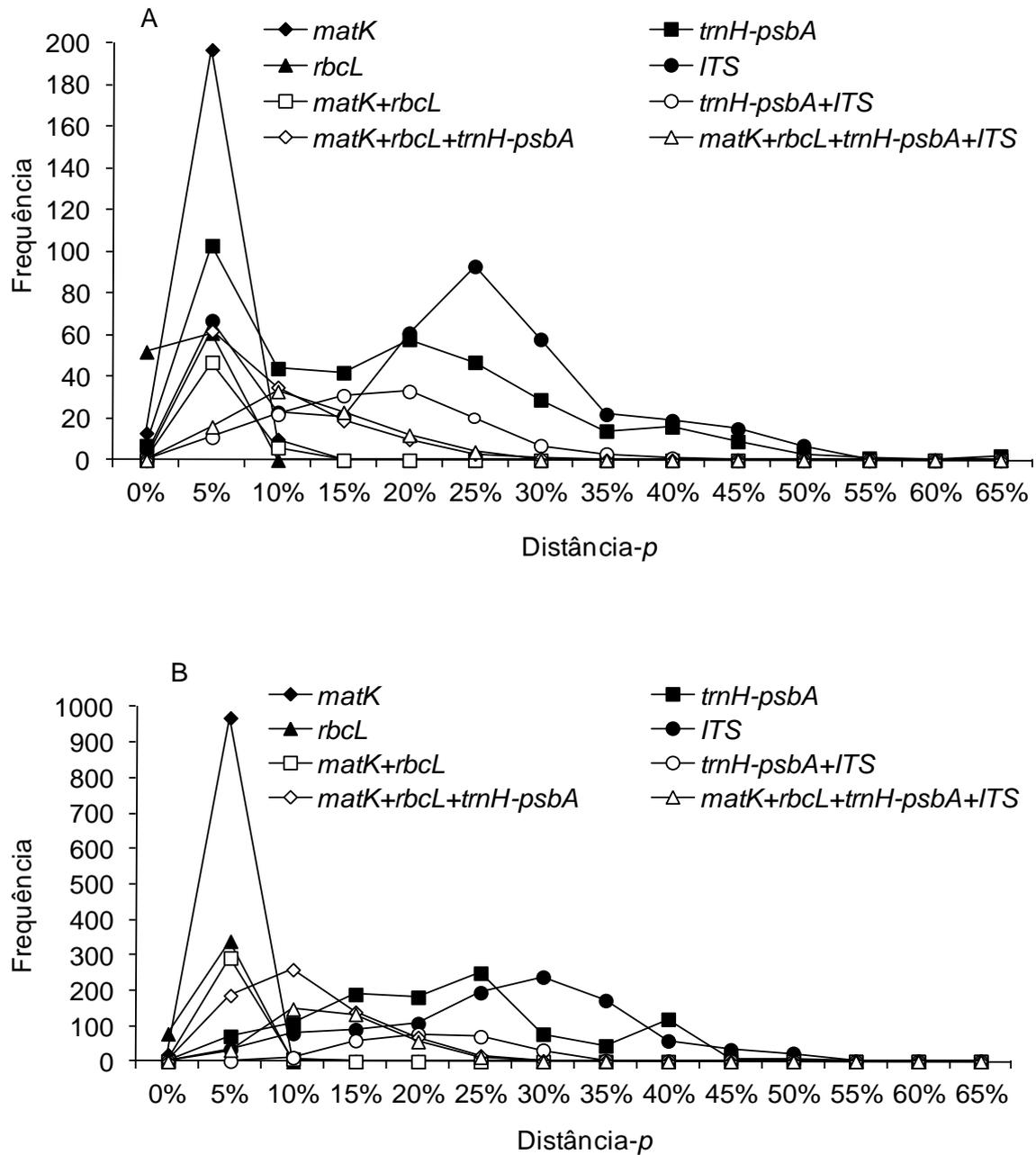


Fig. 2. Relação das divergências intraespecíficas e interespecíficas de todas as regiões individuais do código de barras de DNA e nas combinações especificadas dos quatro fragmentos. A, divergência intraespecífica; B, divergência interespecífica.

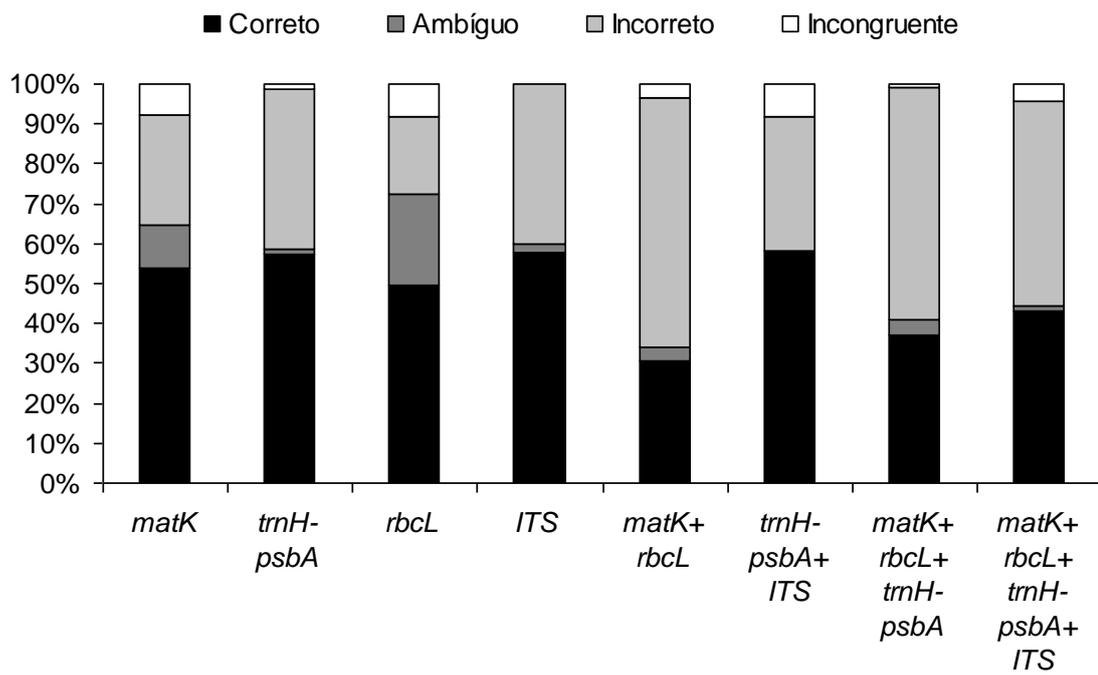


Fig. 3. Desempenho na identificação das espécies arbóreas da FOM a partir de quatro fragmentos nucleotídicos do código de barras e de diferentes combinações entre eles, obtido pelo teste “*best close match*” do TaxonDNA.

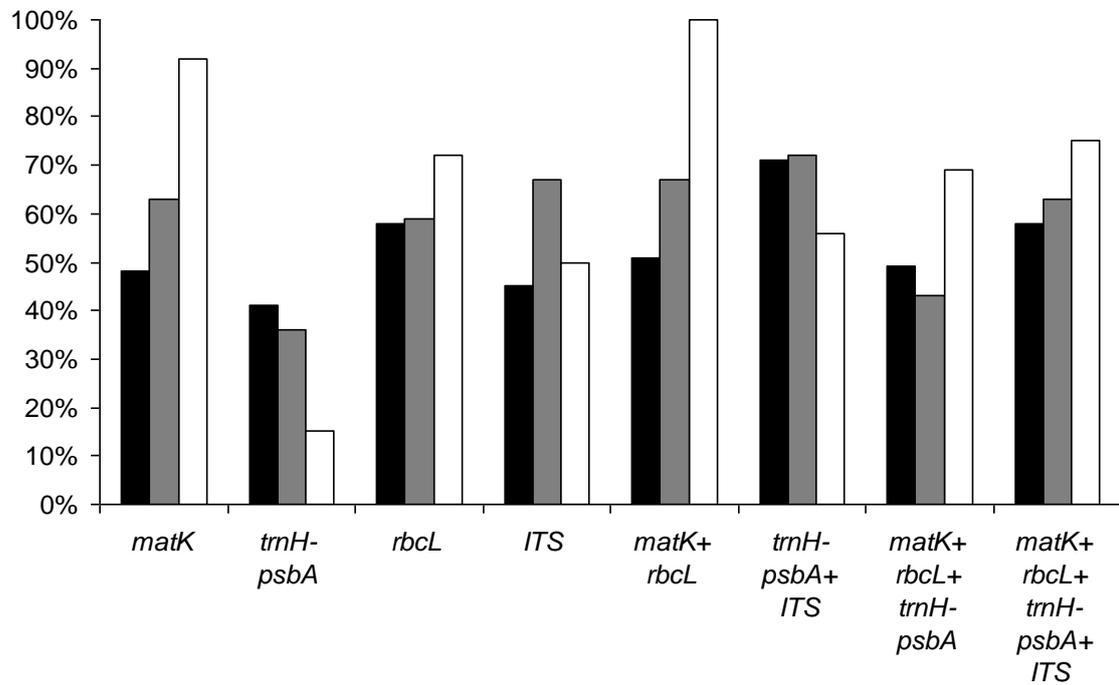


Fig. 4. Desempenho do teste de monofiletismo através de NJ, com suporte de *bootstrap* acima de 75%, para as espécies com mais de 1 indivíduo das regiões do código de barras de DNA individuais e as quatro combinações, especificando o percentual por espécie (barra preta), gênero (barra cinza) e família (barra branca).

Tabela 1. Sucesso de sequenciamento das regiões do código de barras de DNA das espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Mista.

Região	Sucesso de sequenciamento (Nº total de indivíduos)	Nº de indivíduos	Nº de espécies	Nº de gêneros	Nº de famílias	Nº de ordens
<i>matK</i>	88% (193)	168	88	56	31	19
<i>trnH-psbA</i>	82% (305)	252	104	64	38	20
<i>rbcL</i>	98% (166)	161	101	60	37	19
<i>ITS</i>	73% (306)	203	96	58	38	21

Tabela 2. Características moleculares das sequências nucleotídicas das quatro regiões do código de barras de DNA.

Região	Média das bases nucleotídicas (%)				Comprimento mínimo – máximo (pb)	Comprimento médio (pb)	Comprimento alinhamento (pb)	Nº de sítios variáveis (%)
	T	C	A	G				
	<i>matK</i>	36	18,5	29,5	16	414-857	799,0	954
<i>trnH-psbA</i>	37,4	13,6	32,2	16,8	208-961	488,1	974	836 (85%)
<i>rbcL</i>	28,6	20,8	27,5	23,1	502-579	569,8	595	243 (40%)
<i>ITS</i>	18,3	30,7	20,3	30,7	472-756	655,9	833	741 (88%)
<i>matK+ rbcL</i>	32,9	19,4	28,6	19,0	1287-1426	1388,6	1549	872 (55%)
<i>trnH-psbA+ ITS</i>	26,5	23,4	25,4	24,8	900-1386	1136,5	1807	1428 (79%)
<i>matK+ rbcL+ trnH-psbA</i>	34,2	17,8	29,6	18,4	521-2064	1577,3	2523	1710 (67%)
<i>matK+ rbcL+ trnH-psbA+ ITS</i>	30,0	21,2	27,1	21,7	1476-2678	2220,9	3356	2316 (69%)

APÊNDICES

Apêndice 1. Relação dos municípios do estado do Paraná em que foram realizadas as coletas dos indivíduos e populações utilizadas para aplicação do código de barras de DNA da FOM, com as localidades e as coordenadas geográficas.

Município	Coordenadas geográficas do município	Localidade
Almirante Tamandaré	25°19'29" S; 49°18'36" W	Área Rural
Antonina	25°25'43" S; 48°42'43" W	Reserva Natural do Rio Cachoeira (SPVS), Trilha da Bezerra
Clevelândia	26°23'45" S; 52°28'15" W	Margem do rio Chopim
Cambe	23°16'33" S; 51°16'42" W	Parque Municipal Danziger Hof
Campina Grande do Sul	25°18'20" S; 49°3'19" W	
Campo Largo	25°27'31" S; 49°31'42" W	Rondinha, área rural
Campo Mourão	24°2'44" S; 52°22'59" W	Estação Ecológica do Cerrado
Colombo	25°17'30" S; 49°13'27" W	Área rural
Curitiba	25°25'40" S; 49°16'23" W	Bairro Cajuru Bairro Pilarzinho Bairro Tatuquara Bosque de Portugal Bosque do Alemão, trilha principal Bosque João Paulo II BR 277, limite dos municípios de Curitiba e Campo Largo Câmpus Centro Politécnico da UFPR,

		capão próximo ao ginásio da Educação Física
		Câmpus Centro Politécnico da UFPR, Reserva Mata Viva
		Câmpus Jardim Botânico da UFPR, Capão do Tigre
		Jardim Botânico Municipal, bosque de mata nativa
		Parque Barigui
		Parque São Lourenço
		Uberaba de Cima, esquina entre as ruas Julio Wischral e Ivo Ferro
Diamante do Norte	22°39'23" S; 52°51'35" W	Estação Ecológica do Caiuá
Honório Serpa	26°8'28" S; 52°23'13" W	Margem do rio Chopim
Jaguariaíva	24°23'40" S; 49°35'52" W	Parque Estadual do Cerrado
Londrina	23°18'37" S; 51°9'46" W	Parque Estadual Mata dos Godoy
Mato Rico	25°42'19" S; 52°8'46" W	Próximo ao rio Cantu
Morretes	25°28'37" S; 48°50'4" W	Parque Estadual Pico do Morumbi
		Serra da Prata
Paranaguá	25°31'12" S; 48°30'33" W	Ilha do Mel, Trilha do Belo
		Ilha do Mel, Trilha do Farol
		Ilha do Mel, Trilha do Forte
		Ilha do Mel, Praia do Istmo
Piraquara	25°26'30" S; 49°3'48" W	Caminho Trentino do Mananciais

		Parque Estadual Pico do Marumbi, Trilha da Chaminé Trilha para o Morro do Canal
Ponta Grossa	25°5'42" S; 50°9'43" W	Parque Estadual de Vila Velha
Quatro Barras	25°21'56" S; 49°4'37" W	Morro Anhangava
São José dos Pinhais	25°7'58" S; 53°16'38" W	Serra do Salto
Telêmaco Borba	24°19'26" S; 50°36'56" W	Próximo ao rio Tibagi
Terra Roxa	24°09'24" S; 54°05'49" W	RPPN Fazenda Açú
Tibagi	24°30'34" S; 50°24'49" W	Parque Estadual do Guartelá, Trilha do Mirante
Tijucas do Sul	25°55'41" S; 49°11'56" W	Remanescentes florestais marginais à represa de Vossoroça Trilha para Morro Araçatuba

Apêndice 2. Relação do teste 'best close match' do TaxonDNA na identificação das espécies da FOM.

Região	Número de indivíduos	Identificação correta	Identificação ambígua	Identificação incorreta	Incongruente	Limite calculado
<i>matK</i>	218	53,66%	11,0%	27,52%	7,79%	5,03%
<i>trnH-psbA</i>	290	57,24%	1,37%	40,0%	1,37%	39,13%
<i>rbcL</i>	186	49,46%	23,11%	19,35%	8,06%	25,19%
<i>ITS</i>	294	57,82%	2,04%	40,13%	0,0%	41,52%
<i>matK+rbcL</i>	121	30,57%	3,3%	62,8%	3,3%	7,70%
<i>trnH-psbA+ ITS</i>	164	55,36%	0,69%	43,25%	0,69%	28,48%
<i>matK + rbcL+ trnH-psbA</i>	196	37,24%	3,57%	58,16%	1,02%	19,09%
<i>matK+ rbcL+ trnH-psbA+ ITS</i>	160	43,12%	1,25%	51,24%	4,37%	20,40%

Apêndice 3. Lista das espécies arbóreas coletadas na FOM, coletor e número de coleta, localidade e o número de acesso do GenBank das quatro regiões do código de barras de DNA. A classificação dos taxa está de acordo com APG III (2009).

