

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FELIPE ZATT SCHARDOSIN

IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DE AMOSTRAS DE MADEIRAS BASEADO NA
REGIÃO DO ITS (rDNA) ASSOCIADO À ANATOMIA DA MADEIRA

CURITIBA
2015

FELIPE ZATT SCHARDOSIN

IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DE AMOSTRAS DE MADEIRAS BASEADO NA
REGIÃO DO ITS (rDNA) ASSOCIADO À ANATOMIA DA MADEIRA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Florestal, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Graciela Inés Bolzon de Muñiz

Co-Orientadora: Profa. Dra. Silvana Nisgoski

CURITIBA
2015

Biblioteca de Ciências Florestais e da Madeira - UFPR
Ficha catalográfica elaborada por Denis Uezu – CRB 1720/PR

Schardosin, Felipe Zatt

Identificação botânica de amostras de madeiras baseado na região do ITS (rDNA) associado à anatomia da madeira / Felipe Zatt Schardosin. – 2015
118 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Graciela Inéz Bolzon de Muñiz

Coorientadora: Profa. Dra. Silvana Nisgoski

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Defesa: Curitiba, 10/02/2015.

Área de concentração: Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais

1. Madeira - Identificação. 2. Madeira - Anatomia. 3. Código genético. 4. Genética vegetal. 5. Teses. I. Muñiz, Graciela Inéz Bolzon de. II. Nisgoski, Silvana. III. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. IV. Título.


CDD – 634.9

CDU – 634.0.811

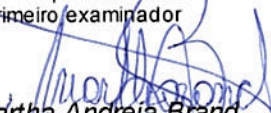
PARECER

Defesa nº. 1078

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, após arguir o(a) mestrando(a) *Felipe Zatt Schardosin* em relação ao seu trabalho de dissertação intitulado "**IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DE AMOSTRAS DE MADEIRA BASEADO NA REGIÃO DO ITS (rDNA) ASSOCIADA À ANATOMIA DA MADEIRA**", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de *Mestre* em Engenharia Florestal, área de concentração em **TECNOLOGIA E UTILIZAÇÃO DE PRODUTOS FLORESTAIS**.



Dr. *Guilherme Schnell e Schühli*
Embrapa Florestas
Primeiro examinador




Dr. *Martha Andreia Brand*
Universidade do Estado de Santa Catarina
Segundo examinador



Dr. *Graciela Ines Bolzon de Muniz*
Universidade Federal do Paraná
Orientador e presidente da banca examinadora



Curitiba, 10 de fevereiro de 2015.



Antonio Carlos Batista
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

A todos que amam a madeira e desejam seu uso sustentável dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma se envolveram e me ajudaram na realização desse trabalho. Especialmente às minhas orientadoras, Prof^a Graciela Inés Bolzon de Muñiz e Prof^a Silvana Nisgoski pelo amparo, suporte, compreensão e orientação ao longo de toda a convivência e trabalho.

À Elisabeth Magel, professora da Universidade de Hamburgo, por ter aberto meus horizontes e me introduzido na temática de identificação de madeiras com marcadores de DNA.

À Aiga Jucy Fuchshuber da Silva Caldas pelo material cedido e pela oportunidade de conhecer a problemática da perícia botânica criminal.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia e Qualidade da Madeira – UFPR, pelos bons momentos que passamos.

Ao Professor Emanuel Maltempi de Souza por abrir as portas dos Laboratórios do Departamento de Bioquímica da UFPR, e aos colegas do anexo por toda a ajuda e aconselhamento, em especial à Michelle Zibetti Tadra e ao técnico Valter Antonio de Baura, fundamentais na execução desse trabalho.

Agradeço com muito carinho à minha família pelo suporte e apoio ao longo da minha caminhada, em especial à mãe, pai, Cris, Dani, Miguel, Weronika, Fernando, Lu, Andressa, Alessa e Alessandra.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal por essa oportunidade dada.

Ao Davi e Reinaldo, secretários da secretaria da Pós-Graduação em Engenharia Florestal da UFPR.

Ao CNPQ pelo financiamento do projeto e pela formação e contribuição no meu conhecimento científico.

RESUMO

A identificação taxonômica da madeira é de fundamental importância para a sua correta aplicação tecnológica, controle de fraudes e controle de atividades do comércio ilegal de espécies protegidas. No Paraná, a Mata Atlântica, que já ocupou 99% da área do estado, hoje ocupa apenas 13% e continua ameaçada pelas atividades madeireiras ilegais, avanço das áreas agrícolas e urbanas. Metodologias de identificação da madeira podem contribuir para a preservação desse bioma. A metodologia tradicional de identificação de madeiras baseia-se nos conhecimentos da anatomia da madeira, que vem sendo complementada por técnicas alternativas. Uma dessas técnicas é o *DNA-barcode* que permite a identificação de espécie baseada em regiões padronizadas do DNA. Uma região com promissora aplicação como marcador de *barcode* é a região do espaçador interno transcrito (ITS) do DNA ribossômico. Essa região tem consagrada aplicação como ferramenta de inferência evolutiva e filogenética e vem sendo indicada como candidata ao *DNA-barcode*. Esse trabalho teve como objetivo a identificação de amostras de madeira de apreensão utilizando a anatomia da madeira associada à região do ITS do rDNA. Oito amostras de madeira foram caracterizadas anatomicamente, e tiveram seu DNA extraído segundo dois protocolos, amplificado e sequenciado. Os dados anatômicos foram aplicados em chaves de identificação e as sequências do rDNA foram procuradas utilizando-se da ferramenta BLAST no banco de dados GENBANK. Foi possível extrair DNA genômico de todas as amostras, tendo o protocolo de grande escala rendido melhores resultados. Quatro das amostras tiveram a região do ITS completa sequenciada e uma a região do ITS1. As amostras foram identificadas como *Hovenia dulcis*, um integrante da família Lauraceae, *Protium* spp., *Cedrela* spp., *Chrysophyllum* spp. e *Nectandra* spp. Do isolado da amostra L3 foi possível a amplificação, sequenciamento da região do ITS1 e identificação de um fungo. O GENBANK se mostrou uma boa fonte de sequências para espécies madeireiras e a anatomia da madeira conciliada com a região do ITS foi eficaz identificando a maioria das amostras, porém se faz necessário o conhecimento da sequência de um número maior de indivíduos para se obter resoluções maiores.

Palavras-chave: Identificação da madeira, *Barcoding*, Anatomia da Madeira.

ABSTRACT

The timber's taxonomic identification is of fundamental importance for its proper technological application, fraud control and control of illegal protected species trade activities. In Paraná State, the Atlantic Forest that has held 99% of the state area today occupies only 13% and still threatened by illegal logging, increase of agricultural and urban areas. Wood identification methodologies can contribute to the preservation of this biome. The traditional methodology for wood identification is based on the knowledge of wood anatomy, which has been supplemented by alternative techniques. One of these techniques is the DNA barcode, that allows species identification based on DNA standardized regions. A region with promising application as barcode marker is the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal DNA. This region has usual application as evolutionary and phylogenetic inference tool and has been recommended as a candidate for DNA barcode. This study aimed to identify seizure wood samples using the wood anatomy associated with the rDNA ITS region. Eight wood samples were characterized anatomically, and had their DNA extracted, according to two protocols, amplified and sequenced. The anatomical results were applied in identification keys and the rDNA sequences were searched using the BLAST tool in GENBANK database. It was possible to extract genomic DNA from all samples, the large-scale protocol yielded the best results. Four of the samples had the complete ITS region sequenced and one the ITS1 region. The samples were identified as *Hovenia dulcis*, a member of the Lauraceae family, *Protium* spp., *Cedrela* spp., *Chrysophyllum* spp. and *Nectandra* spp. The sample L3 isolate was amplified and sequenced, the ITS1 sequence was identified as a fungus. The GENBANK proved to be a good source of sequences for wood species and wood anatomy combined with the ITS region was effective identifying samples, however more sequences for a larger number of individuals are necessary to obtain higher resolutions.

Keywords: *Wood Identification, Barcoding, Wood Anatomy.*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – FITOFISIONOMIAS ORIGINAIS DO ESTADO DO PARANÁ E SEUS REMANESCENTES EM 2012.....	22
FIGURA 02 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA REPETIÇÃO DO rDNA	28
FIGURA 03 – AMOSTRAS DE MADEIRA RECEBIDAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS CASOS 01 e 02.....	37
FIGURA 04 – RALADOR CURVO UTILIZADO PARA OBTENÇÃO DE PÓ DE MADEIRA.....	40
FIGURA 05 – FIGURA ESQUEMÁTICA DA DISPOSIÇÃO DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DO ITS DO DNA RIBOSSÔMICO EM DOIS FRAGMENTOS SOBREPONÍVEIS.....	45
FIGURA 06 – MACROFOTOGRAFIAS DAS SECÇÕES TRANSVERSAIS DAS AMOSTRAS COM MAGNITUDE DE 15X.....	54
FIGURA 07 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE L1.	56
FIGURA 08 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE L2.	60
FIGURA 09 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE U4.	61
FIGURA 10 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE L3.	62
FIGURA 11 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE U1.	64

FIGURA 12 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE U2.	66
FIGURA 13 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE U3.	67
FIGURA 14 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE U5.	68
FIGURA 15 – ELETROFORESE EM AGAROSE DOS ISOLADOS DE DNA (5µl) DA EXTRAÇÃO EM PEQUENA ESCALA (50mg).	71
FIGURA 16 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS ISOLADOS DE DNA DA EXTRAÇÃO EM GRANDE ESCALA (700mg).	71
FIGURA 17 – MEDIDAS DE ABSORBÂNCIA PARA OS ISOLADOS DE U1, L1, L2, L3 DA EXTRAÇÃO EM PEQUENA ESCALA.....	74
FIGURA 18 – MEDIDAS DE ABSORBÂNCIA PARA OS ISOLADOS DE U1, L1, L2, L3 DA EXTRAÇÃO EM GRANDE ESCALA.....	74
FIGURA 19 – AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS ITS1 E ITS2 DO rDNA DOS ISOLADOS OBTIDOS NA EXTRAÇÃO DE PEQUENA ESCALA.....	76
FIGURA 20 – AMPLIFICAÇÕES PARA OS ISOLADOS DA EXTRACAO DE PEQUENA ESCALA NÃO AMPLIFICADOS ANTERIORMENTE DILUIDOS A 0,1X E 0,01X.....	77
FIGURA 21 – AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DO ITS COMPLETA (APLICANDO <i>PRIMERS ITS1.1/ITS4</i>).	78
FIGURA 22 – AMPLIFICAÇÕES PARA OS ISOLADOS DA EXTRACAO DE GRANDE ESCALA.....	80
FIGURA 23 – AMPLIFICAÇÕES PARA A REGIÃO COMPLETA DO ITS DAS AMOSTRAS DA EXTRAÇÃO EM GRANDE ESCALA (APLICANDO <i>PRIMERS ITS1.1/ITS4</i>)	81

FIGURA 24 – IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA INDICANDO HIFA NO INTERIOR DE ELEMENTO DE VASO DA AMOSTRA U1.....	83
FIGURA 25 – INCONFORMIDADE ENTRE OS ELETROFEROGRAMAS DOS SEQUENCIAMENTOS NAS DIREÇÕES 3'-5' E 5'-3' (REVERSO COMPLETO APRESENTADO) PARA A REGIÃO DO ITS1 DAS AMOSTRAS U2, U3 e U5.	85
FIGURA 26 – ÁRVORE DE AGRUPAMENTO DE VIZINHOS PARA AS 11 SEQUÊNCIAS OBTIDAS DO GENBANK E OS DOIS PARÁLOGOS DA REGIÃO DO ITS DE U2, U3 e U5.....	88
FIGURA 27 – SEQUÊNCIAS DA REGIÃO DO ITS PARA AS AMOSTRAS U2, U3 E U5 JUNTO COM AS DUAS SEQUÊNCIAS DE MAIOR SIMILARIDADE DISPONÍVEIS NO GENBANK. (1pb a 400pb).	90
FIGURA 28 – SEQUÊNCIAS DA REGIÃO DO ITS PARA AS AMOSTRAS U2, U3 E U5 JUNTO COM AS DUAS SEQUÊNCIAS DE MAIOR SIMILARIDADE DISPONÍVEIS NO GENBANK. (401pb a 730pb). ...	91
FIGURA 29 – ÁRVORE DE AGRUPAMENTO DE VIZINHOS PARA AS 11 SEQUÊNCIAS OBTIDAS DO GENBANK E A REGIÃO DO ITS DE U4.	93
FIGURA 30 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA NA REGIÃO DO ITS DE U4 E A SEQUÊNCIA DE <i>Nectandra salicifolia</i>	95
FIGURA 31 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA NA REGIÃO DO ITS DE U4 E A SEQUÊNCIA DE <i>Nectandra salicifolia</i>	96
FIGURA 32 – ÁRVORE DE AGRUPAMENTO DE VIZINHOS PARA AS 11 SEQUÊNCIAS OBTIDAS DO GENBANK E A REGIÃO DO ITS1 DE L1.....	98

FIGURA 33 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO DO ITS1 DE L1 COM SEQUÊNCIAS DE <i>H. dulcis</i> E <i>H. trichocarpa</i>	99
FIGURA 34 – ELETROFEROGRAMA DO SEQUENCIAMENTO NA DIREÇÃO 3'-5' DA BANDA AMPLIFICADA PARA L2.	100
FIGURA 35 – REGIÃO DO ITS1 AMPLIFICADA PARA O ISOLADO DE L3 E DUAS SEQUÊNCIAS DE <i>Phialophora spp.</i>	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – ESQUEMA DAS REAÇÕES DE PCR E AS QUANTIDADES E CONCENTRAÇÕES FINAIS DE CADA REAGENTE.	45
TABELA 02 – SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DO ITS DO DNA RIBOSSÔMICO.....	46
TABELA 03 – VOLUMES EMPREGADOS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO.	48
TABELA 04 – CONCENTRAÇÃO DOS ISOLADOS E RENDIMENTO EM DNA DAS EXTRAÇÕES CONDUZIDAS SEGUNDO PROTOCOLOS DE PEQUENA E GRANDE ESCALA. (X INDICA SEGUNDA ELUIÇÃO).	70
TABELA 05. – PARÂMETROS DE QUALIDADE DO DNA ISOLADO NAS EXTRAÇÕES DE DNA SEGUNDO OS PROTOCOLOS EMPREGADOS.	72
TABELA 06 – AS ONZE SEQUÊNCIAS DO ITS COM MAIOR SIMILARIDADE A U2, U3 E U5 DISPONÍVEIS NO GENBANK.....	87
TABELA 07 – AS ONZE SEQUÊNCIAS DO ITS COM MAIOR SIMILARIDADE A U4 DISPONÍVEIS NO GENBANK.	92
TABELA 08 – AS ONZE SEQUÊNCIAS DO ITS COM MAIOR SIMILARIDADE A L1 DISPONÍVEIS NO GENBANK.	97

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 – IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS SEGUNDOS AS CHAVES DE IDENTIFICAÇÃO UTILIZADAS.....	53
QUADRO 02 – RESUMO DOS PRODUTOS DE PCR SUBMETIDOS AO SEQUENCIAMENTO E SUA IMAGEM DE ELETROFORESE	81
QUADRO 03 – DIAGNÓSTICO DAS BANDAS SEQUENCIADAS.	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 MATA ATLÂNTICA, AMEAÇAS E LEGISLAÇÃO	20
2.2 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE MADEIRA	22
2.2.1 Anatomia da Madeira	23
2.2.2 Metodologias alternativas de identificação de madeiras	25
2.2.2.1 Técnicas de espectroscopia	26
2.2.2.2 DNA-Barcode	26
2.2.3 Espaçador Interno Transcrito do rDNA – ITS	28
2.3 XILEMA SECUNDARIO COMO FONTE de DNA.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 MATERIAIS	35
3.2 MÉTODOS	38
3.2.1 Identificação anatômica das amostras	38
3.2.2 Identificação Biomolecular das amostras	39
3.2.2.1 Isolamento de DNA	39
3.2.2.2 Avaliação da Qualidade do DNA Isolado.....	44
3.2.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase	44
3.2.2.4 Eletroforese em gel de agarose	47
3.2.2.5 Purificação e Sequenciamento do DNA	47
3.2.2.6 Alinhamento das sequências.....	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
4.1 IDENTIFICAÇÃO ANATÔMICA DAS AMOSTRAS	51
4.1.1 Caracteres organolépticos e não anatômicos	51

4.1.2. Identificação baseada nos caracteres anatômicos	52
4.1.2.1 Descrição anatômica e identificação de L1.	55
4.1.2.2 Descrição anatômica e identificação de L2 e U4.....	57
4.1.2.3 Descrição anatômica e identificação de L3.	61
4.1.2.4 Descrição anatômica e identificação de U1.....	63
4.1.2.5 Descrição anatômica e identificação de U2,U3 e U5.	65
4.2.1.6 Implicações da identificação anatômica das amostras.....	68
4.2 IDENTIFICAÇÃO BASEADA NA REGIAO DO ITS DO DNA RIBOSSÔMICO....	69
4.2.1 Extração de DNA.....	69
4.2.2 Reações de PCR.....	75
4.2.3 Sequenciamento de DNA.....	83
4.2.3.1 Sequenciamento e identificação de U2, U3 e U5.	84
4.2.3.2. Sequenciamento e identificação de U4	91
4.2.3.3 Sequenciamento e identificação de L1.....	96
4.2.3.4 Sequenciamento e Identificação de U1, L2 e L3.	100
5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	103
REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

No comércio e uso tradicional, as madeiras recebem seus nomes de acordo com aspectos da sua constituição e de acordo com o conhecimento empírico popular. Esses nomes podem apresentar diferenças fonéticas ou ortográficas nas mais diferentes regiões do Brasil ou podem ser atribuídos nomes completamente distintos à mesma espécie.

Essa miscelânea pode levar a casos extremos como o do Mogno (*Swietenia Jacq 1760*), o qual no comércio internacional é conhecido por 446 diferentes nomes populares (ALDEN, 1998), ou o caso do nome vulgar “Angelim”, o qual é atribuído a mais de 20 espécies, distribuídas em quatro gêneros da família Leguminosae, além de espécies de outras famílias botânicas (FERREIRA e HOPKINS, 2004).

A enorme diversidade de nomes populares torna-se um problema, pois a madeira de diferentes espécies tem diferentes propriedades tecnológicas, por consequência, se fazem necessários meios de se atribuir a origem de uma peça de madeira a um táxon, preferencialmente em nível de espécie, pois normalmente as propriedades tecnológicas da madeira encontram-se na literatura listadas e relacionadas a nomes científicos (ZENID e CECCANTINI, 2007; NAHUZ *et al.*, 2013).

A extrema variabilidade de nomenclaturas e a enorme diversidade de espécies arbóreas existente nos biomas brasileiros torna a identificação de madeiras uma atividade complexa, o que dificulta o controle da cadeia de custódia e permite que fraudes ocorram (ZENID e CECCANTINI, 2007).

A identificação da madeira desempenha um importante papel no controle de atividades madeireiras ilegais, as quais infelizmente são uma realidade global, ocorrendo em grande escala principalmente na Bacia Amazônica; na Bacia do Congo; no Sudeste Asiático e na Federação Russa (LI *et al.*, 2008) .

No Laboratório de Anatomia e Qualidade da Madeira, da Universidade Federal do Paraná, são constantes as solicitações de identificação científica de amostras de madeira que compõe parte de inquéritos policiais. Essas análises na maioria dos casos estão relacionadas a amostras apreendidas em flagrantes de desmate e exploração ilegal de madeira no bioma Mata Atlântica, e para que o inquérito seja completo o investigador necessita conhecer a identidade taxonômica da amostra apreendida, o que permite saber se ela se trata de uma espécie protegida, ou ameaçada de extinção.

A metodologia mais empregada na identificação de madeiras baseia-se em análises das propriedades organolépticas da madeira e descrição de sua estrutura anatômica, porém para muitos grupos de espécies raramente são obtidas identificações que vão além do nível de gênero, em alguns casos a identificação permite somente afirmar a família botânica à qual uma amostra provém (GASSON, 2011).

Nesse contexto novas metodologias que facilitem e permitam uma identificação mais precisa de amostras de madeira se fazem necessárias. Uma alternativa para essa problemática está no uso de técnicas de “DNA-Barcode”. Essa técnica baseia-se no sequenciamento de determinadas regiões do genoma de um indivíduo e a comparação da sequência com as já disponíveis provenientes de indivíduos corretamente identificados e catalogados em coleções (HEBERT e GREGORY, 2005; ZAHNEN, 2008; FORD *et al.*, 2009).

Pelo exposto acima, este trabalho tem como objetivo identificar amostras de madeiras apreendidas em cena de crime ambiental aplicando a anatomia da madeira e a região do ITS como marcador de DNA-*Barcoding*.

Como objetivos específicos,

- a) Demonstrar a acurácia da anatomia da madeira como ferramenta de identificação;
- b) Obter as sequências para a região do ITS para as amostras e demonstrar sua eficácia como ferramenta de identificação de madeiras.
- c) Descrever a problemática de se usar madeira como fonte de obtenção de DNA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Estima-se que 15-30% do volume de madeira comercializada no mundo tem origem ilegal (NELLEMANN, 2012). Esse comércio ilegal gera uma receita anual entre 10 e 15 bilhões de dólares e ainda deixa de recolher anualmente outros 5 bilhões em impostos (GONÇALVES *et al.*, 2011).

Informações do Fundo Mundial para a Natureza – WWF (2008) mostram que 47% da madeira no Brasil é de origem ilegal; na Amazônia esse valor é de 80%. Essa discrepância se relaciona com a migração ocorrida das indústrias madeireiras do sul e sudeste brasileiro para a Amazônia frente à escassez de matéria prima nativa nas décadas de 1970 e 1980 (VIEIRA *et al.*, 2012, RUSCHEL *et al.*, 2003). Hoje a grande produção madeireira nas demais regiões brasileiras se baseia quase exclusivamente em florestas plantadas (ABRAF, 2013), porém isso não significa a inexistência de pressões sobre os remanescentes florestais originais (METZGER *et al.*, 2009).

A Floresta Atlântica, que já cobriu 1,5 milhões de km², hoje tem sua área reduzida a somente 11% desse total, estando os remanescentes ainda sob forte pressão antrópica (METZGER *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009; STEHMANN *et al.*, 2009). Galindo-Leal e Câmara (2005) destacam, entre as ameaças sofridas por esse ambiente, a retirada ilegal de lenha, a exploração ilegal de madeira, a expansão urbana e agropecuária.

Estudos conduzidos em uma área da Mata Atlântica no estado da Bahia mostraram que a chance de alguém ser condenado por extração ilegal de madeira é de apenas 0,082%, sendo os problemas orçamentários, de comunicação e falta de competência técnica das autoridades policiais as principais causas (AKELLA e

CANNON, 2004). Além da quase certeza de impunidade por parte dos criminosos, mesmo que punidos, somente 2,5% das multas aplicadas pelos órgãos ambientais brasileiros tem sido recolhidas (LAWSON e MACFAUL, 2010). Esses números deixam latente a necessidade do desenvolvimento de metodologias que possam facilitar as atividades de fiscalização e levantamento de provas com qualidade suficiente para embasar sentenças justas e dar maior fluidez aos julgamentos.

Estudos conduzidos pela INTERPOL, em seu programa de crimes ambientais (NELLEMANS, 2012), e pelo grupo ambientalista Greenpeace (2014) expuseram a troca dos nomes botânicos como uma das estratégias para burlar a fiscalização, principalmente no tangente ao comércio irregular de madeira de espécies protegidas.

2.1 MATA ATLÂNTICA, AMEAÇAS E LEGISLAÇÃO

A Mata Atlântica é considerada um “*hotspot*” da biodiversidade mundial. Está presente em 17 estados brasileiros e compreende diversas fito fisionomias como as florestas ombrófilas densa, aberta e mista; florestas estacionais decidual e semidecidual; campos de altitude, mangues e restingas (TABARELLI *et al.*, 2005; SOS Mata Atlântica, 2013).

O bioma sofreu, desde o início da colonização brasileira, excessiva exploração de seus recursos através da caça, pesca e extração de lenha e madeira e o desmatamento para as atividades agrícolas e as pecuárias (DEAN, 1996).

Hoje, cerca de 69% da população brasileira (131 milhões de pessoas) habita nos domínios desse bioma e todas as capitais dos estados das regiões Sul, Sudeste

e Nordeste brasileiras ali se encontram (SOS Mata Atlântica, 2013; SOS Mata Atlântica e INPE, 2014).

Os domínios e os usos dos biomas estão regulamentados pela Lei da Mata Atlântica Nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006) que visa proteger o bioma, atribuindo critérios muito rígidos para liberações de desmate e manejo florestal nessas áreas

O decreto Nº 6660 de 21 de novembro de 2008 (BRASIL, 2008a) regulamenta a Lei Nº 11.428 e ainda inclui a proibição da exploração de todas as espécies constantes na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2008b), as constantes nas listas dos estados e na lista da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção - CITES (CITES, 2014).

A penalidade prevista para quem destruir ou danificar vegetação primária ou secundária, em estágio avançado ou médio de regeneração, do Bioma Mata Atlântica, ou utilizá-la infringindo as normas de proteção, é de detenção, de 1 (um) a 3 (três) anos, ou multa, ou ambas as penas cumulativamente. Caso esse dano ao bioma envolva dano a espécies ameaçadas de extinção a pena pode ser agravada conforme o proferido pela Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 (BRASIL, 1998).

Apesar das restrições da legislação vigente entre os anos de 2012 e 2013 foram desmatados 23.948 ha dos remanescentes do bioma. O estado do Paraná apresentou nos anos de 2012 e 2013 a quarta maior área de Mata Atlântica desmatada no Brasil (2.011 e 2.126 ha respectivamente). Da área total do estado 99% correspondem legalmente ao bioma Mata Atlântica, contudo os seus remanescentes somam apenas 12,98% do total original (Figura 01) (SOS Mata Atlântica e INPE, 2014).

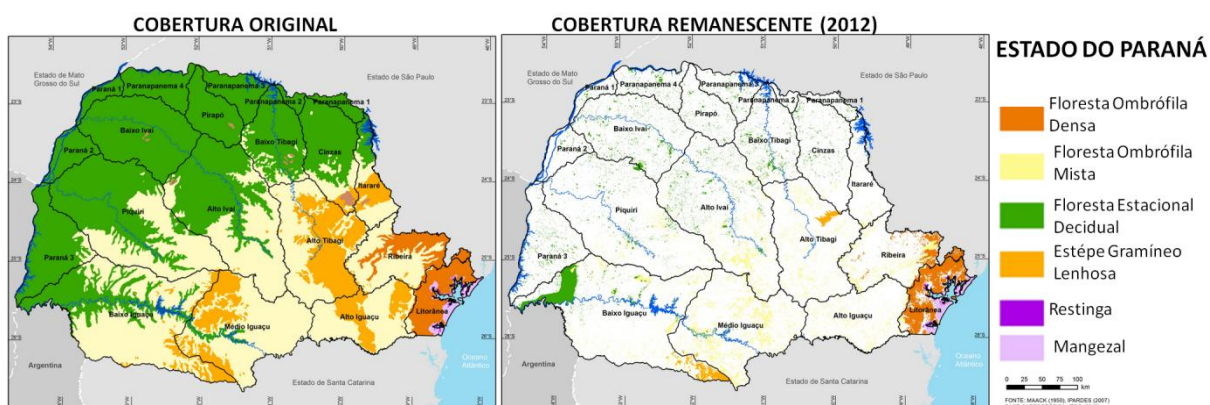


FIGURA 01 – FITOFISIONOMIAS ORIGINAIS DO ESTADO DO PARANÁ E SEUS REMANESCENTES EM 2012.
 FONTE: IPARDES (2012a,b), MODIFICADO PELO AUTOR.

Três são as principais fitofisionomias florestais existentes no Paraná: Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecidual (IBGE, 1992; IBGE, 1993). Todas essas florestas foram provedoras de madeira para a indústria instalada no estado, e também cederam espaço para a agricultura e pecuária, deixando um passivo ambiental representativo (HAUER, 2010).

A lista oficial de espécies da flora ameaçadas de extinção no Paraná foi construída pela Secretaria de Meio Ambiente do Estado – SEMA, em 1995, e conta com 592 espécies listadas (HATSCHBACH e ZILLER, 1995). O Procedimento Operacional Padrão 005 (POP 005) de 20 de julho de 2008 do Instituto Ambiental do Paraná (PARANÁ, 2008) oficializa a lista como oficial e inclusive destaca as 14 principais espécies de uso madeireiro da lista.

2.2 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE MADEIRA

No combate ao corte e comércio ilegal de madeiras, é necessário o desenvolvimento de pesquisas que facilitem a sua correta identificação (JOHNSON e LAESTADIUS, 2011).

Segundo Wheeler e Baas (1998), a identificação de madeiras pode apresentar diferentes níveis de dificuldade, dependendo das informações de origem do material e sua constituição, pois os materiais a serem identificados são muito diversos, podendo ser toras, grandes ou pequenas peças de madeira serrada, ou produtos derivados como compensados, painéis de fibras, cavacos, serragem e polpa celulósica.

A metodologia mais empregada na identificação de madeiras baseia-se em análises das propriedades organolépticas e descrição de sua estrutura anatômica em nível macroscópico e/ou microscópico (WHEELER e BAAS, 1998).

Os caracteres observados podem servir de entrada para chaves de identificação taxonômica (dicotômicas ou de entrada múltipla, eletrônicas ou impressas) permitindo comparação com os dados da literatura e das coleções de referência (WHEELER e BAAS, 1998; RIVERS e UMNEY, 2003).

2.2.1 Anatomia da Madeira

A identificação de madeiras é baseada no conhecimento de taxonomia e no reconhecimento da estrutura celular (caracteres) dos constituintes da madeira. A taxonomia permite uma abordagem lógica no estudo, pois é esperado que a constituição do xilema secundário de espécies próximas seja semelhante (RIVERS e UMNEY, 2003).

Wheeler e Baas (1998) ressaltam que nem sempre características úteis para a identificação de madeiras são as mesmas para a determinação das relações evolutivas ou desenvolvimento de esquemas filogenéticos. Madeiras com características primitivas, como vasos exclusivamente solitários, placa de perfuração

escalariforme e fibras com pontoações areoladas, tendem a ser mais facilmente identificáveis, pois esses caracteres são presentes em poucas famílias botânicas.