Ordem/ Família/ Espécie	Coletor/ Número de coleta	Município	Número de acesso do GenBank			
			<i>matK</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>rbcL</i>	<i>ITS</i>
CONIFERALES						
Araucariaceae						
<i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	Bolson M 477	Curitiba	-	-	-	-
<i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	Bolson M 485-01	Curitiba	-	-	-	-
<i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	Bolson M 485-04	Curitiba	-	-	-	-
<i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze			gi156074095	gi264684362	gi264684344	
Podocarpaceae						
<i>Podocarpus lambertii</i> Klotzsch ex Endl.	Bolson M 486-01	Curitiba	-	-	-	-
<i>Podocarpus lambertii</i> Klotzsch ex Endl.	Bolson M 486-04	Curitiba	-	-	-	-
<i>Podocarpus lambertii</i> Klotzsch ex Endl.	Bolson M 486-03	Curitiba	-	-	-	-
<i>Podocarpus lambertii</i> Klotzsch ex Endl.			gi336111973		gi332713612	
CANELLALES						
Canellaceae						
<i>Cinnamodendron dinisii</i> Schwacke	Hulyk L 1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Cinnamodendron dinisii</i> Schwacke			gi197318430	gi222093769	gi197318453	gi197318433
<i>Cinnamodendron dinisii</i> Schwacke			gi197318406			gi197318434
<i>Cinnamodendron dinisii</i> Schwacke						gi9717241
Winteraceae						
<i>Drimys brasiliensis</i> Miers	Blum CT 10-094	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Drimys brasiliensis</i> Miers	Blum CT 10-092	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Drimys brasiliensis</i> Miers	Bolson M 416	Tibagi	-	-	-	-
<i>Drimys brasiliensis</i> Miers	Blum CT 10-093	Tijucas do Sul	-	-	-	-

		Sul					
<i>Drimys brasiliensis</i> Miers						gi222093758	gi219819806
<i>Drimys brasiliensis</i> Miers						gi222093759	gi219819807
<i>Drimys brasiliensis</i> Miers						gi222093760	gi219819808
<i>Drimys brasiliensis</i> Miers							gi219819809
<i>Drimys brasiliensis</i> Miers							gi219819810
<i>Drimys brasiliensis</i> Miers							gi219819811
LAURALES							
Lauraceae							
<i>Cinnamomum amoenum</i> (Nees) Kosterm.	Blum CT 10-142	Almirante Tamandaré	-	-	-	-	-
<i>Cinnamomum amoenum</i> (Nees) Kosterm.							gi240248170
<i>Cinnamomum sellowianum</i> (Nees & C. Martius ex Nees) Kosterm.	Bolson M 400	Ponta Grossa	-	-	-	-	-
<i>Cinnamomum sellowianum</i> (Nees & C. Martius ex Nees) Kosterm.	Brotto ML 607	Ponta Grossa	-	-	-	-	-
<i>Cinnamomum sellowianum</i> (Nees & C. Martius ex Nees) Kosterm.	Brotto ML 624	Jaguariaíva	-	-	-	-	-
<i>Cinnamomum sellowianum</i> (Nees & C. Martius ex Nees) Kosterm.	Brotto ML 605	Ponta Grossa					-
<i>Cinnamomum sellowianum</i> (Nees & C. Martius ex Nees) Kosterm.	Brotto ML 606	Ponta Grossa			-		
<i>Cryptocarya aschersoniana</i> Mez	Brotto ML 649	Telêmaco Borba	-	-	-	-	-
<i>Cryptocarya aschersoniana</i> Mez	Brotto ML 648	Telêmaco Borba			-	-	-
<i>Endlicheria paniculata</i> (Spreng.) J.F. Macbr	Bolson M 458	Honório Serpa	-	-	-	-	-
<i>Endlicheria paniculata</i> (Spreng.) J.F. Macbr	Brotto ML 575	Terra Roxa	-	-	-	-	-

<i>Endlicheria paniculata</i> (Spreng.) J.F. Macbr	Brotto ML 638	Telêmaco Borba	-	-	-	-
<i>Endlicheria paniculata</i> (Spreng.) J.F. Macbr	Brotto ML 673	Paranaguá	-	-	-	-
<i>Endlicheria paniculata</i> (Spreng.) J.F. Macbr						gi14010594
<i>Nectandra grandiflora</i> Nees & C. Mart. ex Nees	Blum CT 10-033	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Nectandra grandiflora</i> Nees & C. Mart. ex Nees	Brotto ML 641	Telêmaco Borba	-	-	-	-
<i>Nectandra grandiflora</i> Nees & C. Mart. ex Nees	Brotto ML 642	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Nectandra grandiflora</i> Nees & C. Mart. ex Nees	Blum CT 10-034	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Nectandra grandiflora</i> Nees & C. Mart. ex Nees	Blum CT 10-035	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Nectandra grandiflora</i> Nees & C. Mart. ex Nees	Blum CT 10-036	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Nectandra lanceolata</i> Nees	Blum CT 10-116	Colombo	-	-	-	-
<i>Nectandra lanceolata</i> Nees	Brotto ML 651	Mato Rico	-	-	-	-
<i>Nectandra lanceolata</i> Nees	Blum CT 10-117	Colombo	-	-	-	-
<i>Nectandra lanceolata</i> Nees						gi305855569
<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	Brotto ML 174	São José dos Pinhais	-	-	-	-
<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	Brotto ML 504	Clevelândia	-	-	-	-
<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	Brotto ML 645	Telêmaco Borba	-	-	-	-
<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez						gi305855570
<i>Nectandra puberula</i> (Schott) Nees	Brotto ML 413	Quatro Barras	-	-	-	-

<i>Nectandra puberula</i> (Schott) Nees	Brotto ML 655	Quatro Barras	-	-	-
<i>Nectandra puberula</i> (Schott) Nees	Brotto ML 729	São José dos Pinhais	-	-	-
<i>Ocotea bicolor</i> Vattimo	Brotto ML 603	Ponta Grossa	-	-	-
<i>Ocotea bicolor</i> Vattimo	Brotto ML 604	Ponta Grossa	-	-	-
<i>Ocotea bicolor</i> Vattimo	Brotto ML 442	Morretes	-	-	-
<i>Ocotea bicolor</i> Vattimo	Brotto ML 730	São José dos Pinhais	-	-	-
<i>Ocotea bicolor</i> Vattimo	Blum CT 11-035	Tijucas do Sul	-	-	-
<i>Ocotea bicolor</i> Vattimo	Brotto ML 643	Telêmaco Borba	-	-	-
<i>Ocotea bicolor</i> Vattimo	Brotto ML 410	Curitiba	-	-	-
<i>Ocotea bicolor</i> Vattimo	Brotto ML 632	Jaguariaíva	-	-	-
<i>Ocotea catharinensis</i> Mez	Brotto ML 663	Quatro Barras	-	-	-
<i>Ocotea catharinensis</i> Mez	Brotto ML 664	Quatro Barras	-	-	-
<i>Ocotea catharinensis</i> Mez	Brotto ML 694	Diamante do Norte	-	-	-
<i>Ocotea elegans</i> Mez	Brotto ML 618	Ponta Grossa	-	-	-
<i>Ocotea elegans</i> Mez	Brotto ML 639	Telêmaco Borba	-	-	-
<i>Ocotea elegans</i> Mez	Brotto ML 659	Quatro Barras	-	-	-
<i>Ocotea elegans</i> Mez	Brotto ML 503	Honório Serpa	-	-	-
<i>Ocotea glaziovii</i> Mez	Brotto ML 610	Ponta Grossa	-	-	-
<i>Ocotea glaziovii</i> Mez	Brotto ML 682	Paranaguá	-	-	-
<i>Ocotea glaziovii</i> Mez	Brotto ML 441	Morretes	-	-	-

<i>Ocotea glaziovii</i> Mez	Brotto ML 683	Paranaguá	-	-		
<i>Ocotea lancifolia</i> (Schott) Mez	Brotto ML 626	Jaguariaíva	-	-	-	-
<i>Ocotea lancifolia</i> (Schott) Mez	Brotto ML 440	Campina Grande do Sul	-	-	-	
<i>Ocotea lancifolia</i> (Schott) Mez	Brotto ML 627	Jaguariaíva	-	-		
<i>Ocotea nectandrifolia</i> Mez	Brotto ML 657	Quatro Barras	-	-	-	-
<i>Ocotea nectandrifolia</i> Mez	Brotto ML 411	Curitiba	-			
<i>Ocotea nunesiana</i> (Vattimo-Gil) Baitello	Brotto ML 656	Quatro Barras	-	-	-	
<i>Ocotea nunesiana</i> (Vattimo-Gil) Baitello	Brotto ML 277	Quatro Barras	-			-
<i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez	Brotto ML 175	Curitiba	-	-	-	
<i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez	Brotto ML 601	Curitiba	-			
<i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez	Brotto ML 615	Ponta Grossa	-	-		
<i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez	Brotto ML 658	Quatro Barras	-	-		
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	Brotto ML 284	Morretes	-	-	-	-
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	Brotto ML 628	Jaguariaíva	-	-	-	-
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	Brotto ML 620	Ponta Grossa	-	-	-	
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	Brotto ML 414	Curitiba	-	-		
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	Brotto ML 619	Ponta Grossa				-
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer				gi14090628		gi14090784
<i>Ocotea porosa</i> (Nees & C. Mart.) Barroso	Brotto ML 611	Ponta Grossa				-
<i>Ocotea porosa</i> (Nees & C. Mart.) Barroso	Brotto ML 617	Ponta Grossa	-	-	-	
<i>Ocotea porosa</i> (Nees & C. Mart.) Barroso	Brotto ML 665	Curitiba	-	-	-	-
<i>Ocotea porosa</i> (Nees & C. Mart.) Barroso	Brotto ML 715	Morretes				-

Barroso							
<i>Ocotea porosa</i> (Nees & C. Mart.)	Brotto ML 79	Curitiba	-	-	-	-	
Barroso							
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	Blum CT 10-069	Curitiba	-	-	-	-	
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	Bolson M 369	Curitiba	-	-	-	-	
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	Bolson M 375	Curitiba	-	-	-	-	
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	Bolson M 327-1	Curitiba	-	-	-	-	
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	Bolson M 371-1	Curitiba	-	-	-	-	
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees				gi166155824	gi168829672	gi261279475	
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees				gi166155826	gi168829673		
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees				gi166155827	gi261864233		
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees				gi261347963			
<i>Ocotea pulchella</i> (Nees) Mez	Brotto ML 446	Telêmaco Borba	-	-	-	-	
<i>Ocotea pulchella</i> (Nees) Mez	Brotto ML 50	Curitiba	-	-	-	-	
<i>Ocotea pulchella</i> (Nees) Mez	Brotto ML 602	Curitiba	-	-	-	-	
<i>Ocotea pulchella</i> (Nees) Mez	Bolson M 454	Paranaguá	-	-	-	-	
<i>Ocotea pulchella</i> (Nees) Mez							gi14090787
<i>Ocotea silvestris</i> Vattimo	Brotto ML 640	Telêmaco Borba	-	-	-	-	
<i>Ocotea silvestris</i> Vattimo							gi305855593
<i>Persea major</i> (Meisn.) L.E.Kopp	Brotto ML 644	Telêmaco Borba	-	-	-	-	
<i>Persea major</i> (Meisn.) L.E.Kopp	Brotto ML 716	Morretes	-	-	-	-	
<i>Persea major</i> (Meisn.) L.E.Kopp	Brotto ML 612	Ponta Grossa	-	-	-	-	
Monimiaceae							
<i>Mollinedia clavigera</i> Tul.	Bolson M 367	Curitiba	-	-	-	-	
<i>Mollinedia clavigera</i> Tul.	Bolson M 413	Curitiba	-	-	-	-	
MAGNOLIALES							
Annonaceae							

<i>Annona emarginata</i> (Schltdl.) H.Rainer	Bolson M 418	Tibagi	-	-	-	
<i>Annona rugulosa</i> (Schltdl.) H.Rainer	Blum CT 11-026	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Guatteria australis</i> A.St.	Blum CT 10-145	Curitiba		-	-	-
<i>Guatteria australis</i> A.St.	Blum CT 11-005	Piraquara		-	-	-
<i>Guatteria australis</i> A.St.	Blum CT 11-004	Piraquara		-		
<i>Guatteria australis</i> A.St.				gi55776006		
ARECALES						
Areceaceae						
<i>Syagrus romanzoffiana</i> (Cham.) Glassm				gi270155857	gi270156396	gi270156183
RANUNCULALES						
Berberidaceae						
<i>Berberis laurina</i> Billb.	Bolson M 411	Curitiba		-		-
PROTEALES						
Proteaceae						
<i>Roupala montana</i> var. <i>brasiliensis</i> (Klotzsch) K.S.Edwards	Blum CT 11-011	Curitiba	-	-	-	-
CELASTRALES						
Celastraceae						
<i>Maytenus evonymoides</i> Reissek	Blum CT 10-037	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Maytenus evonymoides</i> Reissek	Bolson M 359	Curitiba	-	-	-	-
<i>Maytenus evonymoides</i> Reissek	Bolson M 380	Curitiba		-		
<i>Maytenus officinalis</i> Mabb.	Bolson M 425	Curitiba	-	-	-	-
MALPIGHIALES						
Erythroxyloaceae						
<i>Erythroxyllum deciduum</i> A. St.	Blum CT 11-047	Tijucas do Sul		-	-	-
<i>Erythroxyllum deciduum</i> A. St.	Bolson M 399	Ponta Grossa		-	-	-
<i>Erythroxyllum deciduum</i> A. St.	Bolson M 421	Tibagi				-

Euphorbiaceae

<i>Alchornea triplinervia</i> Müll.Arg.	Bolson M 415	Tibagi	-	-	-
<i>Sapium glandulosum</i> (L.) Morong	Bolson M 451	Curitiba	-	-	-
<i>Sapium glandulosum</i> (L.) Morong			gi261348033	gi261864286	
<i>Sebastiania brasiliensis</i> Spreng.	Bolson M 476	Curitiba	-	-	-
<i>Sebastiania brasiliensis</i> Spreng.	Bolson M 338-1	Curitiba	-	-	-
<i>Sebastiania commersoniana</i> (Baill.) L.B. Sm. & Downs	Bolson M 373-1	Curitiba	-	-	-
<i>Sebastiania commersoniana</i> (Baill.) L.B. Sm. & Downs	Brotto ML 521	Clevelândia	-	-	-
<i>Sebastiania commersoniana</i> (Baill.) L.B. Sm. & Downs	Bolson M 373-2	Curitiba	-	-	-
<i>Sebastiania commersoniana</i> (Baill.) L.B. Sm. & Downs	Bolson M 396	Piraquara	-	-	-
<i>Sebastiania commersoniana</i> (Baill.) L.B. Sm. & Downs	Bolson M 403	Ponta Grossa	-	-	-
<i>Sebastiania commersoniana</i> (Baill.) L.B. Sm. & Downs	Blum CT 10-133	Campo Largo	-	-	-
Salicaceae					
<i>Casearia decandra</i> Jacq.	Bolson M 409	Curitiba	-	-	-
<i>Casearia decandra</i> Jacq.	Brotto ML 522	Honório Serpa	-	-	-
<i>Casearia decandra</i> Jacq.	Blum CT 10-150	Curitiba	-	-	-
<i>Casearia lasiophylla</i> Eichler	Blum CT 10-074	Curitiba	-	-	-
<i>Casearia lasiophylla</i> Eichler	Bolson M 394	Curitiba	-	-	-
<i>Casearia lasiophylla</i> Eichler	Blum CT 10-147	Curitiba	-	-	-
<i>Casearia obliqua</i> Spreng.	Brotto ML 523	Clevelândia	-	-	-
<i>Casearia sylvestris</i> Sw.			gi261347767	gi313502339	gi261279217
<i>Casearia sylvestris</i> Sw.			gi313502728		gi263042505
<i>Casearia sylvestris</i> Sw.					gi263042507

<i>Casearia sylvestris</i> Sw.							gi313757996
<i>Xylosma ciliatifolia</i> (Clos) Eichler	Blum CT 10-095	Tijucas do Sul	-	-			
OXALIDALES							
Cunoniaceae							
<i>Lamanonia ternata</i> Vell.	Blum CT 10-127	Quatro Barras	-	-	-	-	
<i>Lamanonia ternata</i> Vell.	Bolson M 456	Honório Serpa	-	-	-	-	
<i>Lamanonia ternata</i> Vell.	Blum CT 10-128	Quatro Barras		-		-	
<i>Lamanonia ternata</i> Vell.	Blum CT 10-141	Curitiba		-		-	
<i>Lamanonia ternata</i> Vell.	Bolson M 462	Piraquara		-		-	
<i>Lamanonia ternata</i> Vell.	Blum CT 11-022	Tijucas do Sul		-			
FABALES							
Fabaceae							
<i>Dalbergia brasiliensis</i> Vog.							gi148925523
<i>Dalbergia frutescens</i> (Vell.) Britton							gi148925525
<i>Inga marginata</i> Willd.	Blum CT 11-016	Curitiba	-	-	-	-	
<i>Machaerium stipitatum</i> (DC.) Vogel							gi148925538
<i>Machaerium stipitatum</i> (DC.) Vogel							gi148925539
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	Blum CT 10-045	Campo Largo	-	-	-	-	
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	Bolson M 353	Curitiba	-	-	-	-	
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	Bolson M 347	Curitiba	-	-	-	-	
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	Blum CT 10-046	Campo Largo	-	-	-	-	
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	Blum CT 10-047	Campo Largo	-	-	-	-	
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	Blum CT 10-049	Campo Largo	-	-	-	-	
<i>Senna multijuga</i> (Rich.) H.S. Irwin & Barneby	Bolson M 325	Curitiba	-	-	-	-	

<i>Senna pendula</i> (Humb. & Bonpl. ex Willd.) H.S. Irwin & Barneby	Bolson M 330-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Senna pendula</i> (Humb. & Bonpl. ex Willd.) H.S. Irwin & Barneby	Bolson M 330-2	Curitiba	-	-	-	-
<i>Senna pendula</i> (Humb. & Bonpl. ex Willd.) H.S. Irwin & Barneby	Bolson M 330-3	Curitiba		-		-
<i>Senna pendula</i> (Humb. & Bonpl. ex Willd.) H.S. Irwin & Barneby	Bolson M 330-4	Curitiba		-		-
<i>Senna pendula</i> (Humb. & Bonpl. ex Willd.) H.S. Irwin & Barneby						gi270155701
<i>Senna pendula</i> (Humb. & Bonpl. ex Willd.) H.S. Irwin & Barneby						gi270155887
<i>Senna pendula</i> (Humb. & Bonpl. ex Willd.) H.S. Irwin & Barneby						gi90185442
ROSALES						
Cannabaceae						
<i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sarg.	Bolson M 336-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sarg.	Bolson M 336-4	Curitiba		-	-	-
<i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sarg.	Bolson M 336-2	Curitiba		-		
<i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sarg.	Bolson M 336-3	Curitiba		-		
<i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sarg.						gi40286858
Moraceae						
<i>Ficus luschnathiana</i> (Miq.) Miq.						gi57864713
Rhamnaceae						
<i>Rhamnus sphaerosperma</i> Sw.	Bolson M 463	Piraquara		-	-	-
<i>Scutia buxifolia</i> Reissek					gi9968771	gi48994652
Rosaceae						
<i>Prunus brasiliensis</i> Dietrich	Blum CT 10-053	Campo Largo		-	-	-
<i>Prunus brasiliensis</i> Dietrich	Blum CT 10-054	Campo Largo	-			-
<i>Prunus brasiliensis</i> Dietrich	Blum CT 10-055	Campo Largo				-

<i>Prunus brasiliensis</i> Dietrich	Blum CT 10-075	Campo Largo					
<i>Prunus myrtifolia</i> (L.) Urb.	Bolson M 360	Curitiba	-	-	-	-	-
<i>Prunus myrtifolia</i> (L.) Urb.	Bolson M 417	Tibagi					
<i>Prunus myrtifolia</i> (L.) Urb.	Bolson M 368	Curitiba	-	-	-	-	-
<i>Prunus myrtifolia</i> (L.) Urb.	Bolson M 393	Curitiba					
<i>Prunus myrtifolia</i> (L.) Urb.	Bolson M 375-1	Curitiba	-				
MYRTALES							
Lythraceae							
<i>Lafoensia pacari</i> A. St.	Blum CT 11-017	Curitiba	-	-	-	-	-
<i>Lafoensia pacari</i> A. St.	Lima DF 117	Curitiba	-	-	-	-	-
Myrtaceae							
<i>Acca sellowiana</i> (O. Berg) Burret	Bolson M 414	Curitiba	-	-	-	-	-
<i>Acca sellowiana</i> (O. Berg) Burret			gi46484634	gi164508768			gi125628827
<i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg			gi164606826	gi164508783			gi125628844
<i>Calypttranthes concinna</i> DC.	Blum CT 10-139	Curitiba	-	-	-	-	-
<i>Calypttranthes concinna</i> DC.			gi164606828	gi164508787			gi125628863
<i>Campomanesia guaviroba</i> (DC.) Kiaersk.	Goldenberg 1493	Curitiba	-	-	-	-	-
<i>Campomanesia guaviroba</i> (DC.) Kiaersk.	Blum CT 10-131	Campo Largo					
<i>Campomanesia guaviroba</i> (DC.) Kiaersk.	Blum CT 11-046	Tijucas do Sul					
<i>Campomanesia guazumifolia</i> (Cambess.) O. Berg	Bolson M 449	Curitiba	-	-	-	-	-
<i>Campomanesia guazumifolia</i> (Cambess.) O. Berg			gi164606831	gi164508795			
<i>Campomanesia guazumifolia</i> (Cambess.) O. Berg			gi46486958				
<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg	Blum CT 10-101	Curitiba	-	-	-	-	-

<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg	Blum CT 10-109	Colombo	-	-	-	-
<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg	Blum CT 10-100	Curitiba	-	-	-	-
<i>Eugenia neoverrucosa</i> Sobral	Blum CT 10-096	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess.				gi164508815		
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Lima 52	Paranaguá	-	-	-	-
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Blum CT 10-063	Curitiba	-	-	-	-
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Blum CT 10-064	Curitiba	-	-	-	-
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Blum CT 10-065	Curitiba	-	-	-	-
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Bolson M 350	Curitiba	-	-	-	-
<i>Eugenia uniflora</i> L.			gi164606839	gi164508808	gi15530018	gi125628848
<i>Eugenia uniflora</i> L.			gi270155697	gi270156314	gi270156025	gi45445273
<i>Eugenia uniflora</i> L.			gi41324111			
<i>Myrceugenia alpigena</i> (DC.) Landrum				gi164508858		gi125628858
<i>Myrceugenia myrcioides</i> (Cambess.) O. Berg			gi164606866	gi164508856		gi125628857
<i>Myrceugenia ovata</i> (Hook. & Arn.) O. Berg				gi164508854		gi125628856
<i>Myrcia hatschbachii</i> D. Legrand	Blum CT 10-151	Curitiba	-	-	-	-
<i>Myrcia hatschbachii</i> D. Legrand	Blum CT 10-143	Almirante Tamandaré	-	-	-	-
<i>Myrcia laruotteana</i> Cambess.	Lima 296	Londrina	-	-	-	-
<i>Myrcia laruotteana</i> Cambess.			gi164606870	gi164508862		gi125628875
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.	Blum CT 11-024	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.	Blum CT 11-003	Piraquara	-	-	-	-
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.	Blum CT 10-098	Curitiba	-	-	-	-
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.			gi164513193	gi164508876	gi240253228	gi125628882
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.			gi164606878	gi164508880	gi313758124	gi125628884
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.			gi246655197	gi246905617	gi313758128	

<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.			gi313502815	gi313502471		
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.				gi313502475		
<i>Myrcia venulosa</i> DC.				gi164508882		gi125628885
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum			gi164606891			gi125628843
<i>Psidium cattleianum</i> Sabine	Bolson M 324	Curitiba	-	-	-	-
<i>Psidium cattleianum</i> Sabine	Lima DF 109	Paranaguá	-	-	-	-
<i>Psidium cattleianum</i> Sabine	Bolson M 470	Curitiba		-		-
<i>Psidium cattleianum</i> Sabine			gi164606893	gi164508904		gi125628840
<i>Psidium cattleianum</i> Sabine			gi219686164	gi270156336		gi219686166
<i>Psidium cattleianum</i> Sabine			gi270155747			
Melastomataceae						
<i>Miconia hyemalis</i> A. St.-Hil. & Naudin	Bolson M 376	Curitiba			-	-
<i>Miconia inconspicua</i> Miq.	Fendrich TG 161	Ponta Grossa			-	-
<i>Miconia inconspicua</i> Miq.						gi158267971
<i>Miconia petropolitana</i> Cogn.	Fendrich TG 160	Ponta Grossa		-	-	-
<i>Miconia petropolitana</i> Cogn.						gi158268000
<i>Miconia pusilliflora</i> (DC.) Naudin	Blum CT 10-079	Tijucas do Sul		-	-	-
<i>Miconia pusilliflora</i> (DC.) Naudin						gi158268007
<i>Miconia pusilliflora</i> (DC.) Naudin						gi158268011
<i>Miconia sellowiana</i> Naudin	Bolson M 358-1	Curitiba		-	-	-
<i>Miconia sellowiana</i> Naudin	Bolson M 370-1	Curitiba		-		-
<i>Miconia sellowiana</i> Naudin	Fendrich 157	Ponta Grossa		-		-
<i>Miconia sellowiana</i> Naudin	Bolson M 351-1	Curitiba				-
<i>Miconia sellowiana</i> Naudin						gi158268021
<i>Miconia theaezans</i> (Bonpl.) Cogn	Fendrich 158	Ponta Grossa		-	-	-
<i>Miconia theaezans</i> (Bonpl.) Cogn	Fendrich 177-02	Tibagi				-
<i>Miconia theaezans</i> (Bonpl.) Cogn						gi158268034
<i>Miconia theaezans</i> (Bonpl.) Cogn						gi44921529

SAPINDALES

Anacardiaceae

<i>Lithrea molleoides</i> (Vell.) Engl.	Bolson M 404	Ponta Grossa	-	-	-	-
<i>Schinus polygamus</i> (Cav.) Cabrera	Bolson M 355-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus polygamus</i> (Cav.) Cabrera	Bolson M 377-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus polygamus</i> (Cav.) Cabrera	Bolson M 377-2	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus polygamus</i> (Cav.) Cabrera	Bolson M 355-2	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus polygamus</i> (Cav.) Cabrera	Bolson M 362	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus polygamus</i> (Cav.) Cabrera	Bolson M 377-3	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Bolson M 328-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Bolson M 332-1	Campina Grade do Sul	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Bolson M 331-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Blum CT 11-013	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Bolson M 331-2	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Bolson M 332-2	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi			gi270155669		gi270155997	gi57867884
Meliaceae						
<i>Cabralea canjerana</i> (Vell.) Mart.	Blum CT 10-102	Curitiba	-	-	-	-
<i>Cabralea canjerana</i> (Vell.) Mart.	Bolson M 460	Ponta Grossa	-	-	-	-
<i>Cabralea canjerana</i> (Vell.) Mart.					gi83637884	gi116292934
<i>Cedrela fissilis</i> Vell.	Bolson M 487	Curitiba	-	-	-	-
<i>Cedrela fissilis</i> Vell.						gi219810145
<i>Cedrela fissilis</i> Vell.						gi219816486
<i>Cedrela odorata</i> L.			gi261347777	gi261864077	gi261279229	gi116292923
<i>Cedrela odorata</i> L.			gi32815133		gi32815209	gi299802806
<i>Cedrela odorata</i> L.					gi9909612	gi219816475
<i>Cedrela odorata</i> L.						gi219816478
<i>Cedrela odorata</i> L.						gi219816479

Cedrela odorata L.

gi219816482

Rutaceae

Zanthoxylum rhoifolium Lam. Blum CT 10-106 Colombo - - - -

Sapindaceae

Allophylus edulis (A. St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. Bolson M 391-1 Curitiba - - - -

Allophylus edulis (A. St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. Blum CT 11-008 Curitiba - - - -

Allophylus edulis (A. St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. Bolson M 372-1 Curitiba - - - -

Allophylus edulis (A. St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. Blum CT 10-058 Curitiba - - - -

Allophylus edulis (A. St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. Bolson M 378 1 Curitiba - - - -

Allophylus guaraniticus Radlk. Blum CT 10-115 Curitiba - - - -

Cupania vernalis Cambess. Blum CT 11-040 Tijucas do Sul - - - -

Cupania vernalis Cambess. Bolson M 340-1 Curitiba - - - -

Cupania vernalis Cambess. Brotto ML 530 Clevelândia - - - -

Cupania vernalis Cambess. Blum CT 11-038 Tijucas do Sul - - - -

Cupania vernalis Cambess. Blum CT 11-039 Tijucas do Sul - - - -

Matayba elaeagnoides Radlk. Blum CT 10-107 Colombo - - - -

Matayba elaeagnoides Radlk. Blum CT 10-132 Campo Largo - - - -

Matayba elaeagnoides Radlk. Bolson M 345 Curitiba - - - -

Matayba elaeagnoides Radlk. Blum CT 11-027 Tijucas do Sul - - - -

Matayba elaeagnoides Radlk. gi209169307 gi209169021

MALVALES

Malvaceae

<i>Luehea divaricata</i> Mart.	Bolson M 349	Curitiba	-	-	-	-
<i>Luehea divaricata</i> Mart.	Bolson M 471	Curitiba	-	-	-	-
Thymelaeaceae						
<i>Daphnopsis racemosa</i> Griseb.	Bolson M 365	Curitiba	-	-	-	-
ERICALES						
Clethraceae						
<i>Clethra scabra</i> Pers.	Blum CT 11-012	Curitiba	-	-	-	-
<i>Clethra scabra</i> Pers.	Bolson M 398	Ponta Grossa	-	-	-	-
<i>Clethra scabra</i> Pers.	Blum CT 11-041	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Clethra scabra</i> Pers.	Blum CT 11-042	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Clethra scabra</i> Pers.						gi37779254
Myrsinaceae						
<i>Myrsine coriacea</i> (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult.	Bolson M 383	Antonina	-	-	-	-
<i>Myrsine coriacea</i> (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult.	Blum CT 10-050	Campo Largo	-	-	-	-
<i>Myrsine coriacea</i> (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult.	Blum CT 10-071	Curitiba	-	-	-	-
<i>Myrsine coriacea</i> (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult.	Bolson M 389-1	Antonina	-	-	-	-
<i>Myrsine coriacea</i> (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult.	Bolson M 344	Piraquara	-	-	-	-
<i>Myrsine parvula</i> (Mez) Otegui	Bolson M 346	Curitiba	-	-	-	-
<i>Myrsine parvula</i> (Mez) Otegui	Bolson M 361	Curitiba	-	-	-	-
<i>Myrsine parvula</i> (Mez) Otegui	Bolson M 357-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Myrsine parvula</i> (Mez) Otegui	Bolson M 357-2	Curitiba	-	-	-	-
<i>Myrsine parvula</i> (Mez) Otegui	Bolson M 465	Curitiba	-	-	-	-
<i>Myrsine umbellata</i> Mart.	Blum CT 10-024	Tijucas do Sul	-	-	-	-

<i>Myrsine umbellata</i> Mart.	Blum CT 10-076	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Myrsine umbellata</i> Mart.	Blum CT 10-072	Curitiba	-	-	-	-
<i>Myrsine umbellata</i> Mart.	Bolson M 401	Ponta Grossa	-	-	-	-
Styracaceae						
<i>Styrax leprosus</i> Hook. & Arn.	Blum CT 10-130	Campo Largo	-	-	-	-
<i>Styrax leprosus</i> Hook. & Arn.	Blum CT 11-033	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Styrax leprosus</i> Hook. & Arn.						gi24559847
<i>Styrax martii</i> Seub.						gi13249221
<i>Styrax martii</i> Seub.						gi24559845
Symplocaceae						
<i>Symplocos celastrinea</i> Mart. ex Miq.				gi70907442		gi38197784
<i>Symplocos celastrinea</i> Mart. ex Miq.						gi70907422
<i>Symplocos falcata</i> Brand				gi70907462		gi70907432
<i>Symplocos falcata</i> Brand				gi70907464		gi70907433
<i>Symplocos pentandra</i> (Mattos) Occhioni ex Aranha				gi70907450		gi70907426
<i>Symplocos pentandra</i> (Mattos) Occhioni ex Aranha				gi70907452		gi70907427
<i>Symplocos tenuifolia</i> Brand	Blum CT 10-080	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Symplocos tenuifolia</i> Brand	Blum CT 10-129	Campo Largo				
<i>Symplocos tenuifolia</i> Brand				gi38197892		gi38197808
<i>Symplocos uniflora</i> (Pohl) Benth.	Blum CT 10-135	Curitiba	-	-	-	-
<i>Symplocos uniflora</i> (Pohl) Benth.	Bolson M 473	Curitiba	-	-	-	-
<i>Symplocos uniflora</i> (Pohl) Benth.	Blum CT 10-144	Curitiba				
<i>Symplocos uniflora</i> (Pohl) Benth.				gi70907458		gi70907430
GENTIANALES						
Rubiaceae						

<i>Cordia concolor</i> (Cham.) Kuntze	Bolson M 335-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Guettarda uruguensis</i> Cham. & Schldl.					gi1050483	gi58339208
<i>Guettarda uruguensis</i> Cham. & Schldl.						gi73811236
<i>Psychotria suterella</i> Müll.Arg.	Bolson M 405	Ponta Grossa	-	-	-	-
LAMIALES						
Bignoniaceae						
<i>Jacaranda puberula</i> Cham.	Blum CT 339-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Jacaranda puberula</i> Cham.	Blum CT 339-2	Curitiba	-	-	-	-
<i>Jacaranda puberula</i> Cham.	Blum CT 10-104	Colombo	-	-	-	-
<i>Jacaranda puberula</i> Cham.	Blum CT 10-103	Colombo				-
Lamiaceae						
<i>Aegiphila integrifolia</i> (Jacq.) Moldenke	Blum CT 10-146	Curitiba	-	-	-	-
<i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	Blum CT 10-136	Curitiba		-	-	-
<i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	Bolson M 321	Curitiba		-		
<i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	Blum CT 10-137	Curitiba		-		-
<i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	Blum CT 10-140	Curitiba		-		-
<i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	Bolson M 326	Curitiba		-		-
<i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	Blum CT 11-023	Tijucas do Sul		-		
Verbenaceae						
<i>Duranta vestita</i> Cham.	Bolson M 322	Curitiba	-	-	-	
<i>Duranta vestita</i> Cham.	Bolson M 342-1	Curitiba	-	-		
SOLANALES						
Solanaceae						
<i>Solanum campaniforme</i> Roem. &	Bolson M 412	Curitiba	-	-	-	-

<i>Ilex microdonta</i> Reissek							gi32346378
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	Blum CT 11-032	Tijucas do Sul	-	-	-	-	-
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	Blum CT 10-108	Colombo	-	-	-	-	-
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	Blum CT 10-123	Quatro Barras					
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.			gi156142279	gi182406665			gi229915144
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.			gi246655174	gi246905590			gi32346385
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.							gi32346386
<i>Ilex theezans</i> Mart.	Blum CT 11-044	Tijucas do Sul	-	-	-	-	-
<i>Ilex theezans</i> Mart.	Blum CT 10-125	Quatro Barras	-	-	-	-	-
<i>Ilex theezans</i> Mart.	Blum CT 10-086	Tijucas do Sul	-	-	-	-	-
<i>Ilex theezans</i> Mart.				gi182406696	gi22796791	gi229915155	
<i>Ilex theezans</i> Mart.					gi229915069	gi32346387	
<i>Ilex theezans</i> Mart.						gi32346392	
Cardiopteridaceae							
<i>Citronella gongonha</i> (Mart.) R.A. Howard	Bolson M 364	Curitiba	-	-	-	-	-
<i>Citronella gongonha</i> (Mart.) R.A. Howard	Blum CT 10-041	Campo Largo					
<i>Citronella gongonha</i> (Mart.) R.A. Howard	Bolson M 363	Curitiba					
<i>Citronella gongonha</i> (Mart.) R.A. Howard	Blum CT 10-043	Campo Largo					
<i>Citronella gongonha</i> (Mart.) R.A. Howard	Bolson M 354	Curitiba					
ASTERALES							
Asteraceae							

<i>Dasyphyllum brasiliense</i> (Spreng.) Cabrera	Bolson M 348	Curitiba	-	-		
<i>Dasyphyllum brasiliense</i> (Spreng.) Cabrera					gi209970550	gi15788533
<i>Dasyphyllum brasiliense</i> (Spreng.) Cabrera						gi209970401
<i>Piptocarpha angustifolia</i> Dusén ex Malme	Blum CT 10-099	Curitiba	-	-	-	-
<i>Piptocarpha axillaris</i> (Less.) Baker	Blum CT 10-032	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Piptocarpha axillaris</i> (Less.) Baker	Bolson M 333 1	Campina Grade do Sul	-	-	-	-
<i>Piptocarpha axillaris</i> (Less.) Baker	Blum CT 10-029	Tijucas do Sul	-			-
<i>Piptocarpha axillaris</i> (Less.) Baker	Blum CT 10-031	Tijucas do Sul		-		-
<i>Piptocarpha axillaris</i> (Less.) Baker	Blum CT 10-030	Tijucas do Sul		-		-
<i>Piptocarpha regnellii</i> (Sch.Bip.) Cabrera	Blum CT 10-039	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Vernonanthura discolor</i> (Spreng.) H.Rob	Blum CT 10-040	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Vernonanthura discolor</i> (Spreng.) H.Rob	Blum CT 10-090	Tijucas do Sul		-		-
<i>Vernonanthura discolor</i> (Spreng.) H.Rob	Blum CT 10-091	Tijucas do Sul		-		-
<i>Vernonanthura discolor</i> (Spreng.) H.Rob	Blum CT 10-040	Tijucas do Sul				-
ESCALLONIALES						
Escalloniaceae						
<i>Escallonia bifida</i> Link & Otto	Bolson M 467-1	Curitiba	-	-		-
<i>Escallonia bifida</i> Link & Otto	Bolson M 467-2	Curitiba				-

**CAPÍTULO II: APLICAÇÃO DE *DNA BARCODING* EM ESPÉCIES MADEIRÁVEIS
DA FLORESTA COM ARAUCÁRIA**

Aplicação de *DNA Barcoding* em espécies madeiráveis da Floresta com Araucária*

MÔNICA BOLSON,† ERIC DE CAMARGO SMIDT,† MARCELO LEANDRO BROTTTO‡
e VIVIANE DA SILVA-PEREIRA†

*Parte da dissertação de mestrado da primeira autora, †Laboratório de Filogenia e Genética da Conservação de plantas, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil, ‡Engenheiro Florestal, Mestre em Botânica pela Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Correspondência: Mônica Bolson

Tel: (041) 3078-6188

E-mail: monicabolson@gmail.com

Resumo

A Floresta Ombrófila Mista (FOM) tem hoje sua cobertura vegetal reduzida, pois foi, durante muitos anos, considerada uma das principais fontes de matéria-prima para a indústria madeireira nos estados do Sul do Brasil. O *DNA barcode* é uma ferramenta molecular que utiliza sequências de regiões específicas do DNA para a identificação de espécies. Visando a padronização da técnica como uma alternativa de identificação rápida de espécies vegetais arbóreas exploradas como fonte de madeira na FOM testou-se a aplicabilidade das quatro regiões indicadas para o *barcode* como recurso forense para este grupo plantas. Neste estudo foram obtidas 367 sequências das regiões, *matK*, *trnH-psbA*, *rbcL* (DNA plastidial) e *ITS* (DNA nuclear) de 112 indivíduos pertencentes a 33 espécies madeiráveis, com pressão de extração. As quatro regiões testadas mostraram diferentes desempenhos no sequenciamento, variando de 99% a 74%. Entre todas as regiões e as diferentes combinações, *ITS* (86%) foi a mais eficiente para a identificação das espécies conforme o teste *'best close match'*, tendo a combinação *trnH-psbA+ITS* também desempenho semelhante e satisfatório (81%). A partir das análises filogenéticas foram obtidas de árvores de Neighbor-Joining (NJ), Máxima Verossimilhança (ML) e Máxima Parcimônia (MP) e comparadas para cada região *barcode*. As quatro regiões individuais apresentaram maior porcentagem de espécies monofiléticas nas árvores de NJ, já as combinadas em ML, no entanto a combinação das quatro regiões foi melhor apoiada em MP. A maioria das espécies se agruparam em suas respectivas famílias, e baseando-se na média da porcentagem de espécies monofiléticas nos três métodos, as regiões que apresentaram melhor desempenho no reconhecimento de espécies monofiléticas foram *ITS* (75%), *trnH-psbA+ITS* (77%) e *matK+ trnH-psbA+rbcL* (76%), com variação de 75% a 77%. O *DNA Barcoding* demonstrou ser uma alternativa prática e rápida na identificação das

principais espécies madeireiras da Floresta com Araucária. Analisando a praticidade da técnica, indicamos *ITS* como *barcode* dessas espécies, por se tratar de uma única região com o melhor sucesso de identificação no TaxonDNA e a melhor resolução de espécies monofiléticas na árvore gerada pelo método mais prático (NJ). Para as espécies não discriminadas, o uso do *barcode* pode indicar problemas de taxonomia do grupo, dúvidas na delimitação de espécies ou mesmo a presença de linhagens parafiléticas, gerando a necessidade de estudos biosistemáticos específicos para estes complexos.