Com a finalidade de normatizar e unificar a nomenclatura dos caracteres com relevância para a identificação da madeira de espécies de folhosas (Angiospermas-Dicotiledôneas), 163 caracteres anatômicos e 58 caracteres gerais foram listados pela Associação Internacional dos Anatomistas de Madeira (*International Wood Anatomists Association - IAWA*, 1989).

A Universidade Estadual da Carolina do Norte mantém um banco de dados on-line para identificação da madeira de folhosas usando a Lista dos Caracteres Anatômicos para a Identificação de Folhosas da IAWA (1989). Nesse banco de dados, o InsideWood (2004), existem descrições anatômicas para mais de 5700 espécimes, funcionando como uma chave de identificação de entrada múltipla (GASSONS *et al.*, 2010, WHEELER, 2011).

Diferentes caracteres anatômicos são úteis dentro de diferentes grupos de espécies ou entre grupos, porém não se pode esperar que uma única lista inclua todos os caracteres necessários para a precisa identificação de todas as madeiras existentes (BRAZIER, 1976).

A identificação de espécies através da anatomia da madeira consome muito tempo e exige profissionais altamente treinados (KOCH *et al.*, 2011; SARMIENTO *et al.*, 2011), e a identificação resultante dificilmente é mais acurada que a nível de gênero, em alguns casos apenas a família botânica é identificada (ABE *et al.*, 2011; BRAGA *et al.*, 2011; GASSON, 2011; HANSEN *et al.*, 2011; LOWE e CROSS, 2011).

Gasson (2011) explica o problema de identificação de espécies pela falta de coletas devidamente cadastradas em número suficiente nas xilotecas no mundo, não permitindo assim aos peritos afirmar com certeza a identidade de uma amostra.

Wheeler e Baas (1998) afirmam que entre peritos pode haver discordância na identificação e descrição de alguns caracteres da estrutura anatômica da madeira, trazendo, esse fator de subjetividade, prejuízo ao processo de identificação.

O processo de identificação baseado em caracteres morfológicos de modo geral é limitado, devido à plasticidade fenotípica e variabilidade genética dos caracteres empregados, *taxa* crípticos não são detectados e as chaves de identificação não contemplam todos os estágios de vida do indivíduo, além de serem muito difíceis de usar, o que torna a identificação extremamente dependente de especialistas (AZEREDO, 2005).

2.2.2 Metodologias alternativas de identificação de madeiras

Gasson (2011) busca demonstrar o quão precisa a identificação de madeiras pode ser tendo como exemplo as espécies na lista da CITES, embora a anatomia seja suficiente em muitos casos de identificação, em alguns momentos técnicas complementares se fazem necessárias. O autor cita como técnicas auxiliares à anatomia da madeira, a espectroscopia no infravermelho próximo, e os *DNA-barcoding*.

2.2.2.1 Técnicas de espectroscopia

O uso da espectroscopia do infravermelho associada a análises estatísticas multivariadas tem demonstrado potencial como uma ferramenta para auxiliar na identificação de madeiras (MUÑIZ *et al.*, 2012). Estudos realizados por Pastore *et al.* (2011) e Braga *et al.* (2011) indicam a possibilidade de aplicação da técnica na identificação e diferenciação de espécies similares ao Mogno (*Swietenia macrophylla*, CITES Apêndice II).

Os estudos conduzidos por Sandak *et al.* (2011) utilizando a espectroscopia no infravermelho próximo demonstraram que a técnica é suficientemente sensível para distinguir amostras de madeira de diferentes origens geográficas.

Em muitos passos da construção de calibrações no infravermelho podem ocorrer erros, desde a coleta dos espectros, análise e processamento (OLALE *et al.*, 2013). Variações entre indivíduos contribuem para a alta heterogeneidade dos dados obtidos, fatores como umidade, orientação e granulometria das amostras são parâmetros que devem ser rigidamente observados a fim de minimizar a variabilidade dos espectros (BATTEN, 1998; SCHWANNINGER *et al.*, 2011).

Um fator limitante na utilização da espectroscopia no infravermelho próximo está na pouca universalidade de aplicação da técnica, pois é difícil a transferência de calibrações realizadas de um espectrofotômetro para outro (SINGH *et al.*, 2011).

2.2.2.2 DNA-Barcode

Os principais estudos conduzidos utilizando o DNA como ferramenta de identificação visam à construção de impressões digitais genéticas (DNA-

fingerprinting) e código de barras de DNA (DNA-Barcode) (HEBERT *et al.*, 2003; NYBOM *et al.*, 2014).

A diversidade nas sequências de DNA entre os organismos permite a identificação. De fato, é possível a analogia das sequências com os códigos de barras presentes em produtos comerciais (UPC – *Universal Product Code*) (HEBERT *et al.*, 2003; AZEREDO, 2005; van den BERG, 2005).

Os DNA-*barcodes* são regiões curtas e padronizadas do genoma do indivíduo (HEBERT e GREGORY, 2005). Para que uma região do DNA seja um *barcode*, ela deve necessariamente ser facilmente amplificável por *primers* universais, ser curta e suficientemente variável para separar espécies irmãs (FORD *et al.*, 2009).

A fim de organizar e estimular as iniciativas de DNA-*barcode* de todos os organismos da terra foi criado, em 2004, o *Consortium of Barcode of Life* (CBOL), que pretende gerar um banco de dados mundial contendo sequências referenciadas com material de testemunho de todas as espécies existentes (AZEREDO, 2005; KRESS *et al.*, 2005).

O sequenciamento do gene *CO1* (Citocromo oxidase I) do DNA mitocondrial (DNAm) é suficientemente preciso para identificação da maioria das espécies de animais (HEBERT *et al.*, 2003). Para plantas, no entanto, a baixa taxa de substituição nucleotídica no genoma mitocondrial dificulta seu uso com DNA-*barcode* (CBOL - PLANT WORKING GROUP, 2009).

Como alternativa de DNA-*barcode* para plantas, o *Plant Working Group* do CBOL sugeriu duas regiões codificantes do genoma plastidial (plastos), sendo esses marcadores o *matK* e *RbcL*, esses devem ser complementados com outros marcadores quando necessários (CBOL - PLANT WORKING GROUP, 2009).

Como complemento aos marcadores matK e RbcL, vem sendo estudada a região do Espaçador Interno Transcrito do rDNA, o qual pode ser necessário quando os demais marcadores plastidiais tem resolução muito baixa para identificação (HOLLINGSWORTH, 2011).

2.2.3 Espaçador Interno Transcrito do rDNA – ITS

Dentro do genoma de um indivíduo, embora existam muitos genes codificantes, boa parte do DNA compõe-se de regiões não-codificantes, que se repetem sucessivamente. Mutações ocorridas nessas regiões são facilmente transmitidas, portanto elas apresentam grande variabilidade e são de grande potencial para estudos filogenéticos e diferenciação de espécies (HILLIS e DAVIS, 1986; HERSHKOVITZ, 1999; WICKE *et al.*, 2011).

O DNA ribossômico (rDNA) no núcleo da célula tem seus genes agrupados como unidades repetitivas (FIGURA 02). Cada unidade consiste de regiões transcritas, nas quais estão os genes para as subunidades 18S, 5,8S e 28S dos ribossomos, dois espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2, e um espaçador externo transcrito (ETS) ou espaçador intergênico – IGS (HILLIS e DIXON, 1991).

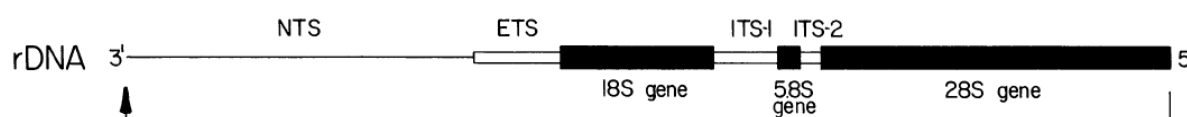


FIGURA 02 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA REPETIÇÃO DO rDNA: (NTS=ESPAÇADOR NÃO TRANSCRITO, ETS= ESPAÇADOR EXTERNO TRANSCRITO; ITS=ESPAÇADOR INTERNO TRANSCRITO)
 FONTE: HILLIS e DAVIS (1986), MODIFICADO PELO AUTOR.

Cada unidade de rDNA evolui de forma sincronizada, não acumulando mutações e podendo assim ser tratada e amplificada como um único gene (HERSHKOVITZ, 1999).

Ao contrário do DNA mitocondrial e o DNA plastidial, o DNA nuclear tem origem biparental, o que aumenta o poder de separação de espécies dos marcadores na região do ITS, como demonstrado por Hollingsworth (2011).

Buckler *et al.* (1997), em contra partida, ressaltam a possibilidade de existência de cópias parálogas¹ divergentes nas muitas repetições no rDNA.

Essas características peculiares da região do ITS permitem que ela seja usada para inferências evolutivas, inclusive em níveis hierárquicos mais altos (COLEMAN, 2003).

Visando verificar em larga escala a viabilidade de aplicação da região do ITS como DNA-*barcode* complementar, o *China Plant BOL Group* (2011) amostrou 6286 indivíduos de 1575 espécies, 145 gêneros e 75 diferentes famílias. O DNA desses indivíduos foi amplificado para as tradicionais regiões *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* do DNA plastidial e também a região do ITS do DNA nuclear. A eficácia dos marcadores na discriminação de espécies e a sua universalidade foram avaliadas. Quanto à universalidade, a amplificação da região do ITS foi efetiva para 88% das amostras de angiospermas, porém somente 56% para as amostras de gimnospermas. A taxa de sucesso de sequenciamento foi de 89,8% para angiospermas e 67% em gimnospermas.

Nesse mesmo estudo, quando usado somente um par de *primers* (ITS5 e ITS4) e sequenciamento unidirecional, a região do ITS1 teve sucesso para 71,7%

¹ Cópias parálogas nesse caso correspondem a cópias de um mesmo gene com sequências diferentes dentro do genoma de um indivíduo.

dos indivíduos e 75,5% das espécies, ocorrendo problemas com a existência de parálogos em apenas 7,4% dos indivíduos; 2,5% das sequências obtidas tiveram contaminação por fungos. A região do ITS retornou sequências de alta qualidade em 58,6% dos casos. Em análises com sequenciamento em leituras bidirecionais, o ITS teve taxa de convergência entre as sequências de 93,6%, a maior entre todas as regiões.

Seguindo a análise do poder de discriminação das sequências, a região do ITS demonstrou o maior poder discriminatório, distinguindo 67,2% de todas as espécies estudadas. Em combinação com os demais marcadores, a região do ITS demonstrou aumentar o poder de discriminação em até 20%.

Muitos trabalhos têm demonstrado a relevância desse marcador na identificação de espécies e em estudos filogenéticos em níveis de espécie e gênero, como por exemplo, os trabalhos envolvendo a identificação de fungos de White *et al.* (1990), Borneman e Hartin (2000), Schmidt e Moreth (2002), e de trufas em alimentos (AMICUCCI *et al.*, 2002). De fato a região do ITS é o marcador oficial de *barcode* para fungos (SCHOCH *et al.*, 2012).

O marcador mostrou-se eficiente separando plantas medicinais em estudos de Gao *et al.* (2010) e Chen *et al.* (2010). Ótimos resultados foram obtidos por Magel *et al.* (2010) aplicando a região do ITS como marcador único na identificação e diferenciação de espécies madeireiras com estrutura macroscópica similar, inclusive as do gênero *Gonystylus* (Protegido pela CITES² Apendice II) e *Pterygota* spp. e *Terminalia* spp. Hansen *et al.* (2011) aplicou com sucesso a região do ITS como

²CITES: Refere-se a lista da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção. As espécies presentes nessa lista tem seu comercio internacional proibido ou estritamente controlado. (CITES, 2014).

marcador na identificação e separação da madeira de *Fitzroya cupressoides* (Protegida CITES Apêndice I) de suas madeiras substitutas, *Sequoia sempervirens* e *Thuja plicata*. Esse trabalho também contornou um dos principais problemas no uso da região do ITS como *barcode*, a contaminação por fungos, amplificando a região em dois fragmentos separados e utilizando *primers* internos em regiões conservadas para vegetais próximas do gene 5,8S.

Recentemente Bolson (2012) teve sucesso aplicando o marcador associado aos marcadores do DNA plastidial na identificação de espécies arbóreas com potencial madeireiro da Floresta Ombrófila Mista do Paraná, sendo esse o primeiro e único trabalho para as espécies da região. Contudo, as extrações foram conduzidas a partir de folhas, as quais geram isolados de DNA de maior qualidade (FINKELDEY *et al.*, 2010). Estudos demonstrando as dificuldades práticas na aplicação de *DNA-Barcode* em perícias reais de amostras de madeira são escassos.

2.3 XILEMA SECUNDÁRIO COMO FONTE DE DNA

A extração de DNA de tecidos vegetais vivos ou frescos, tais como folhas ou acículas, é hoje prática comum em muitos laboratórios de biologia molecular (DOYLE e DOYLE, 1987; COSTA e MOURA, 2001), o que é facilitado, pois dentro de células vivas, a integridade das moléculas de DNA é constantemente mantida por processos enzimáticos de reparação (LINDAHL, 1993).

Com a morte da célula as organelas celulares, que normalmente sequestram enzimas catabólicas, desintegram-se. Como consequência, o DNA é rapidamente degradado por enzimas, tais como nucleases lisossomais. Além disso, a molécula

de DNA pode enfrentar ataques de bactérias, fungos e insetos que se alimentam dela (EGLINTON e LOGAN, 1991).

A madeira é o produto do crescimento secundário dos vegetais. Esse processo envolve a divisão celular no câmbio vascular, a diferenciação e especialização das células, a formação da parede secundária, lignificação, morte programada da célula e por fim a formação do cerne (MAGEL, 2001).

Durante o processo de morte programada da célula os núcleos celulares se contraem, a cromatina se condensa, e as endonucleases são ativadas, essas cortam o DNA em muitos fragmentos de variados comprimentos. (PENNEL e LAMB, 1997; MAGEL, 2001).

No xilema secundário as células parenquimáticas tendem a permanecer ativas por maior tempo e as alterações na forma dos núcleos celulares são indicativos de quão avançado o processo de formação do cerne está, uma vez desaparecidos os núcleos o processo de formação do cerne é completo (TAYLOR e GARTNER, 2002).

Estudos recentes de Zhang *et al.* (2015) conseguiram visualizar e quantificar a quantidade de núcleos e plastídios aderidos às paredes das células parenquimáticas no cerne e alburno da madeira, frescas e secas, de duas espécies a diferentes temperaturas. Os resultados obtidos demonstraram que os plastídios e os núcleos são degradados durante a formação do xilema e morte programada da célula, e que elementos prosenquimáticos³ não conservam nenhuma das organelas. A formação do cerne contribui para a degradação dos núcleos e plastídios nas

³ Traqueoides, vasos, fibras entre outros elementos lignificados com parede secundária.

células parenquimáticas e que essas estruturas continuam sendo degradadas após o corte da árvore enquanto armazenada ou seca tecnologicamente.

Dumolin-Lapègue *et al.* (1999) tiveram sucesso acessando o DNA no interior da madeira e o isolando de peças modernas e históricas de Carvalho (*Quercus* spp.), os isolados tiveram qualidade suficiente para reações de PCR⁴ e sequenciamento.

Nem mesmo quando a madeira é submetida a processos térmicos, como secagem e termorretrificação, o isolamento de DNA deixa de ser possível, contudo a quantidade de DNA isolado e a taxa de sucesso das ampliações e sequenciamentos decaem bruscamente (YOSHIDA *et al.*, 2007; TNAH *et al.*, 2012).

Jiao *et al.* (2014), extraíndo DNA de amostras de madeira de *Aquilaria sinensis*, relatou a impossibilidade na amplificação da região do ITS e regiões do DNA plastidial a partir de DNA isolado de amostras secas a 120°C por 10 dias e de amostras de xiloteca armazenadas por 39 anos.

O resultado do isolamento de DNA em madeira é muito variável, variando entre espécies, indivíduos de uma mesma espécie e inclusive dentro de um mesmo tronco (FINKELDEY *et al.*, 2010).

Rachmayanti *et al.* (2009) constataram aumento no nível de degradação do DNA de espécies tropicais no sentido câmbio-medula, em contrapartida, a concentração de substâncias inibidoras do PCR decresceu. Para o estudo, a taxa de sucesso entre extração e efetiva amplificação foi de 75,7%, e os principais fatores influenciando o sucesso foram o grau de processamento da madeira e o

⁴ PCR: Sigla em inglês para *polimerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase. Reação que permite a amplificação in vitro de fragmentos de DNA.

comprimento do fragmento amplificado. O tempo de armazenamento da amostra também teve influência negativa no sucesso das ampliações.

Os métodos de extração de DNA a partir da madeira geralmente modificados de Doyle e Doyle (1987), e baseados no tenso ativo CTAB ou usando *Kits* comerciais (coluna de extração) raramente retornam DNA com nível de degradação menor que o isolado de tecidos frescos (FINKELDEY *et al.*, 2010).

A escolha de regiões alvo no DNA com grande número de repetições no interior da célula e de pequeno comprimento são fatores que contribuem para o sucesso da extração (RACHMAYANTI *et al.*, 2009; FINKELDEY *et al.*, 2010).

Em resumo Finkeldey *et al.* (2010) explica as principais dificuldades do uso de madeira como fonte de DNA:

- 1- Física: A ruptura de tecidos lenhosos e liberação do DNA exige um tratamento mecânico (lixamento ou fatiamento) que pode levar a superaquecimento e denaturação do DNA.
- 2- Química: Os componentes fenólicos (lignina) presentes nas espessas paredes celulares são poderosos inibidores de PCR.
- 3- Biológica: A decomposição dos tecidos lenhosos por microrganismos e fungos não só destrói o DNA da planta como a contamina com DNA intruso.
- 4- Envelhecimento: O DNA começa a se degradar no interior da célula logo após sua morte, na madeira tecidos vivos e mortos coexistem, sendo a maior parte das células vivas as do câmbio vascular e as das células parenquimáticas nos anéis de crescimento mais externos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Anatomia e Qualidade da Madeira (LANAQM), do Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal, e no Laboratório de Biologia Molecular, do Núcleo de Fixação de Nitrogênio, do Departamento de Bioquímica, na Universidade Federal do Paraná.

3.1 MATERIAIS

As amostras de madeira foram fornecidas pela Polícia Federal e compunham parte dos inquéritos policiais de dois casos de desmate ilegal.

Primeiro caso:

Três amostras de madeira provenientes do corte ilegal de árvores realizado na Área de Preservação Permanente (APP) do reservatório de Itaipu Binacional. As amostras recebidas tinham pequenas dimensões (FIGURA 03), não maior que 6 cm (L3), mas com tamanho suficiente para a observação dos três planos anatômicos. Sinais de podridão branca eram visíveis na amostra L2 e L3. L1 apresentava estrutura sólida e não expressivamente degradadas.

Segundo caso:

Foram cinco amostras (FIGURA 03) provenientes de corte ilegal realizadas em fragmento florestal do Bioma Mata Atlântica, em estágio avançado de regeneração, pertencente à União, situado no município de Medianeira-PR⁵. As amostras recebidas apresentaram dimensões maiores que as do caso 01, com

⁵ (Coordenadas geográficas: 25.295807 S, 54.093104 N).

exceção da amostra U2. A amostra U1 estava visivelmente em estágio avançado de deterioração por podridão branca. A amostra U5 apresentava ataque por insetos (provavelmente Lictídeos), porém as regiões entre as galerias mostravam-se sadias e livres de degradação.

Os dois locais de crime situam-se na fitofisionomia Floresta Estacional Semidecidual do bioma Mata Atlântica. Os infratores violaram artigos da Lei da Mata Atlântica (BRASIL, 2006), a identificação das amostras e a verificação da existência de alguma espécie ameaçada de extinção entre elas é de interesse da autoridade policial.

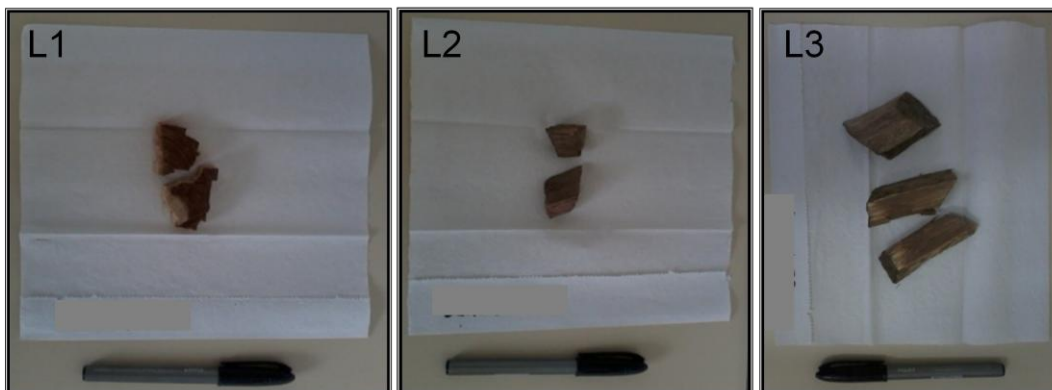
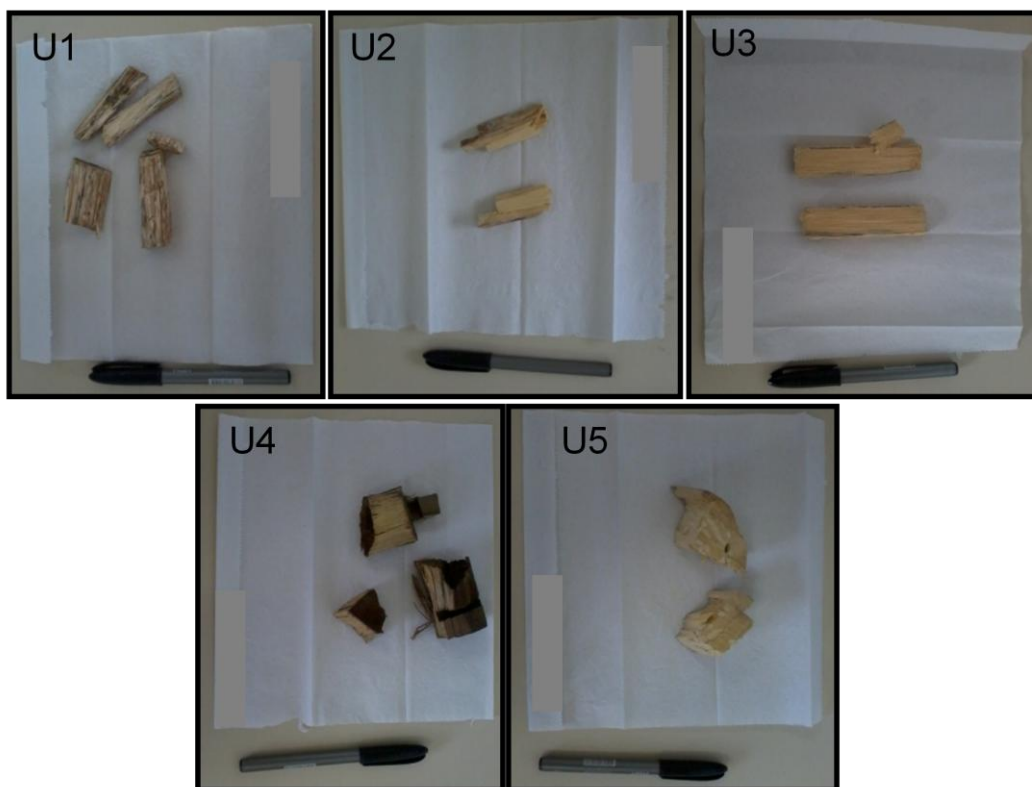
AMOSTRAS DE MADEIRA RECEBIDAS:**CASO 1: AMOSTRAS L1, L2 e L3.****CASO 2: AMOSTRAS U1, U2, U3, U4 e U5.****REFERÊNCIA: CANETA COM 14CM.**

FIGURA 03 – AMOSTRAS DE MADEIRA RECEBIDAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS CASOS 01 e 02.
FONTE: O AUTOR (2015).

3.2 MÉTODOS

Os procedimentos realizados para atingir os objetivos são elencados na sequência.

3.2.1 Identificação anatômica das amostras

Os procedimentos de identificação das amostras obedeceram aos protocolos e às rotinas aplicadas no Laboratório de Anatomia e Qualidade da Madeira da UFPR.

Os caracteres anatômicos foram descritos segundo as recomendações da *List of microscopic features for hardwood identification* da IAWA (1989). Inicialmente a nível macroscópico e posteriormente microscópico.

Inicialmente a face transversal das amostras foi observada em estéreo microscópio Zeiss Discovery 12 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e os caracteres macroscópicos foram descritos e fotografias foram obtidas.

O preparo dos cortes histológicos iniciou-se com o amolecimento das amostras através de cozimento em água, em frascos de Erlenmeyer, sobre placa aquecedora por 80 horas. As amostras U1 e L3 tiveram tempos de apenas 24h, devido ao acentuado grau de biodegradação.

Em seguida, foram obtidos os cortes histológicos das seções transversal, tangencial e radial em micrótomo de deslize, marca Carl Zeiss (Jena, Alemanha), modelo HYRAX S50, com espessura nominal de 25µm. Os cortes foram tingidos segundo metodologia de tripla coloração: crisoidina, acridina vermelha e azul de Astra (DUJARDIN, 1964). Posteriormente, as seções anatômicas foram desidratadas em série alcoólica ascendente (50% a Etanol absoluto), colocadas em acetato de butila e montadas entre lâmina e lamínula com Entellan®.

As lâminas foram analisadas, fotografadas e tiveram seus caracteres descritos em microscópio de luz transmitida com câmera acoplada.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura foram coletadas utilizando o equipamento Hitachi TM-1000.

Em posse dos caracteres anatômicos de todas as amostras procedeu-se a identificação das amostras utilizando-se:

- 1- Da chave eletrônica on-line para identificação de madeiras o INSIDEWOOD (2004);
- 2- Da chave de identificação de madeiras tropicais desenvolvida por RECORD e HESS (1949).

3.2.2 Identificação Biomolecular das amostras

Os procedimentos de isolamento, amplificação e sequenciamento do DNA das amostras e análise das sequências são apresentados em seguida.

3.2.2.1 Isolamento de DNA

A extração de DNA foi realizada usando-se o *kit* de extração de DNA *DNeasy mericon Food Kit* (Qiagen S.A., Hilden, Alemanha). A escolha desse *kit* se deu em função da sua eficácia no isolamento de DNA muito fragmentado, uma vez que alimentos industrializados normalmente são submetidos a tratamentos térmicos, alta pressão, irradiação, mudanças de pH e secagem. Condições às quais a madeira também pode ser exposta. O *kit* também tem ótimo desempenho na remoção de sacarídeos e demais metabólitos secundários inibidores, muito comuns em madeiras (FINKELDEY *et al.*, 2010).

Com o intuito de evitar contaminação cruzada entre as amostras, cada extração de DNA foi conduzida separadamente, com extremo cuidado com a limpeza da bancada com a solução desinfetante de marca Lysoform (BOMBRIL S:A., São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil) e Hipoclorito de Sódio (0,5%) a fim de evitar contaminação com DNA vegetal externo. Todas as ferramentas, vidrarias e materiais plásticos (ponteiras mesmo que novas) foram devidamente autoclavados anteriormente ao seu uso.

As amostras de madeira tiveram sua superfície externa limpa com o uso de um bisturi cirúrgico com lâmina descartável e foram reduzidas a pó com ralador metálico curvo (FIGURA 04) sobre papel alumínio. Entre o preparo de uma amostra e outra o ralador foi lavado, seco, aquecido em bico de Bunsen até o ponto de calor latente e autoclavado.



FIGURA 04 – RALADOR CURVO UTILIZADO PARA OBTENÇÃO DE PÓ DE MADEIRA.
FONTE: TRAMONTINA S.A. (2014)

Uma vez obtido o pó de madeira, procederam-se as extração de DNA seguindo as orientações do manual de instrução da QIAGEN S.A. (2010) com algumas adaptações. Os protocolos básicos de extração encontram-se listados a seguir:

Extração em pequena escala:

- Passo 01: Pesar 50mg de pó de madeira em microtubo de 2ml, adicionar 1,5ml do tampão *Food Lysis* e 3,75 μ l da solução de Proteinase K (concentração de fabrica);
- Passo 02: Agitar em agitador vortex com vigor, garantindo a completa homogeneidade da mistura;
- Passo 03: Incubar a mistura a 60°C por 60 minutos, em termo bloco agitando a cada 15 minutos em agitador vortex;
- Passo 04: Retirar os tubos do termo bloco e permitir que resfriem até a temperatura ambiente;
- Passo 05: Centrifugar os microtubos a 2.500g por 5min;
- Passo 06: Em capela com exaustão adicione 500 μ l de clorofórmio em microtubos de 2ml;
- Passo 07: Após a centrifugação transferir cuidadosamente 700 μ l do sobrenadante para o tubo com clorofórmio e agitar vigorosamente no agitador vortex por 15s;
- Passo 08: Centrifugar os microtubos por 15min a 14.000g;
- Passo 09: Adicionar 350 μ l do tampão de ligação PB em tubos de 2ml e adicionar 350 μ l do sobrenadante obtido na centrifugação e agitar cuidadosamente a mistura;
- Passo 10: Pipetar a solução do passo 09 em uma coluna de centrifugação QIAquick em um tubo de coleta de 2ml e centrifugar por 1min a 17.900g;
- Passo 11: Descartar o filtrado e reutilizando o tubo de coleta adicionar 500 μ l do tampão AW2 na coluna de centrifugação QIAquick e centrifugue por 1min a 17.900g;

- Passo 12: Descartar o filtrado e secar com cuidado a borda do tubo de coleta em papel toalha, recolocar a coluna de centrifugação QIAquick e centrifugar por 2min a 17.900g para secar a membrana;
- Passo 13: Transferir a coluna para um microtubo de ensaio de 1,5ml e pipetar com cuidado sobre a membrana 50µl do tampão de eluição EB preaquecido a 60°C. Deixar encubar por 5 min e centrifugar por 1min a 17.900g;
- Passo 14: Repetir o passo 13 em novos microtubos de 1,5ml;
- Passo 15: Armazenar o isolado de DNA a -80°C por longos períodos e a 4°C para uso repetido corriqueiro;

Extrações em grande escala:

- Passo 01: Em um graal limpo e autoclavado, adicionar 700mg de serragem e com auxílio do pistilo e nitrogênio líquido moer até obter-se pó fino;
- Passo 02: Adicionar 5ml de tampão *Food Lysis* ao graal sobre a amostra já macerada e proceder nova maceração em circunstância aquosa;
- Passo 03: Adicionar 5ml do tampão *Food Lysis* à mistura no graal e cuidadosamente transferir a mistura para um tubo de ensaio tipo *falcon* de 15ml;
- Passo 04: Adicionar ao tubo *falcon* 25µl da solução de Proteinase K (concentração de fabrica) e agitar os tubos por 5min em agitador *vortex* com suporte horizontal;

- Passo 05: Incubar os tubos em banho-maria a 60°C por 60min agitando os tubos em agitador *vortex* a cada 15min;
- Passo 06: Deixar os tubos resfriarem até temperatura ambiente e centrifugar a 2.500g;
- Passo 07: Em capela com exaustão adicionar 700µl de clorofórmio em 07 microtubos de 2ml;
- Passo 08: Transferir 1ml do sobrenadante para cada microtubo previamente preparado no passo 07 e agitar com vigor em agitador de *vortex* e centrifugar por 15min a 17.900g;
- Passo 09: Adicionar 700µl do tampão de ligação PB a 7 microtubos de 2ml;
- Passo 10: Cuidadosamente transferir 700µl do sobrenadante para os tubos previamente preparados no passo 09 e misturar;
- Passo 11: Transferir 700µl da mistura para uma coluna de centrifugação QIAquick instalada em um tubo de coleta de 2ml e centrifugar por 30s a 17.900g. Após centrifugação descartar o filtrado;
- Passo 12: Repetir o passo 11 até que toda a solução tenha sido filtrada (13 vezes);
- Passo 13: Adicionar 500µl do tampão AW2 e centrifugar por 1min a 17.900g e descartar o filtrado;
- Passo 14: Repetir o passo 13;
- Passo 15: Cuidadosamente secar a borda do tubo de coleta em papel toalha sobre a bancada e centrifugar a coluna de centrifugação reaproveitando o tubo de coleta por 2min a 17.900g;
- Passo 16: Descartar o tubo de coleta e colocar a coluna de centrifugação QIAquick em um microtubo de 1,5ml;

- Passo 17: Adicionar 150µl do tampão de eluição preaquecido a 60°C e deixar incubar por 5min, centrifugar por 1min a 17.900g;
- Passo 18: Repetir o passo 17;
- Passo 19: Armazenar o isolado a -80°C para longos períodos e a -4°C para uso corriqueiro.