Palavras-chave: Biodiversidade, Conservação, Floresta Ombrófila Mista, Identificação de espécies, Mata Atlântica.

Introdução

A Mata Atlântica, considerada um dos 34 *hotspots* de biodiversidade do mundo é, provavelmente, o ecossistema mais seriamente ameaçado do planeta restando apenas 7 a 8% da floresta original (Young 2005; Mittermeier *et al.* 2005). Uma de suas várias formações florestais, a Floresta com Araucária ou Pinheiral, como é conhecida popularmente a Floresta Ombrófila Mista (FOM) (Veloso *et al.* 1991), constituiu por cerca de 150 anos (Reitz *et al.* 1979) a área mais significativa para a indústria madeireira, principal atividade econômica do Paraná, assim como para os demais estados do Sul do Brasil (Koch & Corrêa 2002).

Distribuída, quase exclusivamente, entre os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, atualmente a FOM ocupa uma reduzida área quando comparada com a original (Castella & Britez 2004). No Paraná estima-se que restem apenas 0,8% da FOM em bom estado de conservação (Koch & Corrêa 2002).

A sua composição arbórea, especialmente aquela tradicionalmente utilizada como fonte de matéria-prima para a indústria madeireira, apresenta somente os dois únicos gêneros nativos de coníferas, *Araucaria* Juss. e *Podocarpus* L'Hér. ex Pers. (Inoue *et al.* 1984). Entre as centenas de espécies arbóreas associadas à *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, espécie predominante e característica desta formação, algumas se destacam de forma especial, como é caso da erva-mate e de muitas plantas pertencentes às famílias Myrtaceae e Lauraceae. Esta última abriga muitas espécies próximas, como nos gêneros *Ocotea* Aubl. e *Nectandra* Rol. ex Rottb., onde a identificação taxonômica não é uma tarefa trivial para não-especialistas. Apresenta também uma das espécies com maior valor comercial, a *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso (popularmente conhecida como imbuia) e outras espécies igualmente exploradas, e talvez sejam historicamente as mais importantes no fornecimento de madeira para construção civil e moveleira na região de abrangência da FOM. Diante da diminuição das

populações naturais da imbuia, espécies taxonomicamente próximas são secundariamente exploradas, muitas vezes sem que a identificação correta seja feita, gerando aumento da pressão de exploração para o grupo como um todo.

Com a publicação da Resolução nº 278, de 24 de maio de 2001 pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que determinou a suspensão de corte ou exploração de espécies ameaçadas de extinção do Bioma Mata Atlântica, ficou vetado todo e qualquer aproveitamento comercial dessas espécies (Pires 2006). Atualmente, entre as presentes na FOM, destaca-se *A. angustifolia*, *Ocotea catharinensis* Mez, *O. odorifera* (Vellozo) Rohwe, e *O. porosa* (MMA 2008). Era de se esperar que os órgãos ambientais restringissem a exploração por uma alteração na disponibilidade de recursos florestais devido à exploração indiscriminada. Isto pode proporcionar a exploração não só de outras espécies madeireiras, mas também de outros tipos de recursos genéticos (Ruschel *et al.* 2003).

A técnica molecular "*DNA barcode*" ou "códigos de barras de DNA" (Hebert *et al.* 2003) foi desenvolvida na tentativa de se identificar organismos no nível específico, utilizando-se sequências de regiões específicas do DNA. Tal técnica pode ser utilizada como um recurso forense, a partir da implementação de um banco de DNA total de plantas e uma biblioteca de sequências produzidas através de espécimes previamente identificados e depositados em herbários com acesso público (van den Berg 2005).

Em animais utiliza-se uma parte da sequência do gene da subunidade I da citocromo oxidase (COI) do DNA mitocondrial como o código de barras (Herbert *et al.* 2003). Em plantas, as regiões *matK* e *rbcL*, do genoma plastidial, foram estabelecidas inicialmente como as regiões promissoras para o *barcode* (Lahaye *et al.* 2008; Consortium for the Barcode of Life (CBOL) - Plant Working Group 2009; Chase *et al.* 2005; Newmaster *et al.* 2006). Porém, a baixa resolução para a identificação molecular no nível de espécie e problemas com a amplificação de *matK* levou o CBOL a recomendar a inclusão de uma região complementar,

trnH-psbA (Kress *et al.* 2005; Shaw *et al.* 2007). Kress *et al.* (2005), Yao *et al.* (2010) e Hollingsworth (2011) recomendaram ainda a inclusão do espaçador interno transcrito (*ITS*) do DNA nuclear ribossômico como um bom ponto de partida para teste em *DNA Barcoding* com várias amostras de angiospermas. A aplicação deste marcador para a identificação molecular de plantas medicinais teve resultados eficientes na diferenciação de várias espécies (Gao *et al.* 2010; Chen *et al.* 2010).

As sequências *barcode* surgiram como alternativas moleculares para a identificação de espécies através da comparação entre sequências do material de interesse, podendo este ser colhido em qualquer estágio da vida do indivíduo (Hebert *et al.* 2003), com aquelas depositadas em bancos de sequências. A partir desta técnica e da implementação do banco de sequências de DNA de espécies arbóreas da FOM, seria possível identificar de forma mais rápida as espécies apreendidas em exploração e comércio ilegal de madeira e a biopirataria de plantas, entre os estados brasileiros e para o exterior.

Desta forma, o presente estudo testou a aplicabilidade da combinação de fragmentos das regiões codificadoras *matK* e *rbcL* e não-codificadoras *trnH-psbA* (DNA plastidial) e *ITS* (DNA nuclear) para a técnica de "códigos de barra de DNA" como ferramenta forense de identificação molecular de espécies com potencial madeireiro características da Floresta com Araucária.

Material e Métodos

Área de estudo

As espécies com potencial madeireiro características da Floresta com Araucária foram estudadas a partir de parques e bosques urbanos da cidade de Curitiba (25°25'40" S;

49°16'23" W) e em fragmentos florestais presentes em regiões do entorno, como nos municípios Campina Grande do Sul (25°18'20" S; 49°3'19" W), Campo Largo (25°27'31" S; 49°31'42" W), Colombo (25°17'30" S; 49°13'27" W), Piraquara (25°26'30" S; 49°3'48" W), Quatro Barras (25°21'56" S; 49°4'37" W), e Tijucas do Sul (25°55'41" S; 49°11'56" W) e em outros municípios do estado do Paraná, como Clevelândia (26°23'45" S; 52°28'15" W), Honório Serpa (26°8'28" S; 52°23'13" W), Morretes (25°28'37" S; 48°50'4" W), Paranaguá (25°31'12" S; 48°30'33" W), Ponta Grossa (25°5'42" S; 50°9'43" W), e Tibagi (24°30'34" S; 50°24'49" W) (Fig. 1).

Coleta das amostras

Para direcionar a amostragem foi realizada uma revisão bibliográfica dos estudos que levantaram as espécies arbóreas características da FOM (Barddal *et al.* 2004; Blum 2008; Carvalho *et al.* 2009; Cervi *et al.* 1989; Cordeiro & Rodrigues 2007; Goldenberg 2004; Isernhagen *et al.* 2002; Kozera *et al.* 2006; Liebsch *et al.* 2009; Liebsch & Acra 2002; Liebsch & Mikich 2009; Nascimento *et al.* 2007; Reginato *et al.* 2008; Rondon Neto *et al.* 2002; Seger *et al.* 2005; Selusniaki & Acra 2010; Watzlawick *et al.* 2005), e a partir desta listagem, destacou-se as famílias que incluem as principais espécies tradicionalmente utilizadas pela indústria madeireira e aquelas com potencial de uso (Isernhagen *et al.* 2002; Inoue *et al.* 1984; Lorenzi 1992; Lorenzi 1998) (Apêndice 4).

O levantamento das principais espécies madeiráveis da FOM resultou em 40 espécies, sendo 33 amostradas para o presente estudo (Apêndice 1 e 2). A família Lauraceae representou o maior número de espécies, com 26%, seguida de Anacardiaceae, Fabaceae, Meliaceae, Myrtaceae e Sapindaceae, com 5,8% cada.

As espécies foram coletadas em campo e, quando possível, com mais de um indivíduo amostrado por espécie e em populações diferentes. As exsiccatas foram depositadas no

herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB) e identificadas por especialistas e por comparação com o acervo depositado no UPCB e no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM). Duplicatas serão enviadas à herbários nacionais, como HUEFS, SP e RB; e internacionais, como NY e K.

As amostras de tecido foliar foram armazenadas em freezer -20°C ou em sílica-gel (Chase & Hills 1991). O DNA total extraído foi armazenado em ultrafreezers (-80°C).

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Para a extração de amostras de DNA utilizou-se a metodologia baseada no protocolo de CTAB 2X de Doyle & Doyle (1987). Antes do armazenamento, a qualidade da amostra para futura referência foi verificada através de visualização em gel de agarose corado com brometo de etídio com um controle de massa e peso molecular (*DNA mass ladder*). As alíquotas do material extraído foram depositadas no Banco de DNA Total de Plantas da UFPR (UPCB-DNA), vinculadas aos *vouchers* depositados no UPCB.

As amplificações de PCR dos fragmentos das regiões indicadas para uso como *DNA Barcode* foram realizadas em reações de 30µl constituídas de tampão 1X, 2,5mM de MgCl², 0,2mM de dNTPs, 0,5mM de cada *primer*, 10ng de BSA, 2,0 unidades de Taq DNA polimerase e 20-50ng de DNA genômico. O programa de amplificação para cada região pode ser verificado na Tabela 1.

Os produtos de PCR foram purificados com PEG 20% e posteriormente verificados em eletroforese horizontal em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio. As reações de sequenciamento foram feitas através de serviços prestados pela empresa MacroGen Inc. (Seoul, South Korea - <http://dna.macrogen.com>) realizadas com o kit Big Dye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems, California, USA). Os mesmos *primers* utilizados para amplificação foram utilizados para a reação de sequenciamento. Todas as sequências obtidas

neste estudo serão submetidas ao Genbank através do programa Sequin (National Center Biotechnology Information 2011), ao sistema *Barcode of Life Database* (BOLD) e à Rede Nacional de Identificação Molecular (Br-BOL - *Brazilian Barcode of Life*), seguindo todas as recomendações destes bancos de sequências público (Apêndice 4).

Alinhamento das sequências e análises

As sequências *forward* e *reverse* foram editadas e as fitas consenso obtidas utilizando-se o programa Staden Package (Staden *et al.* 2003). Para garantir maior confiabilidade das sequências, todas as extremidades de ambas as regiões foram eliminadas. O alinhamento múltiplo e a matriz das sequências foram editados a partir do programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994) implementado no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011), com os parâmetros usuais, sendo as matrizes conferidas manualmente. Para facilitar o alinhamento das matrizes dos dois espaçadores (*trnH-psbA* e *ITS*), as sequências foram organizadas conforme a classificação dos taxa dada pelo APG III (2009).

Adicionalmente, foram extraídas, até o dia 14 de janeiro de 2012, todas as sequências das espécies ocorrentes na FOM encontradas no GenBank. Esta busca totalizou 14 sequências de *matK*, 12 de *trnH-psbA*, 14 de *rbcL* e 16 de *ITS*, sendo as mesmas inseridas na matriz de cada região.

A presença de ‘*barcoding gap*’ entre as distâncias interespecíficas e intraespecíficas foi avaliada através de histogramas de frequências com base nas distâncias-*p* pareadas obtidas a partir do programa TaxonDNA (Meier *et al.* 2006).

Para avaliar o sucesso da técnica e das regiões do código de barras de DNA na identificação das espécies utilizou-se o teste ‘*best close match*’ do TaxonDNA, onde um valor limite foi calculado separadamente para cada matriz e a frequência relativa de todas as distâncias intraespecíficas foi traçada para determinar um valor limite abaixo de 95% (Meier

et al. 2006). Neste teste as sequências podem ser classificadas como, “correta”, quando as distâncias genéticas entre a sequência alvo e demais sequências da mesma espécie se enquadram em 95% do limite calculado; “ambígua”, quando uma sequência se encontra na faixa desta porcentagem, mas se assemelha a outra espécie; “incorreta” quando uma sequência alvo não encontra uma sequência da mesma espécie dentro no limite; e “incongruente”, quando a sequência não se encontra na faixa de 95% do limite calculado (Pettengill & Neel, 2010).

Os parâmetros foram configurados para comparar todas as sequências com pelo menos 300 pb em comum. Este teste determina a correspondência mais próxima de uma sequência em comparação com todas as outras em um conjunto de dados alinhados, e estabelece um limite de similaridade, baseado na distribuição de frequência das distâncias intraespecífica e interespecífica.

Para avaliar se as amostras de diferentes indivíduos formam um agrupamento específico monofilético, foram utilizadas diferentes abordagens filogenéticas, incluindo métodos de distância com a utilização de distância-*p* pareada, como recomendado por Srivathsan e Meier (2011) e algoritmo Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei 1987), métodos de Máxima Verossimilhança (ML) utilizando modelo selecionado através do Critério Bayesiano de Informação (BIC) (Tamura *et al.* 2011), e Máxima Parcimônia (MP) utilizando busca heurística com 2000 réplicas com adições aleatórias retendo 20 árvores por replicação, algoritmo TBR, seguida de uma análise de TBR para explorar todas as topologias obtidas na análise inicial, estabelecendo-se um limite de 10.000 árvores. Deste resultado de múltiplas árvores igualmente parcimoniosas foi construída uma árvore de consenso estrito. Para análise do suporte, nas análises de NJ e ML, foram utilizadas 1000 pseudo-replicações de bootstrap (Felsenstein 1985), para ML, por questões computacionais, foram utilizadas apenas 100 replicas de bootstrap. As análises de NJ e ML foram realizadas com o programa MEGA5

(Tamura *et al.* 2011) e as análises de Máxima Parcimônia (MP) utilizando parcimônia de Fitch (1971) através do programa PAUP 4.0b10a (Swofford 2002).

As análises foram conduzidas separadamente para cada região e combinadas da seguinte maneira: regiões codificantes (*matK* + *rbcL*) e, regiões não-codificantes (*trnH-psbA* + *ITS*), neste dois casos considerando apenas as espécies que possuíam sequências de ambas as regiões; regiões do genoma plastidial (*matK* + *rbcL* + *trnH-psbA*) e as quatro regiões combinadas (*matK* + *rbcL* + *trnH-psbA* + *ITS*), nestas duas últimas combinações, considerou-se apenas as espécies que possuíam sequências de pelo menos duas ou três regiões, respectivamente. Nas análises filogenéticas as árvores de *matK*, *rbcL* e *trnH-psbA* foram enraizadas com *Araucaria angustifolia*, a principal espécie de Gimnosperma características da FOM. Uma vez que não foi possível amplificar e nem obter no GenBank uma sequência de *ITS* das espécies de Gimnospermas da FOM, para esta região foi utilizado o grupo formado pelas famílias de angiospermas basais (Canellaceae ou Winteraceae ou Lauraceae).

Resultados

Sucesso de sequenciamento

Foram coletados 112 indivíduos de 33 espécies com potencial madeireiro da Floresta com Araucária, para compor um banco de 367 sequências, juntamente com as disponíveis no GenBank. As quatro regiões do DNA indicadas para o código de barras foram testadas e as reações de PCR padronizadas para a maioria das espécies. Para *matK* nenhum dos dois pares de *primers* testados mostraram eficiência na amplificação da região alvo das espécies *Araucaria angustifolia* e *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., representantes únicos de Gimnosperma neste estudo, e que possuem grande potencial madeireiro. Sequências de alta

qualidade foram obtidas para *rbcL* (99%), seguida de *matK* (87%) e *trnH-psbA* (78%) (Tabela 1). *ITS* apresentou baixa eficiência, sequenciando 74% da amostragem.

Avaliação das divergências intraespecífica e interespecífica

Após o alinhamento múltiplo de todas as sequências obteve-se a média do comprimento de cada região, onde *matK* foi o maior fragmento com 805,6 pb e *trnH-psbA* o menor com 503,5 pb, porém o alinhamento desta última apresentou o maior comprimento com 1014 pb.

O número de sítios variáveis para as regiões individuais foi de 183 (31%) em *rbcL* a 848 (83%) em *trnH-psbA* (Tabela 2). Em relação às distâncias intraespecíficas e interespecíficas também houve variação entre as regiões. Baseada na distância-*p*, a porcentagem de diferenciação das espécies madeireiras da FOM foi de 0%-3% para *rbcL* apresentando-se como o fragmento mais conservado (Fig. 2), contudo a variação intraespecífica se sobrepôs a interespecífica. O mesmo ocorreu para a combinação *matK+rbcL* que apresentou uma variação um pouco maior (0%-8%). As regiões *barcode* que apresentaram maior variação dentro das espécies foi *trnH-psbA* e a combinação dos quatro fragmentos (0%-23%), sendo que somente a primeira se sobrepôs em relação a variação interespecífica (Fig. 2).

Performance das regiões barcode na identificação das espécies

Nos resultados do 'best close match' (Tabela 3), individualmente, *ITS* (86%) e *trnH-psbA* (77%) apresentaram o melhor desempenho no sucesso de identificação correta das espécies, seguido de *rbcL* (73%) e *matK* (65%). As regiões combinadas apresentaram resultados próximos, 81% de identificação correta para *trnH-psbA+ITS*, 74% para *matK+trnH-psbA+rbcL+ITS* e 69% para *matK+trnH-psbA+rbcL* (Fig. 3, Tabela 3). A

combinação de *matK+rbcL* foi a que apresentou a menor taxa de identificação correta e a maior proporção de identificação incorreta. As identificações ambíguas foram relativamente baixas, abaixo de 5%, para a maioria das regiões individuais e das combinações, no entanto *matK* e *rbcL* apresentaram percentuais diferentes, 14% e 15% respectivamente.

Teste de monofiletismo baseado em árvores filogenéticas

A verificação da porcentagem de espécies monofiléticas baseou-se na reconstrução de árvores filogenéticas, a partir de três análises (NJ, ML, MP) para as quatro regiões testadas e as quatro combinações entre elas. Os parâmetros de cada análise de MP e os modelos evolutivos selecionados para as análises de ML encontram-se resumidos na Tabela 4. As árvores geradas a partir das três análises diferiram quanto à topologia e ao grau de resolução, entretanto, entre os resultados obtidos com NJ e ML houve pouca diferença na porcentagem de espécies monofiléticas (Tabela 5, Apêndice 3). A topologia gerada a partir de NJ apresentou os maiores valores de suporte para as regiões individuais *ITS* (84%), seguida de *rbcL* (75%) e *trnH-psbA* (74%). *matK* apresentou a mesma porcentagem com NJ e ML (55%). Para as regiões combinadas (*matK+rbcL* e *trnH-psbA+ITS* e *matK+trnH-psbA+rbcL*) a análise de ML mostrou a melhor topologia (Fig. 4). As árvores geradas a partir de MP não apresentaram boas resoluções e, apenas para a combinação das quatro regiões, apresentou a melhor topologia, com 75% de suporte (Tabela 5).

Entre as espécies madeireiras da FOM, os únicos gêneros que apresentaram mais de uma espécie foram *Nectandra* e *Ocotea*, ambos pertencentes à família Lauraceae e os mais importantes para a indústria madeireira. Nas três análises realizadas a maioria das árvores não apresentou valores de suporte significativos para separar todas as espécies de cada um destes gêneros. A melhor topologia para este grupo foi encontrada na análise de ML com a combinação dos dois espaçadores (*trnH-psbA+ITS*), mas nem todas as espécies foram bem

suportadas. Para *Ocotea* a melhor resolução na diferenciação das espécies foi para a região individual *ITS* nesta mesma análise, com valores de suporte acima de 80%. A única espécie que se mostrou monofilética em 75% das análises foi *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, que dependendo da região *barcode* possuía três ou mais indivíduos.

Discussão

A região que se apresentou como a mais eficiente na distinção das espécies madeiras da Floresta com Araucária foi *ITS*, demonstrando ser eficiente em outros trabalhos também (Chen *et al.* 2010; Gao *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011; Dong *et al.* 2011; Xue & Li 2011). No presente estudo, a porcentagem de sequenciamento desta região foi a menor em relação às demais testadas, pois apresentou dificuldades na amplificação e não obteve sucesso no sequenciamento das espécies *Araucaria angustifolia* e *Podocarpus lambertii*. Sass *et al.* (2007) não encontrou dificuldades em amplificar *ITS*, mas teve problemas em sequenciar espécies de Cycadales devido a grande variação no comprimento da região, e acrescenta ainda que isso também é comum em Gimnosperma. Esse empecilho faz com que o espaçador nuclear não seja totalmente aceito como um código de barras de DNA padrão (Fu *et al.* 2011).

As regiões do DNA plastidial mostraram melhor desempenho no sequenciamento das espécies. *rbcl* sequenciou 99% das amostras e mostrou ser a mais conservada entre as quatro regiões. Apesar disso, apresentou maior sucesso na distinção das espécies no teste do TaxonDNA (Fig. 3, Tabela 5) quando comparado a *matK*, região com alto número de sítios variáveis (Tabela 2). Esta última região apresentou a segunda maior porcentagem de sequenciamento com 87%, mas, assim como *ITS*, não foi possível obter sequências de *matK*

das espécies representantes de Gimnosperma a partir do banco de amostras reunidas, pois os dois pares testados para esta região não foram eficientes na amplificação das duas espécies, assim como para *Erythroxylum deciduum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae) e *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke (Lamiaceae).

Newmaster & Ragupathy (2009) relataram a eficiência de *matK* na identificação de espécies do gênero *Acacia* Mill. (Fabaceae), no entanto outros trabalhos questionam sua utilização devido ao problema com a universalidade dos *primers* (Sass *et al.* 2007; Roy *et al.* 2010; Du *et al.* 2011; Yan *et al.* 2011). Em Podostemaceae foi necessário utilizar outro *reverse primer* como complemento para a amplificação de algumas espécies, apesar disso *matK* apresentou o melhor desempenho em termos de padrões adequados de variabilidade e distinção das espécies, revelando ser uma região com grande potencial na identificação de espécies de Podostemaceae africanas (Kelly *et al.* 2010).

Li *et al.* (2011) discutiram a universalidade dos *primers* de *matK*, candidatos ao *barcode*, em Gimnosperma e propuseram um novo par de *primers* que apresentou melhor desempenho na amplificação e sequenciamento de 57 espécies de Gimnosperma chinesas. Em Angiosperma, a universalidade dos *primers* também foi testada a partir de 33 ordens amostradas aleatoriamente (Yu *et al.* 2011), sendo indicado um novo par de *primers* de *matK* (*matK472F* + *matK1248R*), porém os autores alertam que a sua utilização ainda precisa ser avaliada em todas as Angiosperma.

O espaçador intergênico *trnH-psbA* apresentou o maior número de sítios variáveis, e uma matriz com muitos *indels*, sendo necessário alguns esforços para o alinhamento desta região, isso também foi relatado por Lahaye *et al.* 2008; Starr *et al.* 2009; Roy *et al.* 2010.

A combinação das regiões *barcode* foi recomendada (Kress & Erickson 2007; CBOL - Plant Working Group, 2009) e mostrou em vários trabalhos as melhores resoluções na discriminação das espécies quando comparada às regiões individuais (Fu *et al.* 2011; Yan *et*

al. 2011; Roy *et al.* 2010). Para as espécies madeireiras da Floresta com Araucária a combinação das duas regiões indicadas como *core barcode* (*matK+rbcL*) (CBOL - Plant Working Group, 2009) foi eficiente na identificação correta de apenas 55% das espécies, apresentando menor desempenho do que as regiões individuais (*matK*, 65%; *rbcL*, 73%). Esta combinação mostrou desempenho semelhante (50%) em espécies de *Primula L.* (Yan *et al.* 2011), sendo difícil a utilização do *core barcode* para a distinção das espécies neste gênero.

A porcentagem da correta identificação para combinação *matK+ trnH-psbA+ rbcL* demonstra que combinações que contenham somente regiões do DNA plastidial não são tão eficientes na identificação das espécies, uma vez que os resultados mostraram que as melhores combinações foram *trnH-psbA+ITS* (81%) e *matK+ trnH-psbA + rbcL +ITS* (74%), sem identificação ambígua e com valores baixos de identificação incorreta. Roy *et al.* (2010) também tiveram melhores resultados com *trnH-psbA+ITS* na identificação de espécies de *Berberis L.* indianas.

Entre as três análises de monofiletismo, NJ, considerado o método mais simples e mais utilizado, apresentou cladogramas com melhores resoluções para as regiões individuais, sendo que *ITS* apresentou a maior porcentagem (84%) de espécies monofiléticas em relação às quatro regiões *barcode* testadas e as quatro diferentes combinações entre elas. No entanto, para as regiões combinadas a análise de ML apresentou a maior porcentagem de espécies monofiléticas. As combinações *trnH-psbA+ ITS* e *matK+ trnH-psbA+ rbcL* apresentaram a melhor topologia com 82% e 81% das espécies monofiléticas, respectivamente. Nesta análise, *ITS*, individualmente, também mostrou um cladograma com boa resolução com 80% de espécies monofiléticas. Os baixos valores de suporte e a menor resolução nas árvores de MP sugerem ser mais viável concentrar esforços nas análises de NJ e ML.

Nenhum cladograma dentre as três análises mostrou porcentagem maior que 85% de espécies monofiléticas. A baixa resolução geral das árvores se deve, quase exclusivamente, ao

posicionamento das espécies dos gêneros *Nectandra* e *Ocotea* dentro do clado de Lauraceae. As espécies destes gêneros, principalmente de *Ocotea*, apresentam casos onde reconhecidamente as variações morfológicas não são claramente distintas, dificultando a identificação pela taxonomia clássica. Nesta abordagem molecular, ambos os gêneros não formaram agrupamentos de espécies monofiléticas. A análise de NJ foi a única que apresentou agrupamento monofilético para estes dois importantes gêneros com valores de suporte dos ramos acima de 80%. A região *trnH-psbA* foi a que mostrou melhor resolução para *Nectandra* e *Ocotea* (100%), sendo que todas as combinações que possuíam esta região também se destacaram com boas resoluções.

Recentemente Liu *et al.* (2012) testaram as mesmas regiões *barcode* aplicadas à FOM, em 42 espécies de 11 gêneros de Lauraceae. A partir desta amostragem verificaram que *trnH-psbA* foi eficiente na identificação de aproximadamente 82% das espécies. Com o intuito de verificar a capacidade de identificação desta região, mais 175 amostras pertencentes a 117 espécies desta mesma família foram amostradas a partir da base de dados do GenBank, sendo o resultado do teste igualmente satisfatório, com 84% de identificação das espécies e 92% à nível de gênero. Esta região foi então indicada como o código de barras de DNA para espécies da família Lauraceae. No entanto, estes autores constataram falhas na identificação das espécies de cinco gêneros, gêneros dos quais sempre apresentaram controvérsias na taxonomia da família. Entre eles destaca-se *Ocotea*, sendo que *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer e *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, foram as únicas espécies madeireiras da FOM representadas no referido estudo e nenhuma região individual ou as combinações realizadas foram suficientemente eficientes na identificação das espécies destes gêneros.

No presente trabalho, como já mencionado, *trnH-psbA* foi eficiente na distinção dos gêneros da família. Assim sendo, o problema na distinção das espécies de Lauraceae ainda permanece, e as espécies próximas à imbuia (*Ocotea porosa*) não puderam ser reconhecidas

molecularmente com os fragmentos aplicados. Uma alternativa para a identificação molecular deste grupo seria buscar regiões mais variáveis e indicadas como de evolução rápida (Shaw *et al.* 2007) e usá-las de modo associado às regiões estabelecidas como *barcode*. No geral, as demais espécies madeireiras, que possuíam mais de um gênero se agruparam em suas respectivas famílias e ordens, isso também ocorreu para as espécies em que apenas um indivíduo foi amostrado. Consideramos, portanto, que aplicação do *DNA Barcoding* demonstrou ser uma alternativa prática e rápida na identificação das principais espécies madeireiras da Floresta com Araucária.

Esta alternativa molecular tem como principal objetivo neste estudo, fornecer uma ferramenta forense prática como auxílio em apreensões de madeiras. Além disso, pode servir ainda como um instrumento para estudos de ecologia de comunidades, visando melhorar a compreensão dos efeitos dos ambientes sobre a manutenção da diversidade de espécies e função do ecossistema de comunidades vegetais (Kress *et al.* 2010).

Privilegiando a praticidade e viabilidade na aplicação da técnica como ferramenta rotineira, indicamos *ITS* como *barcode* dessas espécies, por se tratar de uma única região com o melhor sucesso de identificação no TaxonDNA e a melhor resolução de espécies monofiléticas na árvore gerada pelo método mais prático (NJ).

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária (Nº Prot. 19068), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e pela Rede de Brasileira de Identificação Molecular da Biodiversidade (Br-BOL). Mônica Bolson recebeu bolsa REUNI/CAPES (Nº Edital 01/2010). Agradecemos a Secretaria Municipal do Meio Ambiente de

Curitiba, ao Jardim Botânico Municipal de Curitiba e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (Nº 23702-1) pela concessão das licenças de coleta; a Christopher T. Blum pelo auxílio nas coletas em campo; aos funcionários do MBM pelas identificações das espécies; e a Marília N. Moreira pela elaboração do mapa.

Fig. 1 Locais de coleta das espécies madeireiras característica da FOM no Paraná. Fonte: Roderjan *et al.* (2002), modificado.

Fig. 2 Comparações das divergências intraespecíficas (barra preta) e interespecíficas (barra branca) das regiões individuais e combinadas. Eixo x corresponde a distância- p com base na variação de cada região. Eixo y é o número de ocorrências.

Fig. 3 Desempenho na identificação das espécies arbóreas da FOM a partir de quatro fragmentos nucleotídicos do código de barras e de diferentes combinações entre eles, obtido pelo teste “*best close match*” do TaxonDNA.

Fig. 4 Cladogramas da combinação *trnH-psbA+ ITS* gerados a partir das análises de Neighbor Joining (A), Máxima Verossimilhança (B) e Máxima Parcimônia (C) das espécies madeiráveis da Floresta com Araucária. Os números nos nós representam os valores de *bootstrap*. O nome e número adjacentes às espécies são, respectivamente, coletor e número do coletor.

Fig. 5 Cladogramas da combinação das quatro regiões *barcode* (*matK+trnH-psbA+ rbcL+ ITS*) gerados a partir das análises de Neighbor Joining (A), Máxima Verossimilhança (B) e Máxima Parcimônia (C).

Referências Bibliográficas

- Angiosperm Phylogeny Group III (APG III) (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnaean Society*, **161**, 105-121.
- Barddal ML, Roderjan CV, Galvão F, Curcio GR (2004) Fitossociologia do sub-bosque de uma Floresta Ombrófila Mista Aluvial, no município de Araucária, PR. *Ciência Florestal*, Santa Maria, **14**(1), 35-45.
- Beyra-Matos A, Lavin M (1999) Monograph of *Pictetia* (Leguminosae: Papilionoideae) and review of the *Aeschynomeneae*. *Syst. Bot. Monogr.*, **56**, 1-3.
- Blum CT (2008) Lista Preliminar de Espécies Vegetais da Floresta Ombrófila Mista no Paraná. FLORA PARANÁ, Sociedade Chauá. Disponível em: <www.chaua.org.br/fa>. Acesso em 29 ago. 2010.
- Castella PR, Brites RM de (2004) *A floresta com araucária no Paraná: conservação e diagnóstico dos remanescentes florestais*. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 236p.
- Carvalho J, Marques MCM, Roderjan CV, Barddal M, Sousa SGA de (2009) Relações entre a distribuição das espécies de diferentes estratos e as características do solo de uma floresta aluvial no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, **23**(1), 1-9.
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**(31), 12794-12797.
- Cervi AC, Paciornik EF, Vieira RF, Marques LC (1989) Espécies vegetais de um remanescente de Floresta de Araucária (Curitiba, Brasil): Estudo preliminar I. *Acta Biologica Paranaense*, **18**, 73-114.

- Chase MW, Hills HG (1991) Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon*, **40**, 215-220.
- Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haider N, Savolainen V (2005) Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360**, 1889–1895.
- Chen SL, Yao H, Han JP, Liu C, Song JY, Shi LC, Zhu YJ, Ma XY, Gao T, Pang XH, Luo K, Li Y, Li XW, Jia XC, Lin YL, Leon C (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, **5**, e8613. doi:10.1371/journal.pone.0008613.
- Cordeiro J, Rodrigues WA (2007) Caracterização fitossociológica de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista em Guarapuava, PR. *Revista Árvore*, **31**(3), 545-554.
- Desfeaux C, Maurice S, Henry JP, Lejeune B, Gouyon PH (1996) The evolution of reproductive system in the genus *Silene*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **263**, 409-414.
- Dong LN, Wortley AH, Wang H, Li DZ, Lu L (2011) Efficiency of DNA barcodes for species delimitation: a case in *Pterygiella* Oliv. (Orobanchaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, **49**, 189–202.
- Doyle J, Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small amounts of leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**, 810-815.
- Du ZY, Qimike A, Yang CF, Chen JM, Wang QF (2011) Testing four barcoding markers for species identification of Potamogetonaceae. *Journal of Systematics and Evolution*, **49**, 246–251.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach to using bootstrap.

- Evolution*, **39**, 783–791.
- Fitch WM (1971) Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, **20**, 406–416.
- Ford CS, Ayres KL, Toomey N, Haider N, Stahl JVA, Kelly LJ, Wikstrom N, Hollingsworth PM, Duff RJ, Hoot SB, Cowan RS, Chase MW, Wilkinson MJ (2009) Selection of candidate coding DNA Barcoding regions for use on land plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **159**, 1–11.
- Fu YM, Jiang WM, Fu CX (2011) Identification of species within *Tetrastigma* (Miq.) Planch. (Vitaceae) based on DNA Barcoding techniques. *Journal of Systematics and Evolution*, **49**, 237–245, doi: 10.1111/j.1759-6831.2011.00126.
- Gao T, Yao H, Song JY, Liu C, Zhu YJ, Ma XY, Pang XH, Xu HX, Chen SL (2010) Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of Ethnopharmacology*, **130**, 116-121.
- Goldenberg R (2004) O gênero *Miconia* (Melastomataceae) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, **18**(4), 927-947.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, De Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, 313-322.
- Hollingsworth PM (2011) Refining the DNA barcode for land plants. *Proceedings of National Academy of Sciences* **108**, 19451-19452.
- Inoue MT, Roderjan CV, Kuniyoshi SY (1984) *Projeto madeira do Paraná*. Curitiba, FUPEF, 260p.
- Isernhagen I, Silva SM, Rodrigues W, Galvão F (2002) Listagem de espécies arbustivo-arbóreas citadas nos trabalhos de fitossociologia florestal no Paraná, Brasil: uma contribuição aos programas de recuperação de áreas degradadas (RAD). In: A

- fitossociologia florestal no Paraná e os programas de recuperação de áreas degradadas: uma avaliação*. Piracicaba: Instituto de Pesquisa e Estudo Florestais, **1**, 51-134.
- Käss E, Wink M (1997) Molecular phylogeny and phylogeography of *Lupinus* (Leguminosae) inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene and *ITS* 1+2 regions of rDNA. *Plant Systematics and Evolution*, **208**, 139-167.
- Kelly LJ, Ameka GK, Chase MW (2010) DNA Barcoding of African Podostemaceae (river-weeds): A test of proposed barcode regions. *Taxon*, **59**, 251-260.
- Koch Z, Corrêa MC (2002) *Araucária: a floresta do Brasil Meridional*. Curitiba: Olhar Brasileiro, 148 p.
- Kozera C, Dittrich VA de O, Silva SM (2006) Fitossociologia do componente arbóreo de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista Montana, Curitiba, PR, BR. *Floresta*, **36**(2), 225-237.
- Kress J, Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*, **6**, 1-10, (modified from Fofana B *et al.* (1997) *Belgian Journal of Botany*, **129**, 118-122).
- Kress WJ, Erickson DL, Swenson NG, Thompson J, Uriarte M, Zimmerman JK (2010) Advances in the Use of DNA Barcodes to Build a Community Phylogeny for Tropical Trees in a Puerto Rican Forest Dynamics Plot. *PLoS ONE* **5**: e15409. doi:10.1371/journal.pone.0015409.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 8369–8374.

- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V (2008) DNA Barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0709936105. Acesso em 10 fev. 2010.
- Levin RA, Wagner WL, Hoch PH, Nepokroeff M, Pires JC, Zimmer EA, Sytsma KJ (2003) Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* data. *American Journal of Botany*, **90**, 107–115, (modified from Soltis P *et al.* (1992) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 449-451.
- Li Y, Gao LM, Poudel RC, Li DZ, Forrest A (2011) High universality of *matK* primers for barcoding gymnosperms. *Journal of Systematics and Evolution*, **49**, 169–175.
- Liebsch D, Acra LA (2002) Riqueza de espécies de sub-bosque de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista em Tijucas do Sul, PR. *Ciência Florestal*, Santa Maria, **14**(1), 67-76.
- Liebsch D, Mikich SB (2009) Fenologia reprodutiva de espécies vegetais da Floresta Ombrófila Mista do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, **32**(2), 375-391.
- Liebsch D, Mikich SB, Possette RF da S, Ribas O dos S (2009) Levantamento florístico e síndromes de dispersão em remanescentes de Floresta Ombrófila Mista na região centro-sul do estado do Paraná. *Hoehnea*, **36**(2), 233-248.
- Liu Z, Chen SL, Song JY, Zhang SJ, Chen KL (2012) Application of deoxyribonucleic acid barcoding in Lauraceae plants. *Pharmacognosy Magazine*, **8**(29), 4-11
- Lorenzi H (1992) *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 373 p.

- Lorenzi H (1998) *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 373 p.
- Meier R, Shiyang K, Vaidya G, Ng PKL (2006) DNA Barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, **55**, 715-728.
- Ministério do Meio Ambiente - MMA (2008) Instrução Normativa MMA nº 06, de 23 de setembro de 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=179&idConteudo=8121&idMenu=8618>. Acesso em 11 nov. 2011.
- Mittermeier RA, Fonseca GAB, Hylands AB, Brandon K (2005) Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. *Megadiversidade*, **1**(1), 14-21.
- Nascimento DS do, Maranhão LT, Hatschbach G (2007) Fitossociologia da vegetação fanerogâmica do Jardim Botânico Municipal de Curitiba, PR, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, **5**, 240-242.
- National Center Biotechnology Information - NCBI (2011) “Sequin: A DNA Sequence Submission and Update Tool”. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/index.html>. Acessado em 07 jan 2012.
- Newmaster SG, Fazekas AJ, Ragupathy S (2006) DNA Barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*, **84**, 335–341.
- Newmaster SG, Ragupathy S (2009) Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical *Acacia* (Mimosoideae, Fabaceae). *Molecular Ecology Resources*, **9**, 172–180.
- Pettengill JB, Neel MC (2010) An evaluation of candidate plant DNA barcodes and

- assignment methods in diagnosing 29 species in the genus *Agalinis* (Orobanchaceae). *American Journal of Botany*, **97**, 1391-1406.
- Pires PTL (2006) Aspectos legais. In: Sanquetta CR, Mattei E *Perspectivas de recuperação e manejo sustentável das florestas de araucária*. Curitiba: Multi- Graphic, 2006. p. 53-104.
- Reginato M, Matos FB, Lindoso G da S, Souza CMF de, Prevedello JA, Morais JW, Evangelista PHL (2008) A vegetação na Reserva Mata Viva, Curitiba, Paraná, Brasil. *Acta Biologica Paranaense*, **37**, 229-252.
- Reitz R, Klein RM, Reis A (1979) *Madeiras do Brasil*. Florianópolis: Lunardelli, 320p.
- Roderjan CV, Galvão F, Kuniyoshi YS, Hatschbach GG (2002). As unidades fitogeográficas do Estado do Paraná. *Ciência & Ambiente*, **24**, 75–92.
- Rondon Neto RM, Kozera C, Andrade R do R, Cecy AT, Hummes AP, Fritzsos E, Caldeira MVW, Maciel M de NM, Souza MKF de (2002) Caracterização florística e estrutural de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista, em Curitiba, PR – Brasil. *Floresta*, **32**(1), 3-16.
- Roy S, Tyagi A, Shukla V, Kumar A, Singh UM, Chaudhary LB, Datt B, Bag SK, Singh PK, Nair NK, Husain T, Tuli R (2010) Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: A case study with Indian *Berberis* species. *PLoS ONE*, **5**, e13674. doi:10.1371/journal.pone.0013674.
- Ruschel AR, Nodari ES, Guerra MP, Nodari RO (2003) Evolução do uso e valorização das espécies madeiráveis da Floresta Estacional Decidual do Alto-Uruguai, SC. *Ciência Florestal*, **13**(1), 153-166.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.

- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, **84**, 1120–1136.
- Sass C, Little DP, Stevenson DW, Specht CD (2007) DNA Barcoding in the Cycadales: Testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads. *PLoS ONE*, **2**, e1154. doi:10.1371/journal.pone.0001154.
- Seger CD, Dlugosz FL, Kurasz G, Martinez DT, Ronconi E, Melo LAN de, Bittencourt SM de, Brand MA, Carniatio I, Galvão F, Roderjan CV (2005) Levantamento florístico e análise fitossociológica de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista localizado no município de Pinhais, Paraná-Brasil. *Floresta*, **35**(2), 291-302.
- Selusniaki M, Acra LA (2010) O componente arbóreo-arbustivo de um remanescente de Floresta com Araucária no município de Curitiba, Paraná. *Floresta*, **40**(3), 593-602.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms. The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, **94**, 275-288.
- Srivathsan A, Meier R (2011) On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics*, **27**, 1-5.
- Staden R, Judge DP, Bonfield JK (2003) Analysing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. In: Krawetz SA, Womble DD (eds.), *Introduction to Bioinformatics: A theoretical and practical approach*. Totawa: Human Press.
- Starr JR, Naczi RF, Chouinard BN (2009) Plant DNA barcodes and species resolution in sedges (*Carex*, Cyperaceae). *Molecular Ecology Resources*, **9**, 151-63.
- Swofford DL (2002) *PAUP: Phylogenetic Analysis using Parsimony*. Version 4.0b. Illinois Natural Survey. Champaign, Illinois.

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739. doi:10.1093/molbev/msr121.
- Tate JA, Simpson BB (2003) Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany*, **28**, 723-737.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673–4680.
- van den Berg C (2005) Banco de DNA de Plantas: notas técnicas. *Centro de Gestão e Estudos Estratégicos*. Disponível em: www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1744. Acesso em 10 fev. 2010.
- Veloso HP, Rangel-Filho ALR, Lima ICA (1991) *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal*. Rio de Janeiro: IBGE.
- Wang W, Wu Y, Yan Y, Ermakova M, Kerstetter R, Messing J (2010) DNA Barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. *BMC Plant Biology*, **10**, 205 doi:10.1186/1471-2229-10-205.
- Watzlawick LF, Sanquetta CR, Valério AF, Silvestre R (2005) Caracterização da composição florística e estrutura de uma Floresta Ombrófila Mista, no município de General Carneiro (PR). *Ambiência*, **1**(2), 229-237.
- Xue CY, Li DZ (2011) Use of DNA barcode *sensu lato* to identify traditional Tibetan medicinal plant *Gentianopsis paludosa* (Gentianaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, **49**, 267–270.

- Yan HF, Hao G, Hu CM, Ge XJ (2011) *DNA Barcoding* in closely related species: A case study of *Primula* L. sect. *Proliferae* Pax (Primulaceae) in China. *Journal of Systematics and Evolution*, **49**, 225–236.
- Yao H, Song J, Liu C, Luo K, Han J, Li Y, Pang X, Xu H, Zhu Y, Xiao P, Chen S (2010) Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLoS ONE*, **5**, 10, e13102.doi:10.1371/journal.pone.0013102.
- Young CEF (2005) Causas socioeconômicas do desmatamento na Mata Atlântica brasileira. In Galindo-Leal C, Câmara IG (2005) *Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas*. Conservação Internacional, Belo Horizonte, p. 31-42.
- Yu J, Xue JH, Zhou SL (2011) New universal *matK* primers for DNA Barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*, **49**, 176–181.

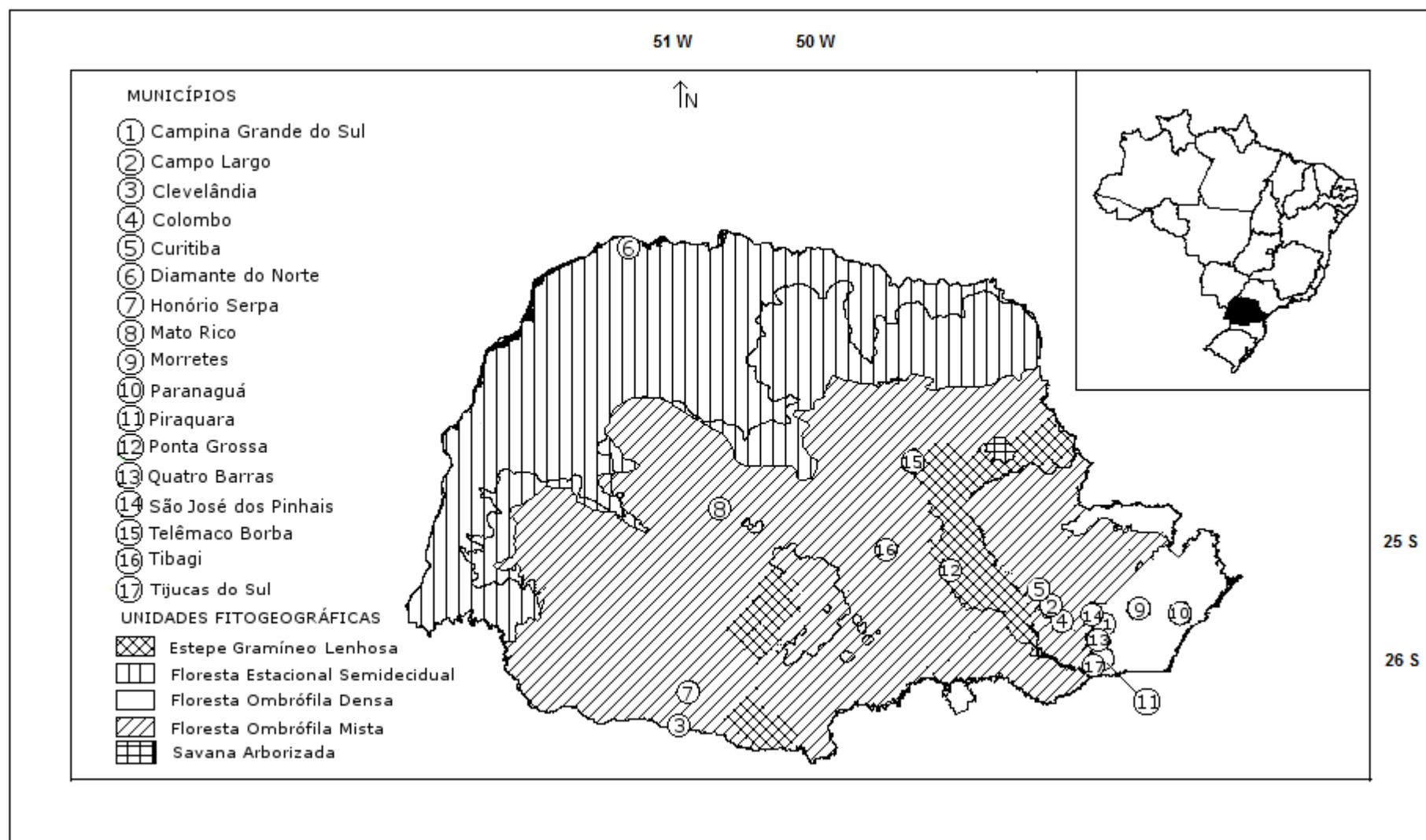


Fig. 1

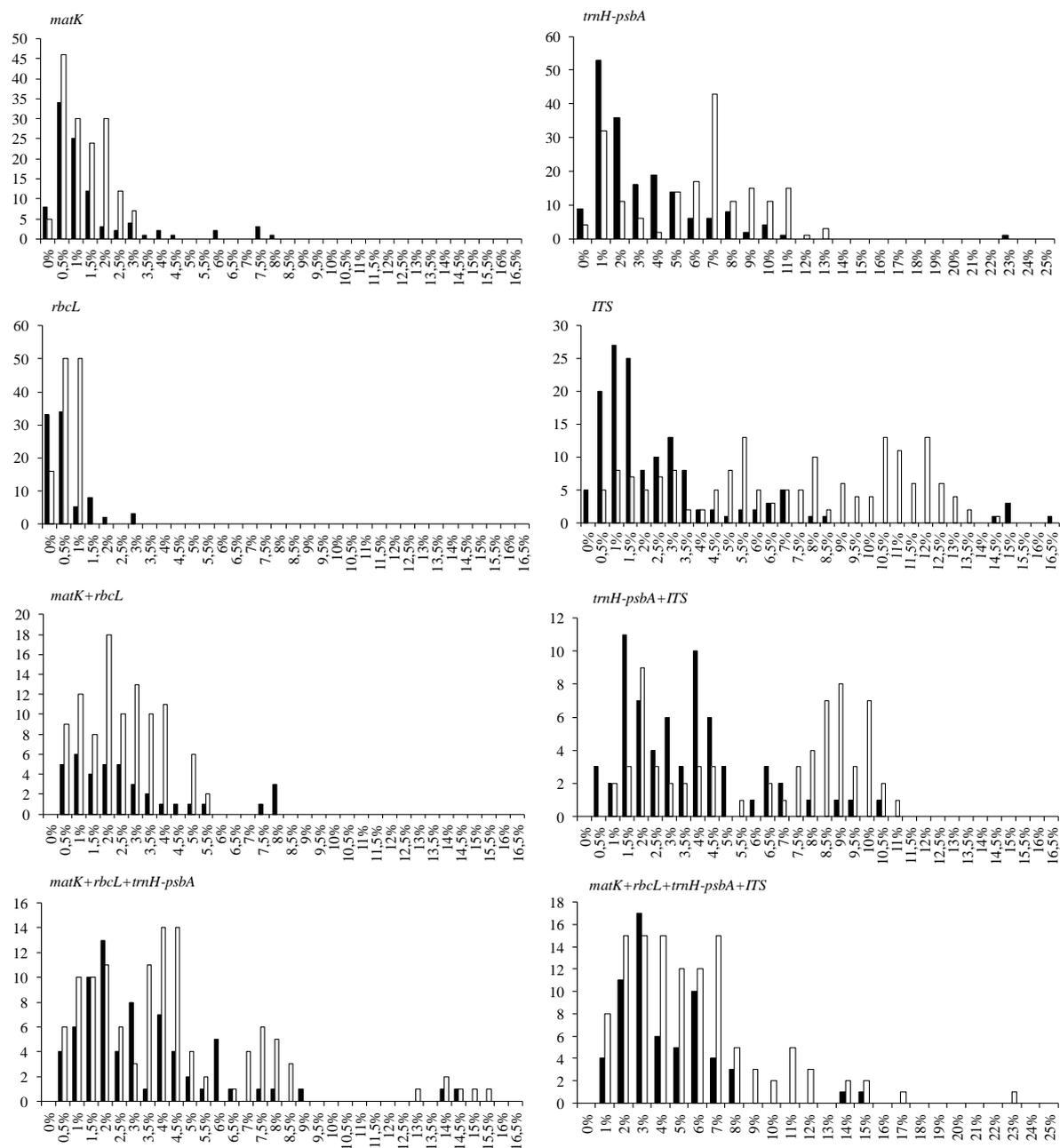
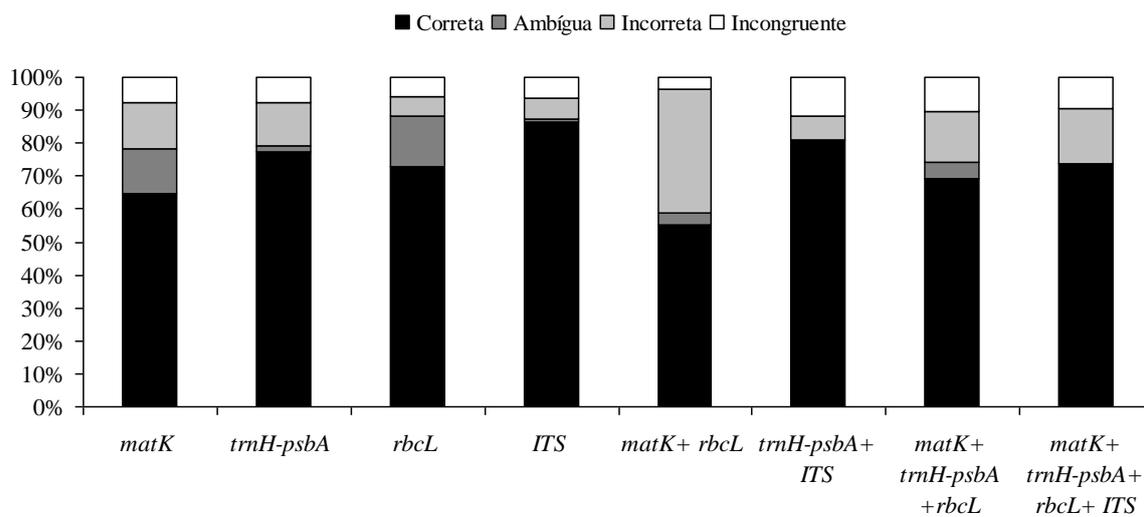