3.2.2.2 Avaliação da Qualidade do DNA Isolado

O nível de fragmentação do DNA isolado foi avaliado em gel de agarose a 2,0% com duração de 60min e tensão de 110V. Foram aplicados 5µl do isolado somados a 2µl do tampão de amostra (0,25%Bromofenol e 0,75% Glicerina). Os géis foram coloridos em solução de brometo de etídio a 0,000002% por 10min, lavados em água destilada e fotografados em transiluminador.

A concentração e qualidade do DNA isolado também foram determinadas utilizando o Espectrofotômetro NanoDrop 2000 da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da America), na faixa entre os comprimentos de onda de 230-350 nm e tendo como referência os parâmetros propostos por Gallagher (2011).

3.2.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase

As reações de PCR foram realizadas utilizando a enzima Taq DNA Polimerase da empresa Ludwig Biotec (Alvorada, Rio grande do Sul, Brasil). As reações foram realizadas com volume de 12,5µl e 0,5µl de amostra. Os volumes aplicados, as reações, assim como a concentração e quantidade dos reagentes na

reação, estão apresentados na Tabela 01. Controles negativos e positivos (*Cedrela* spp.) foram realizados para todas as reações.

TABELA 01 – ESQUEMA DAS REAÇÕES DE PCR E AS QUANTIDADES E CONCENTRAÇÕES FINAIS DE CADA REAGENTE.

Mistura de PCR 1x12,5µl			
	Volume (µl)	Quantidade	Concentração final
H ₂ O	9,375	-	-
Tampão 10x	1,25	1X	-
MgCl ₂ (50mM)	0,375	18,75 ηmol	1,5 ηmol/µl
Nucleotídeos (10mM)	0,25	2,5 ηmol	0,2 ηmol/µl
<i>Primer forward</i> (10µM)	0,5	5µmol	0,4ηmol/µl
<i>Primer reverse</i> (10µM)	0,5	5µmol	0,4ηmol/µl
Polimerase Taq (5U/µl)	0,25	1,25U	0,1U/µl
Amostra (40,5- 200,4 ng/µl)	0,5	20,2-100,2	1,6-8 ng/µl

FONTE: O AUTOR (2015).

Para aumentar as taxa de sucesso das amplificações de DNA e evitar a amplificação de DNA contaminante de fungos, a região do ITS das amostras estudadas foi amplificada em dois fragmentos curtos e sobreponíveis, utilizando a combinação de *primers* ITS1.1 e ITS2.1 para amplificar a região do ITS1 e ITS3.1 e ITS 4 para amplificar a região do ITS2. Como demonstrado na FIGURA 05, as sequências geradas tem parte da região conservada, 5,8S como sobreposição, o que facilita o alinhamento posterior das sequências.

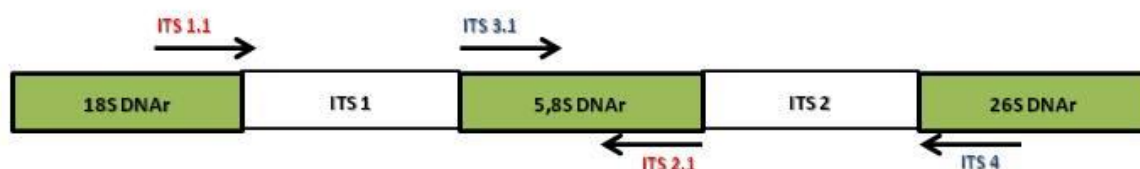


FIGURA 05 – FIGURA ESQUEMÁTICA DA DISPOSIÇÃO DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DO ITS DO DNA RIBOSSÔMICO EM DOIS FRAGMENTOS SOBREPONÍVEIS.
FONTE: O AUTOR (2015).

As seqüências dos *primers* encontram-se listadas na TABELA 02 assim como seus autores.

TABELA 02 – SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DO ITS DO DNA RIBOSSÔMICO.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>	<i>Autoria</i>
ITS1	ITS1.1 5' GAA CCT GCG GAA GGA TCA T 3'	(HANSEN <i>et al.</i> , 2011)
	ITS2.1 5' GAC TCG ATG RTT CAC GGG 3'	
ITS2	ITS3.1 5' GAC TCT CGG CAA CGG ATA TC 3'	(WHITE <i>et al.</i> , 1990)
	ITS4 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'	

FONTE: O AUTOR (2015).

Reações visando a amplificação da região total usando a combinação de *primers* ITS1.1 e ITS4 foram também realizadas.

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador modelo Veriti® da Applied Biosystems® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América) e compreenderam uma denaturação inicial a 94°C por 4min seguido de 40 ciclos sucessivos de 94°C por 1min, 55°C por 30s para anelamento dos *primers*, 72°C por 30-45s de alongamento dependendo da combinação de *primers*. Ao final dos 40 ciclos realizou-se um alongamento final a 72°C por 7min seguido da refrigeração das reações a 4°C.

Para amostras não efetivamente amplificadas aplicaram-se os seguintes testes padrões:

- A diluição do DNA *template* a 0,1% e 0,01%;
- O aumento de Taq polimerase em 2X;
- A variação da concentração de MgCl₂ em ± 25%.
- A variação da temperatura de anelamento dos primers em ± 5°C.

3.2.2.4 Eletroforese em gel de agarose

A efetividade das reações de PCR foi verificada em eletroforese de gel de agarose a 1,5% submetidos à tensão de 70V por 60min. Foram adicionados 2,5µl de produto de PCR a 1,0µl do tampão de amostra (0,25% Bromofenol e 0,75% Glicerina). Para aferir o comprimento dos fragmentos amplificados usou-se o *ladder* de 100pb da Ludiwig Biotec (Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil).

Os géis foram corados em banho de brometo de etídio (0,000002%) por 10min, lavados em água destilada e fotografados em transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.2.5 Purificação e Sequenciamento do DNA

Os produtos de PCR com comprovado sucesso foram purificados com a enzima EXO-SAP-IT® (USB-Corporation, Santa Clara, Califórnia, EUA). Para cada 10µl de produto de PCR foram adicionados 0,33µl da enzima EXO1, 0,33µl da enzima FastAP e 0,34µl de água nano pura estéril. A mistura foi incubada em termociclador permanecendo 60min a 37°C seguidos de 15min a 85°C. Esse tratamento visa digerir os fragmentos de DNA de fita única, tais como *primers*.

A reação de sequenciamento foi realizada com a enzima Kit Big Dye® *Terminator v.3.1 Cycle Sequencing* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América) utilizando os volumes de reagentes descritos na TABELA 03.

TABELA 03 – VOLUMES EMPREGADOS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO.
 FONTE: O AUTOR (2015).

	Volume (μl)
Produto de PCR	4
<i>Big Dye Terminator</i>	1
<i>Primer</i> (10 μ mol/ μ l)	0,5
Tampão <i>Save Money</i>	2
H ₂ O	2,5

FONTE: O AUTOR (2015).

Para cada amostra foram realizadas três reações de sequenciamento nas direções de 3' a 5' e de 5' a 3'. As reações foram encubadas no termociclador e tiveram denaturação inicial de 96°C por 1min, seguida de 40 ciclos de 15s a 96°C, 30s a 55°C e 4min a 60°C e por fim resfriamento a 4°C.

As reações de sequenciamento foram precipitadas obedecendo ao seguinte protocolo:

Protocolo de purificação de reação de sequenciamento (10 μ l):

- Passo 01: Adicionar ao tubo da reação de sequenciamento na seguinte ordem: 2 μ l Acetato de Amônio (7,5M), 10 μ l de H₂O estéril, 66 μ l etanol absoluto;
- Passo 02: Incubar a -20°C por 10min;
- Passo 03: Centrifugar por 30min a 17.900 x g;
- Passo 04: Descartar a solução com cuidado, o DNA permanecerá na forma de pellet (não visível);
- Passo 05: Adicionar 100 μ l de Etanol 70% agitando suavemente;
- Passo 06: Centrifugar por 15min a 17.900 x g;
- Passo 07: Verter a solução;
- Passo 08: Secar a vácuo por 30 min;
- Passo 09: Ressuspender com SLS (*Sample Loading Solution*);

A corrida eletroforética das reações de sequenciamento foi realizada no sequenciador Applied Biosystems® 3500xL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

3.2.2.6 Alinhamento das sequências.

As sequências consenso dos produtos de PCR foram obtidas e alinhadas utilizando o programa MEGA 5.1-*Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (TAMURA *et al.*, 2011) com interface para o programa ClustalX 2.0 (LARKIN *et al.*, 2007).

Uma vez obtidas as sequências para as amostras, utilizou-se a ferramenta NCBI-BLAST – *Basic Local Alignment Search* (ALTSCHUL *et al.*, 1990) para encontrar as sequências semelhantes disponíveis no banco de dados do Genbank (BENSON *et al.*, 2005).

O número de sequências apresentadas no resultado foi observado assim como a variação entre os parâmetros:

1. *Score*: Nota atribuída pelo algoritmo da ferramenta *BLAST* como consequência do número de inserções, deleções e substituições no pareamento da sequência buscada e as do banco de dados.
2. *Query cover*: percentual da sequência buscada coberto por alguma sequência disponível no banco de dados.
3. *E-value*: Valor estatístico que indica a probabilidade de um alinhamento ser real ou ocorrer por acaso, zero é o ideal.

4. **Identidade:** Indica o percentual de coincidências entre a sequência buscada e uma disponível no banco de dados, e indica a conservação evolutiva.
5. **Gap:** Indica o percentual de espaços em branco adicionados a uma sequência do banco de dados para se alinhar a sequência buscada para compensar deleções e inserções.

As 11 sequências com maior valor de *score* foram alinhadas à sequência usada na busca e uma árvore teste de Neighbor-Joining foi desenhada. Utilizou-se o método Kimura 2-parâmetros com 1000 repetições de *Bootstrap*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nessa seção os resultados são apresentados e discutidos. Inicialmente são apresentadas as características anatômicas das amostras e as suas implicações para identificação botânica. Em seguida os resultados dos procedimentos de identificação baseado em marcadores de sequência são apresentados e discutidos.

4.1 IDENTIFICAÇÃO ANATÔMICA DAS AMOSTRAS

As características anatômicas e as possíveis identidades taxonômicas das amostras são apresentadas nessa seção.

4.1.1 Caracteres organolépticos e não anatômicos

As amostras recebidas tinham dimensões reduzidas e/ou estado de conservação ruim, não possibilitando a descrição dos caracteres organolépticos com a segurança necessária. A análise da densidade também não foi possível devido à severa biodegradação de algumas amostras. As amostras L1, U4 e U5 tratavam-se claramente de cerne, para as demais amostras essa afirmação não pode ser feita.

As florestas de origem das amostras não compunham fragmentos originais e sim áreas de regeneração natural (capoeiras), portanto critérios de distribuição geográfica foram levados em conta com ressalvas. Espécies não distribuídas no território brasileiro foram excluídas, com exceção das espécies exóticas conhecidamente introduzidas no Brasil.

Esses fatores levaram à necessidade de identificação das amostras baseando-se exclusivamente nos caracteres anatômicos.

4.1.2. Identificação baseada nos caracteres anatômicos

A distribuição geral das características anatômicas das amostras encontra-se ilustrada nas macrofotografias das secções transversais das amostras com 15 vezes de aumento (FIGURA 06). A esse nível de aumento alguns caracteres podem ser descritos como, por exemplo, a porosidade em anel semicircular das amostras L1 e U1 e a porosidade difusa das demais amostras.

Nas secções transversais das amostras L2 e U1 (FIGURA 06) as regiões descoloridas (indicado por flechas) estão degradadas por fungos de podridão branca. Para a amostra U1 o ataque é mais severo e acomete toda secção transversal da amostra. Felizmente para a amostra L3 foi possível realizar a fotografia em uma secção livre de zonas afetadas, porém boa parte da amostra encontrava-se também acometida de ataque.

A descrição anatômica das amostras está distribuída no texto agrupando-se as espécies semelhantes. Microfotografias dos cortes histológicos dos três planos anatômicos das amostras podem ser visualizadas nas FIGURAS 07 a 14. O número de caracteres descrito por amostra variou de acordo com as especificidades do xilema secundário de cada indivíduo, eventuais caracteres especiais ou fatores que demandam especial atenção do leitor encontram-se indicados por setas.

Simultaneamente a descrição dos caracteres anatômicos discute-se a suas implicações na identificação botânica das amostras. Os resultados obtidos utilizando os caracteres anatômicos como entrada nas chaves de identificação encontram-se

listados na no QUADRO 01. A anatomia da madeira elencou as 8 amostras em 7 diferentes famílias. Para a amostra U1 chegou-se a uma definição de gênero e a identidade está entre três espécies. Para as amostras U2, U3, U4 e U5 a identidade está em dois gêneros botânicos. Para L1 a identidade compreende dois gêneros em duas famílias botânicas, para L2 está entre três gêneros da família Lauraceae, e para L3 no gênero *Protium*. Esse resultado deixa claro o papel das chaves de identificação como uma ferramenta indicadora de possibilidades, que podem ter um leque maior ou menor dependendo da taxonomia da amostra e da quantidade de informação disponível.

QUADRO 01 – IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS SEGUNDO AS CHAVES DE IDENTIFICAÇÃO UTILIZADAS.

Amostra	Possível identificação		
	Família	Gênero	Espécie
L1	Verbenacea	<i>Citharexylum</i>	
	Rahmnaceae	<i>Hovenia</i>	
L2	Lauraceae	<i>Aniba</i>	
		<i>Licaria</i>	
		<i>Nectandra</i>	
		<i>Phoebe</i>	
		<i>Endlicheria</i>	
L3	Burseraceae	<i>Protium</i>	
U1	Meliaceae	<i>Cedrela</i>	<i>fissilis</i>
			<i>odorata</i>
			<i>lilloi</i>
U2	Sapotaceae	<i>Pouteria</i>	
U3		<i>Chrysophyllum</i>	
U4	Lauraceae	<i>Ocotea</i>	
		<i>Nectandra</i>	
U5	Idem U2 e U3	Idem U2 e U3	

FONTE: O AUTOR (2015).

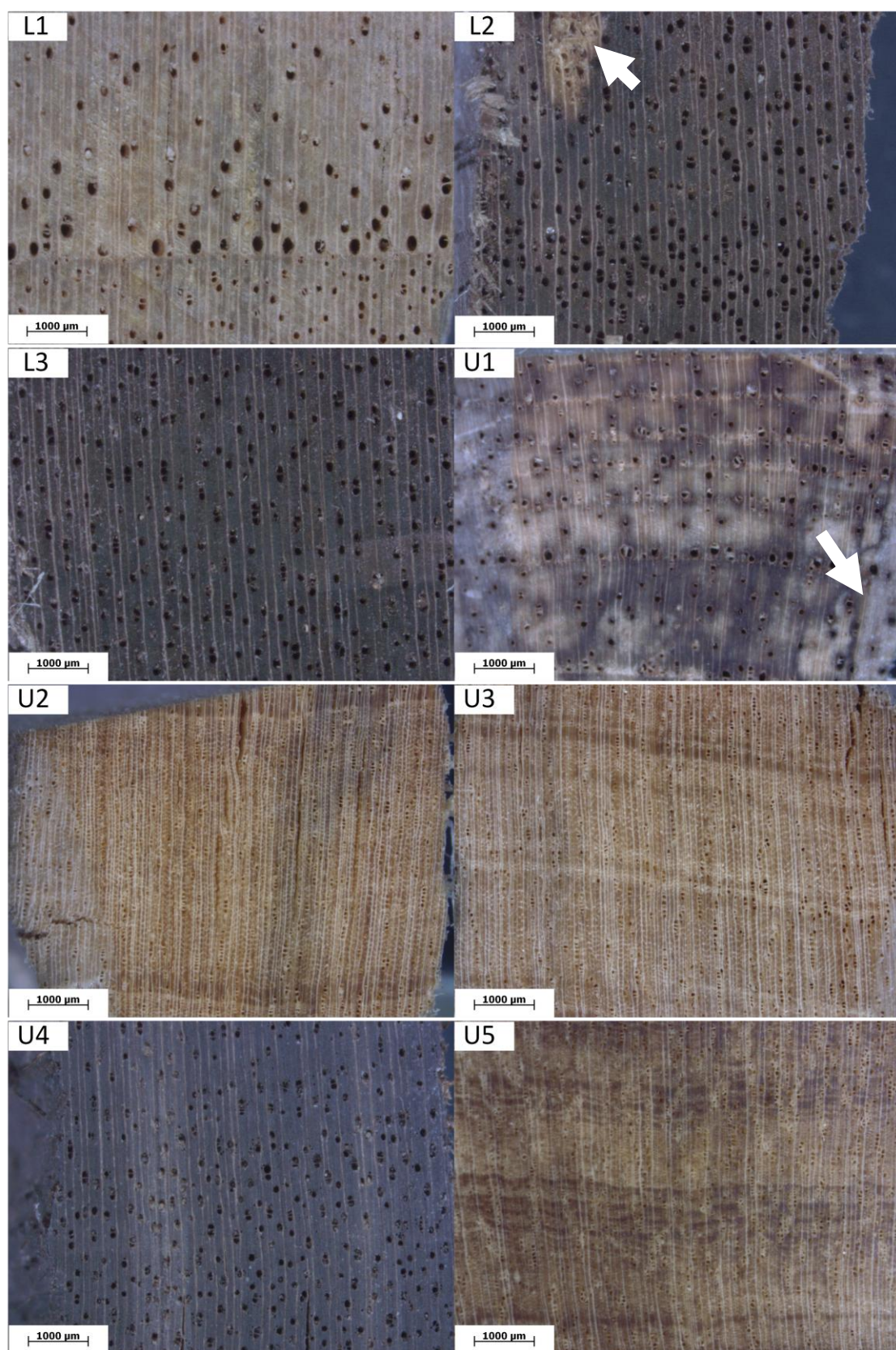


FIGURA 06 – MACROFOTOGRAFIAS DAS SECÇÕES TRANSVERSAIS DAS AMOSTRAS COM MAGNITUDE DE 15X.
FONTE: O AUTOR (2015).

O observado vem de encontro como o já ressaltado por Wheeler (1998) e Gasson (2011) de que a efetiva identificação de uma amostra de madeira baseada na anatomia da madeira depende da verificação e comparação da estrutura anatômica das amostras com descrições e imagens da literatura científica e com coleções de referência.

4.1.2.1 Descrição anatômica e identificação de L1.

A madeira apresenta porosidade em anel semi poroso, poros solitários em maioria, múltiplos de 2 a 3 presentes, eventualmente cachos, vazios. Placa de perfuração simples, pontoações intervasculares alternas, pequenas, pontoações raio-vasculares semelhantes às intervasculares. Parênquima axial escasso, unilateral e vasicêntrico. Raios heterogêneos, com uma camada marginal de células quadradas, uni e multisseriados de 4 a 5 células de largura e em torno de 20 células de altura, não estratificados. Cristais isolados presentes nas margens do raio. Fibras médias a espessas, não septadas.

Os caracteres anatômicos indicam que a amostra L1 pode pertencer ao gênero *Citharexylum* da família Verbenaceae. Esse gênero apresenta 130 espécies validas e se distribui desde o sul dos Estados Unidos até o Uruguai existindo espécies em florestas primárias e secundárias do sul do Brasil (MOLDENKE, 1958; GOMES *et al.*, 2008). A espécie *Citharexylum solanaceum* teve sua estrutura anatômica descrita por Gomes *et al.* (2008) e os tipos de placa de perfuração para a espécie *C. myrianthum* foram estudados por Gomes *et al.* (1989). Os resultados foram coerentes com o observado por Record e Hess (1949), Metcalfe e Chalk (1972) e Meylan e Butterfield (1975) que demonstraram o predomínio de placas de

perfuração simples mas a coexistência de escalariformes e reticuladas no vasos de espécies desse gênero. Para a pequena amostra L1 esse tipo de estrutura não foi observado, mesmo com auxílio das imagens de microscopia eletrônica de varredura, o que diminui muito a possibilidade da amostra L1 pertencer a esse gênero.

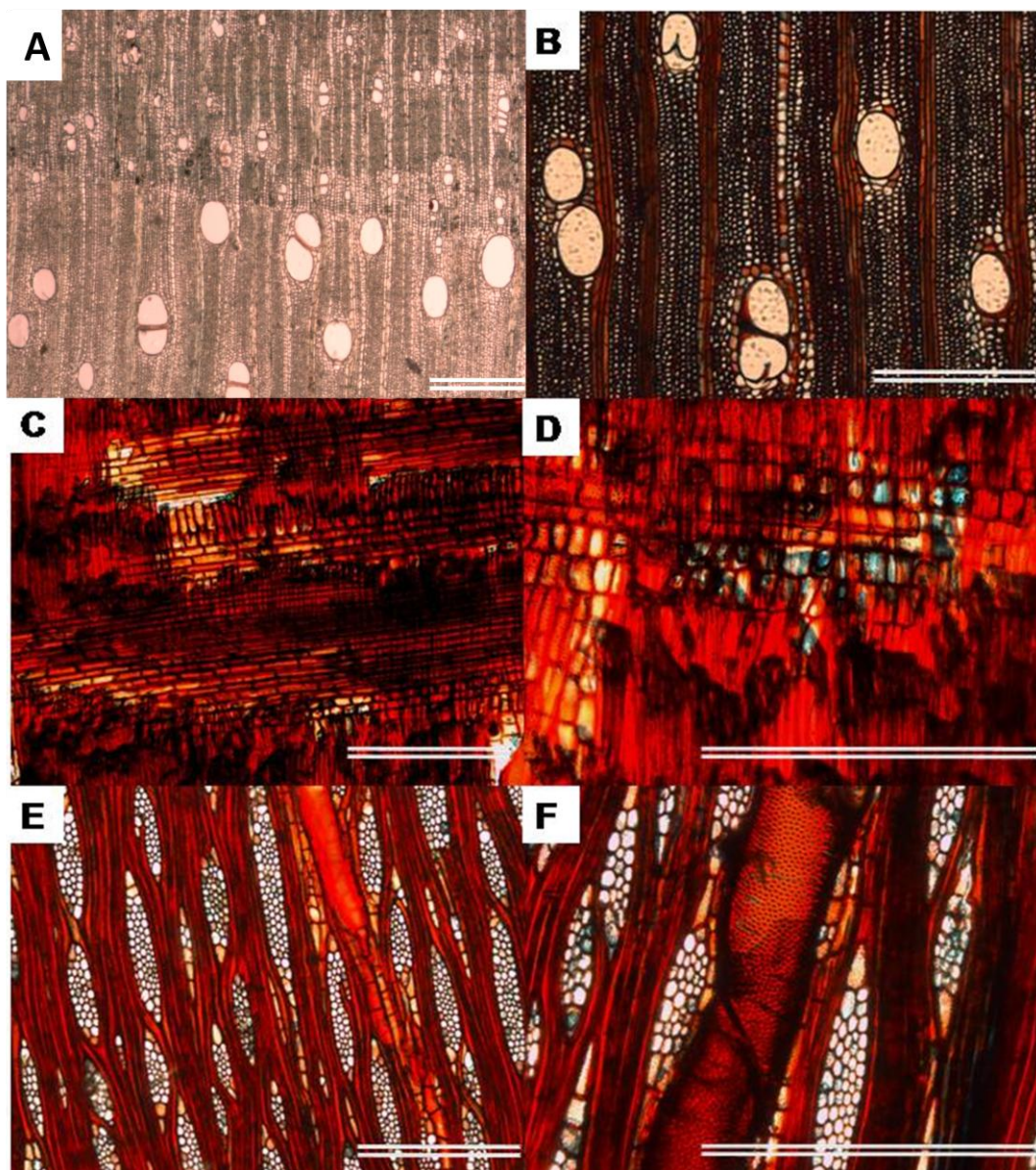


FIGURA 07 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE L1. ESCALA = 200 μ m.
FONTE: O AUTOR (2015).

Os indivíduos do gênero *Hovenia* Thun da família Rhamnaceae em contrapartida apresentam somente placas de perfuração simples (GUPTA e SAXENA, 2011). Esses mesmos autores detectaram diferenças quanto ao tipo de parênquima e separação dos raios de amostras crescendo na Índia e nos Estados Unidos da América, porém nenhuma diferença entre placas de perfuração foram mencionadas. A espécie *Hovenia dulcis*, embora originária da Ásia (China, Japão e Coreias) é amplamente cultivada no sul do Brasil, isolada ou em pequenos povoados (CARVALHO, 1994), com o problema de a espécie *Hovenia dulcis* corresponder a uma espécie exótica invasora na região e ter suas sementes dispersas com grande facilidade (LIMA, 2014). Esses fatores descartam a possibilidade da amostra L1 pertencer à família Verbenaceae e indicam a amostra como um *táxon* da família das Rhamnaceae com grande possibilidade de corresponder à espécie *Hovenia dulcis*.

4.1.2.2 Descrição anatômica e identificação de L2 e U4

As amostras L2 e U4 apresentaram anéis de crescimento distintos pelo espessamento da parede das fibras, porosidade difusa, poros solitários e múltiplos de 2 a 5 para L2 e de 2 a 4 para U4. Obstruídos por tilos em ambas, e óleo-resina em U4. Placa de perfuração simples para L2, simples e escalariforme para U4, pontoações intervasculares alternas, pequenas para L2 e médias para U4, pontoações raio-vasculares semelhantes às intervasculares, grandes. Parênquima axial escasso, unilateral e vasicêntrico. Raios: homogêneos em L2, bi a trisseriados, de 8 a 20 células de altura. Heterogêneos em U4, com duas a três camadas marginais de células quadradas, bi a trisseriados. Em ambas as amostras não

estratificados. Fibras de médias a espessas, septadas, com espessamento no lenho tardio. Células oleíferas presentes.

O conjunto dessas características leva a indicação de que as amostras advêm de indivíduos da família Lauraceae. A amostra U4 advém de um táxon dos gêneros *Ocotea* ou *Nectandra*. A amostra L2 teve um leque de probabilidades maior que incluiu espécies dos gêneros *Nectandra*, *Aniba*, *Licaria*, *Phoebe* e *Endlicheria*.

No Paraná existem 69 espécies de Lauraceae, distribuídas em 12 gêneros. Na Floresta Estacional Semidecidual ocorrem 11 desses gêneros: *Aiouea*, *Aniba*, *Cassytha*, *Cryptocarya*, *Endlicheria*, *Ocotea*, *Nectandra* e *Licaria* (QUINET *et al.*, 2015), o gênero *Phoebe* não ocorre na região, logo as possibilidades para L2 caem para apenas quatro gêneros.

A identificação dessas amostras com maior resolução é de fundamental importância, pois da família das Lauraceae doze são as espécies na lista oficial das espécies brasileiras ameaçadas de extinção, e três ocorrem no Paraná, sendo elas *Ocotea odorifera*, *Ocotea porosa* e *Ocotea catharinensis* (BRASIL, 2008b).

Essas três espécies ameaçadas têm em comum na suas estruturas anatômicas os raios heterogêneos (SILVA e MEDEIROS, 2000; CURY, 2002; SILVA, 2003). Raios heterogêneos estão presentes somente em U4, logo L2 não corresponde à espécie ameaçada de extinção.

Espera-se que a região do ITS possa trazer maior resolução na identificação dessas espécies, pois apesar da importância da família Lauraceae, ela é subestudada no Paraná, existem poucas coletas e determinações errôneas de espécimes dificultam a identificação de indivíduos (BROTTO *et al.*, 2013).

Gasson (2011) admite ser muito difícil a identificação anatômica de amostras de madeiras da família Lauraceae, inclusive em nível de gênero, devido à falta de coleções, cortes histológicos e fotografias como referência na literatura.

Segundo Scheer e Blum (2011) são oito as espécies de *Ocotea* existentes na Floresta Estacional Semidecidual paranaense, sendo o gênero o terceiro mais abundante no estrato arbóreo da formação. Para Brotto *et al.*, (2013) essa contagem inclui 11 indivíduos, entre eles estão as espécies ameaçadas *Ocotea odorifera* e *Ocotea catharinensis* (VIDAL, 2000; BROTTTO *et al.*, 2009).

Em relação ao gênero *Nectandra*, na Floresta Estacional Semidecidual do estado do Paraná sete são as espécies, quatro delas exclusivas dessa fitofisionomia, sendo elas *N. angustifolia*, *N. cissiflora*, *N. cuspidata* e *N. hihua* (ZANON *et al.*, 2009).

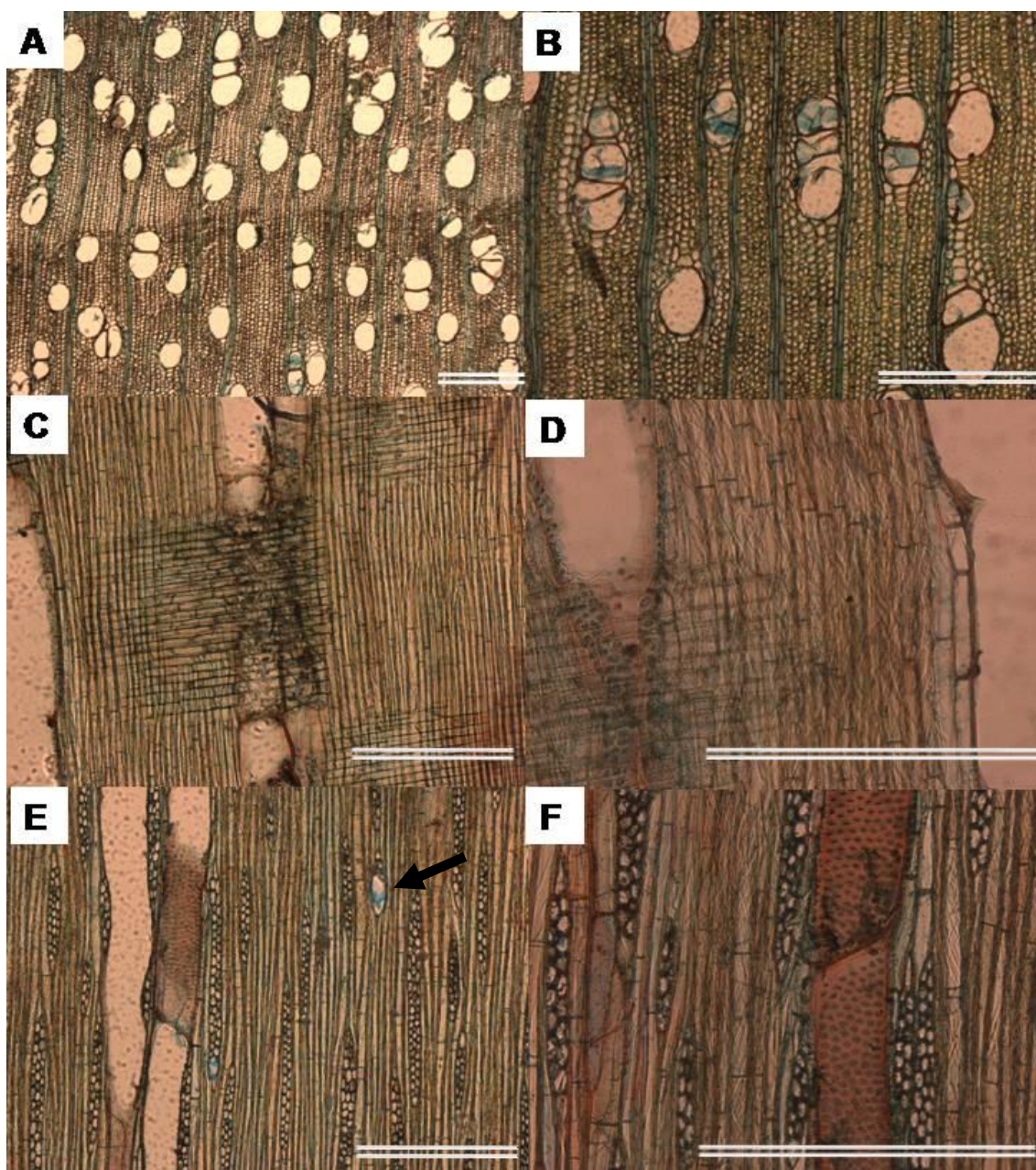


FIGURA 08 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE L2. ESCALA = 200 μ m. Seta em E: Célula oleífera.
 FONTE: O AUTOR (2015).

As células oleíferas associadas ao raio podem ser observadas para as amostras L2 (FIGURA 08 E) e U4 (FIGURA 09 D-F). Um exemplo de placa de perfuração escalariforme pode ser observado na madeira de U4 (FIGURA 09 D).

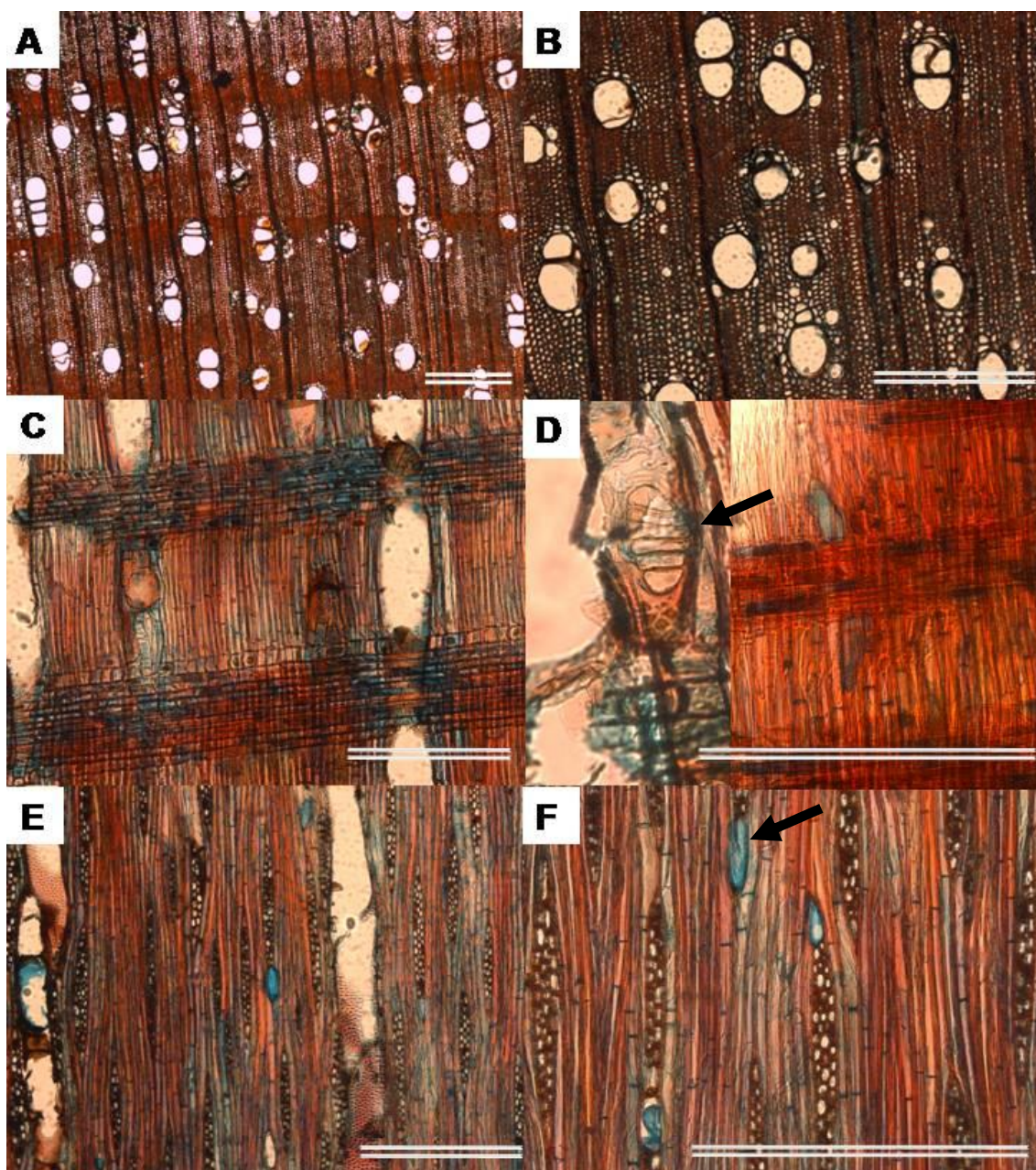


FIGURA 09 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE U4. ESCALA = 200 μ m. SETA EM D: placa de perfuração escalariforme, Seta em F: Célula oleífera.
FONTE: O AUTOR (2015).

4.1.2.3 Descrição anatômica e identificação de L3.

A madeira de L3 apresenta anéis de crescimento indistintos. Madeira com porosidade difusa, poros solitários e múltiplos de 2 a 3, eventualmente cachos,

vazios. Placa de perfuração simples, pontoações intervasculares alternas, pequenas, pontoações raio-vasculares semelhantes às intervasculares, grandes. Parênquima axial escasso e unilateral. Raios heterogêneo, com uma camada marginal de células quadradas, bi a trisseriados, de 4 a 22 células de altura, não estratificados. Fibras médias a espessas, septadas.

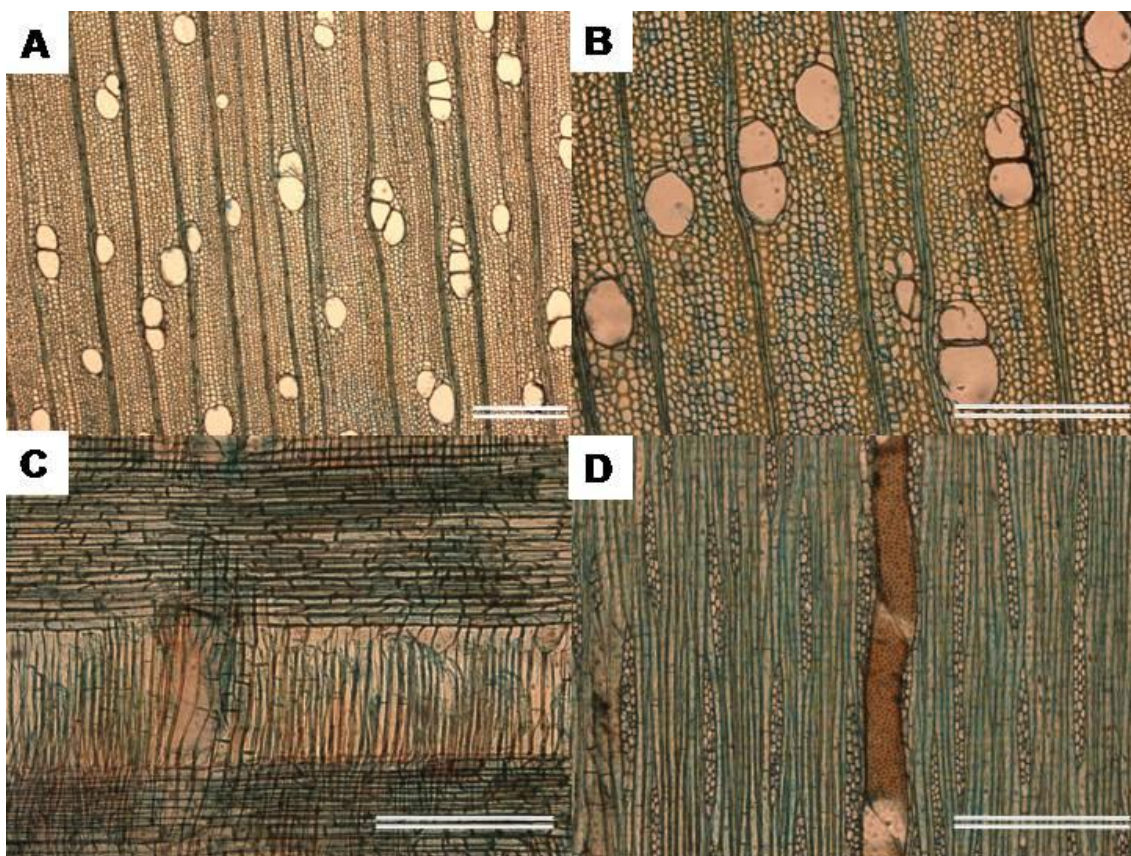


FIGURA 10 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE L3. ESCALA = 200 μ m.
FONTE: O AUTOR (2015).

A amostra L3 foi identificada como possível táxon do gênero *Protium*, esse gênero representa cerca de 80% das espécies da família Burseraceae (SIQUEIRA, 1991). *Protium* Burm f. é o único gênero da família Burseraceae que ocorre na região sul do país e nenhuma espécie desse gênero encontra-se oficialmente listada como ameaçada de extinção (BRASIL, 2008b; DALY, 2015).

4.1.2.4 Descrição anatômica e identificação de U1.

A madeira de U1 tem anéis de crescimento distintos. Madeira com porosidade em anel, poros solitários e múltiplos de 2 a 3, eventualmente cadeias de vasos pequenos até 6, tilos presentes. Placa de perfuração simples, pontoações intervasculares alternas, pequenas, pontoações raio-vasculares semelhantes às intervasculares. Parênquima axial marginal, vasicêntrico e difuso. Raios heterogêneos, com uma camada marginal de células quadradas, uni a trisseriados, de 10 a 14 células de altura, não estratificados. Cristais presentes. Fibras finas, não septadas.

A amostra U1 foi identificada como pertencente ao gênero *Cedrela* da família das Meliaceae. Segundo Cervi *et al.* (2008), no sul do Brasil duas são as principais espécies desse gênero, a *C. fissilis* Velloso e *C. odorata* L. No estado do Paraná a espécie *C. odorata* é considerada rara, e só existe um registro dessa em todo o estado, no Parque Nacional do Iguaçu, parque esse limdeiro a Medianeira, região de origem da amostra.

Essa duas espécies de *Cedrela* encontram-se listadas na lista da CITES no Apendice III sendo *C. odorata* protegido na Bolívia, Colômbia, Guatemala e Peru e *C. fissilis* na Bolívia (CITES, 2014).

No Brasil nenhuma espécie do gênero é oficialmente listada como ameaçada de extinção, apenas a espécie *C. lilloi* C.D.C. encontra-se oficialmente listada como uma espécie com deficiência de dados, podendo futuramente vir a ser listada como ameaçada (BRASIL, 2008b). Essa espécie foi reportada no centro oeste do Paraná (MATTOS *et al.*, 2007) e nas florestas fronteiriças da Argentina com o estado do Paraná (TARNOWSKI, 2010).

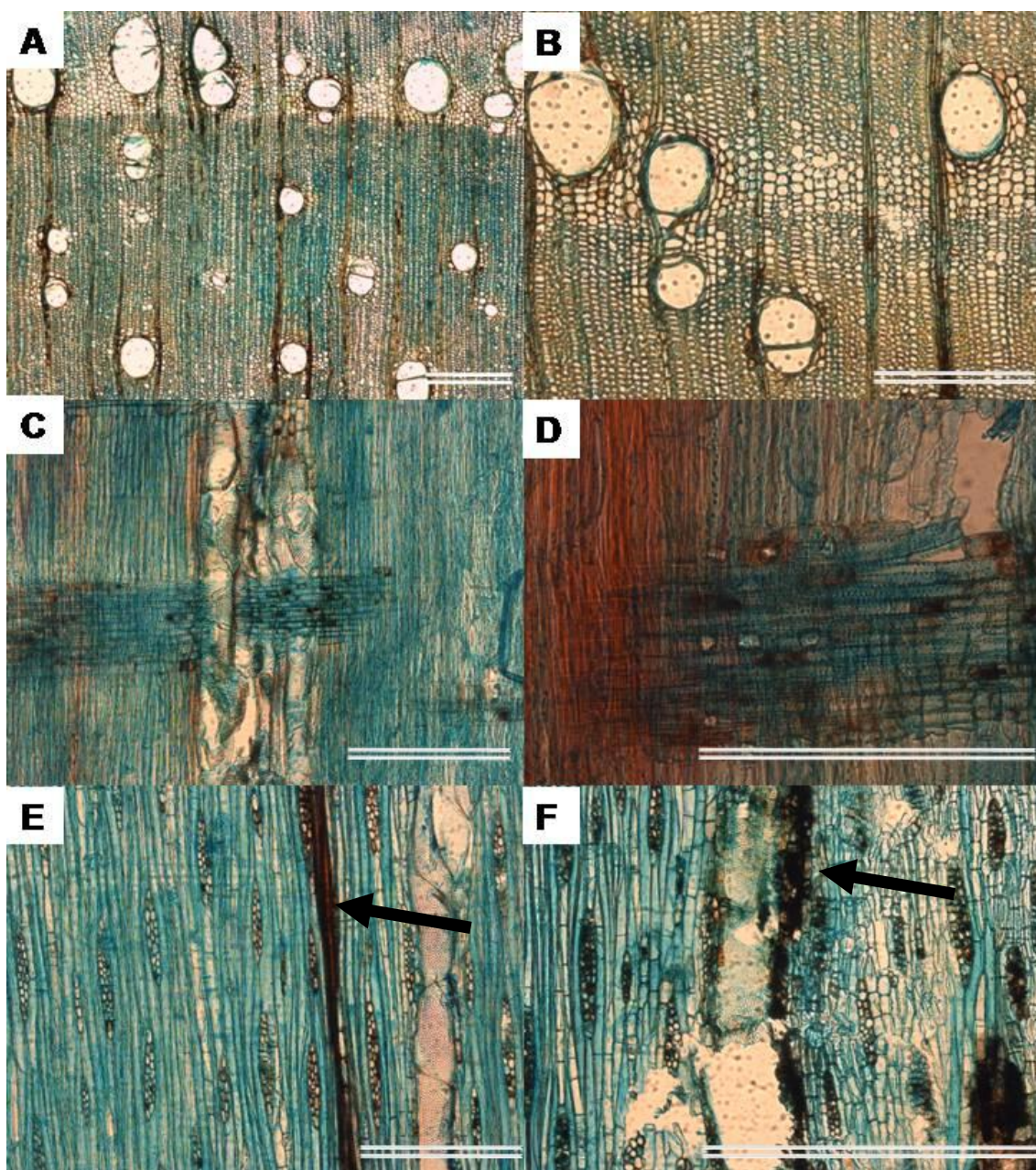


FIGURA 11 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE U1. ESCALA = 200 μ m. Seta em E e F: Frente enzimática do ataque de podridão branca na amostra U1.
FONTE: O AUTOR (2015).

Na FIGURA 11 (E-F), pode-se observar a frente enzimática do ataque de fungos na madeira de U1, a coloração azul na imagem é decorrente da hidrólise da lignina pelos fungos, melhor explicada posteriormente.

4.1.2.5 Descrição anatômica e identificação de U2,U3 e U5.

A madeira das amostras U2, U3 e U5 têm as seguintes características: Anéis de crescimento distintos. Madeira com porosidade difusa, poros múltiplos de 2 a 3, cadeias radiais até 10, 12 para U5, eventualmente solitários, tilos presentes. Placa de perfuração simples, pontoações intervasculares alternas, pequenas, pontoações raio-vasculares semelhantes às intervasculares, grandes. Parênquima axial reticulado irregularmente. Cristais presentes. Raios heterogêneos, com duas a três camadas marginais de células quadradas, uni a trisseriados, predominando os bisseriados, com 3 a 25 células de altura, 10 a 12 em U5, não estratificados. Fibras de parede grossa, não septadas.

Como pode ser visto na FIGURA 13 (D) hifas de fungo estão presentes no interior das células do raio da amostra U3.

As características anatômicas das amostras U2, U3 e U5 levaram à conclusão de que essas são indivíduos da família botânica Sapotaceae. As amostras aparentemente têm a mesma identidade taxonômica e tiveram como possíveis identificações dois gêneros, *Pouteria* e *Chrysophyllum*.

Os gêneros *Pouteria* e *Chrysophyllum* são presentes no sul do Brasil, e junto com *Manilkara* e *Micropholis* são os mais expressivos dos 14 gêneros de Sapotaceae existentes no Brasil (ALMEIDA, 2010).

A única espécie na lista oficial das espécies ameaçadas de extinção da família Sapotaceae corresponde à espécie *Pouteria psammophila* do bioma Mata Atlântica, porém essa espécie não ocorre no estado do Paraná (BRASIL, 2008b; LORENZI, 2009).

Gasson (2011) afirma ser difícil a identificação de espécies de Sapotaceae, levando a identificação da família botânica somente.

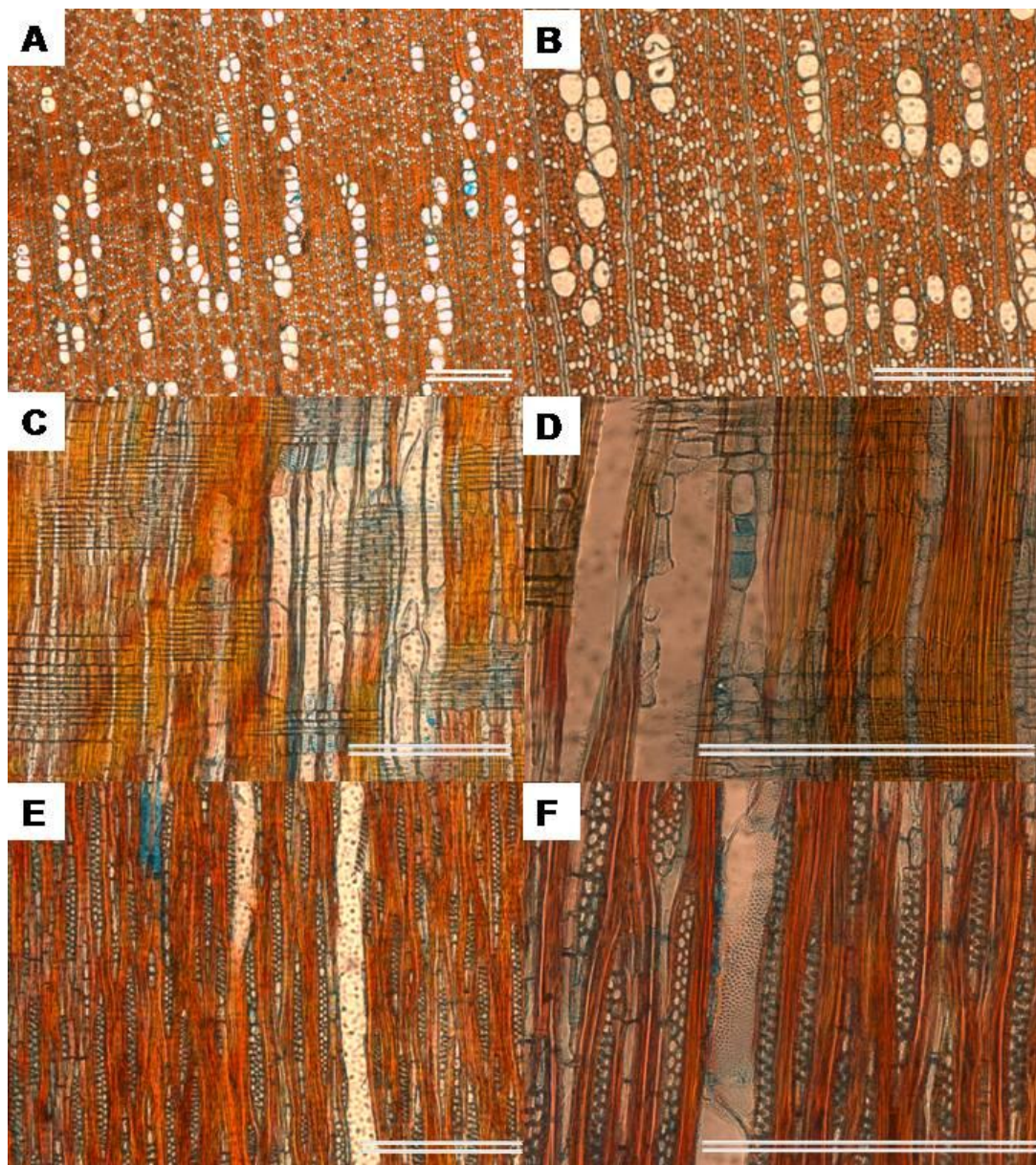


FIGURA 12 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE U2. ESCALA = 200 μ m.
FONTE: O AUTOR (2015).

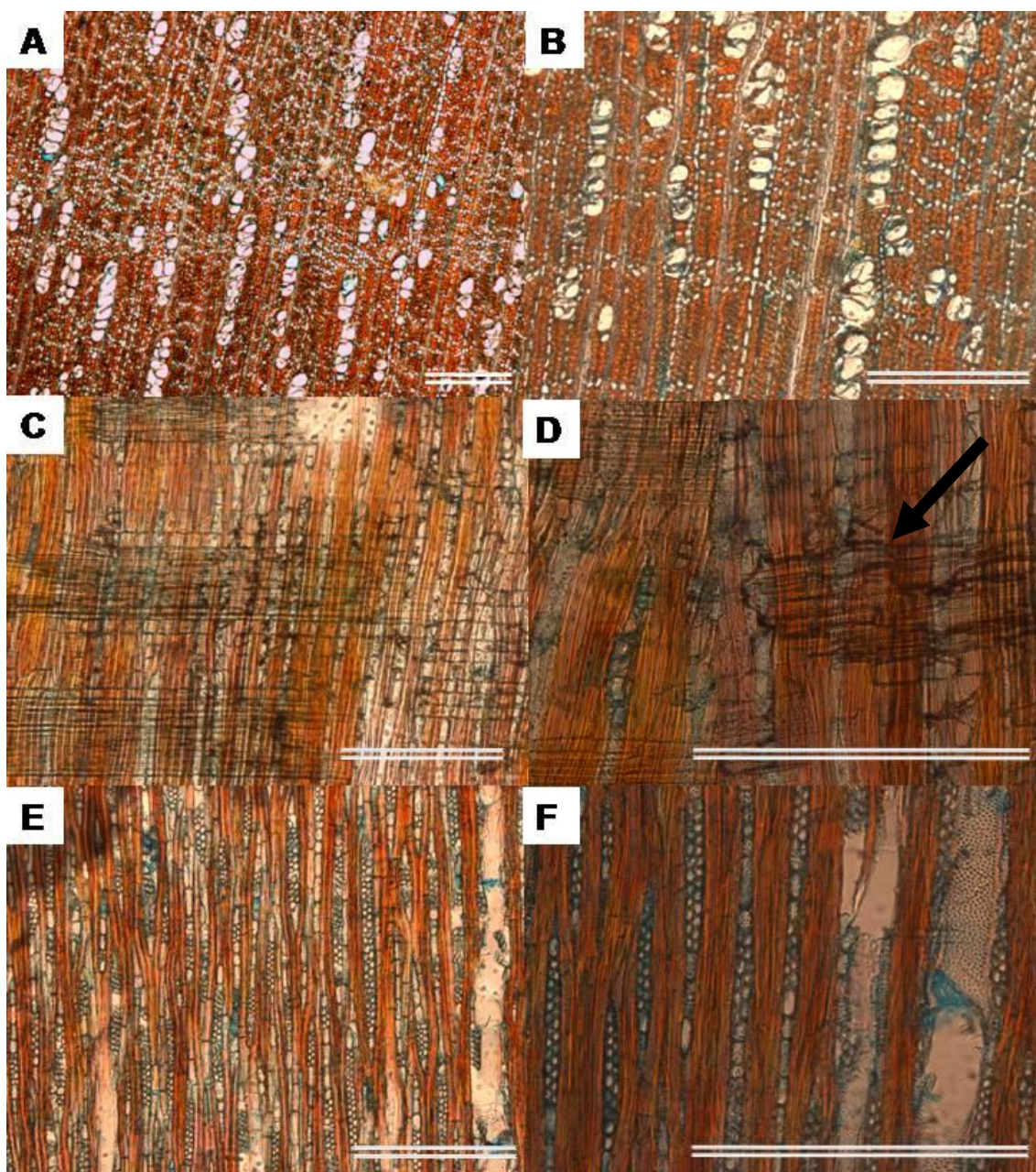


FIGURA 13 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE U3. ESCALA = 200 μ m. SETAS INDICAM HIFAS DE FUNGO NAS CELULAS DO PARENQUIMA RADIAL.
FONTE: O AUTOR (2015).

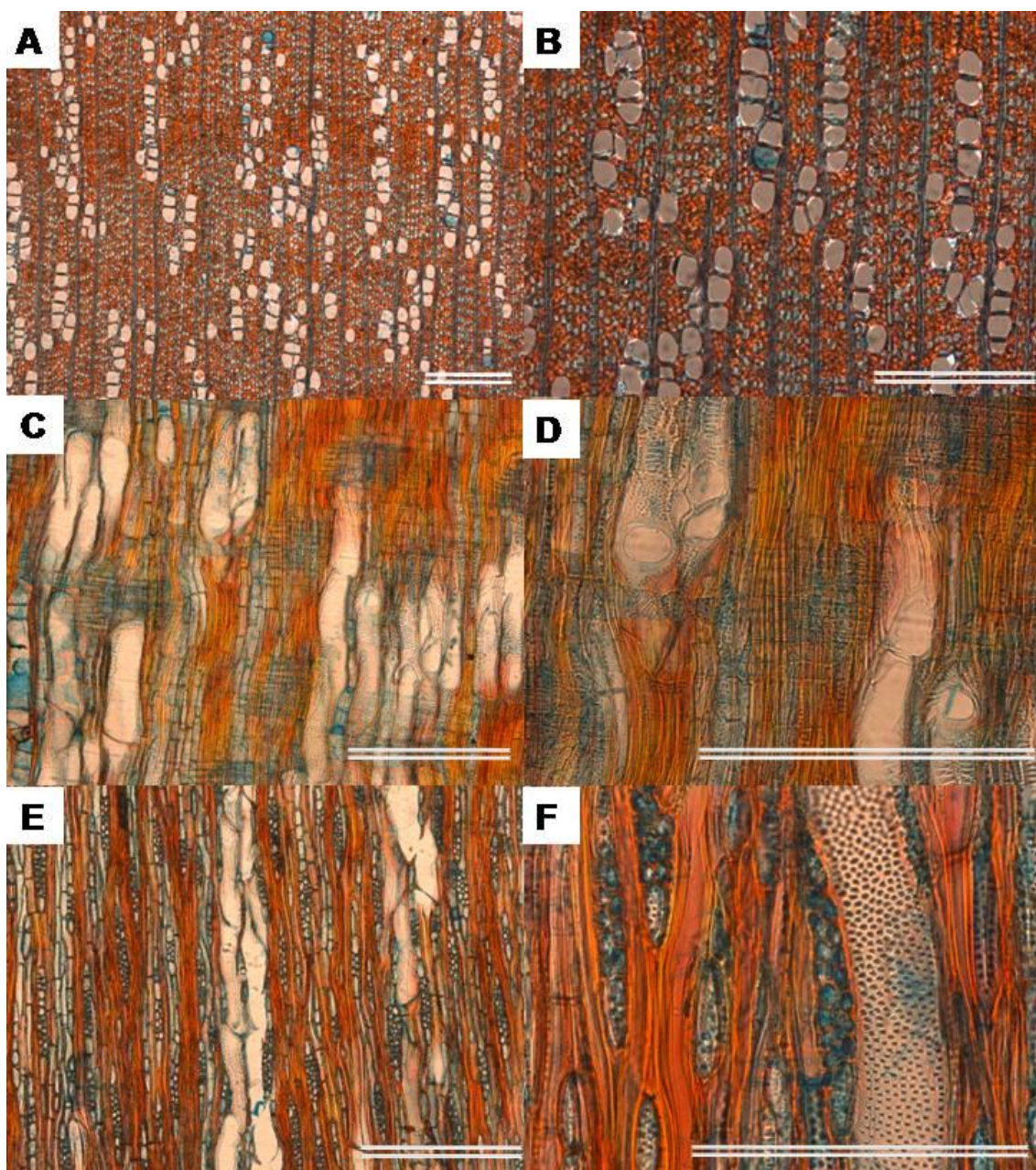


FIGURA 14 – SECÇÃO TRANSVERSAL (A,B), RADIAL (C,D) E TANGENCIAL (E,F) DA MADEIRA DE U5. ESCALA = 200 μ m.
FONTE: O AUTOR (2015).