Fig. 2

**Fig. 3**

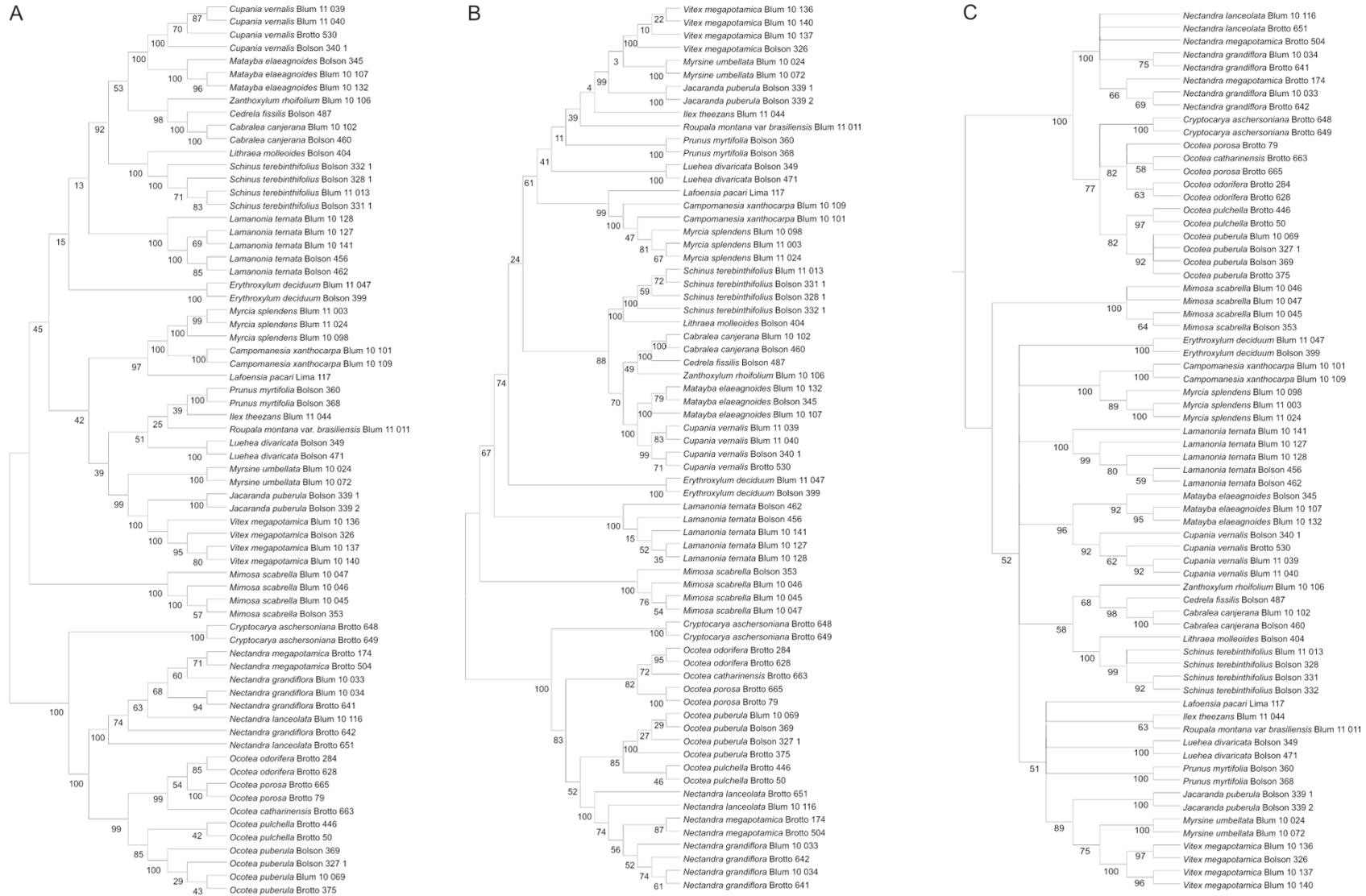
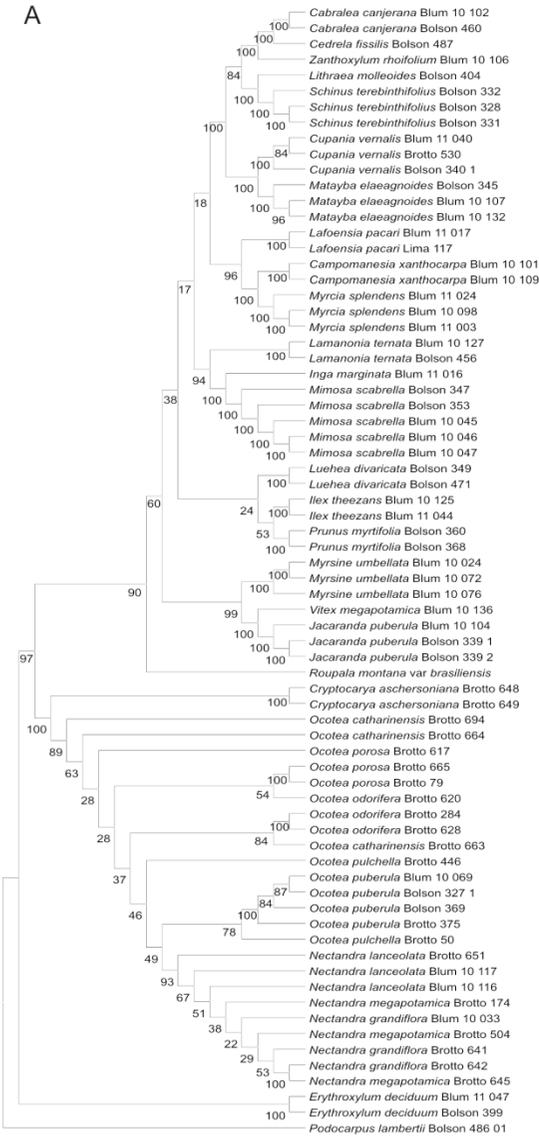
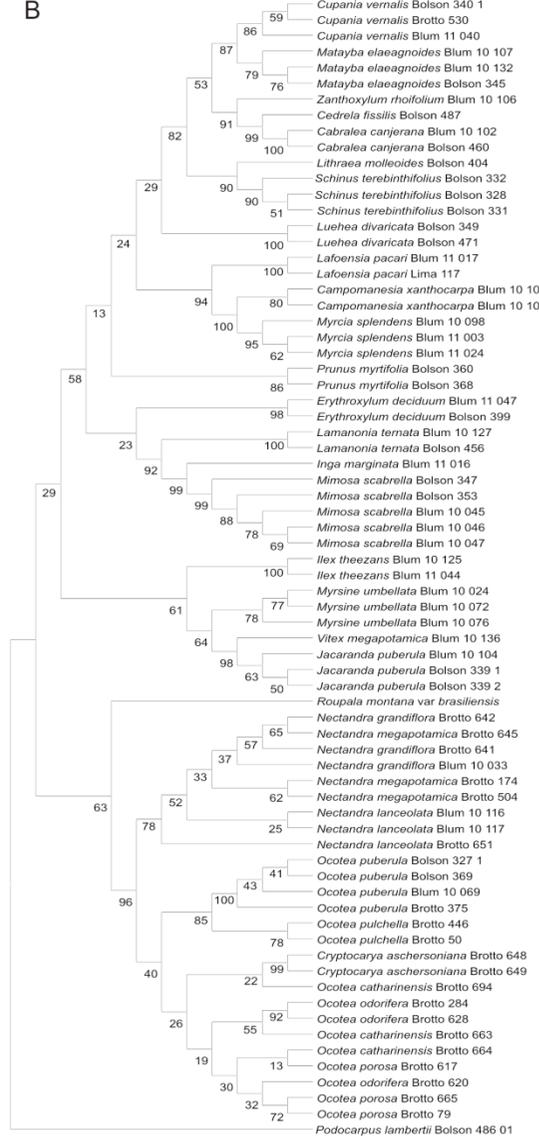


Fig. 4

A



B



C

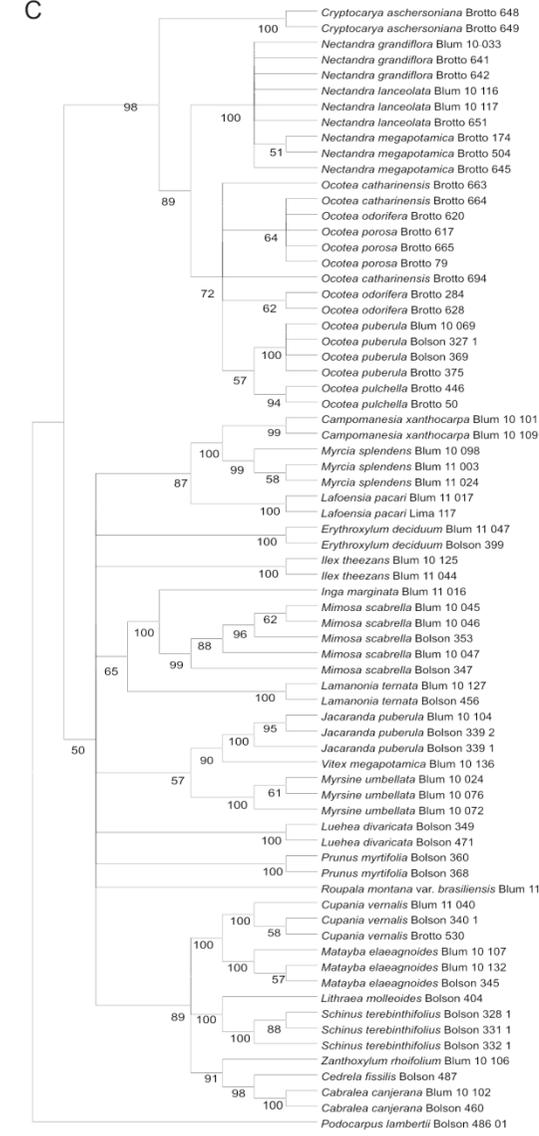


Fig. 5

Tabela 1. Lista de *primers* e condições de reação utilizadas neste estudo para amplificação das sequências de DNA plastidial e nuclear.

Região	<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Programa PCR	Referência
<i>matK</i>	<i>3F_KIM_f</i>	5'- CGT ACA GTA CTT TTG TGT	94°C 1min	Ki-Joong Kim, http://www.barcoding.si.edu/plant_working_group.html
		TTA CGA G- 3'	(94°C 30seg 53°C 40seg	
	<i>1R_KIM_r</i>	5'- ACC CAG TCC ATC TGG AAA	72°C 40seg) x40	Ki-Joong Kim, http://www.barcoding.si.edu/plant_working_group.html
		TCT TGG TTC- 3'	72°C 5min	
	<i>2.1F</i>	5'- CCT ATC CAT CTG GAA ATC		Ford <i>et al.</i> (2009)
		TTA G- 3'		
	<i>5R</i>	5'- GTT CTA GCA CAA GAA AGT		Ford <i>et al.</i> (2009)
		CG- 3'		
<i>rbcL</i>	<i>rbcLa_f</i>	5'- ATG TCA CCA CAA ACA GAG	94°C 1min	Levin <i>et al.</i> (2003)
		ACT AAA GC- 3'	(94°C 30seg 53°C 40seg	
	<i>rbcLa_r</i>	5'-GTA AAA TCA AGT CCA CCR	72°C 40seg) x40	Kress & Erickson (2007)
CG- 3'	72°C 5min			

<i>psbA-</i>	<i>psbA3_f</i>	5'- GTT ATG CAT GAA CGT AAT	95°C 3min	Sang <i>et al.</i> (1997)
<i>trnH</i>		GCT C- 3'	(95°C 30seg 55°C 1min	
	<i>trnHf_05</i>	5'- CGC GCA TGG TGG ATT CAC	72°C 1,5min) x35	Tate & Simpson (2003)
		AAT CC- 3'	72°C 4min	
<i>ITS</i>	<i>ITS92</i>	5'- AAG GTT TCC GTA GGT GAA-	94°C 1min	Desfeaux <i>et al.</i> (1996)
		3'	(94°C 30seg 51°C 40seg	
	<i>ITS75</i>	5'- TAT GCT TAA ACT CCA CGG	72°C 40seg) x40	Desfeaux <i>et al.</i> (1996)
		G- 3'	72°C 5min	
	<i>ITS18_F</i>	5'- GTC CAC TGA ACC TTA TCA		Kass & Wink (1997), modificado por
		TTT AGA GG- 3'		Beyra-Matos & Lavin (1999)
	<i>ITS26_R</i>	5'-GCC GTT ACT AAG GGA ATC		Kass & Wink (1997)
		CTT GTT AG- 3'		

Tabela 2. Sucesso de sequenciamento e características moleculares das quatro regiões do código de barras de DNA.

Região	<i>matK</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>rbcL</i>	<i>ITS</i>
Porcentagem de amostras sequenciadas (Nº total de indivíduos)	87% (75)	78% (116)	99% (73)	74% (117)
Número de indivíduos	65	88	72	86
Número de espécies	28	32	32	30
Número de generous	22	26	26	24
Comprimento mínimo (pb)	511	208	502	472
Comprimento máximo (pb)	857	961	578	735
Comprimento médio (pb)	805,6	503,5	567,7	654,6
Comprimento alinhamento (pb)	939	1014	580	835
Número de sítios variáveis	675	848	183	655

Tabela 3. Relação do teste *'best close match'* do TaxonDNA no sucesso de identificação das espécies madeireiras da FOM.

Região	Número de indivíduos	Identificação correta	Identificação ambígua	Identificação incorreta	Incongruente	Limite calculado
<i>matK</i>	79	64,55%	13,92%	13,92%	7,59%	7.17%:
<i>trnH-psbA</i>	100	77,35%	1,88%	13,20%	7,54%	8.28%
<i>rbcL</i>	86	72,94%	15,29%	5,88%	5,88%	1.9%:
<i>ITS</i>	102	86,45%	1,04%	6,25%	6,25%	8.02%
<i>matK+rbcL</i>	56	55,35%	3,57%	37,50%	3,57%	7,98
<i>trnH-psbA +ITS</i>	68	80,88%	0,00%	7,35%	11,76%	8.59%:
<i>matK+ trnH-psbA + rbcL</i>	78	69,23%	5,12%	15,38%	10,25%	8.51%
<i>matK+ trnH-psbA + rbcL +ITS</i>	72	73,61%	0,00%	16,66%	9,72%	7.98%

Tabela 4. Parâmetros das análises de Máxima Parcimônia (MP) para as quatro regiões do código de barras de DNA e as quatro diferentes combinações entre elas e o modelo evolutivo selecionado pelo Critério de informação Bayesiano (BIC) para a análise de Máxima Verossimilhança (ML).

Região	Nº de sequências	L	MPT	TC	CC	PIC	CI	HI	CI*	HI*	RI	RC	Modelo evolutivo (BIC)
<i>matK</i>	79	2052	10000	939	264	572	0,531	0,468	0,501	0,498	0,864	0,459	GTR+G
<i>trnH-psbA</i>	100	4131	10000	1014	166	702	0,434	0,565	0,411	0,588	0,864	0,375	HKY-G
<i>rbcL</i>	86	479	3449	580	397	174	0,517	0,482	0,508	0,491	0,896	0,464	T92+G+I
<i>ITS</i>	102	3960	10000	835	180	626	0,389	0,61	0,384	0,615	0,852	0,337	GTR+G+I
<i>matK+rbcL</i>	56	1842	10000	1519	808	620	0,56	0,439	0,534	0,465	0,866	0,485	GTR+G
<i>trnH-psbA +ITS</i>	68	6789	10000	1849	591	1184	0,418	0,581	0,41	0,589	0,814	0,34	GTR+G+I
<i>matK+ trnH-psbA + rbcL</i>	78	6125	10000	2533	942	1274	0,462	0,537	0,429	0,57	0,824	0,381	GTR+G+I
<i>matK+ trnH-psbA + rbcL +ITS</i>	72	9359	324	3368	1325	1806	0,432	0,567	0,414	0,585	0,8	0,346	T92+G+I

L= Comprimento; MPT= N° arvores mais parcimoniosas; TC= N° total de caracteres; CC= N° de caracteres constantes; PIC= N° de

caracteres parcimoniosamente informativos; CI= Índice de consistência; HI= Índice de homoplasia; CI*= CI excluindo caracteres não informativos; HI*= HI excluindo caracteres não informativos; RI= Índice de retenção; RC= Índice de consistência reescalado.

Tabela 5. Porcentagem das espécies monofiléticas, com valores de *bootstrap* acima de 70%, das filogenias geradas por Neighbor-Joining (NJ), Máxima Verossimilhança (ML) e Máxima Parcimônia (MP) para as quatro regiões do código de barras de DNA e as quatro diferentes combinações entre elas; média das porcentagens das regiões e combinações entre os três métodos; e média das porcentagens por método.

Regiões	NJ	ML	MP	Média
<i>MatK</i>	54,5	54,5	31,7	47
<i>trnH-psbA</i>	74,1	59,2	70,4	68
<i>RbcL</i>	75	71,5	53,6	67
<i>ITS</i>	84	80	60	75
<i>matK+rbcL</i>	60	65	40	55
<i>trnH-psbA+ITS</i>	72,6	81,7	77,2	77
<i>matK+trnH-psbA+rbcL</i>	76,9	80,7	69,2	76
<i>matK+trnH-psbA+rbcL+ITS</i>	66,7	70,9	75,1	71
Média	70	70	60	

APÊNDICES

Apêndice 1. Espécies madeiráveis da Floresta com Araucária. A, *Ilex theezans* Mart.; B, *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg; C, *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke; D, *Prunus myrtifolia* (L.) Urb.; E, *Lamanonia ternata* Vell.; F, *Cedrela fissilis* Vell.; G, *Schinus terebinthifolius* Raddi; H, *Inga marginata* Willd.; I, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze; J, *Matayba elaeagnoides* Radlk.; K, *Erythroxylum deciduum* A. St.; L, *Luehea divaricata* Mart.; M, *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl; N, *Mimosa scabrella* Benth.; O, *Cupania vernalis* Cambess.; P, *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; Q, *Casearia sylvestris* Sw.; R, *Lafoensia pacari* A. St.; S, *Roupala montana* var. *brasiliensis* (Klotzsch) K.S.Edwards. (Fotos: C. T. Blum [A, E-G, I-P, R, S]; E. C. Smidt [C, D, Q]; M. Bolson [B, H]).



Apêndice 2. Fotos das espécies da família Lauraceae com potencial madeireiro. A, *Ocotea puberula* (Rich.) Nees; B, *Ocotea catharinensis* Mez; C, *Ocotea porosa* (Nees & C. Mart.) Barroso; D, *Cryptocarya aschersoniana* Mez; E, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer; F, *Ocotea pulchella* (Nees) Mez; G, *Nectandra lanceolata* Nees. (Fotos: M. L. Brotto [B-F]; E. C. Smidt [A]; M. Bolson [G]).



Apêndice 3. Porcentagem das espécies monofiléticas (e.m) com valores de *bootstrap* da filogenia e espécies não monofiléticas (e.n.m.) em árvores geradas por NJ, ML, MP para as regiões do código de barras, individuais e combinadas.