4.2.1.6 Implicações da identificação anatômica das amostras

A descrição anatômica das amostras de madeira e a aplicação dessas nas chaves de identificação permitiram chegar a determinação da família botânica, a qual as oito amostras pertencem.

Para as amostras L1, L2, L3, U2, U3 e U5, as chaves empregadas foram suficientemente precisas a ponto de levar a conclusão de que as amostras não estão oficialmente ameaçadas de extinção, informação que basta para a autoridade policial.

No caso das amostras U1 e U4 os resultados trazidos pelas chaves de identificação levam a necessidade de maior resolução na identificação dessas amostras, pois ambas podem ser espécies oficialmente ameaçadas de extinção, logo sua identificação deve ter maior resolução, pois isso pode interferir na penalidade aplicada ao infrator.

4.2 IDENTIFICAÇÃO BASEADA NA REGIAO DO ITS DO DNA RIBOSSÔMICO

Os resultados para os procedimentos biomoleculares empregados são apresentados em seguida.

4.2.1 Extração de DNA

Na Tabela 04 estão apresentados as concentrações de DNA obtidas para as duas extrações realizadas, a primeira partindo de 50mg de pó de madeira e seguindo os passos do protocolo de pequena escala e a segunda partindo de 700mg de pó de madeira e seguindo os passos do protocolo de grande escala.

Como observado, nas duas extrações, a repetição da eluição do DNA retido no filtro da coluna de extração mostrou-se válida, pois em todos os casos uma quantidade expressiva de DNA genômico foi obtida mesmo após a primeira eluição. Isso permitiu um ganho de rendimento global na extração e um melhor aproveitamento do kit.

TABELA 04 – CONCENTRAÇÃO DOS ISOLADOS E RENDIMENTO EM DNA DAS EXTRAÇÕES CONDUZIDAS SEGUNDO PROTOCOLOS DE PEQUENA E GRANDE ESCALA. (X INDICA SEGUNDA ELUIÇÃO).

	Pequena Escala (50mg)		Grande escala (700mg)	
	Concentração (ng/μl)	Rendimento (ng/mg)	Concentração (ng/μl)	Rendimento (ng/mg)
U1	52,0		108,3	
U1x	15,2	67,2	41,3	32,1
U2	40,5		-	-
U2x	34,2	74,7	-	-
U3	16,4		-	-
U3x	12,0	28,4	-	-
U4	58,1		-	-
U4x	32,4	90,5	-	-
U5	94,4		-	-
U5x	25,3	119,7	-	-
L1	49,0		83,0	
L1x	38,2	87,2	27,7	23,7
L2	52,4		136,1	
L2x	26,9	79,3	38,1	37,3
L3	52,9		204,1	
L3x	13,6	66,5	54,9	55,5

FONTE: O AUTOR (2015).

Embora o protocolo de grande escala tenha permitido um ganho de concentração de DNA isolado para as amostras U1, L1, L2 e L3, o rendimento da extração foi menor que o obtido para a extração em pequena escala. Isso ocorreu devido às sucessivas repetições de centrifugação (Passos 13 e 14) das colunas de extração, que acabaram por “lavar” da coluna certa quantidade de DNA.

As imagens das corridas de eletroforese realizadas para os isolados de ambas a extrações (FIGURAS 15 e 16) permitem observar que o DNA genômico isolado compõe-se principalmente de DNA fragmentado e que frações com comprimentos menores que 500pb são comuns para a maioria das amostras.

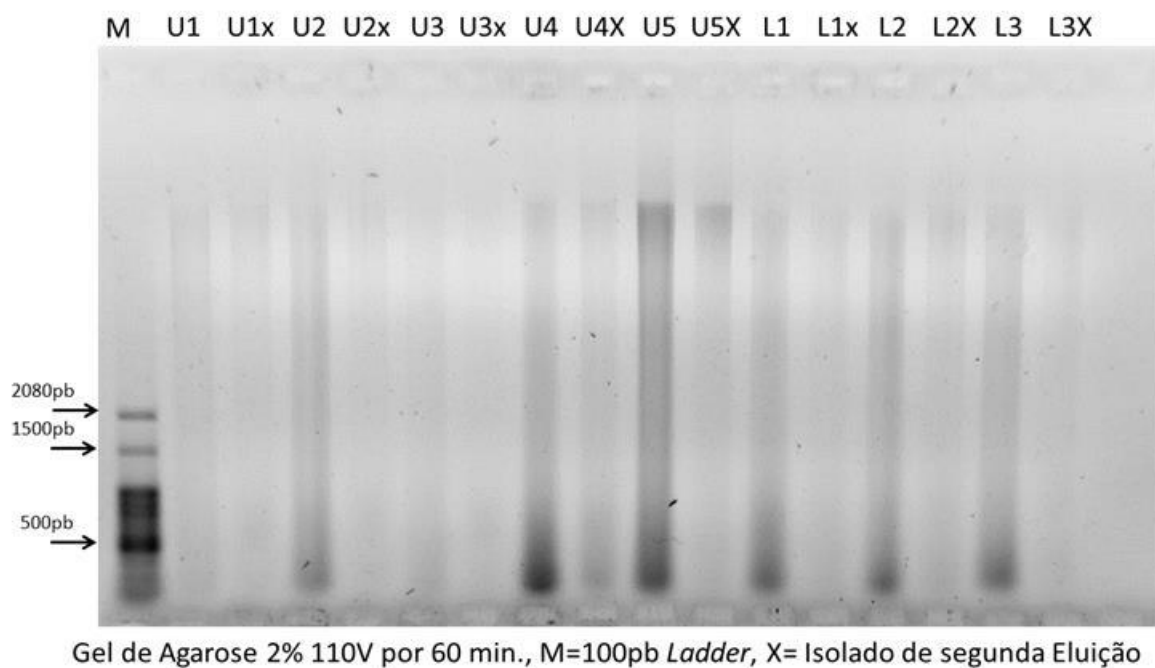


FIGURA 15 – ELETROFORESE EM AGAROSE DOS ISOLADOS DE DNA (5 μ l) DA EXTRAÇÃO EM PEQUENA ESCALA (50mg).
FONTE: O AUTOR (2015).

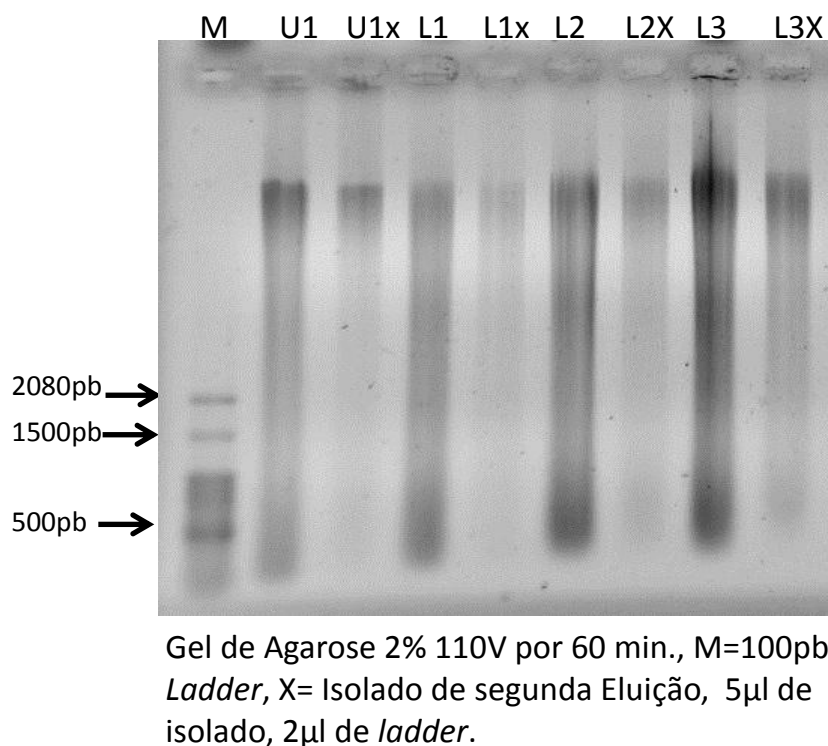


FIGURA 16 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS ISOLADOS DE DNA DA EXTRAÇÃO EM GRANDE ESCALA (700mg).
FONTE: O AUTOR (2015).

O aumento na quantidade inicial de madeira aumentou significativamente as frações de maior comprimento para as amostras U1, L1, L2 e L3, e provavelmente a quebra mais delicada do pó de madeira utilizando nitrogênio líquido tenha permitido que mais DNA de comprimentos maiores fossem acessados durante a extração.

O parâmetro adicional de avaliação da qualidade do DNA isolado, a relação entre as absorvâncias nos comprimentos de onda de 230nm, 260nm e 280nm, resultados da análise de espectroscopia encontram-se expostos na Tabela 05.

TABELA 05. – PARÂMETROS DE QUALIDADE DO DNA ISOLADO NAS EXTRAÇÕES DE DNA SEGUNDO OS PROTOCOLOS EMPREGADOS.

	Pequena Escala (50mg)		Grande escala (700mg)	
	Razão 260/280	Razão 260/230	Razão 260/280	Razão 260/230
U1	1,72	0,63	1,91	1,69
U1x	1,93	0,89	1,88	1,42
U2	1,89	1,15	-	-
U2x	1,7	0,67	-	-
U3	1,88	0,57	-	-
U3x	1,78	0,71	-	-
U4	1,9	1,19	-	-
U4x	1,86	1,04	-	-
U5	1,92	1,58	-	-
U5x	1,88	1,23	-	-
L1	1,93	1,35	1,9	1,55
L1x	1,75	0,67	1,91	1,12
L2	1,96	1,17	1,89	1,75
L2x	1,83	0,88	1,91	1,58
L3	1,95	1,14	1,89	1,89
L3x	1,93	0,75	1,94	1,65

FONTE: O AUTOR (2015).

A relação 260/280 indica a relação entre a quantidade de ácido desoxirribonucleico e a de proteínas contaminantes, segundo Gallagher (2011).

A razão ideal para um isolado de DNA com baixa contaminação por proteínas é de 1,8, 1,9 ou 2,0. Proteínas têm alta absorvância a 280nm e quando presentes

baixam essa relação. Para todos os isolados das duas extrações a relação 260/280 ficou dentro ou muito próximo do esperado, indicando que a aplicação da Proteinase K e a lavagem com clorofórmio foram efetivas na quebra e retirada das proteínas durante a extração.

A relação 260/230 está relacionada com a contaminação por compostos fenólicos, polissacarídeos, Trizol, pois esses têm maior absorbância a 230nm, e ao baixo pH no isolado (WILFINGER *et al.*, 1997; BILGIN *et al.*, 2009; PICO de COAÑA *et al.*, 2010; GALLAGHER, 2011). Para nenhum dos isolados obtidos, segundo os dois protocolos, essa razão ficou entre os 2,0-2,2 indicados por NANODROP (2007) e Johnson *et al.* (2012).

Os piores resultados foram os obtidos segundo o protocolo de pequena escala, onde oito dos isolados ficaram abaixo de 1,0. As quatro amostras reextraídas segundo o protocolo de grande escala tiveram as razões 260/230 aumentadas, tendo atingido valores próximos a 1,9 para a primeira eluição de U3. Três foram os fatores que levaram a esse ganho: primeiro, o aumento global da quantidade de DNA isolado e, portanto, um maior absorbância a 260nm; segundo, as sucessivas centrifugações (Passos 13 e 14) que “lavaram” os contaminantes da coluna de extração; e terceiro, a diluição dos contaminantes com um maior volume de eluição.

Os isolados de segunda eluição apresentaram menor razão 260/230 para todas as extrações, com exceção da extração de pequena escala para as amostras U1 e U3.

Os espectros dos isolados de DNA U1, L1; L2 e L3 extraídos segundo ambos os protocolos estão apresentados nas FIGURAS 17 e 18. É possível observar que as curvas da extração em grande escala mostram-se muito mais harmoniosas, sendo possível a visualização de picos claros a 260nm e vales a 230nm. As

amostras U1 e L1 apresentaram visivelmente a maior variação no comportamento das curvas tanto para a primeira como segunda eluição.

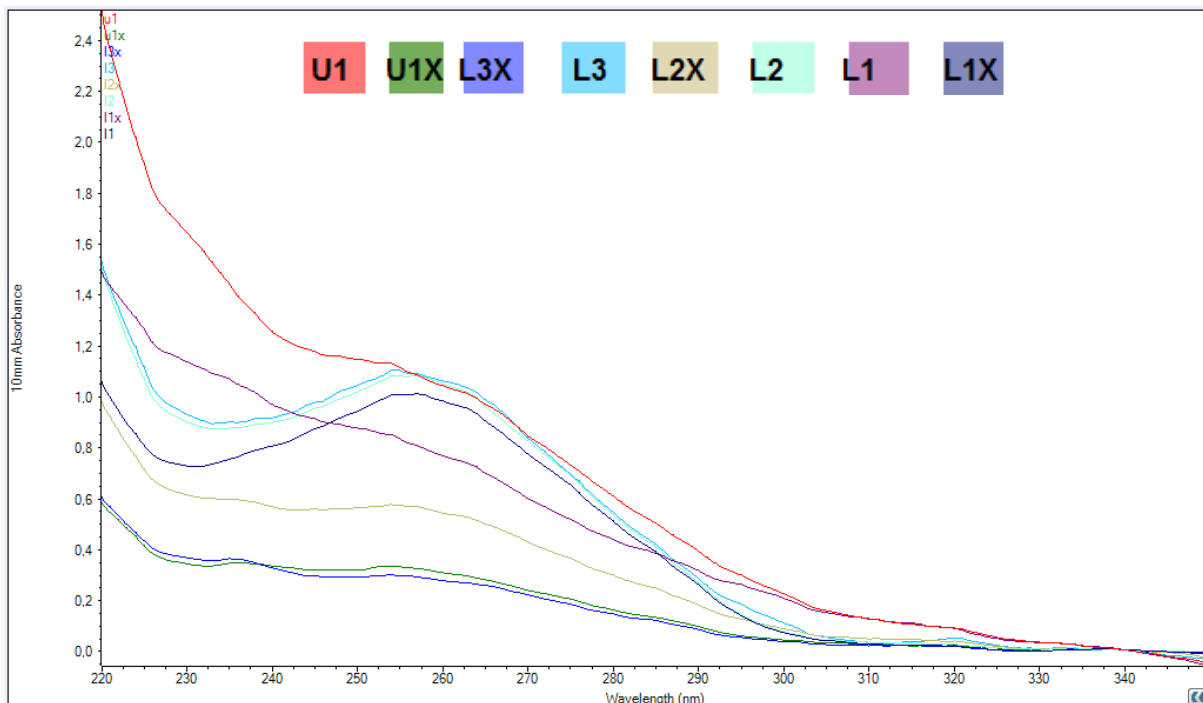


FIGURA 17 – MEDIDAS DE ABSORBÂNCIA PARA OS ISOLADOS DE U1, L1, L2, L3 DA EXTRAÇÃO EM PEQUENA ESCALA. FONTE: O AUTOR (2015).

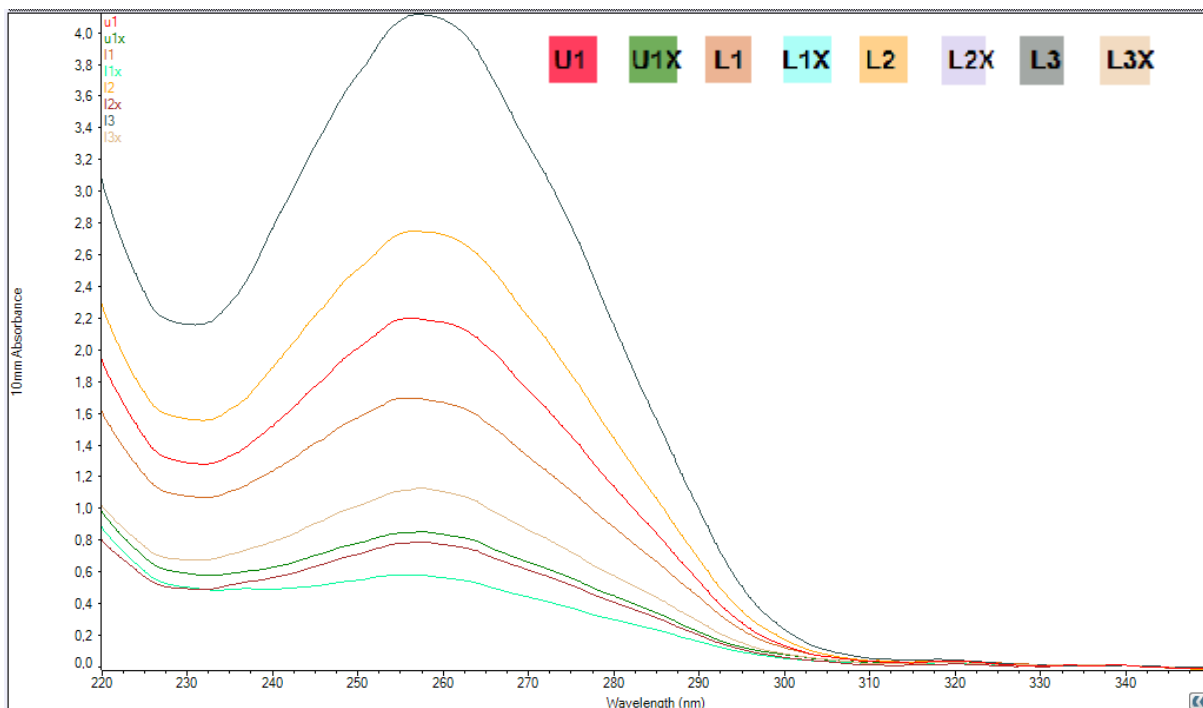


FIGURA 18 – MEDIDAS DE ABSORBÂNCIA PARA OS ISOLADOS DE U1, L1, L2, L3 DA EXTRAÇÃO EM GRANDE ESCALA. FONTE: O AUTOR (2015).

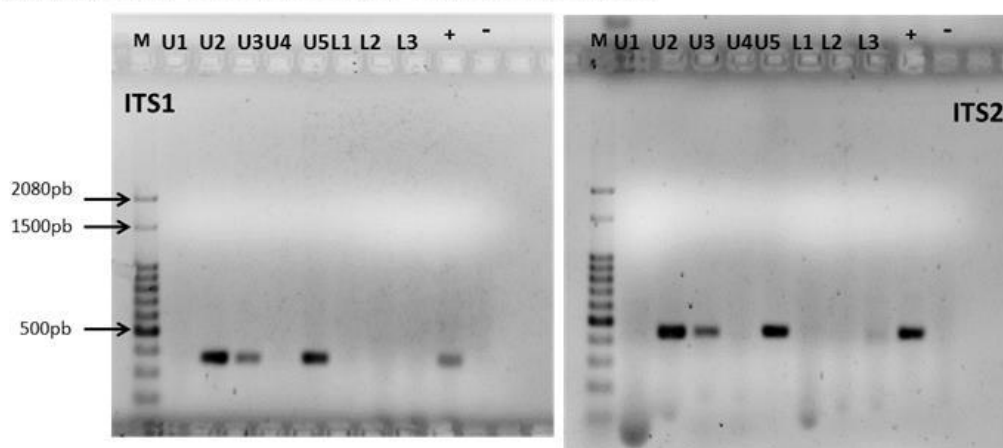
Embora se tenha constatado a eficácia da aplicação do kit DNeasy® mericon™ Food na extração de DNA a partir das oito amostras estudadas e a clara existência de diferenças de qualidade nos isolados quanto aos dois protocolos aplicados, deve-se observar esses resultados com certa cautela, pois nenhuma das metodologias aplicadas na avaliação da qualidade do DNA extraído é suficientemente sensível para diferenciar quais ácidos nucleicos compõe DNA ou RNA, e nenhuma RNase foi aplicada na extração.

Outro fator está relacionado à possível presença de DNA contaminante nas amostras, pois é sabido que as amostras U1, L2 e L3 encontravam-se infestadas por fungos e a amostra U5 por insetos. Desse modo a correta afirmação de sucesso ou insucesso do isolamento de DNA está relacionado com o sucesso da amplificação do fragmento pretendido e a correspondência com um táxon compatível.

4.2.2 Reações de PCR

As eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR para a região do ITS1 e ITS2 dos isolados da extração em pequena escala estão apresentadas na FIGURA 19.

EXTRAÇÃO DE PEQUENA ESCALA / Regiões ITS1 e ITS2.



Gel de Agarose 1,5%, 70V, 60min, M=Ladder 100pb, += controle positivo, - = controle negativo.

FIGURA 19 – AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS ITS1 E ITS2 DO rDNA DOS ISOLADOS OBTIDOS NA EXTRAÇÃO DE PEQUENA ESCALA.
FONTE: O AUTOR (2015).

Das oito amostras extraídas foi possível a amplificação da região do ITS somente para as amostras U2, U3 e U5. As seis bandas apresentaram qualidade suficiente para proceder com o sequenciamento dessas em duas direções.

A diluição do DNA *template* aplicado na reação de PCR pode reduzir os inibidores e aumentar a eficiência do PCR, em contra partida essa diluição pode aumentar a sensibilidade do PCR ou favorecer que DNA exógenos venham a ser mais representativamente amplificados (PÄÄBO *et al.*, 2004; DEMEKE e JENKINS, 2010). Tomado esse risco, os resultados das reações de PCR para os isolados não efetivamente amplificados anteriormente diluídos a 10% e 1% encontram-se expostos na FIGURA 20.

EXTRAÇÃO DE PEQUENA ESCALA / Regiões do ITS1 e ITS2/ Teste de diluição dos extratos

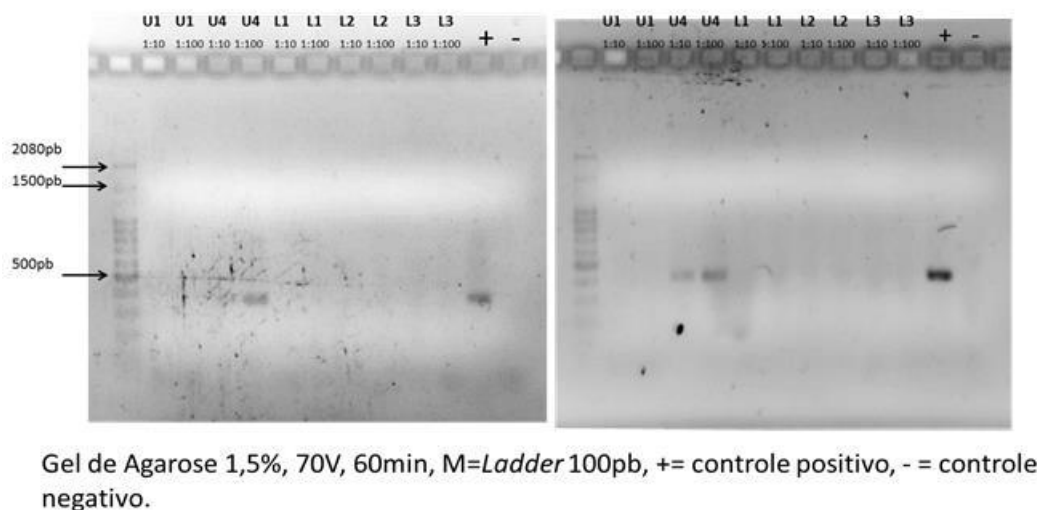
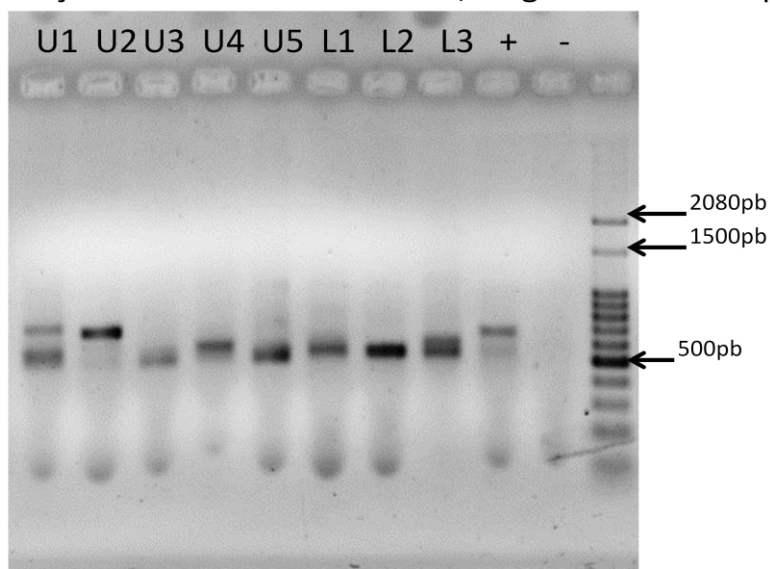


FIGURA 20 – AMPLIFICAÇÕES PARA OS ISOLADOS DA EXTRAÇÃO DE PEQUENA ESCALA NÃO AMPLIFICADOS ANTERIORMENTE DILUIDOS A 0,1X E 0,01X.
 FONTE: O AUTOR (2015).

A diluição mostrou-se efetiva para a amostra U4 que apresentou banda para a região ITS1 quando diluído a 1% e para a ITS2 quando diluído a 10% e 1%. As bandas foram sequenciadas.

A não efetiva amplificação dos isolados para U1, L1, L2 e L3, poderia indicar a presença de uma quantidade muito grande de inibidores, que não permitem a atuação da enzima *Taq* polimerase. Esse pressuposto não se sustenta quando observa-se a FIGURA 21 com os resultados das reações de PCR aplicando os *primers* ITS1.1 e ITS4 e amplificando a região do ITS completa. Bandas foram obtidas para todos os isolados. Os comprimentos dos fragmentos amplificados foram variáveis para todas as reações. Surgiram bandas duplas ou múltiplas para os isolados com exceção do L2, que teve aparentemente qualidade suficiente para sequenciamento.

EXTRAÇÃO DE PEQUENA ESCALA / Região do ITS completa.



Gel de Agarose 1,5%, 70V, 60min, M=Ladder 100pb,
+= controle positivo, - = controle negativo.

FIGURA 21 – AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DO ITS COMPLETA (APLICANDO *PRIMERS* ITS1.1/ITS4).
FONTE: O AUTOR (2015).

A não amplificação das regiões do ITS1 e ITS 2 das amostras U1, L1, L2 e L3 e amplificação da região do ITS completa pode estar relacionada a dois fatores:

- 1- Os *primers* ITS 2.1 e ITS 3.1 não encontram regiões onde possam se acoplar no DNA molde;
- 2- Ou não existem fitas molde do DNA vegetal e apenas o DNA contaminante de fungos está sendo amplificado.

A existência de bandas múltiplas torna mais plausível a hipótese dois, pois a função inicial do *primer* ITS 4 desenvolvido por White *et al.* (1990) era amplificação da região do ITS de fungos. Hansen *et al.* (2011) teve sucesso amplificando a região do ITS utilizando a combinação dos primers ITS1.1/ITS2.1 e ITS3.1/ITS4, porém desaconselha-se a combinação ITS1.1/ITS4 para amplificação de DNA vegetal, principalmente com *template* de isolados de DNA a partir de madeira, considerada

um substrato natural para esses organismos saprófitos (SKYBA, 2013). Os resultados dos sequenciamentos levaram a essa mesma conclusão.

Os resultados da amplificação das regiões do ITS1 e ITS2 para as amostras U1, L1, L2 e L3 reextraídas segundo o protocolo de extração de grande escala encontram-se apresentados na FIGURA 22. A nova metodologia de extração permitiu a amplificação de bandas anteriormente não obtidas.

As bandas para a região do ITS1 dos produtos de PCR de L1 e L3 tiveram qualidade suficiente para sequenciamento, a banda L3 apresentou comprimento menor que o controle positivo (*Cedreia* spp.) em torno de 50pb, essa variação de comprimento está além do esperado para angiospermas.

Para a região do ITS2 a amplificação de U1 rendeu uma banda, que pode ser conduzida para sequenciamento. A amplificação de L1 não foi efetiva para a região do ITS2. L2 apresentou uma banda mais intensa com comprimento aproximado de 700pb cerca de 300pb mais longa que o controle positivo, além disso, bandas múltiplas com comprimentos menores puderam ser observadas, logo esse produto de PCR não pode ser sequenciado. A região do ITS2 da amostra L3 também apresentou o mesmo problema com bandas duplas, não podendo ser encaminhada para sequenciamento.

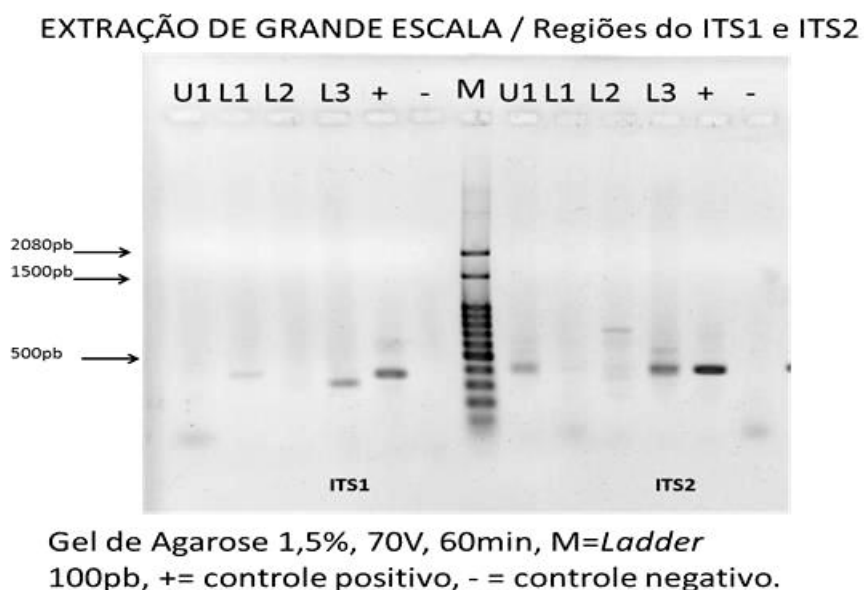


FIGURA 22 – AMPLIFICAÇÕES PARA OS ISOLADOS DA EXTRAÇÃO DE GRANDE ESCALA.
FONTE: O AUTOR (2015).

Testes com diluição dos isolados e outros parâmetros para o PCR (concentração de Taq polimerase, concentração de $MgCl_2$ e temperatura de anelamento) não renderam resultados diferentes dos apresentados na FIGURA 22.

Os resultados da amplificação da região completa do ITS para os isolados da extração segundo o protocolo de grande escala encontram-se na FIGURA 23.

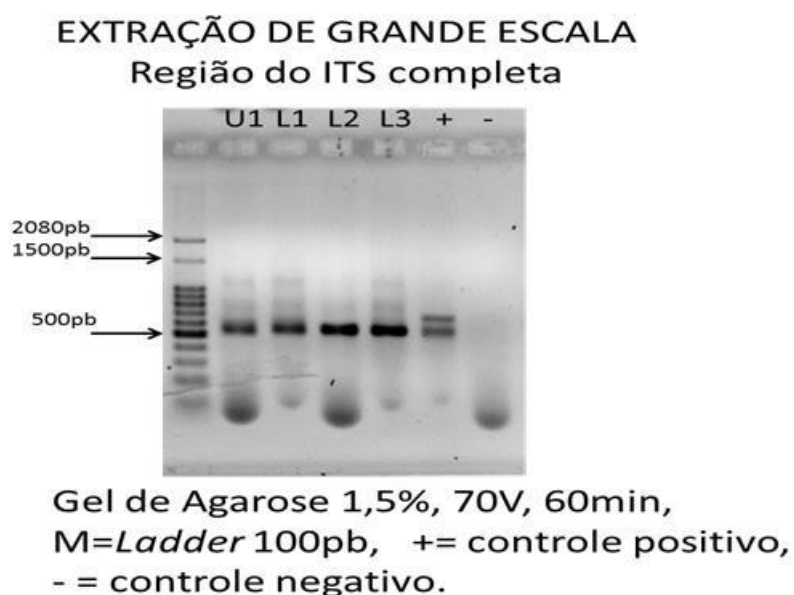


FIGURA 23 – AMPLIFICAÇÕES PARA A REGIÃO COMPLETA DO ITS DAS AMOSTRAS DA EXTRAÇÃO EM GRANDE ESCALA (APLICANDO PRIMERS ITS1.1/ITS4)
FONTE: O AUTOR (2015).

Foram obtidas bandas para todos os isolados, porém somente o produto de PCR para o isolado L2 foi passível de sequenciamento.

O resumo dos amplificados com qualidade suficiente para sequenciamento encontram-se listados no QUADRO 02.

QUADRO 02 – RESUMO DOS PRODUTOS DE PCR SUBMETIDOS AO SEQUENCIAMENTO E SUA IMAGEM DE ELETROFORESE. (X= sequenciado, - = não sequenciado).

	REGIÃO SEQUENCIADA			Eletroforese
	ITS 1	ITS 2	ITS completo	
U1	-	x	-	FIGURA 21
U2	x	x	-	FIGURA 19
U3	x	x	-	FIGURA 19
U4	x	x	-	FIGURA 20
U5	x	x	-	FIGURA 19
L1	x	-	-	FIGURA 22
L2	-	-	x	FIGURAS 21 e 23
L3	x	x	-	FIGURA 22

FONTES: O AUTOR (2015).

A única amostra que não apresentou amplificadas com qualidade suficiente para sequenciamento foi a amostra U1, essa amostra pode ser oriunda de uma espécie oficialmente listada como deficiente de dados, tendo a amplificação da região do ITS falhado, a verificação se essa amostra corresponde à espécie *Cedrela lilloi* deve basear-se na anatomia da madeira.

A amostra U1 corresponde à amostra com maior degradação biológica entre todas. Fungos responsáveis pelo fenômeno da podridão branca atuam degradando a lignina existente na madeira (SKYBA, 2013). Se observada a FIGURA 11, percebe-se a clara coloração azulada dos cortes anatômicos, indicando a quase total destruição da lignina presente na madeira da amostra U1, pois o corante azul de astra normalmente liga-se as regiões ausentes de lignina, enquanto os corantes crisoidina, acridina vermelha interagem com os anéis aromáticos existentes na lignina (DUJARDIN, 1964).

A hipótese de que os *primers* utilizados não se acoplam a região do 5,8S do rDNA de espécies de *Cedrela* é pouco provável, primeiramente porque o controle positivo utilizado corresponde a um isolado de DNA de *Cedrela fissilis* e foram analisadas mais de 100 sequências disponíveis no GENBANK e em todas os *primers* utilizados poderiam se acoplar nessas, a amostra U1 teve portanto seu DNA original quase completamente degradado pelos fungos da podridão branca.

Na imagem de microscopia eletrônica de varredura (FIGURA 24) da secção transversal da amostra U1 é possível observar a hifa de um fungo dentro de um elemento de vaso.

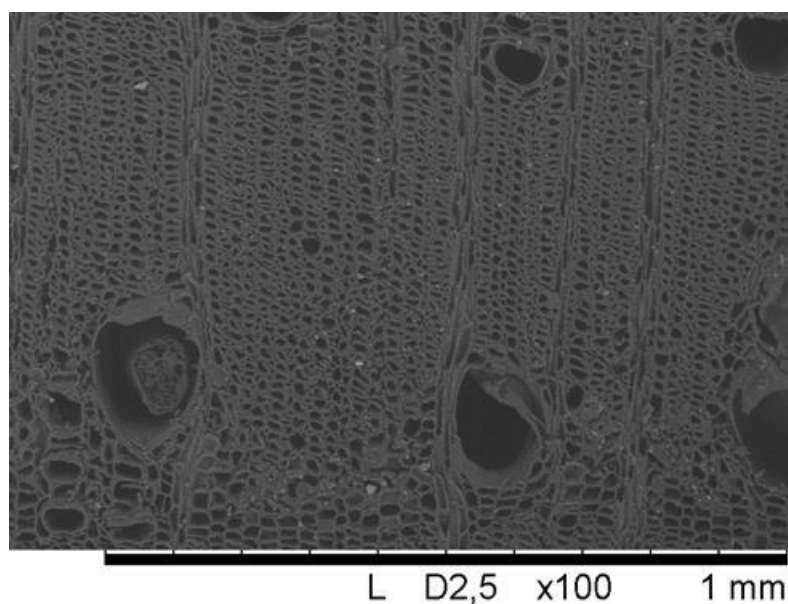


FIGURA 24 – IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA INDICANDO HIFA NO INTERIOR DE ELEMENTO DE VASO DA AMOSTRA U1.
FONTE: O AUTOR (2015).

4.2.3 Sequenciamento de DNA

As bandas sequenciadas e o eventual resultado do sequenciamento encontram-se no QUADRO 03. Ao todo foram obtidas nove sequências. Oito delas para os isolados obtidos na extração em pequena escala (U2, U3, U4 e U5). A extração em grande escala foi capaz de viabilizar a amplificação de DNA a partir das amostras U1, L1, L2 e L3, porém apenas as sequências da região do ITS1 de L1 e L3 puderam ser lidas, sendo L3 DNA contaminante de fungos.

QUADRO 03 – DIAGNÓSTICO DAS BANDAS SEQUENCIADAS. X= SEQUENCIADO COM SUCESSO, -= NÃO SEQUENCIADO.
FONTE: O AUTOR (2015).

REGIÃO SEQUENCIADA				
	ITS 1	ITS 2	ITS completo	SEQUÊNCIA
U1	-	Contaminado	-	-
U2	x	x	-	FIGURA 26 e 27
U3	x	x	-	FIGURA 26 e 27
U4	x	x	-	FIGURA 29 e 30
U5	x	x	-	FIGURA 26 e 27
L1	x	-	-	FIGURA 32
L2	-	-	Contaminado	FIGURA 33
L3	Fungo	Contaminado	-	FIGURA 34

4.2.3.1 Sequenciamento e identificação de U2, U3 e U5.

O resultado do sequenciamento das amostras U2, U3 e U5 mostram que as três amostras tem sequências idênticas para a região do ITS. Para o sequenciamento da região do ITS1 observou-se a existência de cópias parálogas nessa região, havendo uma inserção ou deleção de guanina entre as bases 246 e 247 de diferença entre as duas cópias no rDNA das amostras.

Essa alteração foi observada e descoberta apenas observando-se a diferença entre os eletroferogramas dos sequenciamentos nos dois sentidos dos produtos de PCR, e transcrevendo as sequências manualmente, não houve a necessidade de clonagem. Essa análise levou a duas sequências possíveis para os indivíduos estudados. Os eletroferogramas dos dois sentidos de sequenciamento das três amostras encontram-se na FIGURA 25, para as leituras no sentido 5'-3' o reverso complemento foi apresentado.

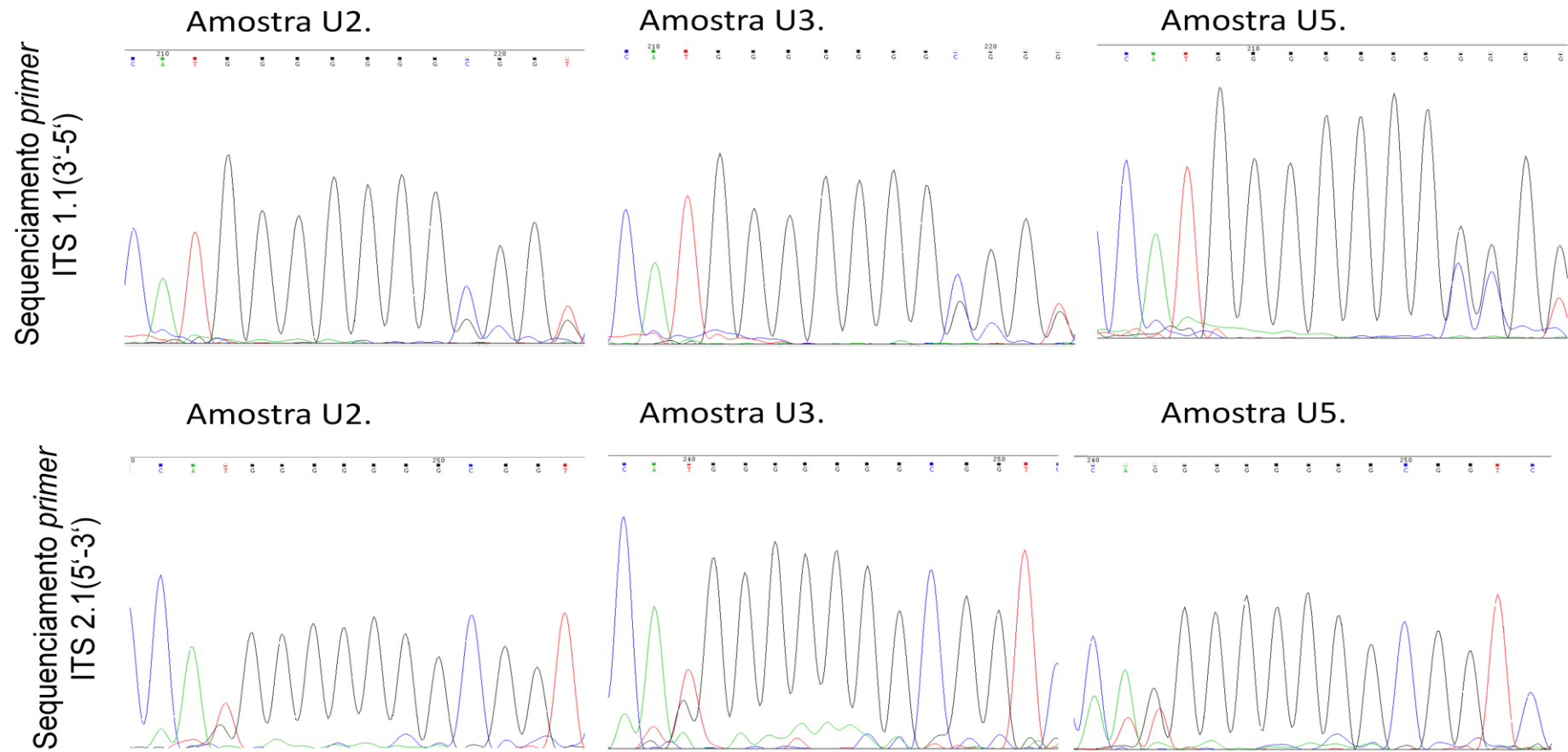


FIGURA 25 – INCONFORMIDADE ENTRE OS ELETROFEROGRAMAS DOS SEQUENCIAMENTOS NAS DIREÇÕES 3'-5' E 5'-3' (REVERSO COMPLETO APRESENTADO) PARA A REGIÃO DO ITS1 DAS AMOSTRAS U2, U3 e U5. FONTE: O AUTOR (2015).

Esse tipo de divergência paráloga intraindividual para a região do ITS do DNA ribossômico já foi reportada para angiospermas dicotiledôneas por Wendel *et al.* (1995) e Razafimandimbison *et al.* (2004), para angiospermas monocotiledôneas Zhang *et al.* (2002), para gimnospermas Gernandt *et al.* (2001) e para algas Behnke *et al.* (2004). Esses estudos sugerem que a principal causa para essa variabilidade está relacionada à hibridação interespecífica e a poliploidia, possível para o DNA nuclear ribossomal devido à sua origem biparental.

No caso das amostras U2, U3 e U5 a possibilidade de parentesco é grande, pois as amostras advêm exatamente da mesma área de desmate.

As duas sequências obtidas para as amostras U2, U3 e U5 apresentaram comprimentos de 719pb e 720pb. Optou-se por utilizar a sequência mais curta como referência para o uso da ferramenta BLAST. Como resultado da busca de sequência semelhantes, as 100 primeiras sequências tiveram nível de identidade variando de 98% a 91% e *e-value* de 0,0 em todos os casos, ou seja os alinhamentos são reais e não meramente produtos do acaso, os valores de *score* variaram de 1245 a 965 bits.

Segundo as analogias entre as regiões do ITS a provável identidade das amostras U2, U3 e U5 é a de um integrante do gênero *Chrysophyllum*. As onze sequências com maiores valores de *score* para a busca no Genbank encontram-se na TABELA 06 assim como a espécie da qual advém.

TABELA 06 – AS ONZE SEQUÊNCIAS DO ITS COM MAIOR SIMILARIDADE A U2, U3 E U5 DISPONÍVEIS NO GENBANK.

Codigo sêquencia	Espécie	Score	E-value	Identidade	Gap
gi156106153	<i>Chrysophyllum imperiale</i>	1245bits(674)	0	709/725(98%)	6/725 (0%)
gi4934964	<i>Sapotaceae sp.</i>	1033bits(559)	0	675/729(93%)	15/729(2%)
gi121755747	<i>Planchonella crenata</i>	1026bits(555)	0	676/731(92%)	21/731(2%)
gi121755757	<i>Planchonella povilana</i>	1026bits(555)	0	676/731(92%)	21/731(2%)
gi76446170	<i>Planchonella rheophytopsis</i>	1026bits(555)	0	676/731(92%)	21/731(2%)
gi49344910	<i>Planchonella kaalensis</i>	1026 bits(555)	0	676/731(92%)	21/731(2%)
gi49344928	<i>Niemeyera balansae</i>	1022 bits(553)	0	673/729(92%)	15/729(2%)
gi121755756	<i>Planchonella povilana</i>	1020 bits(552)	0	675/731(92%)	21/731(2%)
gi49344938	<i>Ochrothallus gordoniiifolius</i>	1016 bits(550)	0	675/732(92%)	21/732(2%)
gi121755745	<i>Planchonella contermina</i>	1014 bits(549)	0	673/729(92%)	23/729(3%)
gi49344950	<i>Pouteria lauracea</i>	1011 bits(547)	0	674/732(92%)	21/732(2%)

FONTE: O AUTOR (2015).

Das espécies listadas apenas a décima primeira amostra corresponde ao gênero *Pouteria*, e se analisada a árvore de agrupamento de vizinhos para essas onze sequências (FIGURA 26), de fato as sequências da região do ITS das amostras U2, U3 e U5 estão mais próximas do gênero *Chrysophyllum*.

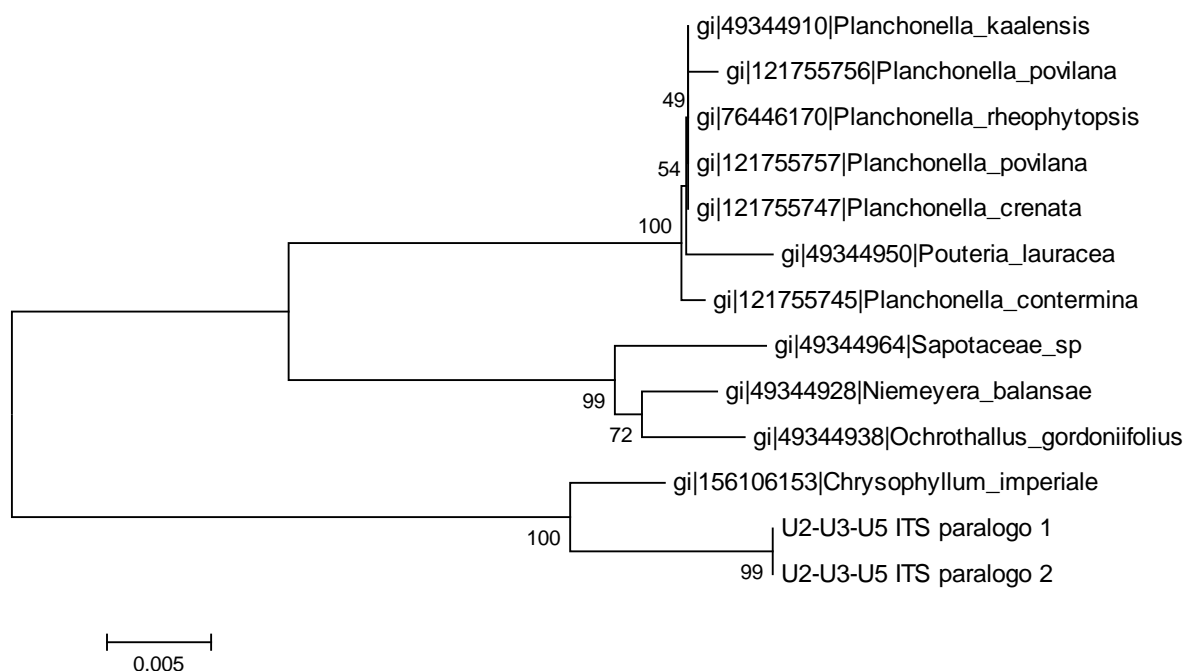


FIGURA 26 – ÁRVORE DE AGRUPAMENTO DE VIZINHOS PARA AS 11 SEQUÊNCIAS OBTIDAS DO GENBANK E OS DOIS PARÁLOGOS DA REGIÃO DO ITS DE U2, U3 e U5. FONTE: O AUTOR (2015).

A sequência gi156106153 da espécie *Chrysophyllum imperiale* foi obtida por Sweson *et al.* (2008). As 719 bases nucleotídicas da sequência U2-U3-U5 alinham-se a 725 bases da sequência da espécie *C. imperiale* havendo divergências entre 10 bases e 6 deleções ou inserções que levaram a *gaps*.

Essas diferenças e *gaps* podem ser melhor observadas nas FIGURAS 27 e 28, onde as sequências de U2, U3 e U5 estão alinhadas com a sequência de *C. imperiale*. As figuras também permitem a observação dos loci (1, 3, 4 e 5) onde os primers utilizados na amplificação das sequências acoplam-se e o locus 2 onde a divergência entre as duas cópias parálogas da região do ITS da amostra.

A espécie *C. imperiale* é encontrada em florestas de baixa altitude nos estados brasileiros de Rio de Janeiro e Minas Gerais (PENNINGTON, 1990) o gênero *Chrysophyllum*, no entanto, é amplamente representado no Brasil, existindo no país trinta e uma espécies desse gênero e oito subespécies (PINTO *et al.*, 2012).

A própria filogenia da família Sapotaceae não é algo completamente estudado, devido à grande diversidade de espécies aliada à alta homoplasia dos caracteres morfológicos, as opiniões quanto às delimitações genéricas e as classificações intrafamiliares divergem entre os taxonomistas. A última revisão taxonômica para a família foi realizada por Pennington (1990, 1991) e essa foi mais recentemente questionada por Anderberg e Swenson (2003) e Swenson *et al.* (2008) que encontraram resultados diferentes usando marcadores biomoleculares associados aos caracteres morfológicos.

Muitos pesquisadores defendem a anatomia da madeira como critério para a classificação taxonômica desse grupo de espécies (KUKACHKA, 1978; COSTA, 2006). No caso das amostras U2, U3 e U5 a convergência dos resultados da morfologia do xilema secundário e região do ITS dá subsídios para afirmação de que as amostras advém de um *táxon* do gênero *Chrysophyllum*.

Sequências de U2, U3, U5 e *Chrysophyllum imperiale*.

```

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50
U2-U3-U5_ (1)      1 GAACCTGCGG AAGGATCATT GTCGAAACCT GCCAAGCAGA AAGACCCGCG
U2-U3-U5 (2)      GAACCTGCGG AAGGATCATT GTCGAAACCT GCCAAGCAGA AAGACCCGCG
gb|EF558615.1| Chrysophyllum
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      60      70      80      90     100
U2-U3-U5_ (1)      AACTAGTATA --GCAACCAC AGGGGGGTGC TAGTGGCGGG CTTGACTGTC
U2-U3-U5 (2)      AACTAGTATA --GCAACCAC AGGGGGGTGC TAGTGGCGGG CTTGACTGTC
gb|EF558615.1| Chrysophyllum
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      110     120     130     140     150
U2-U3-U5_ (1)      CCCGCTCTCT ACCCCCCTCG TCGGGTGCGC TATTGAATTG CGTTCCTCGG
U2-U3-U5 (2)      CCCGCTCTCT ACCCCCCTCG TCGGGTGCGC TATTGAATTG CGTTCCTCGG
gb|EF558615.1| Chrysophyllum
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      160     170     180     190     200
U2-U3-U5_ (1)      CAAAAACAA ACCCCGACGC AAATCGCGTC AAGGAACTCA AACAAAGAGAA
U2-U3-U5 (2)      CAAAAACAA ACCCCGACGC AAATCGCGTC AAGGAACTCA AACAAAGAGAA
gb|EF558615.1| Chrysophyllum
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      210     220     230     240     250
U2-U3-U5_ (1)      GAGA--CTTC GGTCCCCC-- GGTTCCTCGT CGCGAGTAAA GCCATGGGGG
U2-U3-U5 (2)      GAGA--CTTC GGTCCCCC-- GGTTCCTCGT CGCGAGTAAA GCCATGGGGG
gb|EF558615.1| Chrysophyllum
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      260     270     280     290     300
U2-U3-U5_ (1)      GG-CGGTTCG ATCCTTCATG AACATAACGA CTCTCGGCAA CGGATATCTC
U2-U3-U5 (2)      GGGCGGTTCG ATCCTTCATG AACATAACGA CTCTCGGCAA CGGATATCTC
gb|EF558615.1| Chrysophyllum
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310     320     330     340     350
U2-U3-U5_ (1)      GGCTCTCGCA TCGATGAAGA ACGTAGCGAA ATGCGATACT TGGTGTGAAT
U2-U3-U5 (2)      GGCTCTCGCA TCGATGAAGA ACGTAGCGAA ATGCGATACT TGGTGTGAAT
gb|EF558615.1| Chrysophyllum
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      360     370     380     390     400
U2-U3-U5_ (1)      TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTCTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG
U2-U3-U5 (2)      TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTCTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG
gb|EF558615.1| Chrysophyllum
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      410     420     430     440     450
U2-U3-U5_ (1)      CCATTAGGCC GAGGGCACGT CTGCCTGGGC GTCTCACATC GCGCCGCCCC
U2-U3-U5 (2)      CCATTAGGCC GAGGGCACGT CTGCCTGGGC GTCTCACATC GCGCCGCCCC
gb|EF558615.1| Chrysophyllum
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      460     470     480     490     500
U2-U3-U5_ (1)      TCGCCTTGCG CCCATAAAGG GTTCTTGGGT TGATGGGGGC GGGATTTTGG
U2-U3-U5 (2)      TCGCCTTGCG CCCATAAAGG GTTCTTGGGT TGATGGGGGC GGGATTTTGG
gb|EF558615.1| Chrysophyllum

```

FIGURA 27 – SEQUÊNCIAS DA REGIÃO DO ITS PARA AS AMOSTRAS U2, U3 E U5 JUNTO COM AS DUAS SEQUÊNCIAS DE MAIOR SIMILARIDADE DISPONÍVEIS NO GENBANK. (1pb a 400pb). 1= Locus do *primer* ITS1.1, 2= Locus de inserção ou deleção de guanina entre as sequências, 3= Locus do *primer* ITS 3.1, 4= Locus do *primer* ITS2.1. FONTE: O AUTOR (2015).