Regiões	Valores de suporte das e.m.					e.n.m.
	<70%	>70%	>80%	>90%	=100%	%
NJ						
<i>matK</i>	4,5	0,0	0,0	13,6	40,9	40,9
<i>trnH-psbA</i>	3,7	3,7	7,4	3,7	59,3	22,2
<i>rbcL</i>	0,0	0,0	0,0	28,6	46,4	25,0
<i>ITS</i>	0,0	4,0	0,0	8,0	72,0	16,0
<i>matK+rbcL</i>	0,0	0,0	10,0	10,0	40,0	40,0
<i>trnH-psbA+ITS</i>	9,1	4,5	0,0	4,5	63,6	18,2
<i>matK+trnH-psbA+rbcL</i>	0,0	3,8	0,0	7,7	65,4	23,1
<i>matK+ trnH-psbA+rbcL+ITS</i>	4,2	0,0	0,0	0,0	66,7	29,2
ML						
<i>matK</i>	4,5	0,0	4,5	9,1	40,9	40,9
<i>trnH-psbA</i>	7,4	3,7	14,8	40,7	0	33,3
<i>rbcL</i>	3,6	3,6	0,0	0,0	67,9	25,0
<i>ITS</i>	4,0	0,0	12,0	28,0	40,0	16,0
<i>matK+rbcL</i>	0,0	0,0	0,0	65,0	0,0	35,0
<i>trnH-psbA+ITS</i>	13,6	4,5	4,5	9,1	63,6	4,5
<i>matK+trnH-psbA+rbcL</i>	0,0	11,5	0,0	26,9	42,3	19,2
<i>matK+ trnH-psbA+rbcL+ITS</i>	8,3	4,2	20,8	29,2	16,7	20,8
MP						

<i>matK</i>	4,5	4,5	4,5	9,1	13,6	63,6
<i>trnH-psbA</i>	3,7	0,0	3,7	7,4	59,3	25,9
<i>rbcL</i>	3,6	3,6	3,6	39,3	7,1	42,9
<i>ITS</i>	12,0	4,0	4,0	20,0	32,0	28,0
<i>matK+rbcL</i>	10,0	0,0	5,0	20,0	15,0	50,0
<i>trnH-psbA+ITS</i>	4,5	0,0	0,0	22,7	54,5	18,2
<i>matK+trnH-psbA+rbcL</i>	3,8	0,0	3,8	23,1	42,3	26,9
<i>matK+ trnH-psbA+rbcL+ITS</i>	0,0	0,0	4,2	16,7	54,2	25,0

Apêndice 4. Lista das espécies madeireiras coletadas na FOM, coletor e número de coleta, local de coleta e o número de acesso do GenBank das quatro regiões do *DNA Barcode*. A classificação dos taxa se apresenta de acordo com APG III (2009).

Ordem/ Família/ Espécie	Coletor/ Número do coletor	Município	Número de acesso do GenBank			
			<i>matK</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>rbcL</i>	<i>ITS</i>
CONIFERALES						
Araucariaceae						
<i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	Bolson M 477	Curitiba	-	-	-	-
<i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	Bolson M 485-01	Curitiba	-	-	-	-
<i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	Bolson M 485-04	Curitiba	-	-	-	-
<i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze			gi156074095	gi264684362	gi264684344	
Podocarpaceae						
<i>Podocarpus lambertii</i> Klotzsch ex Endl.	Bolson M 486-01	Curitiba	-	-	-	-
<i>Podocarpus lambertii</i> Klotzsch ex Endl.	Bolson M 486-04	Curitiba	-	-	-	-
<i>Podocarpus lambertii</i> Klotzsch ex Endl.	Bolson M 486-03	Curitiba	-	-	-	-
<i>Podocarpus lambertii</i> Klotzsch ex Endl.			gi336111973		gi332713612	
LAURALES						
Lauraceae						
<i>Cryptocarya aschersoniana</i> Mez	Brotto ML 649	Telêmaco Borba	-	-	-	-
<i>Cryptocarya aschersoniana</i> Mez	Brotto ML 648	Telêmaco Borba	-	-	-	-
<i>Nectandra grandiflora</i> Nees & C. Mart. ex Nees	Blum CT 10-033	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Nectandra grandiflora</i> Nees & C. Mart. ex Nees	Brotto ML 641	Telêmaco Borba	-	-	-	-
<i>Nectandra grandiflora</i> Nees & C. Mart. ex Nees	Brotto ML 642	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Nectandra grandiflora</i> Nees & C. Mart.	Blum CT 10-034	Tijucas do Sul	-	-	-	-

ex Nees							
<i>Nectandra grandiflora</i> Nees & C. Mart.	Blum CT 10-035	Tijucas do Sul					-
ex Nees							
<i>Nectandra grandiflora</i> Nees & C. Mart.	Blum CT 10-036	Tijucas do Sul					-
ex Nees							
<i>Nectandra lanceolata</i> Nees	Blum CT 10-116	Colombo	-		-		-
<i>Nectandra lanceolata</i> Nees	Brotto ML 651	Mato Rico	-		-		-
<i>Nectandra lanceolata</i> Nees	Blum CT 10-117	Colombo	-		-		-
<i>Nectandra lanceolata</i> Nees							gi305855569
<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	Brotto ML 174	São José dos Pinhais	-	-	-		-
<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	Brotto ML 504	Clevelândia	-	-	-		-
<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	Brotto ML 645	Telêmaco Borba	-		-		-
<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez							gi305855570
<i>Ocotea catharinensis</i> Mez	Brotto ML 663	Quatro Barras	-	-	-		-
<i>Ocotea catharinensis</i> Mez	Brotto ML 664	Quatro Barras	-	-	-		-
<i>Ocotea catharinensis</i> Mez	Brotto ML 694	Diamante do Norte	-	-	-		-
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	Brotto ML 284	Morretes	-	-	-		-
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	Brotto ML 628	Jaguariaíva	-	-	-		-
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	Brotto ML 620	Ponta Grossa	-	-	-		-
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	Brotto ML 414	Curitiba		-			-
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	Brotto ML 619	Ponta Grossa					-
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer					gi14090628		gi14090784
<i>Ocotea porosa</i> (Nees & C. Mart.) Barroso	Brotto ML 611	Ponta Grossa					-
<i>Ocotea porosa</i> (Nees & C. Mart.) Barroso	Brotto ML 617	Ponta Grossa	-	-	-		-
<i>Ocotea porosa</i> (Nees & C. Mart.) Barroso	Brotto ML 665	Curitiba	-	-	-		-
<i>Ocotea porosa</i> (Nees & C. Mart.) Barroso	Brotto ML 715	Morretes					-

<i>Ocotea porosa</i> (Nees & C. Mart.) Barroso	Brotto ML 79	Curitiba	-	-	-	-
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	Blum CT 10-069	Curitiba	-	-	-	-
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	Bolson M 369	Curitiba	-	-	-	-
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	Bolson M 375	Curitiba	-	-	-	-
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	Bolson M 327-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	Bolson M 371-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees			gi166155824	gi168829672	gi261279475	
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees			gi166155826	gi168829673		
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees			gi166155827	gi261864233		
<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees			gi261347963			
<i>Ocotea pulchella</i> (Nees) Mez	Brotto ML 446	Telêmaco Borba	-	-	-	-
<i>Ocotea pulchella</i> (Nees) Mez	Brotto ML 50	Curitiba	-	-	-	-
<i>Ocotea pulchella</i> (Nees) Mez	Brotto ML 602	Curitiba				-
<i>Ocotea pulchella</i> (Nees) Mez	Bolson M 454	Paranaguá		-		
<i>Ocotea pulchella</i> (Nees) Mez						gi14090787
PROTEALES						
Proteaceae						
<i>Roupala montana</i> var. <i>brasiliensis</i> (Klotzsch) K.S.Edwards	Blum CT 11-011	Curitiba	-	-	-	-
MALPIGHIALES						
Erythroxyloaceae						
<i>Erythroxyllum deciduum</i> A. St.	Blum CT 11-047	Tijucas do Sul		-	-	-
<i>Erythroxyllum deciduum</i> A. St.	Bolson M 399	Ponta Grossa		-	-	-
<i>Erythroxyllum deciduum</i> A. St.	Bolson M 421	Tibagi				-
Saliciaceae						
<i>Casearia sylvestris</i> Sw.			gi261347767	gi313502339	gi261279217	
<i>Casearia sylvestris</i> Sw.			gi313502728		gi263042505	
<i>Casearia sylvestris</i> Sw.					gi263042507	

Casearia sylvestris Sw.

gi313757996

OXALIDALES

Cunoniaceae

<i>Lamanonia ternata</i> Vell.	Blum CT 10-127	Quatro Barras	-	-	-	-
<i>Lamanonia ternata</i> Vell.	Bolson M 456	Honório Serpa	-	-	-	-
<i>Lamanonia ternata</i> Vell.	Blum CT 10-128	Quatro Barras	-	-	-	-
<i>Lamanonia ternata</i> Vell.	Blum CT 10-141	Curitiba	-	-	-	-
<i>Lamanonia ternata</i> Vell.	Bolson M 462	Piraquara	-	-	-	-
<i>Lamanonia ternata</i> Vell.	Blum CT 11-022	Tijucas do Sul	-	-	-	-

FABALES

Fabaceae

<i>Inga marginata</i> Willd.	Blum CT 11-016	Curitiba	-	-	-	-
<i>Machaerium stipitatum</i> (DC.) Vogel						gi148925538
<i>Machaerium stipitatum</i> (DC.) Vogel						gi148925539
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	Blum CT 10-045	Campo Largo	-	-	-	-
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	Bolson M 353	Curitiba	-	-	-	-
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	Bolson M 347	Curitiba	-	-	-	-
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	Blum CT 10-046	Campo Largo	-	-	-	-
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	Blum CT 10-047	Campo Largo	-	-	-	-
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	Blum CT 10-049	Campo Largo	-	-	-	-

ROSALES

Rosaceae

<i>Prunus myrtifolia</i> (L.) Urb.	Bolson M 360	Curitiba	-	-	-	-
<i>Prunus myrtifolia</i> (L.) Urb.	Bolson M 417	Tibagi	-	-	-	-
<i>Prunus myrtifolia</i> (L.) Urb.	Bolson M 368	Curitiba	-	-	-	-
<i>Prunus myrtifolia</i> (L.) Urb.	Bolson M 393	Curitiba	-	-	-	-
<i>Prunus myrtifolia</i> (L.) Urb.	Bolson M 375-1	Curitiba	-	-	-	-

MYRTALES

Lythraceae

<i>Lafoensia pacari</i> A. St.	Blum CT 11-017	Curitiba	-	-	-	-
<i>Lafoensia pacari</i> A. St.	Lima DF 117	Curitiba	-	-	-	-

Myrtaceae

<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg	Blum CT 10-101	Curitiba	-	-	-	-
<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg	Blum CT 10-109	Colombo	-	-	-	-
<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg	Blum CT 10-100	Curitiba	-	-	-	-
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.	Blum CT 11-024	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.	Blum CT 11-003	Piraquara	-	-	-	-
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.	Blum CT 10-098	Curitiba	-	-	-	-
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.			gi164513193	gi164508876	gi240253228	gi125628882
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.			gi164606878	gi164508880	gi313758124	gi125628884
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.			gi246655197	gi246905617	gi313758128	
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.			gi313502815	gi313502471		
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.				gi313502475		

SAPINDALES**Anacardiaceae**

<i>Lithrea molleoides</i> (Vell.) Engl.	Bolson M 404	Ponta Grossa	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Bolson M 328-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Bolson M 332-1	Campina Grade do Sul	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Bolson M 331-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Blum CT 11-013	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Bolson M 331-2	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Bolson M 332-2	Curitiba	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi			gi270155669		gi270155997	gi57867884

Meliaceae

<i>Cabrlea canjerana</i> (Vell.) Mart.	Blum CT 10-102	Curitiba	-	-	-	-
--	----------------	----------	---	---	---	---

<i>Cabralea canjerana</i> (Vell.) Mart.	Bolson M 460	Ponta Grossa	-	-	-	-
<i>Cabralea canjerana</i> (Vell.) Mart.					gi83637884	gi116292934
<i>Cedrela fissilis</i> Vell.	Bolson M 487	Curitiba	-	-	-	-
<i>Cedrela fissilis</i> Vell.						gi219810145
<i>Cedrela fissilis</i> Vell.						gi219816486
Rutaceae						
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam.	Blum CT 10-106	Colombo	-	-	-	-
Sapindaceae						
<i>Cupania vernalis</i> Cambess.	Blum CT 11-040	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Cupania vernalis</i> Cambess.	Bolson M 340-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Cupania vernalis</i> Cambess.	Brotto ML 530	Clevelândia	-	-		-
<i>Cupania vernalis</i> Cambess.	Blum CT 11-038	Tijucas do Sul	-	-		
<i>Cupania vernalis</i> Cambess.	Blum CT 11-039	Tijucas do Sul		-		-
<i>Matayba elaeagnoides</i> Radlk.	Blum CT 10-107	Colombo	-	-	-	-
<i>Matayba elaeagnoides</i> Radlk.	Blum CT 10-132	Campo Largo	-	-	-	-
<i>Matayba elaeagnoides</i> Radlk.	Bolson M 345	Curitiba	-	-	-	-
<i>Matayba elaeagnoides</i> Radlk.	Blum CT 11-027	Tijucas do Sul				-
<i>Matayba elaeagnoides</i> Radlk.					gi209169307	gi209169021
MALVALES						
Malvaceae						
<i>Luehea divaricata</i> Mart.	Bolson M 349	Curitiba	-	-	-	-
<i>Luehea divaricata</i> Mart.	Bolson M 471	Curitiba	-	-	-	-
ERICALES						
Myrsinaceae						
<i>Myrsine umbellata</i> Mart.	Blum CT 10-024	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Myrsine umbellata</i> Mart.	Blum CT 10-076	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Myrsine umbellata</i> Mart.	Blum CT 10-072	Curitiba		-	-	-
<i>Myrsine umbellata</i> Mart.	Bolson M 401	Ponta Grossa	-			-

LAMIALES

Bignoniaceae

<i>Jacaranda puberula</i> Cham.	Blum CT 339-1	Curitiba	-	-	-	-
<i>Jacaranda puberula</i> Cham.	Blum CT 339-2	Curitiba	-	-	-	-
<i>Jacaranda puberula</i> Cham.	Blum CT 10-104	Colombo	-	-	-	-
<i>Jacaranda puberula</i> Cham.	Blum CT 10-103	Colombo	-	-	-	-

Lamiaceae

<i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	Blum CT 10-136	Curitiba	-	-	-	-
<i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	Bolson M 321	Curitiba	-	-	-	-
<i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	Blum CT 10-137	Curitiba	-	-	-	-
<i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	Blum CT 10-140	Curitiba	-	-	-	-
<i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	Bolson M 326	Curitiba	-	-	-	-
<i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	Blum CT 11-023	Tijucas do Sul	-	-	-	-

AQUIFOLIALES

Aquifoliaceae

<i>Ilex theezans</i> Mart.	Blum CT 11-044	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Ilex theezans</i> Mart.	Blum CT 10-125	Quatro Barras	-	-	-	-
<i>Ilex theezans</i> Mart.	Blum CT 10-086	Tijucas do Sul	-	-	-	-
<i>Ilex theezans</i> Mart.				gi182406696	gi22796791	gi229915155
<i>Ilex theezans</i> Mart.					gi229915069	gi32346387
<i>Ilex theezans</i> Mart.						gi32346392

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação do *DNA Barcoding* nas espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Mista abrangeram 218 sequências de *matK*, 290 de *trnH-psbA*, 186 de *rbcL* e 294 de *ITS*, totalizando 304 indivíduos, pertencentes a 131 espécies e a 42 famílias. Idealmente esperávamos padronizar uma técnica molecular que fornecesse 100% de acerto no reconhecimento da flora arbórea da FOM. Porém, o conhecimento acumulado na literatura, até o momento, nos mostra que entre plantas esta é uma expectativa pouco realista. Uma vez que muitos marcadores moleculares se comportam de modo variável em diferentes grupos taxonômicos e muitos grupos taxonômicos apresentam limites específicos pouco claros, frequentemente resultantes de processo de especiação incipiente ou hibridização e/ou introgressão, a tarefa de se encontrar uma ou poucas regiões de DNA que forneçam a resolução desejada não é simples. A partir da amostragem reunida nesta dissertação e dos resultados encontrados, as abordagens baseadas nas divergências intraespecífica e interespecífica por distância-*p*, no teste '*best close match*' e nas análises filogenéticas de NJ, mostraram que as regiões individuais e a combinação envolvendo as quatro regiões não apontaram desempenho superior a 80% na identificação das espécies. A combinação dos dois espaçadores (*trnH-psbA* + *ITS*) foi o mais eficiente, embora tenha tido capacidade limitada em diferenciar as espécies da família Lauraceae. Deste modo, com exceção dos representantes desta família, recomendamos *trnH-psbA* + *ITS* como o *barcode* mais adequado para a identificação das demais espécies arbóreas desta formação, com alto nível de confiabilidade.

Das principais espécies com potencial madeireiro da FOM, 33 puderam ser amostradas neste estudo. 112 indivíduos foram sequenciados, resultando em 79 sequências de *matK*, 100 de *trnH-psbA*, 86 de *rbcL* e 102 de *ITS*. Entre as regiões houve diferentes desempenhos no sequenciamento, sendo *rbcL* a mais eficiente (99%). *ITS* com 86% foi a região que melhor distinguiu as espécies através do '*best close match*', no entanto a combinação *trnH-psbA+ITS* apresentou desempenho semelhante, com 81%. As análises filogenéticas de NJ e ML apresentaram árvores com valores de suporte semelhantes quando comparados a MP, sendo que *ITS*, *trnH-psbA+ITS* e *matK+ trnH-psbA+rbcL* apresentaram melhor desempenho no

reconhecimento de espécies monofiléticas, na média dos três métodos. Para a identificação e distinção destas espécies recomendamos o uso de *ITS* como *barcode*

No geral a técnica de *DNA Barcode* demonstrou ser uma ferramenta útil na identificação das principais espécies madeireiras e demais espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Mista. Ressaltamos que os espaçadores *ITS* (nuclear) e *trnH-psbA* (plastidial) foram as regiões que se destacaram como potenciais *barcode* das espécies desta formação. Desta forma o presente estudo sugere que a técnica seja utilizada como auxílio a inventários florísticos, como uma ferramenta forense em apreensões de madeiras, e também como um instrumento para estudos de ecologia de comunidades, fornecendo informações para melhor compreender os efeitos dos ambientes sobre a manutenção da diversidade de espécies e função do ecossistema de comunidades vegetais. Além disso, o uso do *barcode* pode nos indicar problemas de taxonomia de grupos para as não discriminadas pela técnica, indicar dúvidas na delimitação de espécies ou mesmo a presença de linhagens parafiléticas, gerando a necessidade de estudos bio sistemáticos específicos para estes complexos.