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      510      520      530      540      550
U2-U3-U5_(1) CCCCCCGTGT GCCCTTAGTG CGTGGTCGGC CTAAAGATGA GTCCTGGCG
U2-U3-U5_(2) CCCCCCGTGT GCCCTTAGTG CGTGGTCGGC CTAAAGATGA GTCCTGGCG
gb|EF558615.1| Chrysophyllum

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      560      570      580      590      600
U2-U3-U5_(1) ACGAACGTCA CGATGAGTGG TGGATGTTAT AAGCGTTGCG TCATGTCGTG
U2-U3-U5_(2) ACGAACGTCA CGATGAGTGG TGGATGTTAT AAGCGTTGCG TCATGTCGTG
gb|EF558615.1| Chrysophyllum

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      610      620      630      640      650
U2-U3-U5_(1) CACGTCTCGT CGTAAAGGGT TATTTGTATT TTTGACCTTG AAAGCACCGT
U2-U3-U5_(2) CACGTCTCGT CGTAAAGGGT TATTTGTATT TTTGACCTTG AAAGCACCGT
gb|EF558615.1| Chrysophyllum

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      660      670      680      690      700
U2-U3-U5_(1) TTCCACGGAG CCTCGTTCGC GACCCAGGT CAGGCGGGAT TACCCGCTGA
U2-U3-U5_(2) TTCCACGGAG CCTCGTTCGC GACCCAGGT CAGGCGGGAT TACCCGCTGA
gb|EF558615.1| Chrysophyllum

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      710      720
U2-U3-U5_(1) GTTTAAGCAT ATCAATAAGC GGAGGA 5
U2-U3-U5_(2) GTTTAAGCAT ATCAATAAGC GGAGGA
gb|EF558615.1| Chrysophyllum GTTTAAGCAT ATCAATAAGC GGAGGA

```

FIGURA 28 – SEQUÊNCIAS DA REGIÃO DO ITS PARA AS AMOSTRAS U2, U3 E U5 JUNTO COM AS DUAS SEQUÊNCIAS DE MAIOR SIMILARIDADE DISPONÍVEIS NO GENBANK. (401pb a 730pb). 5=Locus do *primer ITS4*. FONTE: O AUTOR (2015).

4.2.3.2. Sequenciamento e identificação de U4

O sequenciamento para os produtos de PCR de U4 foi efetivo e as sequências obtidas puderam ser devidamente alinhadas. A região do ITS completa pode ser usada como *query* (questão) da ferramenta de BLAST.

O resultado inicial do BLAST da sequência retornou as 100 primeiras sequências de maior *score*. A sequência de maior *score* teve 1194bits enquanto a centésima sequência apresentou 970bits. O nível de identidade variou de 99 a 93% e o *e-value* foi de 0,0 para todas as sequências. Uma limitação das sequências disponíveis está nos seus comprimentos, apenas uma sequência disponível no

Genbank teve comprimento suficiente para cobrir toda a sequência de U4, porém essa sequência teve nível de identidade de apenas 96%. Os valores de cobertura das sequências variaram de 100 a 78%.

Na TABELA 07 estão apresentadas as 11 sequências do GEBANK® com maiores valores de *score* para a busca utilizando a ferramenta BLAST.

O resultado da busca convergiu com o indicado pela anatomia da madeira e somente sequências dos *taxa Nectandra* e *Ocotea* estiveram entre os resultados.

Quando alinhadas as sequências dessas 11 espécies e obtida a árvore de agrupamento de vizinhos delas (FIGURA 29), pode-se ver a sequência de U4 agrupada mais próximo dos representantes do gênero *Nectandra*.

TABELA 07 – AS ONZE SEQUÊNCIAS DO ITS COM MAIOR SIMILARIDADE A U4 DISPONÍVEIS NO GENBANK.

Codigo sêquencia	Espécie	Score	E-value	Identidade	Gap
gi14090766	<i>Nectandra cuspidata</i>	1194 bits(646)	0	654/658(99%)	0/658(0%)
gi305855571	<i>Nectandra nitidula</i>	1140 bits(617)	0	623/626(99%)	0/626(0%)
gi14090769	<i>Nectandra salicifolia</i>	1140 bits(617)	0	684/716(96%)	8/716(1%)
gi111120488	<i>Ocotea aciphylla</i>	1129 bits(611)	0	680/711(96%)	13/711(1%)
gi14090770	<i>Nectandra turbacensis</i>	1129 bits(611)	0	626/633(99%)	1/633(0%)
gi305855569	<i>Nectandra cuspidata</i>	1129 bits(611)	0	626/633(99%)	1/633(0%)
gi14090767	<i>Nectandra psammophila</i>	1123 bits(608)	0	625/633(99%)	2/633(0%)
gi240248185	<i>Nectandra amazonum</i>	1114 bits(603)	0	641/657(98%)	11/657(1%)
gi305855569	<i>Nectandra lanceolata</i>	1105 bits(598)	0	609/614(99%)	1/614(0%)
gi111120472	<i>Ocotea cf. glaziovii</i>	1085 bits(587)	0	659/693(95%)	8/693(1%)
gi305855582	<i>Ocotea lancifolia</i>	1083 bits(586)	0	635/658(97%)	5/658(0%)

FONTE: O AUTOR (2015).

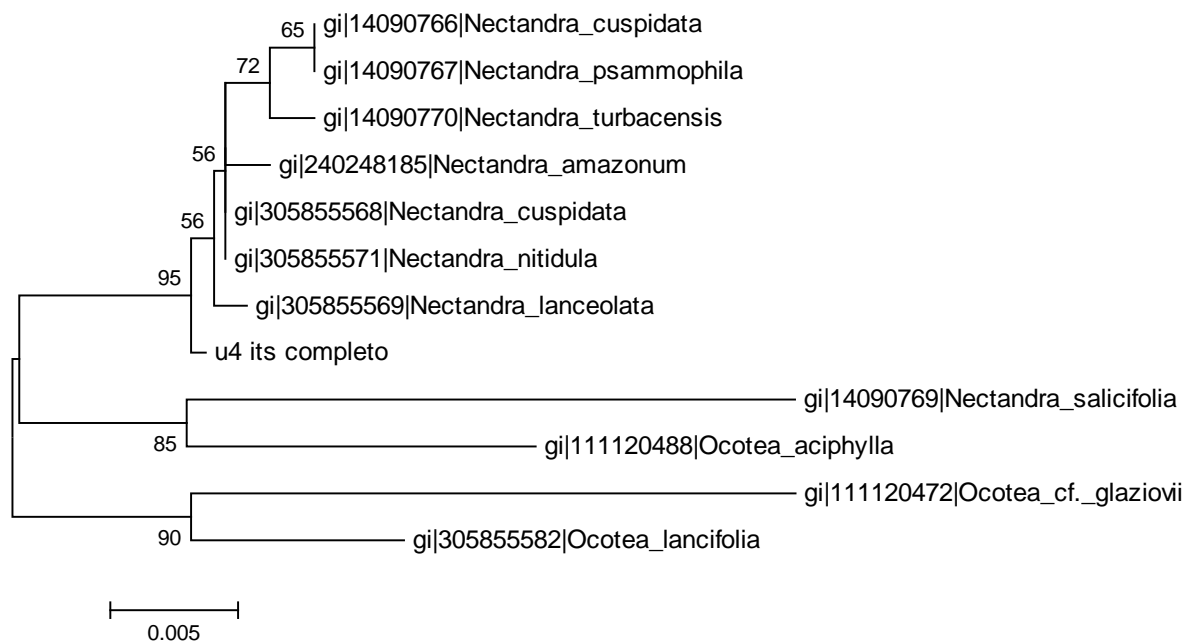


FIGURA 29 – ÁRVORE DE AGRUPAMENTO DE VIZINHOS PARA AS 11 SEQUÊNCIAS OBTIDAS DO GENBANK E A REGIÃO DO ITS DE U4. FONTE: O AUTOR (2015).

Ocotea odorifera é a única espécie oficialmente ameaçada de extinção da família Lauraceae representada no banco de dados do GENBANK, com duas sequências para a região do ITS2. Essas sequências têm um nível de similaridade de 96% com a sequência de U4 e tem *score* muito abaixo do obtido para *Nectandra cuspidata*.

De todas as espécies de *Nectandra* resultados da ferramenta BLAST, *Nectandra cuspidata* é a única espécie com ocorrência na Floresta Estacional Semidecidual (ZANON *et al.*, 2009) e é justamente a mais próxima, com 99% de identidade.

Seria de grande valia se as sequências das espécies *Ocotea porosa* e *Ocotea odorifera* também estivessem presentes nessa lista, embora sabidamente a região do ITS permita a inferência taxonômica e evolutiva de espécies, a preocupação está no fato do gênero *Ocotea* ser muito variável morfologicamente, servindo como última

opção para espécies que não são prontamente acomodadas em outros gêneros (VAN DER WERFF, 1991).

O conjunto dos resultados da anatomia da madeira conciliada com a análise e comparação da região do ITS da amostra indica que a amostra U4 é um representante do gênero *Nectandra* e o provável táxon *N. cuspidata*. Porém o aumento no número de sequências para um número maior de espécies e espécimes pode amplificar a resolução dessa identificação, trabalhos se fazem necessários nesse sentido.

O alinhamento da sequência da região do ITS da amostra U4 com uma espécie do gênero *Nectandra* é apresentada nas FIGURAS 30 e 31.

Sequência U4 e Nectandra

```

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50
u4 its completo 1 GAACCTGCGG AAGGATCATT GCCGTCTCTA GAACCACCAC CGGCGAACCA
gi|14090769 Nectandra GAACCTGCGG AAGGATCATT GCCGTCTCTA GAACCACCAC CGGCGAACCA

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      60      70      80      90     100
u4 its completo  --GTCCCCGT GAAACGCGC CTCGCGGCGC GCGGCACCCG GGGGAGGACC
gi|14090769 Nectandra CAGTCCCCGC GAAAGGCGC CTAGCGGCGC GCGGC--CCG GGGGAGGACC

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      110     120     130     140     150
u4 its completo  C-GGGGACGC GCGTCCCGTC GAGCTCCGAA CAAACCCCTCT GGGCGCGGCG
gi|14090769 Nectandra CCGGGGACGC GCGTCCCGGC GAGCTYGGAA CAAACCCCTCT GGGCGCGGCG

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      160     170     180     190     200
u4 its completo  AGCGCCAAGG AATCGAAGCG GAAAGGGCGG CCGCCCCGCC CGGTGCGGGC
gi|14090769 Nectandra AGCGCCAAGG AATCGAAGCG GAAAGGGCGG CCGCTCGGCC CGGC GCGGGC

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      210     220     230     240     250
u4 its completo  ACGCCCCGAA AGGCGACGCG GCACCGCGGT GGGGGATCCG CCGCCCCGTCT
gi|14090769 Nectandra ACGCCCCGAA AGGGGATGCG GCGCCGCGGC GGGGGATCCG CCGCCCCGTCT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      260     270     280     290     300
u4 its completo  GTGAATTCTC TCAGACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
gi|14090769 Nectandra GTGAAT-CTC TGAGACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310     320     330     340     350
u4 its completo  GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG CAGAATCCCCG 3
gi|14090769 Nectandra GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG CAGAATCCCCG

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      360     370     380     390     400
u4 its completo  TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC GCCCGAGGCC CACTCGGCCG
gi|14090769 Nectandra TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC GCCCGAGGCC -GCTCGGCCG

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      410     420     430     440     450
u4 its completo  AGGGCACGCC TGCCTGGGCG TCACGCCACC CCTCGCCCCC CCCGCGGCAT
gi|14090769 Nectandra AGGGCACGCC TGCCTGGGCG TCACGCCACC CATCGCCCCC CC-GCGGCAT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      460     470     480     490     500
u4 its completo  TCCCATGCCC CGCCGGGGAG CGGAGACTGG CCGTCCGTGC CCGAGCCCTC
gi|14090769 Nectandra TCCCATGCAC GGCCGGGGAG CGGAGACTGG CCGTCCGTGC CCGAGCCCTC

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      510     520     530     540     550
u4 its completo  GGCGCGCGGT CGGCAGAAAA GGAGGGCACC GTGCGGCGCG ACACGGCGTG
gi|14090769 Nectandra GGCGCGCGGT CGGCAGAAAA GGAGGGCACC GTGCGGCGCG ACACGGCGTG

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      560     570     580     590     600
u4 its completo  TGGGGGTTGA GAGGCGATCC GTCGCCGATC GTACGTGCGC CCCGCATTCC
gi|14090769 Nectandra TGGGGGTTGA GAGGCGATTC GTCGCCGACC GTACGTGCGC CCGGCATTCC

```

FIGURA 30 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA NA REGIÃO DO ITS DE U4 E A SEQUÊNCIA DE *Nectandra salicifolia* 1= Locus do primer ITS1.1, 2= Locus do primer ITS 3.1, 3= Locus do primer ITS2.1.

FONTE: O AUTOR (2015).


```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      610      620      630      640      650
u4 its completo  GCCGCGCGGT GCCGCCCGTG GGACCAGACT TCGCCCGCAG CCGCGGGCGC
gi|14090769 Nectandra  GCCGCGCGGT CTGCCCCGTG GGACCAGACT CCGCCCGCAG CCGCGGGCGC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      660      670      680      690      700
u4 its completo  TCGGACCGCG ACCCCAGGTC AGGCGTGGCC ACCCGTGAA TTTAAGCATA
gi|14090769 Nectandra  TCGGACCGCG ACCCCAGGTC AGGCGTGGCC ACCCGTGAA TTTAAGCATA

      ....|....| ....|.
      710
u4 its completo  TCAATAAGCG GAGGAG 4
gi|14090769 Nectandra  TCAATAAGCG GAGGAG

```

FIGURA 31 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA NA REGIÃO DO ITS DE U4 E A SEQUÊNCIA DE *Nectandra salicifolia*. 4= Locus do primer ITS4.
 FONTE: O AUTOR (2015).

4.2.3.3 Sequenciamento e identificação de L1.

O sequenciamento da região ITS1 da amostra L1 teve sucesso e as duas sequências obtidas puderam ser sobrepostas gerando uma sequência de 330pb.

O resultado da busca no banco de dados do GENBANK rendeu 100 sequências todas de indivíduos da família Rhamnaceae. As 11 sequências de maior *score* encontram-se apresentadas na TABELA 10. Os dois primeiros resultados foram de integrantes do gênero *Hovenia*.

TABELA 08 – AS ONZE SEQUÊNCIAS DO ITS COM MAIOR SIMILARIDADE A L1 DISPONÍVEIS NO GENBANK.

Codigo sêquencia	Espécie	Score	E-value	Identidade	Gap
gi76363116	<i>Hovenia dulcis</i>	475 bits(257)	2,00E-130	300/321(93%)	1/321(0%)
gi76363117	<i>Hovenia trichocarpa</i>	411 bits(222)	5,00E-111	289/322(90%)	2/322(0%)
gi76363095	<i>Ziziphus horsfieldii</i>	355 bits(192)	2,00E-94	286/330(87%)	11/330(3%)
gi76363089	<i>Ziziphus calophylla</i>	353 bits(191)	8,00E-94	288/333(86%)	14/333(4%)
gi76363102	<i>Ziziphus mucronata</i>	350 bits(189)	1,00E-92	284/329(86%)	10/329(3%)
gi313358164	<i>Emmenosperma sp</i>	346 bits(187)	1,00E-91	282/327(86%)	9/327(2%)
gi451172878	<i>Ziziphus mauritiana</i>	344 bits(186)	5,00E-91	284/330(86%)	11/330(3%)
gi76363110	<i>Ziziphus rugosa</i>	342 bits(185)	2,00E-90	285/332(86%)	12/332(3%)
gi18028437	<i>Alphitonia aff. incana</i>	342 bits(185)	2,00E-90	280/325(86%)	9/325(2%)
gi451172878	<i>Ziziphus mauritiana</i>	340 bits(184)	6,00E-90	284/331(86%)	12/331(3%)
gi76363111	<i>Ziziphus spina-christi</i>	340 bits(184)	6,00E-90	283/330(86%)	11/330(3%)

FONTE: O AUTOR (2015).

Quando alinhadas essas sequências e montada a árvore de agrupamento de vizinhos entre elas (FIGURA 32), percebe-se a clara separação das sequências do gênero *Hovenia* dos demais integrantes da família Rhamnaceae. E a aproximação da sequência de L1 a espécie *Hovenia dulcis*, a uva do Japão.

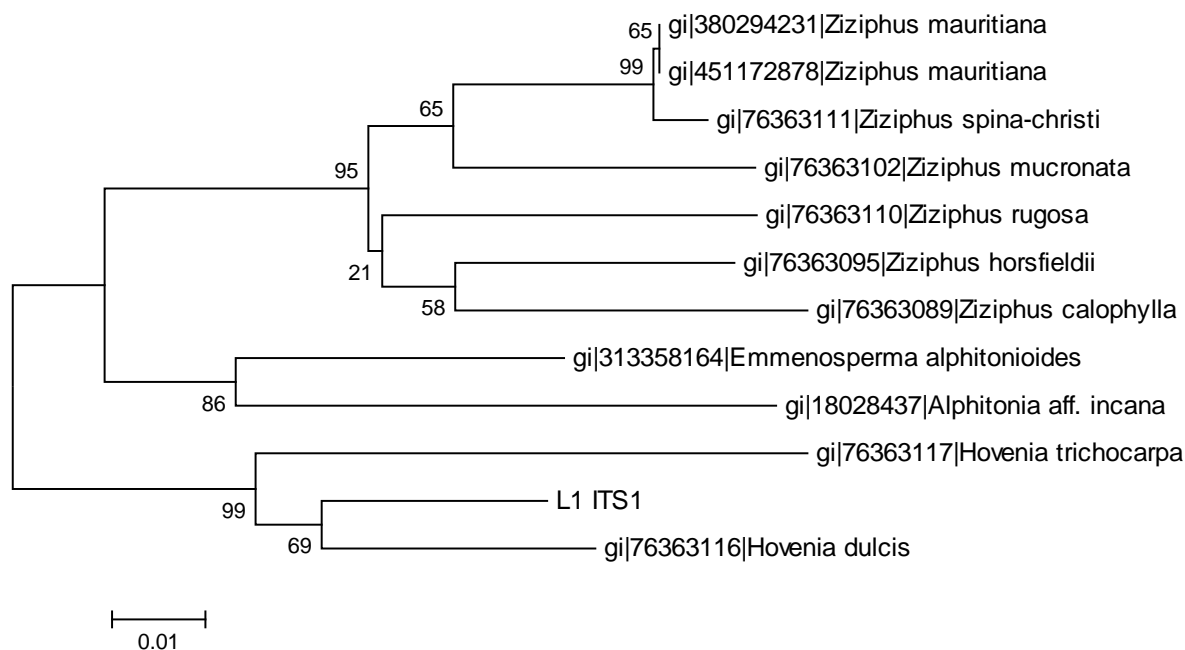


FIGURA 32 – ÁRVORE DE AGRUPAMENTO DE VIZINHO PARA AS 11 SEQUÊNCIAS OBTIDAS DO GENBANK E A REGIÃO DO ITS1 DE L1. FONTE: O AUTOR (2015).

Na flora nativa brasileira ocorrem naturalmente 13 gêneros da família das Rhamnaceae, os quais são: *Alvimiantha*, *Ampelozizyphus*, *Colletia*, *Colubrina*, *Condalia*, *Crumenaria*, *Discaria*, *Gouania*, *Reissekia*, *Rhamnidium*, *Rhamnus*, *Scutia*, *Zizyphus* (SOUZA; LORENZI, 2005; LIMA, 2010).

No Banco de dados do GENBANK estão representados somente os gêneros *Condalia* com duas sequências para o ITS, *Crumenaria* com uma sequência para a região do ITS2, *Reissekia* com uma sequência e *Zizyphus*, que esteve entre as 11 sequências mais próximas da de L1.

Para uma identificação com maior resolução seriam bem vindas sequências da região do ITS de indivíduos do gênero *Rhamnus*, pois espécies desse gênero encontram-se distribuídas no sul do país e têm características anatômicas semelhantes às de *Hovenia* spp., porém os vasos têm dimensões menores que as da amostra L1 e são normalmente obstruídos (SANTOS, 2008).

A amostra L1 corresponde à espécie exótica invasora *Hovenia dulcis* Thun. O alinhamento da sequência do ITS1 de L1 com as duas sequências para indivíduos de *Hovenia* encontram-se na FIGURA 33. A região de acoplamento do primer ITS2.1 não apresentou boa resolução e foi preferivelmente cortada fora das análises realizadas.

Sequência da região do ITS1 de L1 e duas sequências de *Hovenia* spp.

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                10      20      30      40      50
L1 ITS1      1 AGGATCATTG TCGAAACCTG CACAGCAGAA CGACCCGCGA ACCCGTAAAA
gi|76363116|Hovenia d AGGATCATTG TCGAAACCTG CACAGCAGAA CGACCCGTGA ACCCGTAAAA
gi|76363117|Hovenia t AGGATCATTG TCGAAACCTG CATCGCAGAA CGACCCGCGA ACCCGTAAAA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                60      70      80      90     100
L1 ITS1      ACACACCGGG GGGCTCGGGG CCACATGCCT CGTACCCCTT TTGGTCGGGG
gi|76363116|Hovenia d ACACACCGGG GGGCCCGGGG CCACAGGCCC TGTGCCCTCT TTGGTCGGGG
gi|76363117|Hovenia t ACATATCGGG GGGCCCGGGG CCTCAGGCCA CGGACCCCTT TTGGTCGGGG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                110     120     130     140     150
L1 ITS1      GCTGCACCCG TGACCCGC-T GCGGGTGAC GTGTGCCGCT CTCCCGGCCG
gi|76363116|Hovenia d GCTGCACCCG TGACCCGCCT GCCGGTGCGC GGTGCCGCT CTCCCGGCCG
gi|76363117|Hovenia t GCTGCACCCG TGACCCGCCT GTCGGTGAC GGTGCCGCC CTCTCGGCCG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                160     170     180     190     200
L1 ITS1      CACAAACGAA CCCC GGCGCA AACCGGCCA AGGAAAACCC AACGGATTGG
gi|76363116|Hovenia d CACAAACGAA CCCC GGCGCA AACCGGCCA AGGAAAACCC AACGAATTGG
gi|76363117|Hovenia t CACAAACGAA CCCC GGCGCA AACCGGCCA AGGAAAACCC AACGAATCGG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                210     220     230     240     250
L1 ITS1      CATCGCCCCG TCGCCCCAGA AATGGTGCGC GGTCCGGGGT TGCGTCGTAT
gi|76363116|Hovenia d CATCGCCCCG TCGCCCCAGA GATGGCGTGC GGTCCGGGGT TGCGTCGTAT
gi|76363117|Hovenia t CACTGCCCCG TCGCCCCGGA GACGGTGTGC GATCGGGGCG TCGCCTGTGC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                260     270     280     290     300
L1 ITS1      TCTATC-AAT GTCAAACGA CTCTCGGCAA CGGATATCTC GGCTCTCGCA
gi|76363116|Hovenia d TCTGTT-AAT GTCAAACGA CTCTCGGCAA CGGATATCTC GGCTCTCGCA
gi|76363117|Hovenia t TATATTTAAT GTCAAACGA CTCTCGGCAA CGGATATCTC GGCTCTCGCA

      ....|....| ....|....| .
                310     320
L1 ITS1      TCGATGAAGA ACGTAGCGAA A
gi|76363116|Hovenia d TCGATGAAGA ACGTAGCGAA A
gi|76363117|Hovenia t TCGATGAAGA ACGTAGCGAA A

```

FIGURA 33 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO DO ITS1 DE L1 COM SEQUÊNCIAS DE *H. dulcis* E *H. trichocarpa*. 1=Locus parcial do primer ITS1.1, 2= Locus do primer ITS3.1

FONTE: O AUTOR (2015).

4.2.3.4 Sequenciamento e Identificação de U1, L2 e L3.

O sequenciamento das bandas da região do ITS2 de U1 e L3 e das duas bandas da região completa do ITS de L2 retornaram eletroferogramas dos quais não foi possível obter uma sequência confiável. Na FIGURA 34 está apresentado parte do eletroferograma resultado do sequenciamento da banda obtida com o uso dos primers ITS1.1/ITS4 na amplificação de L2. Esse tipo de comportamento indica a inespecificidade dos *primers* aplicados ou, o que é mais provável, a contaminação do isolado DNA com DNA de fungos. Eletroferogramas como esse também foram observados para a região do ITS2 de U1 e L3.

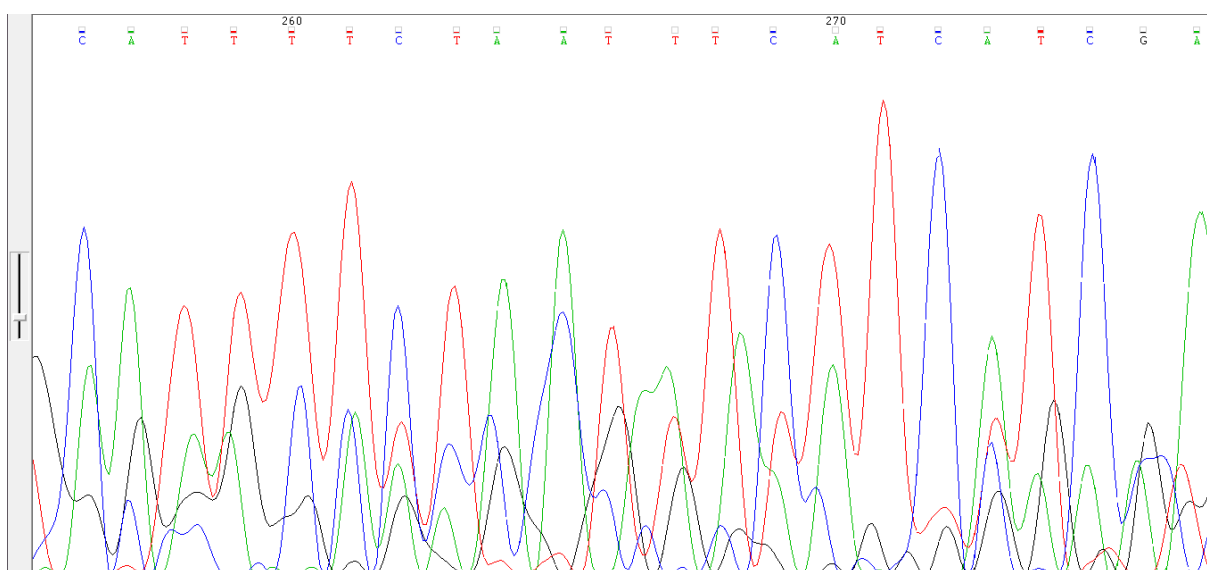


FIGURA 34 – ELETROFEROGRAMA DO SEQUÊNCIAMENTO NA DIREÇÃO 3'-5' DA BANDA AMPLIFICADA PARA L2.
FONTE: O AUTOR (2015).

O primer ITS4 foi desenvolvido por White *et al.* (1990) e apresentado em um protocolo de reação de PCR para amplificação da região do ITS para fungos.

O primer ITS2.1 não deveria acoplar-se a DNA de fungos, porém o sequenciamento da banda obtida para a região do ITS1 de L3 provou o contrário. A sequência resultante teve o comprimento de 317pb e quando realizada a busca de

BLAST teve-se como resultado sequências da região do ITS de fungos do gênero *Phialophora*.

Esse gênero engloba alguns fungos deterioradores de madeira (BLANCHETTE *et al.*, 2004) e muitas das espécies são bolores manchadores da madeira (SCHIMIDT, 2006).

Nesse caso o interesse não é identificar a espécie de fungo atacando a madeira, mas, sim demonstrar que os *primers* desenvolvidos por Hansen *et al.* (2011) são seletivos para DNA vegetal, mas em alguns casos podem vir a amplificar DNA contaminante de fungos.

Na FIGURA 35 a sequência obtida para a região do ITS do isolado L3 alinhada com as sequências de dois fungos do gênero *Phialophora*. A principal diferença entre as sequências está nos comprimentos 308 e 309 pb (locus 2), exatamente nessa região acopla-se o *primer* ITS 2.1.

Fungos como esse, quando presentes na madeira podem vir a ser um problema para a amplificação da região do ITS e o uso dessa região como ferramenta de identificação de espécies.

Sequência ITS1 de L3 e duas sequências de *Phialophora*

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      10      20      30      40      50
L3 ITS 1 completa      1 TGAACCTGCG GAAGGATCAT TAAAGAGTTA GGGTCTCTCC AGGCCCGACC
gi|336088199|Phialophora_verru TGAACCTGCG GAAGGATCAT TAAAGAGTTA GGGTCTCTCC AGGCCCGACC
gi|944930|Phialophora_american TGAACCTGCG GAAGGATCAT TAAAGAGTTA GGGTCTCTCC AGGCCCGACC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      60      70      80      90     100
L3 ITS 1 completa      TCCCAACCCT TTGTTTACTT TGCTGCATGT TGCTTTGGCG GACGAAATCT
gi|336088199|Phialophora_verru TCCCAACCCT TTGTTTACTT TGCTGCATGT TGCTTTGGCG GACCCG-TCC
gi|944930|Phialophora_american TCCCAACCCT TTGTTTACTT TGCTGCATGT TGCTTTGGCG GACCCG-TCT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      110     120     130     140     150
L3 ITS 1 completa      CACGACCGCC CTGGGACCGC CGAGAGGTGC CCCTGGGCCC GTGTCCGCCG
gi|336088199|Phialophora_verru CACGACCGCC CTGGGACCGC CGAGAGGTGC CCCTGGGCCC GTGTCCGCCG
gi|944930|Phialophora_american CACGACCGCC CTGGGACCGC CGAGAGGTGC CCCTGGGCCC GTGTCCGCCG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      160     170     180     190     200
L3 ITS 1 completa      ATAGCCAACC TAAACTCTTG AATGAATCGT GTTTT-ATGT CTGAGTCTAT
gi|336088199|Phialophora_verru ATAGCCAACC TAAACTCTTG AATGAATCGT GTTTT-ATGT CTGAGTCTAT
gi|944930|Phialophora_american ATAGCCAACC TAAACTCTTG AATGAATCGT GTTTT-ATGT CTGAGTCTAT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      210     220     230     240     250
L3 ITS 1 completa      TGATTAATC AAAAGCAAAA ACTTTCAACA ACGGATCTCT TGGTTCGGC
gi|336088199|Phialophora_verru TGATTAATC AAAAGCAAAA ACTTTCAACA ACGGATCTCT TGGTTCGGC
gi|944930|Phialophora_american TGATTAATC AAAAGCAAAA ACTTTCAACA ACGGATCTCT TGGTTCGGC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      260     270     280     290     300
L3 ITS 1 completa      ATCGATGAAG AACGCAGCGA AATGCGATAA GTAATGCGAA TTGCAGAATT
gi|336088199|Phialophora_verru ATCGATGAAG AACGCAGCGA AATGCGATAA GTAATGCGAA TTGCAGAATT
gi|944930|Phialophora_american ATCGATGAAG AACGCAGCGA AATGCGATAA GTAATGCGAA TTGCAGAATT

      ....|....| 2....|...
      310
L3 ITS 1 completa      CCGGTGAACC ATCGAGTC
gi|336088199|Phialophora_verru CCGGTGAGTC ATCGAATC
gi|944930|Phialophora_american CCGGTGAGTC ATCGAATC

```

FIGURA 35 – REGIÃO DO ITS1 AMPLIFICADA PARA O ISOLADO DE L3 E DUAS SEQUÊNCIAS DE *Phialophora* spp. 1= INDICA O LOCUS DO PRIMER ITS1.1 E 2 INDICA O LOCUS DO PRIMER ITS2.1.
FONTE: O AUTOR (2015).

5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

De modo geral a identificação de cada amostra teve um nível de dificuldade e peculiaridade diferente, principalmente no tocante aos bancos de dados existentes e da espécie em questão.

As chaves de identificação anatômica de amostras serviram como bons direcionadores da identificação, em contra partida não permitiram a identificação em nível de espécie em nenhum dos casos. A identificação mais precisa pelas metodologias tradicionais foi a realizada para a amostra U1, classificando-a em um leque de três *taxa* do gênero *Cedrela*. No outro extremo a aplicação da metodologia dos marcadores biomoleculares para a amostra U1 teve um dos piores resultados, não amplificando a região do ITS para essa amostra devido o elevado grau de biodegradação da amostra. Situações com essas indicam que não existe melhor ou pior ferramenta para a identificação de amostras de madeira, mas sim que todas as técnicas têm suas potencialidades e desvantagens e por isso o uso de diferentes metodologias é importante para assegurar a correta identificação.

A identificação das espécies é uma tarefa complexa e com muitas peculiaridades, mas acima de tudo é uma atividade multi e interdisciplinar, que precisa de um leque de conhecimentos em taxonomia, geografia, anatomia da madeira, biologia molecular, entre outras, que acabam sendo necessários para o sucesso na identificação de madeiras.

Existe na literatura um grande otimismo e estímulo ao desenvolvimento de metodologias de identificação de madeiras baseadas em marcadores de DNA. Na maioria desses trabalhos as sequências utilizadas na geração dos bancos de dados foram amplificadas de isolados obtidos de folhas ou outros tecidos vegetais frescos.

Nesse trabalho mostrou-se que de oito amostras apreendidas pela polícia apenas cinco tiveram algum fragmento da região do ITS devidamente sequenciado, e apenas quatro tiveram essa região completamente sequenciada, isso devido à problemática de se usar madeira como fonte de DNA. As três amostras que não puderam ser identificadas apresentavam claros sinais de biodegradação por fungos.

Para as amostras devidamente sequenciadas não houve, em nenhum dos casos, a coincidência exata da sequência obtida com alguma sequência já disponível no banco de dados GENBANK, de modo que as sequências exerceram um papel mais de confirmação da identificação previamente realizada pela anatomia da madeira do que de identificação propriamente dita. Comprovada a possibilidade de aplicação da região do ITS como ferramenta de identificação de madeiras, a necessidade atual é a de construção de bancos de dados que permitam uma maior resolução para a identificação de nossas espécies nativas.

Para trabalhos futuros, seria interessante a abordagem da caracterização e estudo das variações na estrutura do espaçador interno transcrito do rDNA das espécies brasileiras com potencial madeireiro ameaçadas de extinção. Um trabalho dessa natureza poderia facilitar muito a rotina de perícia e investigação das autoridades policiais, que na maioria dos casos, como mostrado aqui, simplesmente precisam incluir em seus inquéritos, se uma espécie ameaçada de extinção foi abatida ilegalmente, ou não.

Para as espécies de Lauraceae e Sapotaceae percebeu-se uma latente demanda por informações da anatomia da madeira das espécies existentes no Paraná e do conhecimento da região do ITS para um maior número de espécies e espécimes, o mesmo se aplica para a família Rhamnaceae.

Contudo todas essas limitações são momentâneas e com o avanço das pesquisas essas dificuldades virão a ser sanadas.

Uma recomendação para trabalhos futuros de identificação de indivíduos desses *taxa* seria aplicação de um número maior de regiões de *DNA-barcode*, tais como os marcadores no cpDNA tais como: *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*. Essas regiões podem levar muito provavelmente a bancos de dados maiores.

As conclusões atingidas com esse trabalho foram:

- As amostras apreendidas pela polícia correspondiam a *taxa* das famílias, Meliaceae, Burseraceae, Rhamnaceae, Lauraceae e Sapotaceae.
- A aplicação de chaves anatômicas e conhecimentos da anatomia da madeira permitiu a identificação das amostras.
- Foi possível isolar DNA a partir de amostras de madeira de apreensão, apesar de algumas apresentarem certo grau de deterioração.
- Foi possível a obtenção de sequências para a região completa do ITS do rDNA de 4 das amostras e da região do ITS1 para uma delas.
- GENBANK mostrou-se uma possível fonte de sequências da região do ITS para madeiras.
- Anatomia da madeira e os marcadores de *DNA-barcode* devem ser vistas como metodologias complementares e não antagônicas.

REFERÊNCIAS

- ABE, H.; WATANABE, U.; YOSHIDA, K.; KURODA, K.; ZHANG, C. Changes in organelle and DNA quality, quantity, and distribution in the wood of *Cryptomeria japonica* over long-term storage. **IAWA Journal**, v.32, n.2, p. 263-272, 2011.
- ABRAF. **Anuário estatístico ABRAF 2013 ano base 2012**. ABRAF. – Brasília: 2013
- AKELLA, S.; CANNON J., Strengthening the Weakest Link—**Strategies for Improving the Enforcement of Environmental Laws Globally**. Center for Conservation and Government at Conservation International, Arlington, VA, 2004.
- ALDEN, H. A. **Scientific limits of microscopic wood analysis of objects d’art**, 26th AIC Annual Meeting, Poster Session, 1-7 Junho, Arlington, VA, 1998.
- ALMEIDA, E. B. **Diversidade de Manilkara Adans. (Sapotaceae) para o Nordeste do Brasil**. Tese (Doutorado em Botânica). Departamento de Biologia. Universidade Federal Rural do Pernambuco, Recife, 2010. 157p.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v.215, n.3, 403-410, 1990.
- AMICUCCI, A.; GUIDI, C.; ZAMBONELLI, A.; POTENZA, L.; STOCCHI, V. Molecular approaches for the detection of truffle species in processed food products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Nova York, v.82, p1391-1397, 2002.
- ANDERBERG, A. A.; SWENSON, U. Evolutionary lineages in Sapotaceae (Ericales): a cladistic analysis based on ndhF sequence data. **International Journal of Plant Science**. V. 164, p.763-773, 2003.
- AZEREDO, A. M. L. O código de barras da vida baseado no DNA “Barcoding of Life”: Considerações e perspectivas. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**, 2005. Disponível em: <http://goo.gl/I3ZXHf> . Acesso em: 22 ago. 2014.
- BALDWIN BG, SANDERSON MJ, PORTER JM, WOJCIECHOWSKI MF, CAMPBELL CS, DONOGHUE MJ The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v82, p 247–277, 1995.
- BATTEN, G. D. Plant analysis using near infrared reflectance spectroscopy: the potential and the limitations. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 38, p. 697-706, 1998.
- BEHNKE A, FRIEDL T, CHEPURNOV VA, and MANN DG. 2004. Reproductive compatibility and rDNA sequence analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). **Journal of Phycology**, v.40, p.193–208, 2004.

BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; WHEELER, D. L. GenBank, **Nucleic Acids Research**, v.33, p.33-38, 2005.

BILGIN, D.D.; de LUCIA, E. H.; CLOUGH, S. J. A robust plant RNA isolation method suitable for Affymetrix GeneChip analysis and quantitative real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, v.4, p.333–340, 2009.

BLACHETTE, R. A.; HELD, B. W.; JURGENS, J. A.; MCNEW, D. L.; HARRINGTON, T. C.; DUNCAN, S. M.; FARREL, R. L. Wood-destroying soft rot fungi in the historic expedition huts of Antarctica. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n. 3, p.1328-1335, 2004.

BOLSON, M. Aplicação de DNA *Barcoding* em espécies vegetais arbóreas da Floresta Ombrófila Mista. Dissertação (Mestrado), Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, 2012, 144p.

BORNEMAN J., HARTIN J. R., PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.10, p. 4356–4360, 2000.

BRAGA, J. W. B.; PASTORE T. C. M.; CORADIN, V. T. R; CAMARGOS, J. A. A.; SILVA, A. R. The use of near infrared spectroscopy to identify solid wood specimens of *Swietenia macrophylla* (Cites Appendix II). **IAWA Journal**, v.32, n.2, p285-297, 2011.

BRASIL. Casa Civil. Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 13 fev. 1998. v. 136, nº 31 Seção 1, p. 25-29.

BRASIL. Lei nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006. Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, e dá outras providências. **Diário Oficial da [República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, V. 143, n. 246, 26 dez. 2006. Seção I, p 1-4. .

BRASILa. Decreto nº 6660 de 21 de novembro de 2008 Regulamenta dispositivos da Lei nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006, que dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, **Diário Oficial da [República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, V. 145, n 228, 24 nov. 2008. Seção I, p. 1-5.

BRASILb. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Instrução Normativa nº 6, de 23 de setembro de 2008. Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, v. 145, n. 185, 24 set. 2008. Seção 1, p. 75-83.

BRAZIER, J.D. Observations on the some anatomical features used in identification and taxonomy. **Leiden Botanical Series** v3: p102-106, 1976.

BROTTO, M. L.; SANTOS, E. P.; BAITELLO, J. B. Lauraceae no morro dos perdidos (Floresta Atlântica), Paraná, Brasil, **Rodriguésia**, v. 60, n. 2, p. 445-459, 2009.

BROTTO, M. L.; CERVI, A. C.; SANTOS, E. P. O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná, Brasil, **Rodriguésia**, v 64, n.3, p. 495-525, 2013.

BUCKLER IV, E. S.; IPPOLITO, A.; HOLTSFORD, T.P. The evolution of ribosomal DNA divergent paralogues and phylogenetic implications. **Genetics**, v.145, n.3, p.821-832, 1997.

CARVALHO, P. E. R. **Ecologia, silvicultura e usos da uva-do-japão (*Hovenia dulcis* Thunberg)**. Colombo: Embrapa CNPF-Florestas, 1994, 24p.

CASTELLANI, D. C.; CASALI, V. W. D.; SOUZA, A. L.; CECON, P. R.; CARDOSO, C. A.; MARQUES, V. B: Produção de óleo essencial em canela (*Ocotea odorifera* Vell.) e guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) em função da época de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.4, p.104-107, 2006.

CBOL PLANT WORKING GROUP. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, n. 31, p. 12794-12797, 2009.

CERVI, A. C.; von LINSINGEN, L.; PATRÍCIO, P. C. O gênero *Cedrela* P. Browne (Meliaceae) no sul do Brasil. **Acta Biológica do Paraná**, v.37, n.1, p.105-110, 2008.

CHEN S, YAO H, HAN J, LIU C, SONG J, et al., Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. **Plos One**, v.5, n.1, p. 1-8. 2010.

CHINA PLANT BOL GROUP. Coparative analysis of large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. **Procedings of National Academy of Sciences**, v.108, p.19641–19646, 2011.

CITES - Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora - **Appendices I, II and III**, Geneva, Switzerland. 2014. Disponível on-line em: <http://goo.gl/qq48ft>. Acesso em: 01 out. 2014

COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Trends in Genetics**, v.19, n.7, p370-375, 2003.

COSTA, A. **Anatomia da madeira em Sapotaceae**. Tese (Doutorado) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Biologia, 2006, 200p.

COSTA, M. R.; MOURA, E. F. **Manual de Extração de DNA**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001, 24p.

CURY, G. **Descrição da estrutura anatômica do lenho e sua aplicação na identificação de espécies arbóreas do Cerrado e da Mata Atlântica do Estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado). ESALQ-USP. Piracicaba, SP, 2002. 125p.

DALY, D.C. *Burseraceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 02 Jan. 2015.

DEAM W., **A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira**. Companhia das Letras, São Paulo, 1996.

DEMEKE, T.; JENKINS, R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits, **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p.1977-1990, 2010.

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

DUJARDIN, EP. **Eine neue Holz-Zellulosenfaerbung**. Mikrokosmos, n.53, p.94, 1964.

DUMOLIN_LAPÈGUE, S.; PEMONGE, M. H.; GIELLY, L.; TABERLET, P.; PETIT, R. J. Amplification of oak DNA from ancient and modern wood. **Molecular Ecology**, v.8, n. 12, p. 2137–2140, 1999.

EGLINTON, G.; LOGAN, G. A. Molecular preservation. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v.333, p.315–327, 1991.

FERREIRA, G. C. E M. J. G. HOPKINS, 2004. **Manual de identificação botânica e anatômica – Angelim**: 1-101. Embrapa Amazônia Oriental, Belém.

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

FINNEY, M.; NISSON, P.E.; RASHTCHIAN, A. Molecular cloning of PCR products. **Current Protocols in Molecular Biology**, cap. 15, u. 15.4, 2001.

FORD S. C. et al., Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 159, p.1–11, 2009.

FORD S. C.; AYRES, K. L.; TOOMEY, N.; HAIDER, N.; STAHL, J. A.; KELLY, L. J.; WIKSTRÖM, N.; HOLLINGSWORTH, P. M.; DUFF J. R.; 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.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. **Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese**. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. **Status do hotspot Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica; Belo Horizonte: Conservação Internacional, 200 **Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy** 5. Cap. 1, p.3-11.

GALLAGHER, S. R. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. **Current Protocols in Neuroscience**, A.1.K1, 2011.

GAO, T.; YAO, H.; SONG, J.; LIU, C.; ZHU, Y.; MA, X.; PANG, X.; XU, H. ; CHEN, S. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. **Journal of Ethnopharmacology**, v.130, n.1, p.116-121, 2010.

GASSON, P., How precise can wood identification be? Wood Anatomy's Role in Support of the Legal Timber Trade, Especially CITES. **IAWA Journal**, v. 32, e. 2, 2011, p137-154.

GASSON, P.; MILLER, R.; STEKEL, J. D.; WHINDER, F. ZIEMINSKA, K.. Wood identification of *Dalbergia nigra* (CITES Appendix I) using quantitative wood anatomy, principal components analysis and naïve Bayes classification, in **Annals of Botany**, v105, p45-56, 2010

GERNANDT, D.S.; LISTON, A.; PINERO, D. Variation in the nrDNA ITS of *Pinus* subsection *Cembroides*: Implications for molecular systematic studies of pine species complexes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 21, p. 449–467, 2001.

GOMES, A. V.; MARCHIORI, J. N. C.; TEIXEIRA, L. L.; SCHAITZA, E. G.; STOFELLA, D. R. E. Anatomia da Madeira de *Citharexylum solanaceum* Chamó (Verbenaceae), **Balduinia**, n.12, p.13-25, 2008.

GOMES, A. V.; TEIXEIRA, L. L.; SCHAITZA, E. G.; HOFMEISTER, R. M. Perforation plates in vessels of *Citharexylum myrianthum* Chamó (Verbenaceae). **IAWA Bulletin**, v. 10, n. 1, p.27-34, 1989.

GONÇALVES M.P., PANJER M., GREENBERG T.S., MARGRATH W.B., **Justice for Forests – Improving Criminal Justice Efforts**, World Bank Study, 2012. Disponível on-line em: <http://goo.gl/Aq0Z7h>. Acesso: 28 set. 2014.

GREENPEACE – **The Amazon's silent crisis**, São Paulo, Brasil, set. 2014. Disponível em: <http://goo.gl/8UFVze>, Acesso em: 01 out. 2014.

GUPTA, S.; SAXENA, V. Wood microstructure of ligneous species of Rhamnaceae from India. **Jornal of Tropical Forest Science**, v. 23, n.3, p.239-251, 2011.

HANSEN, F. WISCHNEWSKI, N. MORETH, U. MAGEL, A:E. Molecular Identification of *Fitzroya cupressoides*, *Sequoia sempervirens*, and *Thuja plicata* wood using Taxon-Specific rDNA-ITS primers. **IAWA Jornal**, v.32 n.2, p. 273-284, 2011.

HATSCHBACH, G. G.; ZILLER S.R. **Lista Vermelha de Plantas Ameaçadas de Extinção no Estado do Paraná**. Curitiba: SEMA/GTZ, 1995. 139 p.

HAUER, M. As Florestas no Paraná: um Processo de Involução. In. **Reforma Agrária e Meio Ambiente: teoria e prática no estado do Paraná**./ Claudia Sonda (Org.), Silvia Cristina Trauczynski (Org.). Curitiba: ITCG, 2010.

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

HERSHKOVITZ, M. A.; ZIMMER, E. A.; HAHN, W. J. Ribossomal DNA sequences and angiosperm systematics. In: HOLLINGSWORTH, M. P.; BATEMAN, R. M.; GORNALL, R. J. **Molecular Sytematics and Plant Evolution**. CRC Press, p.268-326, 1999.

HILLIS, D. M.; DIXON, M.T. Ribossomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, v. 66, p. 411-453, 1991.

HILLIS, D., M.; DAVIS, S. K.; Evolution of ribossomal DNA: Fifty Million Years of Recorded History in the frog genus *Rana*. **Evolution**, v. 40, n.6, p.1275-1288, 1986.

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

IAWA - INTERNATIONAL ASSOCIATION OF WOOD ANATOMISTS. IAWA List of microscopic features for hardwood identification. **IAWA Bulletin** n.s. 10 (3): 219-332, 1989.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Manual técnico da vegetação brasileira. **Séries Manuais técnicos em geociências**, 1, Rio de Janeiro, 1992. 92p.

IBGE. **Mapa de Vegetação do Brasil**. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1993.

INSIDEWOOD. **InsideWood - a web resource for hardwood anatomy**, 2004 Disponível em: <<http://insidewood.lib.ncsu.edu/search>> Acesso: 03/09/2014

IPARDESa- **Estado do Paraná – Cobertura Vegetal Nativa**. Curitiba, 2012. Escala 1: 2.500.000. Disponível on-line em: <http://goo.gl/R4e01f>. Acesso: 05 out 2014.

IPARDESa- **Estado do Paraná – Cobertura Vegetal Remanescente 2012**. Curitiba, 2012. Escala 1: 2.500.000. Disponível on-line em: <http://goo.gl/N0SN50>. Acesso: 05 out 2014.

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

JOHNSON, A.; LAESTADIUS, L. New laws, new needs: The role of wood science in global policy efforts to reduce illegal logging and associated trade. **IAWA Journal**, v.32, n. 2, p125–136, 2011.

JOHNSON, M. T. J.; CARPENTER, E. J.; TIAN, Z. ; BRUSKIEWICH, R.; BURRIS, J. N. *et al.* Evaluating Methods for Isolating Total RNA and Predicting the Success of Sequencing Phylogenetically Diverse Plant Transcriptomes. **PLOS-ONE**, v.7, n.11, 2012.

KOCH, G.; RICHTER, H. J.; SCHMITT, U. Design and application of CITESwoodID-Computer-aided Identification and description of CITES-protected timbers. **IAWA Journal**. v. 32, n. 2, p213-220, 2011.

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.

KUKACHKA, B. F. **Wood Anatomy of the neotropical Sapotaceae, VII Chrysophyllum**. Research Paper FPL 331. Forest Product Laboratory, Madison, Wisconsin, 1978.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.;MCWILLIAN, H.; VALENTIN, F; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R. THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v.23, p2947-2948, 2007.

LAWSON S., MACFAUL L, **Illegal Logging and Related Trade. Indicators of the Global Response, Chatham House** (The Royal Institute of International Affairs) Londres, 2010, 132 p

LI R, BUONGIORNO J., TURNER J.A., ZHU S., PRESTENON J. , Long-term effects of eliminating illegal logging on the world forest industries, trade and inventory, **Forest Policy Economics**.v.10, p.480–490., 2008.

LIMA, R. E. M. **Dispersão de sementes de Hovenia dulcis Thunb. (Rhamnaceae) – uma espécie invasora em área de Floresta Estacional Decidual**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ecologia, UFSC, Florianópolis, SC, 2014, 79p.

LIMA, R.B. 2010. Rhamnaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>> Acesso em jan 2015.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v. 362, p.709-715, 1993.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo da plantas arbóreas nativas do Brasil**, v.3.,3ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2009.

LOWE, A. J.; CROSS, H. B. The application of DNA methods to timber tracking and origin verification. **IAWA Journal**. v. 32, n. 2, p251-262, 2011.

MAGEL, E. Physiology of cambial growth, storage of reserves and heartwood formation. In. HUTTUNEN, S.; BUCHER, J.; SUNDBERG, B.; JARVIS, P.; MATYSSEK, R. (ed). **Tree Physiology, Trends in European Forest Tree Physiology Research**. Springer Science + Business Media B. V., 2001, 259p.

MAGEL, E.; MORETH, U.; VAY, O.; VOSS, M.M.; WISCHNEWSKI, N. **Use of DNA-markers for rapid identification of CITES-listed timber species**, Resumo em Anal de Congresso, IAWS/IAWA/IUFRO Conference, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, EUA, Junho 2010.

MATTOS, P. P.; SANTOS, A. T.; OLIVEIRA, Y. M. M.; ROSOT, M. A. D. Dendrocronologia de espécies da Floresta Ombrófila Mista do Município de Candiói PR. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n.54, 2007.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. Oxford Clarendon Press, 1972, 1500p.

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

MEYLAN, B. A.; BUTTERFIELD, B. A. Scalariform perforation plates: observations using scanning electron microscopy. **Wood and Fiber**, n.4, p.225-233, 1972.

MOLDENKE, H. N. Materials towards a monograph of the genus *Citharexylum* I, **Phytologia**, v. 6, p.242-256, 1958.

MUÑIZ, G. I. B.; MAGALHÃES, W. L. E.; CARNEIRO, M. E.; VIANA, L. C. Fundamentos e estados de arte da espectroscopia no infravermelho próximo no setor de base florestal. **Ciência Florestal**, v.22, n.4, p.865-875, 2012.

NAHUZ, M. A. R., MIRANDA, M. J. A. C., LELO, P. K. Y., PIGOZZO, R: J: B., YOJO, T. **Catálogo de madeiras brasileiras para a construção civil** / [coordenação Augusto Rabelo Nahuz].--São Paulo : IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, 2013.

NANODROP. Technical Support Bulletin T009 260/280 and 260/230 **Ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers**. Nano drop technologies, Inc, Wilmington, Delaware, Estado Unidos da America, 2007.

NELLEMANN, C., INTERPOL Environmental Crime Programme (eds). 2012. **Green Carbon, Black Trade: Illegal Logging, Tax Fraud and Laundering in the Worlds Tropical Forests. A Rapid Response Assessment**. United Nations Environment Programme, GRIDA rendal. www.grida.no

NYBOM, H.; WEISING, K.; ROTTER, B. DNA fingerprinting in botany: past, present, future. **Investigative Genetics**, v.5, n.1, 2014.

OLALE, K. ; YENESEW, A.; JAMANADASS, R.; SILA, A.; AYNEKULU, E.; KUYAH, S.; SHEPHERD, K. Limitations to use infrared spectroscopy for rapid determination of Carbon-Nitrogen and wood density for tropical species. **Advances in Analytical Chemistry**, v. 3, n.3, p. 21-28, 2013.

PÄÄBO, S.; POINAR, H.; SERRE, D.; JAENICKE-DESPRÉS, V.; HEBLER, J.; ROHLAND, N.; KUCH, M.; KRAUSE, J.; VIGILANT, L.; HOFREITER, M. Genetic Analyses from Ancient DNA. **Annual Reviews of Genetics**, v.38, p.645-679, 2004.

PARANÁ-INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ –: **Lista oficial de espécies da flora ameaçadas de extinção no Paraná**. Procedimento Operacional Padrão - POP 005- de 20 de junho de 2008. Disponível em: <http://goo.gl/BkVUMy>. Acesso em: 10 out 2014.

PASTORE T. C. M. , BRAGA J. W. B. , CORADIN V. T. R. , MAGALHÃES W. L. E., OKINO E. Y. A. , CAMARGOS J. A. A. , DE MUÑIZ G. I. B. , BRESSAN A. O. , DAVRIEUX. - Near infrared spectroscopy (NIRS) as a potential tool for monitoring trade of similar woods: Discrimination of true mahogany, cedar, andiroba, and curupixá. **Holzforschung**, v 65, 73-80, 2011.

PENNEL, R. L.; LAMB, C. Programmed cell death in plants, **Plant Cell**, v.9, p. 1157-1168, 1997.

PENNINGTON, T. D. **Flora Neotropica, Monograph 52, Sapotaceae**. NYBG Press, Nova York, 1990, 770p.

PENNINGTON, T. D. **The genera of Sapotaceae**. Royal Botanical Garden, Kew, London, 1991, 225p.

PICO de COAÑA, Y.; PARODY, N.; FERNANDES-CALDAS, E.; ALONSO, C. A modified protocol for RNA isolation from high polysaccharide containing *Cupressus arizonica* pollen. Applications for RT-PCR and phage display library construction. **Molecular Biotechnology**, v.44, p.127–132, 2010.

PINTO, S. P.; MELO, M. G. G.; MENDES, A. M. S. Morfologia comparativa de propágulos de *Chrysophyllum amazonicum* T. D. Penn. E *Chrysophyllum prieurii* A.D. Candolle. **Revista Brasileira de Sementes**, v.34, n. 2, 2012.

QIAGEN S.A. **DNeasy® mericon™ Food Handbook**. For extraction of total nucleic acids from a range of food sample types. Hilden, Alemanha, 32p. 2010.

QUINET, A.; BAITELLO, J.B.; MORAES, P. L. R; ASSIS, L.; ALVES , F.M. *Lauraceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8419>>. Acesso em: 02 Jan. 2015

RACHMAYANTI, Y.; LEINEMANN, L.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. DNA from processed and unprocessed wood: Factors influencing the isolation success. **Forensic Science International: Genetics**, v.3, p. 185-192, 2009.

RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; KELLOGG, E. A.; BREMER, B. Recent origin and phylogenetic utility of divergent ITS putative pseudogenes: a case study from *Naucleaeae* (Rubiaceae). **Systematic Biology**, v. 53, p.177–192, 2004.

RECORD, S. J, HESS, R. W. **Timbers of the New World**. New Haven: Yale University Press, 1949. 640 p.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J. E 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.

RIVERS, S.;UMNEY, N. **Conservation of Furniture**. Elsevier Linacre House, Jordan Hill, Oxford OX2 8DP, 2003. 845p.

RUSCHEL, A.R.; NODARI, E.S.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Evolução do uso e valorização das espécies madeiráveis da Floresta Estacional Decidual do Alto Uruguai, SC. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.13, n.1, p.153-166, 2003

SANDAK, A.; SANDAK, J.; NEGRI, M. Relationship between near-infrared (NIR) spectra and geographic provenance of timber **Wood Science and Technology** v.45, n.1, p.35-48, 2011.

SANTOS, R. S. **Estudo anatômico do lenho e descrição morfológica de cinco espécies sul-rio-grandenses da família Rhamnaceae**. Dissertação (Mestrado), Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008, 121p.

SARMIENTO, C.; DÉTTIENE P.; HEINZ, C., MOLINO, F.; GRARD, P.; BONNET, P. PI@ntWood: a computer-assisted identification tool for 110 species of amazons trees based on wood anatomical features. **IAWA Journal**, v. 32, n2, p.221-232, 2011.

SCHEER, M.B.; BLUM, C.T. Arboreal diversity of the Atlantic Forest of Southern Brazil: from the beach ridges to the Paraná river. In: GRILLO, O.; VENORA, G. (eds.). **The dynamical processes of biodiversity – Case studies of evolution and spatial distribution**. InTech. p.109-134, 2011.

SCHMIDT, O. **Wood and Tree Fungi: Biology, Damage, Protection, and Use**. Springer Verlag Belin Heidelberg, 2006, 334p.

SCHMIDT O., MORETH U., Data bank of rDNA-ITS sequences from building-rot fungi for their identification. **Wood Science and Technology**, v.36, p.429–433, 2002.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGEA, J. L.; LEVESQUE, CHEN, W.; FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.109,n.16,p.6241-6246, 2012.

SCHWANNINGER, M. ; RODRIGUES, J. C.; FACKLER, K.; A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v.19, p.287-308, 2011.

SILVA, M.; MEDEIROS, J. D. Anatomia da madeira de canela-preta: *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Insula**, n.29, p.67-87, 2000.

SILVA, MARCIO. Anatomia da madeira de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae). Dissertação (Mestrado). Biologia Vegetal, UFSC, Florianópolis, SC, 2003. 77p.

SINGH, P.; ANDOLA, H. C.; RAWAT, M. S. M.; PANT, G. J. N.; PUROHIT, V. K. Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy in an-overview. **Research Journal of Medical Plant**, v.5, n. 2, p.127-135, 2011.

SIQUEIRA, J. B. G. **Contribuição ao estudo fitoquímico do gênero *Protium* *P. tenuifolium* (Engl.) Engl. e *P. laxiflorum* Engl. (Burseraceae)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1991.

SKYBA, O.; DOUGLAS, C. J.; MANSFIELD, S. D. Syringil-Rich lignin renders poplars more resistant to degradation by wood decay fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.8, p.2560-2571, 2013.

SOS Mata Atlântica e INPE – Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica – Período 2012-2013** – Relatório Técnico – São Paulo, 2014, 61p.

SOS MATA ATLÂNTICA. **Relatório Anual 2013**. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, 2013, 66p.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

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.

SWESON, U.; RICHARDSON, J. E.; BARTISH, I. V. Multi-gene phylogeny of the pantropical subfamily Chrysophylloideae (Sapotaceae): evidence of generic polyphyly and extensive morphological homoplasy. **Cladistics**, v.24, n.6, p.1006-1031, 2008.

TABARELLI M., PINTO P. L.; SILVA C. M. J., HIROTA M. M.; BEDÊ C. L., Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira, **Megadiversidade**, v.1,n.1, 2005.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON; N.; STECHER, G.; MASATOSHI, N.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n.10, p. 2731-2739, 2011.

TARNOWSKI, C. G. **Desenvolvimento e Caracterização de Marcadores Microssatélites (SSRs) para Cedrela lilloi C. de CANDOLLE**, Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2010. 70p.

TNAH, L. H.; LEE, S. L.; NG, K. K. S; BHASSU, S.; OTHMAN, R. Y. DNA extraction from dry wood of *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae) for forensic DNA profiling and timber tracking. **Wood Science and Technology**, v.46, p.813-825. 2012.

TRAMONTINA S. A. – **Mini Ralador Curvo**. 2014, 1 fotografia, color. Disponível on-line em: <http://goo.gl/6Z7vAB>. Acesso: 02 agosto 2014.

van den BERG, C. Banco de DNA de Plantas: notas técnicas. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**, 2005. Disponível em: <http://goo.gl/w1stEZ>. Acesso em 22 agosto. 2010.

VAN DER WERFF, H. A key to the genera of Lauraceae in the new world. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 78, p. 377-387, 1991

VIDAL, M. A. S., **Análise biométrica da regeneração natural de algumas espécies em uma Floresta Estacional Semidecidual localizada no Município de Cássia-MG**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

VIEIRA, C. M., BRITO E. O., GONÇALVES, F.G. **Evolução Econômica do Painei Compensado no Brasil e no Mundo**. *Floresta e Ambiente* 2012 jul./set.; 19(3):277-285

WENDEL, J. F.;SCHNABEL A.; SEELANAN, T. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v.92, p.280–284, 1995.

WHEELER, E. A.; BAAS, P. Wood Identification – A Review. **IAWA Journal**, v. 19, e. 3, 1998: 241-264.

WHEELER, E.A. InsideWood - a web resource for hardwood anatomy. **IAWA Journal**, v.32, n. 2: 199-211, 2011.

WHITE, T. I.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR protocols: A guide to methods and applications**. Academic Press, San Diego, 1990.

WICKE, S.; COSTA, A.; MUÑOS, J.; QUANDT, D. Restless 5S: The re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. v.61, p.321-332, 2011.

WILFINGER, W. W.; MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH anionic strength on the spectro-photometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, v.22, p.474–481, 1997.

WWF, **Illegal logging and the EU – An analysis of the EU export and import market of illegal wood and related products**. WWF, Frankfurt, Alemanha, 2008, 29p.

YOSHIDA, K.; KAGAWA, A.; NISHIGUCHI, M. Extraction and detection of DNA from wood for species identification. Em: **Proceeding of the international symposium on development of improved methods to identify Shorea species wood and its origin**. Forestry and Forest Products Research Institute, Ibaraki, Japão, p. 27–34, 2007.

ZAHNEN, J., **Foreword from WWF-Germany**. In: **Proceedings of the international workshop “Fingerprinting methods for the identification of timber origins”** October 8–9 2007, Bonn/Germany (Ed. BERND DEGEN). Landbauforschung, vTI Agriculture and Forestry Research, Alemanha., 2008. .

ZANON, M. M. F.; GOLDENBERG, R.; MORAES, P. L. R. O gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb. (LAURACEAE) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 23, n.1, p. 22-35, 2009.

ZENID, G.J.; CECCANTINI, G.C.T. **Identificação Macroscópica de Madeiras**. Laboratório de Madeira e Produtos Derivados; Centro de Tecnologia de Recursos Florestais; Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo – IPT; 2007.

ZHANG, R.; XU, K.; YE, K. Concentration and distribution of nuclei and plastids in xylem cells in *Cunninghamia lanceolata* and *Aquilaria sinensis*. *Bioresources*, v.10,n.1, p.1304-1317, 2015.

ZHANG, W.; QU, L.; GU, H.; GAO, W.; LIU, M.; CHEN, J.; CHEN, Z. Studies on the origin and evolution of tetraploid wheats based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, v.104, p.1099–1106, 2002.